
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QFB

SERVICIO SOCIAL
Determinación de la actividad antiinflamatoria de *Stevia viscida*

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

LUIS ALFONSO ALBARRÁN CARCAÑO

Matrícula
2133060707

ASESOR EXTERNO

M. en C. M. CRISTINA FRESÁN OROZCO
Departamento de Sistemas Biológicos
No. Eco. 3829

ASESOR INTERNO

DRA. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS
Departamento de Sistemas Biológicos
No. Eco. 33148

México, CDMX enero del 2020

ÍNDICE

	página
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	4
<i>Stevia viscida</i>	4
Inflamación	5
Macrófagos	7
Desarrollo de macrófagos	7
Macrófagos e inflamación	8
Citocinas proinflamatorias en macrófagos	9
Factor de necrosis tumoral alfa	10
Interleucina- 6	10
Interleucina- 1	11
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	21
Bibliografía	22
RESUMEN	25

INTRODUCCIÓN

La inflamación está asociada a enfermedades inmunes y enfermedades crónicas como diabetes, gota, artritis reumatoide, Alzheimer, accidente cerebrovascular agudo, hipertensión arterial (Arulselvan y otros, 2016) además también está implicada en procesos como cáncer, isquemia y envejecimiento (Azab y otros, 2016). Actualmente, la inflamación se ha convertido en un tema vital para el estudio de la enfermedad humana (Arulselvan y otros, 2016). Durante la respuesta inflamatoria los macrófagos generan citocinas inflamatorias como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ y $IL-6$; quimiocinas como quimiocina CC con ligando 2 y quimiocina CXC con ligando 8 y PGE_2 (Arulselvan y otros, 2016). Aunque actualmente se puede acceder a medicamentos eficaces contra la inflamación, como la aspirina, el celecoxib, el ibuprofeno, el naproxeno y el diclofenaco, todavía es un desafío descubrir agentes menos tóxicos y más efectivos para tratar la variedad de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (Gasparrinia y otros, 2018).

El uso de extractos favorece el efecto terapéutico debido a que producen interacciones entre un grupo de principios activos o por la interacción de los principios activos junto a moléculas aparentemente inactivas (Fernández y otros, 2013). Cuando se usa un extracto, existe una buena posibilidad de sinergia entre los componentes activos que podrían perderse cuando se aísla cada uno de estos componentes. Por el contrario, la mezcla de diferentes compuestos juntos también puede conducir a efectos inhibitorios, es decir, que un componente puede reducir la actividad biológica del otro. La selección de solventes para la extracción de materiales vegetales es uno de los factores más importantes para determinar la actividad potencial del extracto, ya que la polaridad del solvente determina qué compuestos se extraerán y cuáles no (Azab y otros, 2016)

MARCO TEÓRICO

Los medicamentos producidos a partir de plantas medicinales tienen hoy día una gran demanda (Fernández y otros, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el 80% de los habitantes del mundo utilizan la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria de salud y la mayoría de estas terapias requieren el uso de extractos de hierbas y sus componentes activos (Arulselvan y otros, 2016). Por tanto, las plantas medicinales son un recurso natural de gran importancia (Fernández y otros, 2013) para el desarrollo de nuevos medicamentos de fácil acceso y de bajo costo (Recio y otros, 2012).

Con el desarrollo de la botánica, la química, la medicina y la farmacia, los conocimientos acerca de las plantas medicinales se ha sistematizado ocupando un lugar destacado en las farmacopeas (Fernández y otros 2013). Algunos extractos bioactivos, así como sus componentes activos identificados y aislados han demostrado una variedad de propiedades farmacológicas (Arulselvan y otros, 2016) en el uso de terapias para tratar enfermedades crónicas, incluida la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal. (Recio y otros 2012). Sin embargo, también pueden surgir eventos adversos del mal uso de las especies incorrectas de plantas medicinales, así como la dosificación incorrecta e interacciones con otros medicamentos y uso de productos contaminados con sustancias potencialmente peligrosas, como metales tóxicos, microorganismos patógenos y residuos agroquímicos. Por lo tanto es una de las tareas más importantes es identificar los efectos favorables de los adversos y prohibir plantas venenosas o contaminaciones de mezclas de hierbas (Recio y otros, 2012)

Stevia viscida

Actualmente, diversas especies vegetales están siendo utilizadas en la medicina con el fin de determinar las propiedades y efectos terapéuticos (Marín y otros, 2017). Extractos de hojas de las plantas del género *Stevia* pertenecientes a la familia *Astracae* (Marcinek y Krejpcio, 2017) han sido utilizados en la medicina tradicional, debido a que contiene sustancias con propiedades antihiper glucémicas,

antihipertensivas, antioxidantes (Boonkaewwan, 2013) actividades antitumorales, antimicrobianas y antiinflamatorias (Tiancheng y otros, 2014) Los extractos de hojas del género *Stevia* contienen flavonoides, alcaloides, clorofilas, xantofilas, ácidos hidroxicinámicos, oligosacáridos, azúcares libres, aminoácidos, lípidos y oligoelementos, además, glucósidos diterpenoides, incluyendo esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido y dulcósido, así como diterpenos, como estereina AN y 6-O-acetil-austroinulina (Byoung 2013). De los cuáles esteviósido posee actividad antiinflamatoria (Boonkaewwan, 2013).

Diversos estudios han reportado las actividades antiinflamatorias de los compuestos naturales. Donde los extractos bioactivos y sus compuestos han demostrado la capacidad de bloquear algunas vías principales de señalización que tienen el papel principal en la producción de varios mediadores inflamatorios (Arulselvan y otros, 2016).

Inflamación

La inflamación es una respuesta inmunológica y fisiológica común, causada por (Xiang y otros, 2018), microorganismos como bacterias, virus y hongos, que residen en tejidos o en circulación sanguínea (Azab y otros, 2016), otro factor son los agentes mecánicos (Fujiwara y otros, 2005) como lesiones tisulares o daño celular (Xiang y otros, 2018), y respuestas autoinmunes (Fujiwara y otros, 2005).

Tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa están involucradas en la inflamación. El sistema inmune innato es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos invasores que involucra la actividad de varias células, incluidos los macrófagos, los mastocitos y las células dendríticas (Azab y otros, 2016)

El proceso de inflamación se divide inflamación aguda y crónica. La inflamación aguda, dura unos minutos, varias horas o unos pocos días, y sus características principales son la exudación de proteínas fluidas y plasmáticas (edema) y la

emigración de leucocitos, predominantemente neutrófilos (Fujiwara y otros, 2005). Estas reacciones celulares y vasculares están mediadas por factores químicos producidos a partir de células o plasma y son responsables de los síntomas clínicos clásicos de inflamación, como hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de la función. Incluso su respuesta inflamatoria puede ocurrir en cualquier estímulo perjudicial, la característica de este proceso es la reacción del tejido conectivo vascularizado (Arulselvan y otros, 2016).

Por otro lado, la inflamación crónica es de bajo grado y persistente, lo que resulta en respuestas que conducen a la degeneración del tejido (Franceschi y otros, 2015). La inflamación crónica se asocia con la presencia de linfocitos y macrófagos, fibrosis y necrosis tisular (Fujiwara y otros, 2005). El proceso molecular y celular de la inflamación crónica es variado y depende del tipo de células y órganos inflamados (Arulselvan y otros, 2016). Varios estudios han informado que la inflamación crónica es el vínculo principal para la patogénesis de diversas enfermedades, como la artritis, las enfermedades relacionadas con la edad, la aterosclerosis, el cáncer (Gasparrinia y otros, 2018). y es un factor de riesgo altamente significativo tanto para la morbilidad como para la mortalidad en las personas de edad avanzada (Franceschi y otros, 2015).

En la respuesta inflamatoria participan los macrófagos que reconocen patógenos bacterianos a través de receptores del sistema inmunitario innato, como los receptores Toll-like (TLR) que se expresan en macrófagos residentes en el tejido y estimulan la generación de citocinas inflamatorias como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, entre otras. Estas producciones inflamatorias reaccionan en tejidos diana que incluyen vasos sanguíneos locales para estimular la vasodilatación, la extravasación de neutrófilos y la fuga de plasma en el sitio infectado. Luego, los macrófagos y los neutrófilos que residen en los tejidos se encuentran con los patógenos para eliminarlos (Arulselvan y otros, 2016).

Macrófagos

Los macrófagos (M ϕ), son importantes células inmunes innatas, liberan mediadores proinflamatorios, incluidas las citocinas que regulan críticamente el progreso de la inflamación (Li y otros, 2016)

Desarrollo de macrófagos

Las células madre pluripotentes se diferencian en célula linfoide o célula mieloide, esta diferenciación se da dependiendo del tipo y concentración de los factores de crecimiento (FC) presentes en el microambiente. Las células mieloides pasan por un proceso de maduración dando como resultado células progenitoras, en el caso de los monocitos los FC que interfieren en el proceso son IL-3, GM-CSF, M-CSF. Cuando estos factores están presentes la célula progenitora prolifera y se diferencia, dando como resultado promonocitos, células que en ulteriores divisiones generan monocitos. (Echeverri y otros, 2004). Los monocitos ingresan a la sangre periférica y son distribuidos por todo el cuerpo. Cuando el monocito alcanza el tejido extravascular, se transforma en una célula fagocítica más grande, el macrófago (Fujiwara y otros 2005). Esta diferenciación (monocito a macrófago) involucra gran cantidad de cambios: la célula crece de 5 a 10 veces, sus organelos incrementan tanto su número como su complejidad, adquiere habilidad fagocítica, produce altas concentraciones de enzimas líticas y empieza a secretar gran variedad de factores solubles. Los macrófagos son activados por gran variedad de estímulos en el curso de la respuesta inmune, su actividad pueden incrementarse por citocinas secretadas por linfocitos TH y productos bacterianos (Echeverri y otros, 2004).

Los macrófagos se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos y se nombran para designar su ubicación, como las células microgliales en el sistema nervioso central, las células de Kupffer en el hígado, los macrófagos alveolares en el pulmón y los osteoclastos en el hueso (Fujiwara y otros, 2005) Esto destaca que la homeostasis de los macrófagos está regulada diferencialmente de una manera específica de tejido y sugiere que el entorno del tejido puede imponer una identidad distintiva de macrófagos (Gentek y otros, 2014)

Los macrófagos realizan importantes funciones inmunológicas durante la respuesta innata a los patógenos y el inicio de la inflamación, pero también contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, la reparación de los tejidos y la patogénesis del cáncer. A nivel celular, los macrófagos cumplen estas funciones al englobar patógenos o células apoptóticas (Gentek y otros, 2014), juega un papel en la presentación y procesamiento de los antígenos (Echeverri y otros, 2004) y al producir factores tróficos, mediadores inmunológicos y moléculas efectoras. Estas son células móviles y de corta duración que pueden entrar y salir del tejido. Se han clasificado de diversas maneras como células dendríticas derivadas de monocitos, macrófagos o monocitos de patrullaje de tejidos. Estas células pueden aumentar masivamente en condiciones inflamatorias, lo cual es relevante para múltiples situaciones de enfermedad (Gentek y otros, 2014)

Macrófagos e inflamación

En la inflamación, los macrófagos tienen tres funciones principales; presentación de antígenos, fagocitosis e inmunomodulación a través de la producción de diversas citocinas y factores de crecimiento (Fujiwara y otros, 2005)

Los macrófagos, junto con los neutrófilos, son las principales células inmunes, que están asociadas con la progresión de diversas enfermedades inflamatorias, y son activadas por citocinas, mitógenos, radiación, bacterias o lipopolisacáridos (LPS) (Gasparrinia y otros, 2018). El lipopolisacárido (LPS), un componente principal de la membrana celular de bacterias Gram-negativas, es un inductor de inflamación. La activación de los macrófagos por LPS produce el aumento de numerosas citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico (NO) (Xiang y otros, 2018).

El TNF- α juega un papel importante en la inmunidad antibacteriana además el TNF- α es también uno de los mediadores que causan la sobreexpresión de iNOS de manera complementaria. La IL-6, un activador notable de la respuesta inflamatoria aguda, también es estimulada por LPS, TNF- α o IL-1. Producido por iNOS, NO es

un mediador importante y generalizado de señalización celular en procesos inflamatorios. Por lo tanto, estos mediadores proinflamatorios podrían ser dignos biomarcadores en la patogénesis, diagnóstico y pronóstico de la inflamación (Xiang y otros, 2018). Estas citocinas pueden actuar tanto local como sistémicamente; por lo tanto, su producción y secreción deben estar estrictamente reguladas (Yazdi y otros 2016).

Las intervenciones terapéuticas dirigidas a la interrupción de las redes de señalización de citoquinas se han convertido en las principales opciones terapéuticas para la modificación de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, así como el cáncer. La interrupción de las vías de señalización reduce la inflamación y los eventos de activación inmunitaria al limitar la activación celular y la expansión de las células efectoras, limitando así la lesión tisular y la activación inmunitaria crónica. Es importante darse cuenta de que las citocinas desempeñan funciones esenciales en la defensa del huésped y el mantenimiento de la homeostasis del tejido. Sin embargo, la producción anormal o excesiva de citocinas interrumpe estas funciones y produce inflamación y lesiones tisulares. Esto ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas utilizando citocinas reguladoras o, más comúnmente, sustancias químicas dirigidas a citocinas para el tratamiento de diversas enfermedades (Stanley y otros, 2017).

Citocinas proinflamatorias en macrófagos

Numerosos mediadores inflamatorios se sintetizan y secretan durante las respuestas inflamatorias de diferentes tipos. Las sustancias inflamatorias generalmente se dividen en dos categorías principales: mediadores pro y antiinflamatorios. Entre los mediadores inflamatorios y las vías celulares que se han estudiado ampliamente en asociación con afecciones patológicas humanas se encuentran las citocinas (Azab y otros, 2016).

Las citocinas son proteínas pequeñas (15-20 kDa) y de vida corta importantes en la señalización autocrina, paracrina y endocrina. Las citocinas coordinan el desarrollo y la actividad del sistema inmunitario (Rose, 2017). La activación de los macrófagos

por LPS produce el aumento de numerosas citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico (NO) (Xiang y otros, 2018).

Factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una importante citocina proinflamatoria. (Azab y otros, 2016). Es una molécula de comunicación intercelular. El papel central del TNF- α que inicia las reacciones inflamatorias del sistema inmunitario innato. En respuesta a LPS, el TNF- α es producido principalmente por células del linaje de monocitos y neutrófilos (Balkwil, 2006).

TNF α se ha asociado con múltiples estados de enfermedad en humanos, incluidas enfermedades inmunes e inflamatorias, cáncer, trastornos psiquiátricos, entre otros (Azab y otros, 2016). La producción local desregulada de TNF- α es característica de enfermedades como artritis reumatoide. La inhibición de TNF- α ha demostrado ser una estrategia terapéutica eficaz en varias enfermedades inflamatorias (Balkwil, 2006).

Interleucina- 6

La Interleucina-6 (IL-6) es un mediador soluble con un efecto en la inflamación, la respuesta inmune y la hematopoyesis (Tanaka y otros, 2014). La IL-6 es un estimulador importante de las actividades de células B y células T (Stanley y otros, 2017). Tiene la capacidad de inducir la diferenciación de las células B activadas en células productoras de anticuerpos (Tanaka y otros, 2014). La IL-6 es crítica para el mantenimiento de las defensas del huésped, sugieren que una deficiencia resultaría en un deterioro significativo de la función inmune con riesgo de complicaciones infecciosas (Stanley y otros, 2017).

La producción excesiva y no regulada de IL-6 desempeña un papel en la inflamación crónica. Esto ha llevado al desarrollo de otros agentes que interfieren con las interacciones IL-6 con su receptor para el tratamiento de enfermedades. (Stanley y

otros, 2017). Se ha aprobado un anticuerpo monoclonal neutralizador del receptor de IL-6 (IL-6R) para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y se observó el bloqueo de la actividad de IL-6 es eficiente en pacientes con artritis reumatoide (Rose, 2017).

Interleucina- 1

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina proinflamatoria altamente activa que reduce los umbrales de dolor y daña los tejidos. La interleucina-1 es una citocina maestra de inflamación local y sistémica, y la disponibilidad de agentes específicos dirigidos a IL-1 ha revelado el papel patológico de la inflamación mediada por IL-1 en una lista creciente de enfermedades (Dinarello y otros, 2012). Los macrófagos secretan IL-1 (Yazdi y otros 2016).

Debido a su alto poder biológico y eficacia, la transcripción, síntesis y secreción de IL-1 α e IL-1 β están estrictamente reguladas (Yazdi y otros 2016).. La terapia que bloquea la actividad de IL-1 en los síndromes autoinflamatorios da como resultado una reducción rápida y sostenida de la gravedad de la enfermedad, incluida la reversión de la pérdida de visión, audición y función orgánica mediada por la inflamación (Dinarello y otros, 2012).

JUSTIFICACIÓN

La importancia que ha tenido la medicina tradicional y el uso de los recursos naturales, ha llevado a las personas a buscar alternativas terapéuticas, como el uso de plantas medicinales. El químico farmacéutico tiene la obligación de buscar nuevos productos con actividad antiinflamatoria que no generen efectos adversos, siendo el estudio de la medicina tradicional una excelente alternativa en México. Actualmente no existe ningún estudio sobre los efectos terapéuticos del extracto de *Stevia viscida*. El presente proyecto está dirigido al estudio de la actividad antiinflamatoria de *Stevia viscida*, evaluando la inhibición y expresión de genes de las moléculas proinflamatorias liberadas por los macrófagos en el proceso de inflamación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto *Stevia viscida* en la línea celular de macrófagos J774A.1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la viabilidad de células J774A.1 en presencia de *Stevia viscida*.
- Cuantificar los niveles de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α en sobrenadantes de cultivos de células J774A.1.
- Correlacionar la actividad anti-inflamatoria del extracto *Stevia viscida* de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α mediante su expresión génica.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de macrófagos J774A.1

La línea celular de macrófagos J774A.1 que será cultivada y mantenida en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), se incubarán a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂, hasta 90 % confluencia.

Ensayo de actividad citotóxica

La viabilidad celular se evaluó usando un ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se sembraron macrófagos J774A.1 en DMEM enriquecido con suero fetal bovino (10%) en placas de cultivo de 96 pocillos. Cada pozo contenía 1 x10⁴ macrófagos J774A.1. El conteo de células se realizó en la cámara de Neubauer con azul tripano como agente teñidor para el conteo de células viables. Se dejan en incubación por 24 h, esperando que los macrófagos se adhieran y se diferencien en cada pozo. Una vez transcurrida las 24 h los macrófagos se trataron con extracto hexánico de *Stevia viscida* en ensayos individuales usando las concentraciones 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 µg/mL disuelto en buffer fosfato salino (PBS). Después de 24 h de añadir el tratamiento, se añadió 20 µL de MTT (5mg/mL) en cada pozo, se deja incubar por 4h a 37° C. El sobrenadante es removido y los cristales de formazán se disuelven en 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). La densidad óptica (OD) fue determinada a 540 nm en un lector de placas ELISA de BioRad®. Se utilizaron seis pozos replicados para determinar la viabilidad usando la siguiente ecuación

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{OD_{\text{células tratadas}}}{OD_{\text{células control}}} \times 100$$

Estimulación de macrófagos J77A.1

Los macrófagos J774A.1 se sembraron a una densidad de 4 x10⁵ células/cm² en una placa de 6 pozos, el cultivo de células se incubarán durante 24 h a 37°C con

5% de CO₂, después fueron estimulados con la concentración no citotóxica (12.5, 25 y 50 µg/mL) determinada en el ensayo de citotoxicidad del extracto hexánico de *Stevia viscida*, después de 2 h se adicionará 5µL de lipopolisacárido (LPS, *Escherichia coli* O111: B4, (1mg/mL)), otro cultivo será tratado con indometacina (25 µM) con LPS (5µg/mL) como control positivo. Los cultivos estimulados se incubarán durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂, transcurrido este tiempo los sobrenadantes serán recuperados y congelados a -20°C.

Determinación de la producción de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico se midió por la reacción de Griess. Una vez transcurridas las 24 h después de la estimulación con LPS, se tomaron 100 µL de sobrenadante y se le añadieron 100 µL de Reactivo de Griess (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó a 37 ° C durante 15 min, y luego se midió la absorbancia a 540 nm con un lector de microplacas BioRad®.

Determinación de niveles de IL-1, IL-6 Y TNF-α

Se determinarán las concentraciones de IL-1, IL-6 y TNF-α en los sobrenadantes de los cultivos de la línea de macrófagos J774A.1 usando estuches de ELISA comerciales DGR Diagnostics®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de la expresión génica de las citocinas

Los niveles de ARN de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF-α se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) de dos pasos.

Extracción de ARN

Se eliminó el sobrenadante del cultivo de macrófagos J774A., se añadió 500 µL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA), se raspó el pozo, se recolectó en un microtubo,

se añadió 200 µL de Cloroformo, se mezcló en agitador vortex y se centrifugó a 8000 rpm/ 15 min a 4 °C.

Se transfirió la fase transparente a otro microtubo y se añadió 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión continua y después se centrifugó a 8000 rpm / 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en etanol al 70% y se agitó en vortex, se centrifugo 8000 rpm/ 15 min 4 °C, se decanta y el pellet se resuspende en 20 µL de H₂O libre de RNA_{asa}.

El producto de la extracción de ARN se cuantificó espectrofotométricamente en un Nanodrop.

Transcripción inversa

Se transcribió 1 µg de ARN total de forma inversa a ADNc, en el cual se usó oligonucleótidos específicos (1 µL a 1 mM) y H₂O libre de RNA_{asa}, se llevaron a 70 °C por 10 min, después se añadió 5 µL Buffer de reacción ImProm-II ®, 1.25 µL DNTP's 10 mM, 1µL de transcriptasa reversa 160 u/mL y H₂O libre de RNA_{asa} por reacción, se agitó en vortex y se llevó a 37 °C por 1 h.

El producto se cuantificó espectrofotométricamente en un Nanodrop.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se realizó PCR para el gen constitutivo 18s, y los no constitutivos TNFα, IL-1 e IL-6. Se añadió 10 µL de Master mix que contiene el fluorocromo SYBR Green®, 0.25 µL de Primer Forward 10 µM, 0.25 µL de Primer Reverse 10 µM, H₂O libre de RNA_{asa}, 2 µL de ADNc 50 ng/µL para gen constitutivo (para no constitutivo se usó 2 µL de ADNc concentrado) por reacción. Se realizaron 40 ciclos de reacción usando 95 °C como temperatura de desnaturalización, 60°C la temperatura de alineación y 60 °C la temperatura de elongación. Los resultados de cada citocina se normalizaron con el gen diana 18s. Cada análisis de expresión génica se realizó por duplicado y se expresaron como la media ± DE del valor $2^{-\Delta CT}$ del gen diana normalizado con 18s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de Viabilidad Celular

La viabilidad celular se define como el número de células vivas después de la exposición a una muestra (Adan y otros, 2016). En la Figura 1 se observa que las concentraciones 6.25, 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ no resultaron citotóxicas en los macrófagos J774A.1, razón por la cual se manejan estas concentraciones en los siguientes experimentos. La IC_{50} calculada para el extracto hexánico de *Stevia viscida* fue 86.31 $\mu\text{g/mL}$. El trabajo realizado por Yon- Suk y otros (2016) usó una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de pericarpio de Trapa japónica donde menciona que la viabilidad no se ve afectada, ya que los valores se encuentran cercanos al basal.

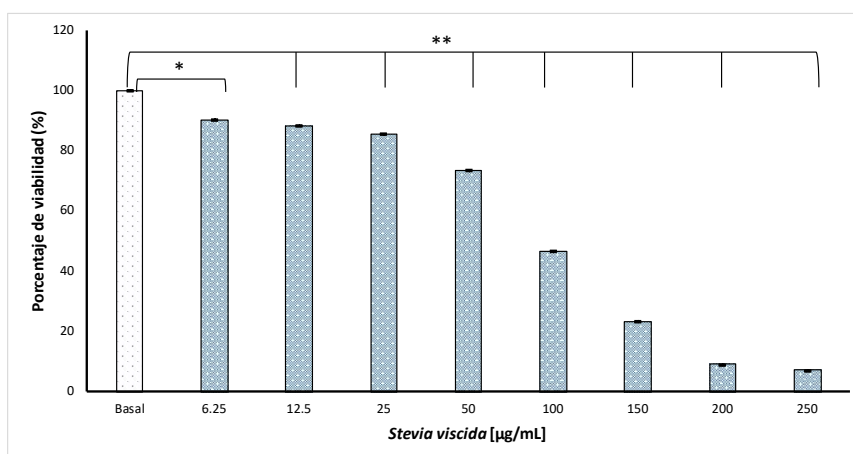


Figura 1. Efecto del extracto hexánico de *Stevia viscida* a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$ en la en la viabilidad celular de macrófagos J774A.1. Los resultados se expresan como el porcentaje de células supervivientes en relación con células de control (Basal). Los resultados son presentados como el promedio \pm desvest de tres determinaciones. ** $p < 0.01$ vs basal.

Prueba de Nitritos

Células dendríticas derivadas de monocitos (Sanmarco y otros 2019) como los macrófagos liberan óxido nítrico (NO) como mediador pro- inflamatorio (Yeom y otros 2015) ante la estimulación de las células con LPS (Maksouri y otros, 2017). La producción sostenida de NO de los macrófagos provee actividad citostática o citotóxica contra virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos y células tumorales (MacMicking y otros, 1997). En el presente trabajo se observa que la producción de óxido nítrico aumenta con la estimulación con LPS, pero disminuye la producción con el uso de extracto hexánico de *Stevia viscida* a concentraciones de 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ llegando a un nivel cercano al basal (Fig. 2), lo mismo sucedió en un trabajo realizado por Yeom y otros (2015) y Yon- Suk y otros (2016) donde el porcentaje de óxido nítrico aumentó con la estimulación con LPS pero disminuyó con la adición del extracto de *Xanthii fructus* y el extracto de pericarpio de *Trapa* japónica respectivamente, a concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/mL llegando a un porcentaje cercano al basal para *Xanthii fructus*, lo mismo sucedió con el extracto de pericarpio de *Trapa* japónica usado a concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde Yeom y otros (2015) mencionan que la producción de NO se reduce significativamente. Por lo tanto, esto podría indicar que el extracto de *Stevia viscida* a esas concentraciones disminuye la producción de óxido nítrico.

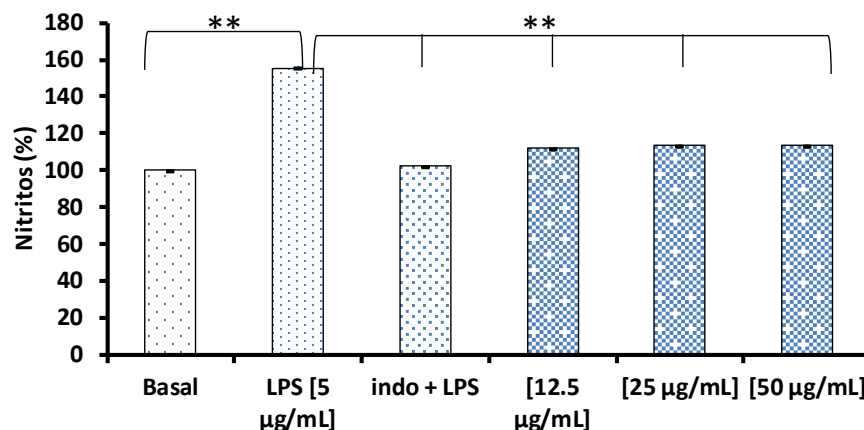


Figura 2. Efecto del extracto hexánico de *Stevia viscida* a concentraciones no citotóxicas (12.5, 25, y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se utilizó como control positivo indometazina 25

μM. Los resultados son presentados como el promedio ± desvest de tres determinaciones. ** p <0.01 vs LPS.

Expresión génica de citocinas

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) permite amplificar un segmento de DNA de interés, el cual podrá ser cualificado o cuantificado mediante el uso de un flourocromo que se une a DNA bicatenario, por lo tanto mientras más copias DNA se hayan amplificado habrá mayor fluorescencia (Navarro y otros, 2015). En el presente trabajo se observa un aumento de la transcripción del gen que codifica para TNF-α, IL-6 e IL-1β en el grupo estimulado solo con LPS, este comportamiento también fue observado en el trabajo realizado por Li y otros (2015), donde observa que la disminución de una proteína antiinflamatoria en una célula previamente estimulada provoca el aumento de producción de citocinas proinflamatorias como TNF-α y IL-6. Además se observó la disminución de la transcripción de estos genes (TNF-α, IL-6 e IL-1β), en respuesta al tratamiento con *Stevia v. hexánica* a concentraciones de 12.5, 25 y 50 μg/mL, por lo que se puede creer que el extracto hexánico puede inhibir la transcripción de los genes para estas citocinas, este comportamiento también fue observado en el trabajo de Uddin y otros (2016), donde usó Tricarbonildiclororuthenio(II) y observó mediante qRT-PCR una disminución de expresión del gen de citocinas mediante el tratamiento con dicha sustancia. El trabajo realizado por Jeong y otros (2019), también obtuvo el mismo comportamiento donde observó que el uso del extracto etanólico de *Hoveniae semen seu fructus* disminuye la producción de ARNm de el gen que codifica para TNF-α, IL-6 e IL-1β con respecto al grupo estimulado solo con LPS.

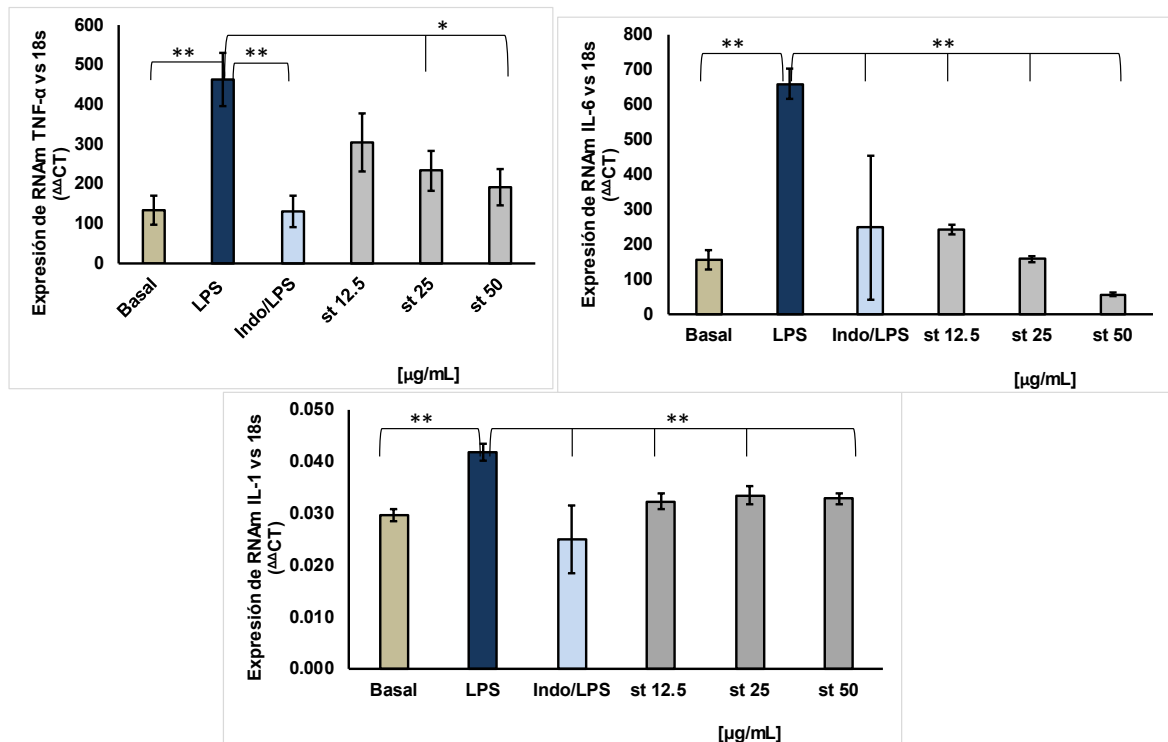


Figura 3. Efecto del extracto hexánico de *Stevia viscida* a concentraciones no citotóxicas (12.5, 25, y 50 µg/mL) en la transcripción de los genes que codifican para TNF-α, IL-6 e IL-1β, los niveles fueron detectados mediante qRT-PCR en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS (5 µg/mL), se utilizó como control positivo indometazina 25 µM. Los resultados son presentados como el promedio ± desvest de dos determinaciones. ** p < 0.01 y * p < 0.05 vs LPS.

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima

El Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) es un método analítico que muestran reacciones de antígeno- anticuerpo a través del cambio de color obtenido mediante el uso de un conjugado ligado a enzimas y un sustrato colorido que sirven para identificar la presencia y la concentración de moléculas como citocinas en fluidos biológicos. (Aydin, 2015) La inflamación está asociada a producción excesiva de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y TNF-α (Ma y otros, 2017)

El trabajo realizado por Wu y otros (2020) obtuvo que la IL-6 puede ser secretada cuando se estimula con LPS, este comportamiento también se observa en el presente trabajo (Figura 4) donde el grupo estimulado con LPS aumenta la producción de IL-6 por lo cual el extracto disminuye la producción de esta citocina proinflamatoria. En el trabajo realizado por Ma y otros (2017) se observa un aumento de los niveles séricos de TNF- α debido a la inflamación en personas que padecen cáncer. En el presente trabajo se observa un aumento de concentración de TNF- α en el grupo estimulado con LPS y una disminución en la producción de esta citocina en los grupos tratados con el extracto de *Stevia viscida* hexánico, lo que también muestra correlación con la disminución de la transcripción del gen para esta citocina mostrada en la figura 3. El trabajo realizado por Yin y otros, (2019), muestra la disminución de la concentración de IL-1 β en la aplicación de tratamiento de Platelet-rich plasma (PRP) en modelo de conejos con sinovitis. La concentración de IL-1B se determinó en líquido articular mediante Kit de ELISA, por lo cual el autor menciona que PRP es efectivo para aliviar la sinovitis. Por el contrario en el presente trabajo no se pudo cuantificar la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de las muestras.

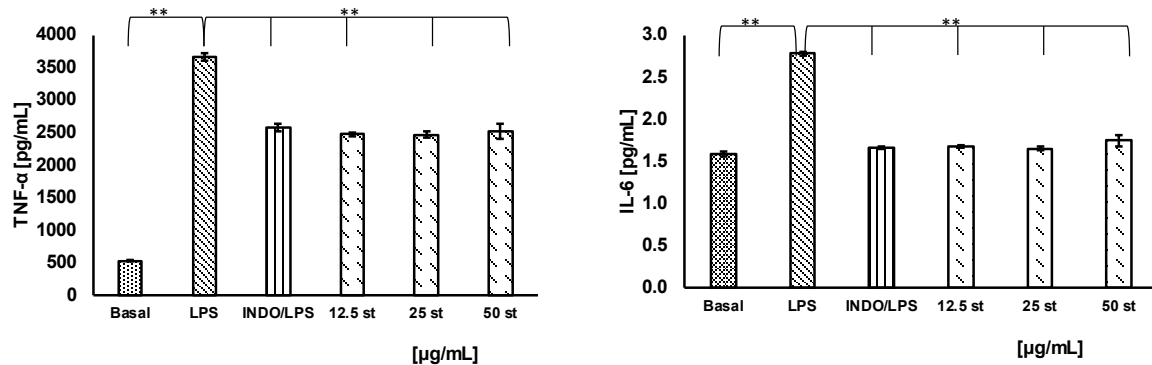


Figura 4. Efecto del extracto hexánico de *Stevia viscida* a concentraciones no citotóxicas (12.5, 25, y 50 μ g/mL) en la expresión a nivel post-traduccionales de los genes que codifican para citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , los niveles fueron detectados mediante kit de ELISA DGR Diagnostics® siguiendo las instrucciones del fabricante, para cuantificar se utilizaron sobrenadantes de cultivo celular de macrófagos J774A.1 estimulados con LPS (5 μ g/mL), se utilizó como

control positivo indometazina 25 μ M. Los resultados son presentados como el promedio \pm desvest. de tres determinaciones ** p <0.01 vs LPS.

CONCLUSIONES

El extracto hexánico de *Stevia viscida* demostró no ser citotóxico en macrófagos J774A.1 a concentraciones menores de 50 μ g/mL. En el presente trabajo se sugiere que el extracto hexánico presenta actividad antiinflamatoria a concentraciones de 12.5, 25, y 50 μ g/mL.

Bibliografía

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology* .
- Arulselvan, P., Tangestani, M., Sean, W., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M., y otros. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* .
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules* .
- Balkwil, F. I. (2006). TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* , 409-416.
- Boonkaewwan, C. (2013). Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Steviol on Colonic Epithelial Cells. *Science of Food and Agriculture* .
- Boraschi, D., Italian, P., Weil, S., & Michael, M. (2017). The family of the interleukin-1. *Immunological Review* , 157-232.
- Byoung, C., Hyung, W., Yangkang, S., Jung, C., Hyun, S., Chang, H., y otros. (2013). Anti-inflammatory effect of austroinulin and 6-O-acetyl-austroinulin from Stevia rebaudiana in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology* , 638–644.
- Dinarelo, C., Simon, A., & Van der Mee, J. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* , 633–652.
- Echeverri, D., Fontanilla, M., & Buitrago, L. (2004). El macrófago en enfermedad vascular¿El enemigo oculto? *CARDIOLOGÍA DEL ADULTO* , 164-173.
- Fernández, F., & Torres, M. (2013). INFLAMACIÓN Y PLANTAS MEDICINALES. *Organización Panamericana de la Salud* .
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2015). Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journal of GERONTOLOGY* .
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* , 281-286.
- Gasparrinia, M., Afrina, S., Forbes, T., Cianciosi, D., Reboredo, P., Amicia, A., y otros. (2018). Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages,. *Food and Chemical Toxicology* .

Gentek, R., Molawi, K., & Sieweke, M. (2014). Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunological Review* , 56-73.

Jeong, Y. H., Oh, Y. C., Cho, W. K., Yim, N. H., & Ma, J. Y. (2019). Hoveniae Semen Seu Fructus Ethanol Extract Exhibits Anti-Inflammatory Activity via MAPK, AP-1, and STAT Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW 264.7 and Mouse Peritoneal Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2019.

Li, Z., Scott, M. ., Li, Y., Liu, J., Xiao, G., Li, S., y otros. (2016). Tissue damage negatively regulates LPS-induced macrophage necroptosis. *Nature* , 1428–1447.

Li, L., Wang, Y., Gao, W., Yuan, C., Zhang, S., Zhou, H., ... & Yao, X. (2015). Klotho reduction in alveolar macrophages contributes to cigarette smoke extract-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Biological Chemistry*, 290(46), 27890-27900.

Ma, Y., Ren, Y., Dai, Z. J., Wu, C. J., Ji, Y. H., & Xu, J. (2017). IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med*, 26(3), 421-426.

MacMicking, J., Xie, Q.-w., & Nathan, C. (1997). NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Rev. Immunol* .

Maksouri, H., Dang, C., Rodrigues, V., Estaquier, J., & Riyad, M. (2017). Moroccan strains of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* differentially impact on nitric oxide production by macrophages. *Parasites and vectors* .

Marcinek, K., & Krejpcio, Z. (2015). STEVIA REBAUDIANA BERTONI, CHEMICAL COMPOSITION AND FUNCTIONAL PROPERTIES. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* , 145-152.

Marin, G., Max, F., Ríos, F. A., & Villacrés, J. (2017). Actividad inmunoestimulante del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Physalis angulata* L. en ratas albinas cepa Holtzman. *REVISTA PERUANA DE MEDICINA INTEGRATIVA* , 38-46.

Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.

Recio, M., Andújar, I., & Ríos, J. (2012). Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Current Medicinal Chemistry* , 2088-2103.

Rose, S. (2017). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect in Biology* .

Sanmarco, L., Postan, M., & Maria, A. (2019). Monocyte glycolysis determines CD8+ T-cell functionality in human Chagas disease. *JCI Insight* .

Stanley, J., Jua, C., Irene, K., Gordon, W., Mieke, T., Bonga, S., y otros. (2017). Interleukin-6, A Cytokine Critical to Mediation of Inflammation, Autoimmunity and Allograft Rejection: Therapeutic Implications of IL-6 Receptor Blockade. *Transplant journal* , 32-44.

- Stefan, R.-J. (2017). The soluble Interleukin 6 receptor: Advanced therapeutic options in inflammation.
- Sulistyowati, E., Mei-Yueh, L., Lin-Chi, W., & Jong-Hau, H. (2018). Exogenous Heat Shock Cognate Protein 70 Suppresses LPS-Induced Inflammation by Down-Regulating NF- κ B through MAPK and MMP-2/-9 Pathways in Macrophages. *Molecules* .
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* .
- Tiancheng, W., Mengyao, G. X., Zecai, Z., Haichao, J., Wei, W., Yunhe, F., y otros. (2014). Stevioside Plays an Anti-inflammatory Role by Regulating the NF- κ B and MAPK Pathways in *S. aureus*-infected Mouse Mammary Glands. *Inflammation* , 1837–1846.
- Uddin, M. J., Joe, Y., Kim, S. K., Jeong, S. O., Ryter, S. W., Pae, H. O., & Chung, H. T. (2016). IRG1 induced by heme oxygenase-1/carbon monoxide inhibits LPS-mediated sepsis and pro-inflammatory cytokine production. *Cellular & molecular immunology*, 13(2), 170.
- Xiang, L., Ying-Fan, H., Jia-Si, W., Li, W., Wen-Ge, H., Chen-Si, X., y otros. (2018). Semi-Mechanism-Based Pharmacodynamic Model for the Anti-Inflammatory Effect of Baicalein in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *Frontiers of Pharmacology* .
- Yazdi, A., & Ghoreschi, K. (2016). The Interleukin-1 Family. En *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology* (págs. 21-28). Tuebingen, Germany: Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Yeom, M., Jae-Hyun, K., Ju-HeeMin, ManKiHwang, SangJung, H., & Youngjoo, S. (2015). Xanthiifructus inhibits inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through suppressing NF- κ B and JNK/p38MAPK. *Journal of Ethnopharmacology* , 394-401.
- Yin, J., Xu, Z., & Liu, J. (2019). Alleviation of synovitis caused by joint instability with application of platelet-rich plasma. *Thrombosis Research*.
- Yon-Suk, K., Jin-Woo, w., Jae-Hyuk, J., Sangkeun, S., Il-Bok, S., Jae-Hyun, J., y otros. (2016). *Trapa japonica* Pericarp Extract Reduces LPS-Induced Inflammation in Macrophages and Acute Lung Injury in Mice. *Molecules* .
- Wu, X., Zhang, G., Feng, X., Li, P., & Tan, Y. (2019). Transcriptome Analysis of Human Periodontal Ligament Fibroblasts Exposed to *Porphyromonas gingivalis* LPS1. *Archives of Oral Biology*, 104632.
- Zhou, J., Jun, Y., & Yan, H. J. (2014). Epinephrine Enhances the Response of Macrophages under LPS Stimulation. *BioMed Research International* .

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

LICENCIATURA QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

PROYECTO: Determinación de la actividad antiinflamatoria de *Stevia viscida*

PROYECTO GENERICO: Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNO: Luis Alfonso Albarrán Carcaño

MATRÍCULA: 2133060707

DIRECCIÓN: CDA Aztecas 10, Col. Tlalcoligia, CP 14430, Tlapan CDMX.

Teléfono celular: 5571907412

Correo electrónico: luis26albarran03@gmail.com

Asesoras

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

M. en C. Ma. Cristina Fresán Orozco

Fecha de inicio: 17 septiembre 2018

Fecha de terminación: 29 Marzo del 2019

Fecha de entrega: Enero 2020

Resumen

La inflamación es una respuesta inmunológica y fisiológica común (Xian y otros, 2018) causada por microorganismos, agentes mecánicos y respuestas autoinmunes (Fujiwara y otros, 2005). La inflamación está asociada a enfermedades inmunes y enfermedades crónicas como diabetes, gota, artritis reumatoide, Alzheimer, accidente cerebrovascular agudo, hipertensión arterial (Arulselvan y otros, 2016), además también está implicada en procesos como cáncer, isquemia y envejecimiento (Azab y otros, 2016). En la respuesta inflamatoria participan los macrófagos generan citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β y IL-6 (Arulselvan y otros, 2016). Aunque actualmente se puede acceder a medicamentos eficaces contra la inflamación, como la aspirina, el celecoxib, el ibuprofeno, el naproxeno y el diclofenaco, todavía es un desafío descubrir agentes menos tóxicos y más efectivos para tratar la variedad de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (Gasparrinia y otros, 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el 80% de los habitantes del mundo utilizan la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria de salud y la mayoría de estas terapias requieren el uso de extractos de hierbas y sus componentes activos. (Arulselvan y otros, 2016). Por tanto, las plantas medicinales son un recurso natural de gran importancia (Fernández y otros, 2013) para el desarrollo de nuevos medicamentos de fácil acceso y de bajo costo (Recio y otros 2012).

En el presente trabajo se informa la actividad antiinflamatoria del extracto hexánico de *Stevia Viscida*, donde se evaluó en el modelo *in vitro* en macrófagos *J774A.1* estimulados con Lipopolisacarido (LPS). En el ensayo de viabilidad se obtuvo una IC50 calculada de 86.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el extracto hexánico de *Stevia Viscida*. El óxido nítrico determinado mediante la reacción de Griess muestra un aumento en la producción de óxido nítrico en el grupo estimulado solo por LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en el tratamiento con concentraciones no citotóxicas del extracto hexánico de *Stevia Viscida* (12.5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) muestra una disminución de la producción de óxido nítrico con respecto al grupo estimulado solo con LPS. La expresión de los genes determinada mediante rt-qPCR muestra una diferencia significativa en la expresión a nivel transcripcional de los genes que codifican las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β en el grupo tratado con el extracto hexánico de *Stevia Viscida* con respecto al control

positivo (tratado solo con LPS). Por otro lado, la expresión a nivel postraduccional de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β determinadas mediante ELISA muestran una disminución en la producción de citocinas TNF- α e IL-6 en los grupos tratados con el extracto hexánico de *Stevia Viscida* con respecto al control positivo (estimulado con LPS), pero IL-1 β no se pudo cuantificar en los sobrenadantes en ninguna de las concentraciones utilizadas del extracto. Por lo cual el extracto hexánico de *Stevia Viscida* posiblemente actúa como inmunomodulador inhibiendo algún paso para la síntesis de citocinas como TNF- α e IL-6 y esto podría representar una alternativa terapéutica para enfermedades inflamatorias.

Bibliografía

Arulselvan, P., Tangestani, M., Sean, W., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M., y otros. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* .

Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules* .

Fernández, F., & Torres, M. (2013). INFLAMACIÓN Y PLANTAS MEDICINALES. *Organización Panamericana de la Salud* .

Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* , 281-286.

Gasparrinia, M., Afrina, S., Forbes, T., Cianciosi, D., Reboredo, P., Amicia, A., y otros. (2018). Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages,. *Food and Chemical Toxicology* .

Recio, M., Andújar, I., & Ríos, J. (2012). Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Current Medicinal Chemistry* , 2088-2103.

Xiang, L., Hu, Y., Wu, J., Wang, L., Huang, W., & Xu, C. (2018). Semi-Mechanism-Based Pharmacodynamic Model for the Anti-Inflammatory Effect of Baicalein in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *Frontiers in Pharmacology* .