



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y LOS MECANISMOS
INMUNOMODULADORES DE EXTRACTOS METANÓLICOS Y
FRACCIONES OBTENIDOS DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Baccharis*
SOBRE CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS**

CHRISTA BEATRIZ BURGOS LEPEL

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y LOS MECANISMOS
INMUNOMODULADORES DE EXTRACTOS METANÓLICOS Y
FRACCIONES OBTENIDOS DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Baccharis*
SOBRE CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS**

CHRISTA BEATRIZ BURGOS LEPEL

Tutor: PROF. DRA. PATRICIA ELENA LANGJAHR PENAYO

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021

Burgos Lepel, Christa Beatriz

Evaluación de la actividad y los mecanismos inmunomoduladores de extractos metanólicos y fracciones obtenidos de tres especies del género *Baccharis* sobre células monocíticas humanas / Christa Beatriz Burgos Lepel; Tutora: Patricia Elena Langjahr Penayo.- -San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas; 2021.

xv, 59; il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas). – UNA, IICS, FCQ; 2021

1. Monocitos 2. *Baccharis* 3. Inmunomodulación 4. Inflamación.

I. Título

CDD (ed 18ª) 612.11822
B914e



Con el apoyo de:



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA PROF. DRA. PATRICIA ELENA LANGJAHR, DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación de la actividad y los mecanismos inmunomoduladores de extractos metanólicos y fracciones obtenidos de tres especies del género *Baccharis* sobre células monocíticas humanas”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **CHRISTA BEATRIZ BURGOS LEPEL** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 03 días del mes de junio de 2021.

Tutora: Prof. Dra. Patricia Langjahr



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación de la actividad y los mecanismos inmunomoduladores de extractos metanólicos y fracciones obtenidos de tres especies del género *Baccharis* sobre células monocíticas humanas”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **CHRISTA BEATRIZ BURGOS LEPEL** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **PROF. DRA. PATRICIA ELENA LANGJAHR PENAYO** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 24 días del mes de junio de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Evaluación de la actividad y los mecanismos inmunomoduladores de
extractos metanólicos y fracciones obtenidos de tres especies del género
Baccharis sobre células monocíticas humanas**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Christa Beatriz Burgos Lepel

Aprobado el 02 de julio de 2021

Tribunal examinador:

Prof. Dr. Derlis Alcides Ibarrola Díaz, PhD, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional del Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Prof. Dra. Ana Ilda Ayala Lugo, PhD, Instituto de Investigaciones en
Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo,
Paraguay.

Prof. Dr. Miguel Ángel Campuzano Bublitz, PhD, Facultad de Ciencias
Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Prof. MSc. Gloria Yaluff de Mareco, Instituto de Investigaciones en Ciencias
de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Prof. Dra. Patricia Langjahr

Tutora

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.

Directora de Postgrado FCQ

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra Patricia Langjahr. Ha sido un verdadero honor contar con su guía. Gracias por todo lo aprendido durante este tiempo, la motivación, confianza y cariño. Gracias por brindarme un espacio para iniciarme en la formación científica.

Al Prof. Dr. Nelson Alvarenga, por la provisión de los extractos metanólicos y fracciones de las especies estudiadas en este trabajo.

A la Prof. Dra. Yenny Montalbetti, por su guía para el manejo de animales de laboratorio y el apoyo e interés que demostró durante la realización de este trabajo desde el primer momento.

A la Dra. María Mercedes Carpinelli, por abrirme las puertas del departamento del Inmunología del IICS- UNA. Gracias por acompañar la realización de este trabajo de investigación y su apoyo de siempre.

Al Prof. Dr. Pablo Sotelo, por recibirme en el departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas con la mejor predisposición. Su apoyo y ayuda durante todo este tiempo son invaluable.

A la Dra. Pamela Mongelós, coordinadora del programa de Postgrado. Gracias por su dedicación y ayuda constante.

A mis compañeras: Claudia, Patricia y Melisa. Gracias por su amistad, comprensión y palabras de aliento. Compartir este desafío con ustedes hizo de esta una de las mejores experiencias. No hubiera sido igual sin ustedes.

A mis padres, gracias por todo su amor. Espero se sientan orgullosos.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y LOS MECANISMOS
INMUNOMODULADORES DE EXTRACTOS METANÓLICOS Y
FRACCIONES OBTENIDOS DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO
Baccharis SOBRE CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS**

Christa Burgos*, Patricia Langjahr**

***Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción**

****Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción**

RESUMEN

Los monocitos participan en la generación de respuestas defensivas al ser rápidamente reclutados a los sitios de lesión ocasionados por patógenos. Sin embargo, una respuesta excesiva o inapropiada puede llevar al desarrollo de desórdenes inflamatorios crónicos, por lo que existe gran interés en la modulación de sus respuestas para la obtención de algún beneficio terapéutico.

A plantas del género *Baccharis* se le atribuyen propiedades para el tratamiento de trastornos inflamatorios e infecciones, constituyéndose así en una fuente potencial de compuestos con actividad inmunomoduladora.

En este trabajo se evaluó la capacidad de los extractos metanólicos y fracciones de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notoserigila* de modular la respuesta inmune en células THP-1 frente al estímulo de lipopolisacárido bacteriano (LPS). Se evaluó la concentración de CD14 soluble en sobrenadante de cultivo mediante ensayo de ELISA y el nivel de expresión de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e IRAK-2, representativas de la respuesta inflamatoria por RT-qPCR. Además, se evaluó la producción de óxido nítrico (NO) en esplenocitos murinos por el método de Griess.

Los extractos de las tres especies estudiadas redujeron significativamente la concentración de CD14 soluble liberada en respuesta a LPS y la producción de mRNA de genes codificantes de citoquinas y quimiocinas de la respuesta inflamatoria en células monocíticas humanas. Así también, se observó una disminución de la producción de NO en esplenocitos murinos tratados con los extractos y estimulados con LPS.

Estos resultados demuestran que las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notoserigila* poseen actividad anti-inflamatoria *in vitro*.

Palabras clave: Monocitos, *Baccharis*, inmunomodulación, inflamación

**EVALUATION OF THE ACTIVITY AND IMMUNOMODULATING
MECHANISMS OF METHANOLIC EXTRACTS AND FRACTIONS
OBTAINED FROM THREE SPECIES OF THE GENUS *Baccharis* ON
HUMAN MONOCYTIC CELLS**

Christa Burgos*, Patricia Langjahr**

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

ABSTRACT

Monocytes participate in the generation of defensive responses by being rapidly recruited to the sites of injury caused by pathogens. However, an excessive or inappropriate response can lead to the development of chronic inflammatory disorders, so there is great interest in modulating their responses to obtain some therapeutic benefit.

Species of the genus *Baccharis* are used for the treatment of inflammatory disorders and infections in the folk medicine, thus constituting a potential source of compounds with immunomodulatory activity.

The aim of this study was to evaluate the capacity of the methanolic extracts and fractions from the species *B. punctulata*, *B. trimera* and *B. notoserigila* to modulate the immune response in THP-1 cells against the stimulus of bacterial lipopolysaccharide (LPS). The concentration of soluble CD14 in culture supernatant was evaluated by ELISA assay and the level of gene expression of TNF- α , IL-1 β , IL- 6, IL- 10, MCP-1 e IRAK-2 at the mRNA level by RT-qPCR. Furthermore, the level of NO production in murine splenocytes was evaluated by the Griess method.

The extracts of the three species reduced the concentration of soluble CD14 released in response to LPS and were able to decrease the production of mRNA of genes associated with cytokines and chemokines of the inflammatory response in human monocytic cells. Likewise, a decrease of NO production was observed in murine splenocytes treated with the extracts and stimulated with LPS.

These results demonstrated that the species *B. punctulata*, *B. trimera* and *B. notoserigila* have anti-inflammatory activity *in vitro*.

Keywords: Monocytes, *Baccharis*, immunomodulation, inflammation

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Origen de los monocitos	1
1.2. Subpoblaciones de monocitos y funciones	2
1.3. Respuesta a lipopolisacárido (LPS) bacteriano.....	3
1.4. Consecuencias del funcionamiento inadecuado de monocitos	7
1.5. Modulación de la respuesta inmune.....	8
1.6. Género <i>Baccharis</i>	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Obtención de especies vegetales y preparación de extractos	12
3.2. Células.....	13
3.3. Ensayo de viabilidad celular	14
3.4. Detección de CD14 soluble.....	15
3.5. Extracción de RNA y RT-qPCR.....	15
3.6. Diferenciación de células THP-1	17
3.7. Western blot	17
3.8. Detección de óxido nítrico	18
3.9. Consideraciones éticas	19
3.10. Análisis estadísticos	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Determinación de la citotoxicidad de los extractos metanólicos y fracciones de las especies en estudio sobre células monocíticas humanas.....	20
4.2. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos de las especies en estudio sobre la producción de CD14 soluble en células monocíticas humanas.....	24
4.3. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos y fracciones de las especies en estudio sobre el nivel de expresión génica de las citoquinas y quimocinas de la respuesta inmune en células monocíticas humanas.	27
4.4. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos de las especies en estudio sobre la vía de producción de óxido nítrico (NO) en células monocíticas.	37
5. DISCUSIÓN	41
6. CONCLUSIONES	49
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8. ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización inducida por el reconocimiento de LPS por el receptor Tipo Toll 4 (TLR-4).	5
Figura 2. Curva estándar de nitrito de sodio.	18
Figura 3. Efecto de los extractos metanólicos sobre la viabilidad de las células THP-1.	22
Figura 4. Efecto de las fracciones de las especies en estudio sobre la viabilidad de las células THP-1.....	23
Figura 5. Efecto del LPS sobre producción de CD14 soluble (sCD14) en células THP-1. ...	25
Figura 6. Efecto de los extractos metanólicos sobre producción de CD14 soluble (sCD14) inducida por LPS en células THP-1	26
Figura 7. Efecto del estímulo inflamatorio LPS sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 en células THP-1	30
Figura 8. Efecto del extracto metanólico de <i>B. punctulata</i> sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1	31
Figura 9. Efecto de fracciones del extracto metanólico de <i>B. punctulata</i> sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1	32
Figura 10. Efecto del extracto metanólico de <i>B. trimera</i> sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1	33
Figura 11. Efecto de fracciones del extracto metanólico de <i>B. trimera</i> sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1	34
Figura 12. Efecto del extracto metanólico de <i>B. notosergila</i> sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1	35
Figura 13. Efecto de fracciones del extracto metanólico de <i>B. notosergila</i> sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1	36
Figura 14. Análisis por <i>Western blot</i> de la enzima iNOS en células THP-1 tipo macrófago.	39
Figura 15. Efecto de los extractos metanólicos sobre el nivel de producción de NO inducido por LPS	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos de especies vegetales estudiadas.....	12
Tabla 2. Secuencias de cebadores para qPCR.....	16
Tabla 3. Valores de Ct del gen iNOS en células THP-1 tratadas o no con 1 µg/mL de LPS	39

ABREVIATURAS

BCA: Ácido bicinconínico

CCL3: Quimocina ligando 3

CCL5: Quimocina ligando 5

CCR5: Receptor de quimocina tipo 5

mCD14: CD14 anclado a membrana

sCD14: CD14 soluble

CSF: Factor de crecimiento estimulante de colonias

DMSO: Dimetilsulfóxido

HLA: Antígeno leucocitario humano

IgG: Inmunoglobulina G

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IFN- γ : Interferón gamma

IRAK-2: Quinasa asociada al receptor de IL-1

LBP: Proteína de unión a Lipopolisacárido

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteínquinasa activada por mitógeno

MD-2: Factor de diferenciación mieloide 2

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro-difeniltetrazolio

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

O.D.: Densidad óptica

PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PHA: Fitohemaglutinina

PMA: Forbol-12- miristato-13- acetato

RLL: Repetición rica en leucina

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPL13A: Proteína ribosomal L13

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TIR: Receptor Toll/ IL-1

TLR: Receptor tipo Toll

TLR-4: Receptor tipo Toll 4

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRAF6: Factor 6 asociado al receptor de TNF

1. MARCO TEÓRICO

Los monocitos, junto con los macrófagos y células dendríticas, forman parte del sistema fagocítico mononuclear de la inmunidad innata y se encuentran involucrados en la regulación del inicio, desarrollo y resolución de los procesos inflamatorios (1,2). A pesar de las muchas funciones que desempeñan en la defensa inmune, inflamación y homeostasis, también contribuyen al desarrollo de diversos procesos patológicos, por lo que existe gran interés en la modulación de sus respuestas para la obtención de algún beneficio terapéutico (3). Esta modulación podría permitir la disminución del número o función de estas células cuando sus respuestas son perjudiciales o promover su movilización y sus respuestas cuando sus actividades son beneficiosas.

1.1. Origen de los monocitos

Los monocitos son fagocitos mononucleares que circulan en el torrente sanguíneo. Se desarrollan en la médula ósea a partir de un progenitor mieloide común y una vez alcanzada su maduración son liberados a la circulación periférica (4).

Por mucho tiempo se los consideró como células precursoras que completaban su proceso de diferenciación a macrófagos y células dendríticas al migrar a los tejidos. Sin embargo, hoy en día se reconoce que la mayoría de los macrófagos poseen un origen embrionario, mientras que las células dendríticas se originan a partir de varios precursores presentes en la médula ósea, y no necesariamente a partir de monocitos (4). Por lo mismo, los monocitos se han liberado de la imagen de células precursoras inmaduras y son consideradas actualmente como células circulantes que cumplen funciones más complejas que las pensadas inicialmente, tanto en circulación como en los tejidos a los que migran o en órganos linfoides (5).

1.2. Subpoblaciones de monocitos y funciones

La población de monocitos se caracteriza por su heterogenicidad y plasticidad. Se han identificado tres subpoblaciones principales de monocitos en la especie humana, clasificados con base en la presencia de los marcadores CD14 y CD16 en células que expresan el receptor de superficie celular HLA-DR. El CD14, junto con el receptor tipo Toll 4 (TLR-4) y su proteína accesoria, el factor de diferenciación mieloide 2 (MD-2), se encarga del reconocimiento de lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas y la activación de respuestas pro- inflamatorias, mientras que el CD16 actúa como un receptor que media la fagocitosis de inmunocomplejos al reconocer la porción Fc de anticuerpos del tipo inmunoglobulina G (IgG) (6). Los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ son los llamados “clásicos”, los monocitos CD14⁺⁺CD16⁺ son conocidos como “intermedios” y los CD14⁺CD16⁺⁺ constituyen a los monocitos “no clásicos” (4). Cada una de estas subpoblaciones se diferencian en sus marcadores de superficie y en las funciones que desempeñan. Estas diferencias podrían deberse en parte al estado de metilación diferencial de genes asociados a sus respuestas (7).

Los monocitos clásicos exhiben un fenotipo del tipo pro- inflamatorio, circulan en el torrente sanguíneo y migran al sitio de lesión o infección, en donde se diferencian a macrófagos y células dendríticas, además de producir citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) y estimular la proliferación de linfocitos T efectores. Los monocitos no clásicos adoptan una función de patrulla caracterizado por un rastreo a lo largo de la superficie luminal de los pequeños vasos que les permite la búsqueda y eliminación de células muertas e infectadas (8). Los monocitos del subtipo intermedio son aptos para la presentación de antígenos y regulación de la apoptosis (7).

Funcionalmente, los monocitos clásicos e intermedios poseen una mayor capacidad fagocítica que los no clásicos (9). Los monocitos clásicos son más eficientes que los intermedios en la producción de ROS y expresan mayor cantidad de receptores de quimocinas, lo que resalta su capacidad de migrar al sitio de lesión. También se caracterizan por su capacidad de producir moléculas pro- inflamatorias como interleucina (IL)-6, IL-8, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y otras quimocinas como CCL3 y CCL5 y es ampliamente aceptado que los monocitos clásicos tienen la capacidad de diferenciarse a macrófagos o células dendríticas y participar en procesos inflamatorios, así como en su resolución (7).

Los monocitos intermedios son capaces de secretar mayores niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL- 1 β en comparación con las otras subpoblaciones posterior a la estimulación del TLR. Sin embargo, la producción de otras citoquinas como IL-6, IL-8 e IL-10 es similar (9). Esta subpoblación además presenta mayores niveles de expresión de moléculas asociadas a la presentación de antígenos y mayores niveles del receptor de quimocina tipo 5 (CCR5) que los monocitos clásicos, lo que los hace más susceptibles a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (7).

Los monocitos no clásicos desempeñan funciones del tipo anti- inflamatorio, y producen citoquinas anti- inflamatorias como la IL-10 posterior a la estimulación del TLR (7).

1.3. Respuesta a lipopolisacárido (LPS) bacteriano

El LPS es el principal componente en la membrana externa de bacterias gramnegativas y actúa como un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP), siendo uno de los estímulos activadores de la respuesta inmune innata más potentes (10).

En la cascada de señalización iniciada por LPS participan de forma secuencial la proteína de unión a LPS (LBP, por sus siglas en inglés), el CD14, la proteína accesoria MD-2 y el receptor TLR-4 (10).

LBP es una proteína soluble que extrae unidades monoméricas de LPS de la membrana de las bacterias gramnegativas al reconocer el dominio del Lípido A presente en su estructura, para finalmente facilitar la unión de LPS al CD14 que actúa como un correceptor que facilita la transferencia del LPS al complejo receptor TLR-4/MD-2 (10).

Posterior al reconocimiento del LPS bacteriano por el TLR-4/MD-2, los monocitos se activan y el CD14 anclado a membrana (mCD14), el cual constituye un marcador de diferenciación presente principalmente en la membrana de monocitos y macrófagos, disminuye en cuanto a su expresión al generarse la forma soluble (sCD14) por acción de proteasas, razón por la cual se considera al sCD14 como un marcador de activación de monocitos (11). Este constituye un mecanismo de contención de la respuesta inmune para evitar una sobre-activación celular que desencadene respuestas contra el propio huésped.

Como los otros miembros de la familia de TLRs, el TLR-4 es una proteína transmembrana con un dominio extracelular que contiene una repetición rica en leucina (RLL) y un dominio intracelular del receptor Toll/IL-1 (TIR), necesario para la transducción de señales (10). Luego del reconocimiento del LPS, se produce la oligomerización del receptor y el reclutamiento de adaptadores a través de la interacción con sus dominios TIR, que poseen tres regiones altamente conservadas que median las interacciones proteína-proteína entre el receptor y las proteínas adaptadoras (12). Las proteínas adaptadoras que interactúan con estos dominios TIR son MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM y SARM (12).

La vía de señalización del TLR-4 se divide en la dependiente de MyD88 y la independiente de MyD88 (dependiente de TRIF) (**Fig. 1**). Se ha demostrado que la vía dependiente de MyD88 es la responsable de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, mientras que la vía independiente de MyD88 induce la expresión de interferón tipo I (12).

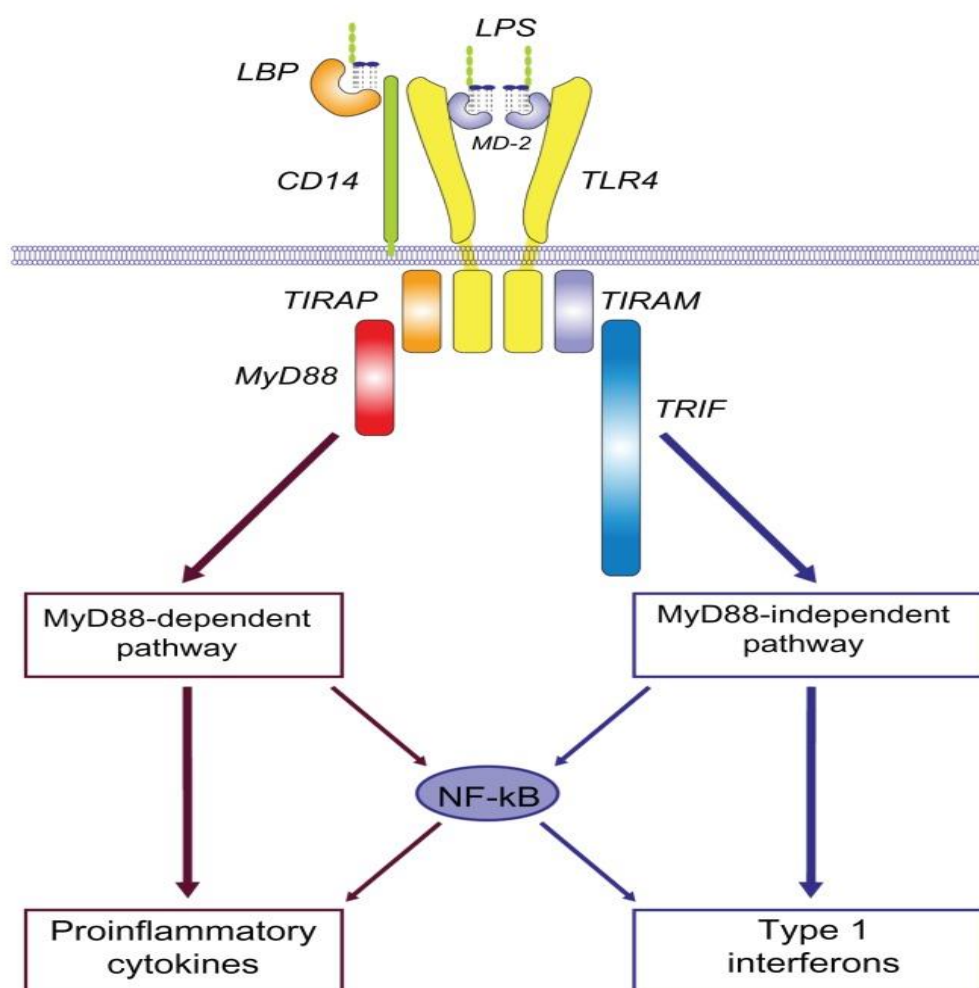


Figura 1. Vía de señalización inducida por el reconocimiento de LPS por el receptor Tipo Toll 4 (TLR-4). De: Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151.(12)

MyD88 recluta y activa a proteínas de la familia IRAK (quinasa asociada al receptor de la IL-1) y este a TRAF6 (factor 6 asociado al receptor de TNF), que de manera coordinada son capaces de activar vías de señalización aguas abajo; principalmente aquellas que conducen a la activación de los factores de transcripción NF-kB, AP-1 e IRF-5 y la vía de proteinquinasa activada por mitógeno (MAPK) que finalmente inducen la expresión de genes de citoquinas pro- inflamatorias y quimocinas (12,13).

La activación de monocitos por LPS lleva a la producción de citoquinas pro-inflamatorias como por ejemplo TNF- α , IL-1 β e IL-6, los cuales sirven como mediadores de inflamación (14).

Las citoquinas son proteínas pequeñas (<40kDa) secretadas por la mayoría de las células, las cuales regulan la respuesta inmune al poseer un efecto sobre la interacción y comunicación entre células. La IL-1, IL-6, el TNF- α y muchas quimocinas como MCP-1 ejercen efectos redundantes y pleiotrópicos que contribuyen en conjunto a la reacción inflamatoria.

Las citoquinas pro- inflamatorias son producidas principalmente por monocitos y macrófagos activados y están involucradas en el proceso de inflamación (15,16). En líneas generales actúan como pirógenos e inducen la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado, promueven el aumento de la permeabilidad vascular e inducen un aumento de la expresión de moléculas de adherencia sobre el endotelio vascular y activación de linfocitos B y T (17–19).

Las citoquinas anti- inflamatorias son unas moléculas inmunorreguladoras que controlan la respuesta pro- inflamatoria para regular la respuesta inmune. IL-10 es un ejemplo de citoquina anti- inflamatoria que reprime la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 en monocitos y macrófagos activados (15)

Sumado a lo mencionado previamente, los monocitos activados son también capaces de inducir la producción de óxido nítrico (NO), el cual es sintetizado a partir de la vía de oxidación de la L-arginina por actividad de óxido nítrico sintasas (NOS), que presentan tres isoformas; dos de ellas dependientes de calcio y expresadas de manera constitutiva que mantienen niveles fisiológicos de NO al producir cantidades del orden de picomolar- nanomolar por periodos cortos; y la isoforma inducible, conocida como óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), independiente de calcio y expresada sólo en células activadas en respuesta a un estímulo inflamatorio como LPS o citoquinas tales como IL-1 β y TNF- α , la cual es capaz de sintetizar grandes cantidades de NO, superando la producción fisiológica de NO hasta 1000 veces (20,21).

El NO está involucrado en la inmunidad innata y desempeña funciones reguladoras importantes en la función, crecimiento y muerte de muchos tipos celulares involucrados en procesos inflamatorios. El NO producido a elevadas concentraciones por iNOS es inestable y es rápidamente oxidado a especies reactivas de nitrógeno con la fórmula general NO_x (22). Ha sido identificado como una molécula capaz de efectuar la destrucción de agentes patógenos y células tumorales. Dependiendo de la concentración de NO presente, puede desencadenar acciones pro- o anti- inflamatorias, razón por la cual se le conoce como “espada de doble filo” (20,23).

1.4. Consecuencias del funcionamiento inadecuado de monocitos

La inflamación juega un papel importante en el desarrollo de numerosas enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, cáncer y enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, entre otras (24,25).

Un funcionamiento aberrante de las respuestas de los monocitos podría afectar no solo el sistema de defensa ante patógenos y células tumorales, sino también llevar al desarrollo de enfermedades inflamatorias. Se ha visto que una capacidad fagocítica reducida en estas células se asocia con el desarrollo de infecciones persistentes. También, una desregulación en la secreción de citoquinas podría favorecer al desarrollo de enfermedades autoinmunes o inflamación excesiva y se ha reportado que la diferenciación de monocitos a macrófagos tipo anti- inflamatorios o M2 favorece la progresión tumoral (26), por lo que la modulación de la respuesta inflamatoria desencadenada por activación de los monocitos se ha convertido en uno de los objetivos en el tratamiento de estas enfermedades.

1.5. Modulación de la respuesta inmune

Las sustancias inmunomoduladoras son aquellas capaces de regular la respuesta inmune, ya sea potenciando o suprimiendo el sistema de defensa del huésped, actuando a distintos niveles del sistema inmune, y pueden incluir a citocinas como el factor de crecimiento estimulante de colonias (CSF), productos bacterianos y sustancias derivadas de plantas (27).

Existen reportes de numerosas plantas con actividad inmunomoduladora. Por ejemplo, Choudhury y colaboradores reportaron que extractos vegetales de *Ocimum sanctum* poseen actividad anti- inflamatoria, al inhibir la secreción de TNF- α e IL- 6 inducida por LPS en células THP- 1 (28). Por su parte, Allen-Hall y colaboradores demostraron que extractos de *Uncaria tomentosa* inhiben la producción de citoquinas pro- inflamatorias en células tipo monocito derivados de la misma línea celular (29). IM- 133N, una preparación conteniendo extractos de *Symplocos racemosa* y *Prosopis glandulosa*, ha demostrado poseer actividad inmunomoduladora al incrementar los niveles de NO y producción de citoquinas pro- inflamatorias como el TNF- α en monocitos y macrófagos THP- 1 (30).

Productos de fuente natural como compuestos derivados de plantas están reemergiendo como una rica fuente para el descubrimiento de principios activos que puedan ser empleados para el desarrollo de nuevas drogas terapéuticas (31), por lo que plantas de uso medicinal tradicional en nuestro país podrían constituir una fuente potencial de compuestos con actividad sobre el sistema inmune.

1.6. Género *Baccharis*

Las plantas del género *Baccharis* son empleadas ampliamente en la medicina popular tradicional de distintos países, para tratar diversas dolencias, incluidas las enfermedades inflamatorias, por lo que el estudio de sus efectos sobre células del sistema inmune es interesante teniendo en cuenta la creciente necesidad de nuevos fármacos con actividad inmunomoduladora (32).

Este género está incluido dentro de la familia *Asteraceae*, representado por aproximadamente más de 400 especies, de las cuales el 90% se encuentra distribuido principalmente en el continente americano. Generalmente, se los encuentra como arbustos perennes que pueden alcanzar hasta los 6 metros de altura (32–34).

En cuanto a su uso tradicional, se emplean las partes aéreas de estas plantas para ser consumidas en forma de infusiones o té para el tratamiento de diversas patologías incluyendo heridas y úlceras, fiebre, reumatismo, dolencias gastrointestinales y hepáticas, trastornos inflamatorios, entre otros (33,34).

Entre sus principales constituyentes químicos destacan los compuestos fenólicos y terpénicos (32,34). Se ha reportado la presencia de una variedad de compuestos diterpénicos y flavonoides, así también ácidos fenólicos como derivados del ácido cinnámico y clorogénico en las especies estudiadas (32).

Los flavonoides poseen una estructura polifenólica que le confiere propiedades antioxidantes (35). En los últimos años, estudios *in vitro* e *in vivo* han evidenciado que algunos flavonoides poseen actividad anti- inflamatoria y como mecanismos posibles se han descrito sus efectos antioxidativos, su acción sobre la modulación de expresión de genes y sobre la secreción de citoquinas, además de su acción sobre la actividad enzimática de fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipooxigenasa (35–37).

Los diterpenos se encuentran entre los compuestos encontrados en mayor cantidad en las especies de este género (34). Entre los diterpénicos más ampliamente aislados destacan el neo-clerodano, labdano y kaurano (32,34). A pesar del gran número de compuestos aislados, poco se conoce sobre sus mecanismos de acción y actividad biológica.

En este trabajo se evaluó el efecto de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notoserghila* sobre células monocíticas humanas.

En un estudio realizado previamente (38) se demostró que estas especies son capaces de inhibir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica inducida por fitohemaglutinina (PHA), indicando que poseen actividad anti-inflamatoria *in vitro* sobre estas células.

Considerando en conjunto los antecedentes, evaluar el efecto de extractos metanólicos y fracciones de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* sobre células monocíticas humanas estimuladas con LPS, como modelo de inflamación *in vitro*, contribuirá al conocimiento sobre las propiedades inmunomoduladoras que poseen.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad y los mecanismos inmunomoduladores de extractos metanólicos y fracciones de tres especies del género *Baccharis* sobre células monocíticas humanas.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la citotoxicidad de los extractos metanólicos y fracciones de las especies en estudio sobre células monocíticas humanas.
2. Evaluar el efecto de los extractos metanólicos de las especies en estudio sobre la producción de CD14 soluble en células monocíticas humanas.
3. Evaluar el efecto de los extractos metanólicos y fracciones de las especies en estudio sobre el nivel de expresión génica de citoquinas y quimocinas de la respuesta inflamatoria en células monocíticas humanas.
4. Analizar el efecto de los extractos metanólicos y fracciones de las especies en estudio sobre la vía de producción de NO en células monocíticas humanas mediante la determinación del nivel de producción de óxido nítrico y de expresión génica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de especies vegetales y preparación de extractos

La recolección e identificación de las especies fueron realizadas por investigadores del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Nacional del Asunción (UNA). Los datos de las especies sometidas a estudio se indican en la **Tabla 1**. La especie *B. trimera* se recolectó del Jardín de Aclimatación de la FCQ, UNA (R. Degen et M. González 4088); *B. punctulata* de la ciudad de Ñemby, departamento Central (R. Degen et G. Delmás, L. Britos, Y. González 4302) y *B. notoserghila* se recolectó de la Ruta Transchaco, departamento de Presidente Hayes (R. Degen et G. González, L. Britos 4362). Un ejemplar de cada uno fue depositado en el Herbario de la FCQ con fines de indexación.

Tabla 1. Datos de especies vegetales estudiadas

ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA	PROCEDENCIA	CÓDIGO DE INDEXACIÓN N°
<i>Baccharis punctulata</i>	Parte aérea	Central	4302
<i>Baccharis trimera</i>	Parte aérea	FCQ – UNA	4088
<i>Baccharis notoserghila</i>	Parte aérea	Presidente Hayes	4362

Los extractos metanólicos y sus respectivas fracciones fueron preparados por el Departamento de Fitoquímica FCQ, UNA, como se describió previamente (38). El material vegetal fue secado a la sombra y posteriormente triturado en un molino de cuchillas. Aproximadamente 200 g de material se puso en contacto con 1,5 L de metanol (J.T. Baker, México D.F., México). La suspensión se sonicó durante 1 hora por 3 veces y el proceso se repitió durante 3 días. Al cabo de ese tiempo el líquido se filtró al vacío empleando papel de filtro (GE Healthcare, Hangzhou, China) y luego se evaporó el solvente empleando un evaporador rotatorio (RVO 400 SD Boeco, Hamburgo, Alemania). Los extractos crudos fueron extraídos luego con solventes de polaridad creciente. Para ello aproximadamente 1 g de extracto fue suspendido en agua y luego particionado sucesivamente con hexano (Anedra, Argentina), diclorometano, acetato de etilo (ambos de JT Baker, México D.F., México), y butanol (Merck AG, Darmstadt, Alemania). Los solventes fueron eliminados en un evaporador rotatorio.

Los extractos concentrados y sus fracciones se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St Louis, MO, USA), fueron filtrados con un filtro de 0,22 micras bajo campana de flujo laminar y se conservaron a 4°C hasta el momento de su uso.

3.2. Células

Se utilizó la línea celular de leucemia monocítica aguda humana THP-1 (ATCC N° TIB-202), la cual fue mantenida en medio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con 2,0 g de bicarbonato de sodio (Cicarelli, Argentina), 10% suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Brasil) y 1X antibiótico-antimicótico (Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B) (Gibco, Grand Island, NY, USA) a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana. Las células fueron descartadas y reemplazadas por stocks frescos luego de 20-30 pasajes.

Para la obtención de esplenocitos murinos se aisló el bazo de ratones suizos albinos hembra de 6-8 semanas de edad bajo técnicas asépticas. Se obtuvieron los esplenocitos por disrupción del bazo en medio RPMI-1640 y filtración con filtro celular de 70 μm (Falcon, USA). Se lisaron los glóbulos rojos presentes con tampón de lisis ACK (cloruro de amonio- potasio). Finalmente, los esplenocitos se colocaron en medio RPMI-1640 suplementado.

3.3. Ensayo de viabilidad celular

Se incubaron 2×10^5 células THP-1 en 200 μL de medio RPMI-1640 suplementado en una placa de cultivo de 96 pocillos (Costar®, USA), por 24 h a 37°C y atmósfera de 5% de CO_2 . Las células fueron tratadas en presencia o ausencia de distintas concentraciones de los extractos metanólicos o fracciones (acuosa, butanólica, diclorometánica, de acetato de etilo y hexánica) de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* o *B. notosergila*. Como control negativo se utilizaron células tratadas sólo con el vehículo DMSO a la concentración máxima utilizada (<1% (v/v)).

Al cabo de las 24 h de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante el método colorimétrico de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro-difeniltetrazolio (MTT). Cada pocillo se incubó con 10 μL de MTT (5 mg/mL) (Sigma, USA) por tres horas a 37°C y 5% CO_2 . Luego se agregó una solución de ácido clorhídrico (0.04 N) (Biopack, Argentina) en isopropanol (Merck Química, Buenos Aires, Argentina) para disolver los cristales de formazán formados. Se midió la densidad óptica (O.D.) en un lector de ELISA (Awareness Technology Inc, USA) a 570 nm, siendo esta directamente proporcional al número de células vivas.

3.4. Detección de CD14 soluble

Se incubaron 2×10^5 células THP-1 en 200 μ L de medio RPMI-1640 suplementado en placa de cultivo de 96 pocillos en presencia de cada uno de los extractos metanólicos a las concentraciones de 10 y 50 μ g/mL por 15 minutos. Posteriormente se estimularon con 1 μ g/mL de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma, USA) por 24 h, a 37°C y 5% CO₂.

Como control negativo se utilizaron células tratadas sólo con el vehículo DMSO y como control positivo células pre- tratadas con el vehículo DMSO (<1% (v/v)) y estimuladas con 1 μ g/mL de LPS en ausencia de extractos.

Al cabo de las 24 h de incubación se determinaron los niveles de CD14 soluble (sCD14) en el sobrenadante de cultivo mediante ensayo de ELISA (Quantikine ELISA, R&D systems, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5. Extracción de RNA y RT-qPCR

Se pretrataron $1,5 \times 10^6$ cél/mL en medio RPMI-1640 suplementado con cada uno de los extractos metanólicos (50 μ g/mL) o fracciones (10 μ g/mL) por 15 minutos y luego se estimularon con 1 μ g/mL de LPS por 4 h a 37°C y 5% CO₂, siguiendo las recomendaciones de Chanput y cols (39). Como control negativo se utilizaron células tratadas con DMSO y como control positivo células pretratadas con DMSO y estimuladas con 1 μ g/mL de LPS en ausencia de extractos.

El RNA total fue extraído con Trizol® Reagent (Ambion, Carlsbad, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA aislado fue resuspendido en agua destilada ultrapura libre de nucleasas (Invitrogen, NY, USA) y tratado con DNAsa RQ1 (Promega®, USA) a 37°C por 30 minutos.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit M-MLV Reverse Transcriptase (RT) (Promega®, USA), con 1 μ L de oligo dT (100 uM) y 1,25 μ L de dNTPs (10 uM), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la reacción de amplificación de las secuencias de interés se utilizó el cDNA junto con 1X SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad, USA) y cebadores específicos (**Tabla 2**). Se utilizó el termociclador *StepOnePlus realtime PCR* con ciclados que consistieron en un paso de desnaturalización previa a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 30 segundos. Se corrieron en simultáneo controles con todos los componentes para la reacción de síntesis de cDNA sin la RT para confirmar la ausencia de DNA genómico. Además, se incluyó un análisis de curvas de *t melting* para comprobar la especificidad de los productos amplificados.

La expresión relativa de mRNA se determinó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizándose como normalizador al gen de la proteína ribosomal L13 (RPL13A).

Tabla 2. Secuencias de cebadores para qPCR

GEN	SECUENCIAS	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
RPL13A	F: CATCGTGGCTAAACAGGTACTG R: CGCACGACCTTGAGGGCAGC	500 nM	(40)
TNF- α	F: TCCTTCAGACACCCTCAACC R: AGGCCCCAGTTTGAATTCTT	300 nM	(41)
IL-1 β	F: TGATGGCTTATTACAGTGGCAATG R: GTAGTGGTGGTCGGAGATTCCG	500 nM	(42)
IL-6	F: TCTCCACAAGCGCCTTCG R: CTCAGGGCTGAGATGCCG	500 nM	(43)
IL-10	F: GCCTAACATGCTTCGAGATC R: TGATGTCTGGGTCTTGGTTC	375 nM	(44)
MCP-1	F: GATCTCAGTGCAGAGGCTCG R: TGCTTGTCCAGGTGGTCCAT	300 nM	(45)
IRAK-2	F: GAGTGGGACTGGATGGAGTTCG R: GGTTTCCAGTTCAGGATGA	500 nM	
iNOS	F: GTTCTCAAGGCACAGGTCTC R: GCAGGTCACCTTATGTCACCTTATC	500 Nm	(46)
	F: TGCAGACACGTGCGTTACTCC R: GGTAGCCAGCATAGCGGATG	500 nM	(47)

3.6. Diferenciación de células THP-1

Para inducir la diferenciación de células tipo monocito al fenotipo macrófago se siguieron las recomendaciones de Lund y cols. (48). Brevemente, se trataron 6×10^6 células THP-1 con 25 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma, USA) por 48 h a 37°C y 5% de CO₂. Al cabo de este tiempo se removieron las células no adheridas por aspiración y se repuso el volumen de medio RPMI-1640 suplementado.

3.7. Western blot

Células THP-1 tipo macrófago pretratadas con 50 µg/mL de cada uno de los extractos metanólicos por 15 minutos y estimuladas con 1 µg/mL de LPS se incubaron por 18 hs a 37°C y 5% de CO₂. Se procedió a la lisis celular y cuantificación de la concentración total de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (G- Biosciences®, USA). Se utilizaron 25 µg de proteína total de cada una de las muestras para su separación por electroforesis en SDS- PAGE y posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa a 100 V por 1,5h en buffer de transferencia conteniendo 25 mM Tris base, 192mM glicina y 20 % (v/v) metanol. Se procedió al bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con leche al 2,5% e incubación de la membrana con anticuerpo primario específico para iNOS (Cat # ABN26-25UG, Merck Millipore, USA) (dilución 1:2.000) y anticuerpo secundario anti-conejo IgG (H+L), HRP (Cat # 31460, Invitrogen) (dilución 1:10.000). Se realizaron lavados utilizando buffer tris salino (TBS, 50 mM Tris, 150mM NaCl, pH=7,4) conteniendo 0.05% Tween 20. El revelado de la unión de los anticuerpos específicos se realizó utilizando el kit ECL Western Blotting Substrate (Promega, USA). La cuantificación densitométrica se llevó a cabo con el software c-Digit® Western Blot Scanner. Como normalizador se utilizó γ -actina (Cat # A8481, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) y anticuerpo secundario anti-ratón.

Como control positivo se utilizaron células pretratadas con DMSO y estimuladas con 1µg/mL de LPS en ausencia de extractos.

3.8. Detección de óxido nítrico

La detección de óxido nítrico (NO) se realizó en cultivo de esplenocitos (3×10^6 cél/mL) pretratados con los extractos por 15 minutos y estimuladas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS en placa de 6 pocillos. Al cabo de 18 h se colectó el sobrenadante de cada condición ensayada y se incubaron en presencia de sulfanilamida y solución de α -naftil-etilendiamina, con lectura a 540 nm en lector de microplacas Multiscan GO y software SkanIt™ (ThermoFisher Scientific). La concentración de NO se determinó mediante extrapolación a una curva estándar de nitrito de sodio (Cicarelli, Argentina) (Fig. 2). Como control negativo se emplearon células tratadas sólo con DMSO y como control positivo células pretratadas con DMSO y estimuladas con LPS en ausencia de extractos.

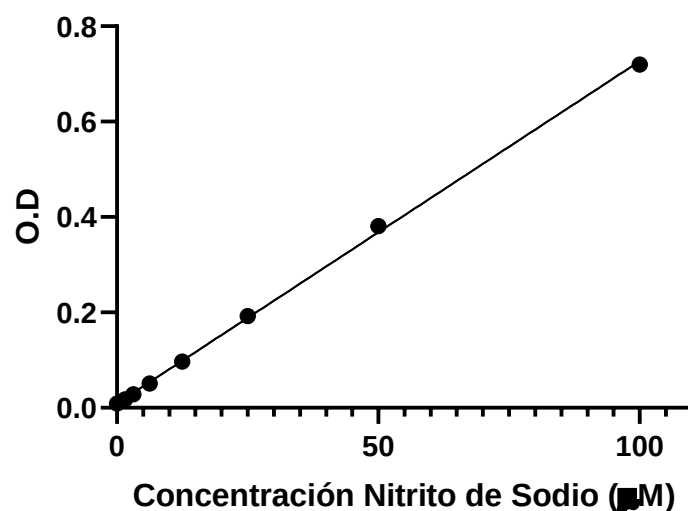


Figura 2. Curva estándar de nitrito de sodio. $R^2 = 0.9994$

3.9. Consideraciones éticas

Este trabajo se realizó en el marco de colaboración interinstitucional entre el Departamento de Fitoquímica, FCQ, UNA, Departamento de Inmunología, IICS, UNA y Departamento de Biotecnología, FCQ, UNA. El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética y Científico del IICS, UNA, código P10/2019.

3.10. Análisis estadísticos

Los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$). Los datos obtenidos se almacenaron en una planilla de Excel y se analizaron estadísticamente mediante la prueba t de Student o de análisis de varianza (ANOVA) con el post test Dunnett, según corresponda, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.1). Se consideraron significativos valores de $p<0,05$, presentándose los valores como media aritmética $\pm$ desviación estándar.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación de la citotoxicidad de los extractos metanólicos y fracciones de las especies en estudio sobre células monocíticas humanas.

A fin de evaluar el efecto de los extractos y las fracciones sobre la viabilidad celular se cultivaron las células THP-1 en presencia de diferentes concentraciones de los extractos metanólicos o fracciones de cada una de las tres especies en estudio (*B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notoserghila*).

Cabe señalar que las células tratadas con el vehículo DMSO no mostraron diferencias en la viabilidad celular respecto a las células no tratadas o sólo con medio de cultivo celular (**Fig. 3**).

La viabilidad de las células se mantuvo sin cambios significativos hasta la concentración de 50 µg/mL del extracto metanólico de *B. punctulata*, con respecto al control de células tratadas con el vehículo DMSO (**Fig. 3 A**). El mismo efecto se observó hasta las concentraciones de 100 µg/mL de los extractos *B. trimera* y *B. notoserghila*, en comparación con el control de células tratadas con DMSO (**Fig. 3 B, C**).

Con respecto a las fracciones de los extractos, a la concentración de 100 µg/mL de las fracciones diclorometánica y hexánica de las especies *B. punctulata* y *B. trimera* se observó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular en comparación con el control DMSO (**Fig. 4 A, B**).

Además, a la concentración de 10 µg/mL de las fracciones acuosa, butanólica, diclorometánica, de acetato de etilo y hexánica de la especie *B. trimera* no se observó una disminución de la viabilidad celular, sino se observó un aumento de la O.D., comparándose con el control DMSO (**Fig. 4 B**).

Finalmente, a la concentración de 100 µg/mL de las fracciones butanólica, diclorometánica y hexánica de la especie *B. notoserghila* se observó una disminución de la viabilidad celular, comparándose con el control de células tratadas con DMSO. (**Fig. 4 C**).

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió utilizar las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los extractos metanólicos y 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada una de las fracciones de las especies en estudio para llevar a cabo los ensayos siguientes, ya que las mismas demostraron no afectar la viabilidad celular.

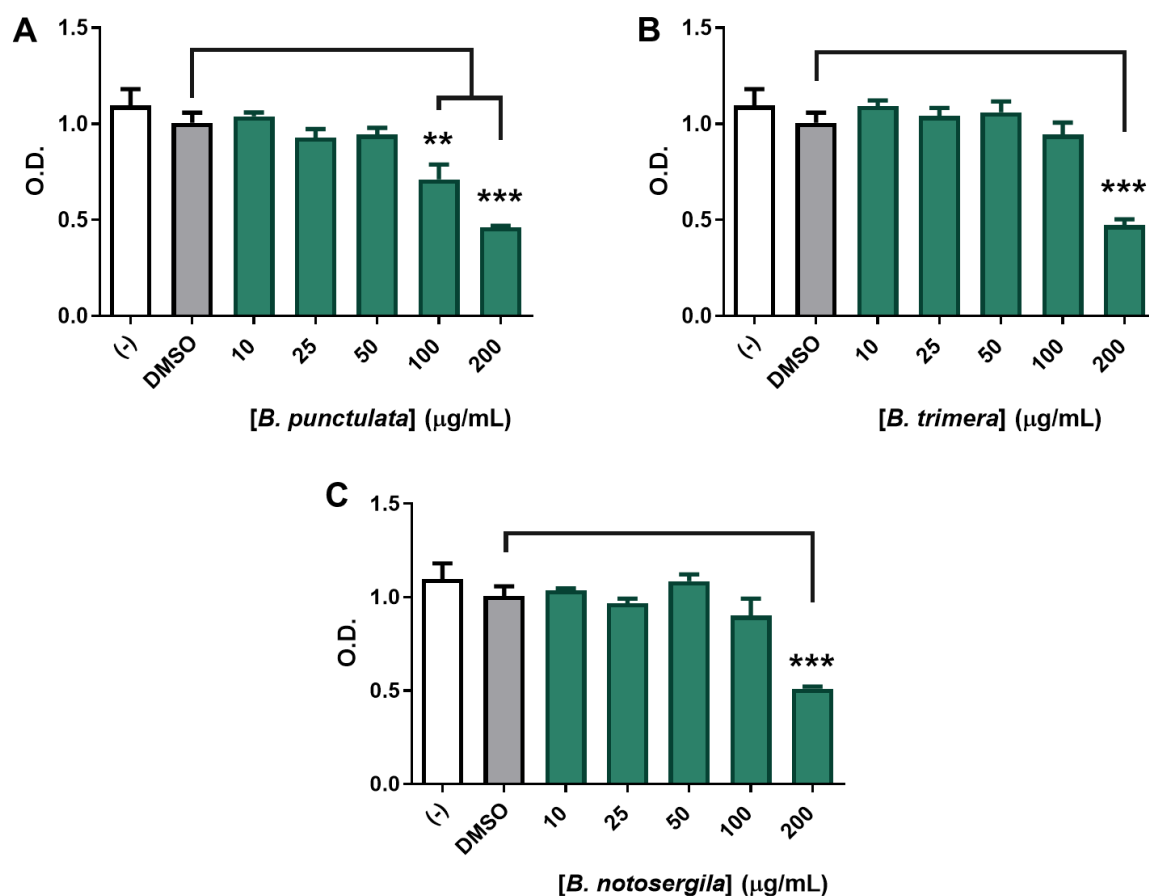


Figura 3. Efecto de los extractos metanólicos sobre la viabilidad de las células THP-1. Las células THP-1 tipo monocito (1×10^6 cél/mL) fueron tratadas o no (-) con DMSO (vehículo) o extracto metanólico de *B. punctulata* (**A**), *B. trimera* (**B**) o *B. notoserigila* (**C**) (10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) por 24 h a 37°C y 5% CO₂. Las células tratadas con DMSO (vehículo) se utilizaron como control. La viabilidad celular se determinó mediante el método de MTT. n=3, ANOVA, post test de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

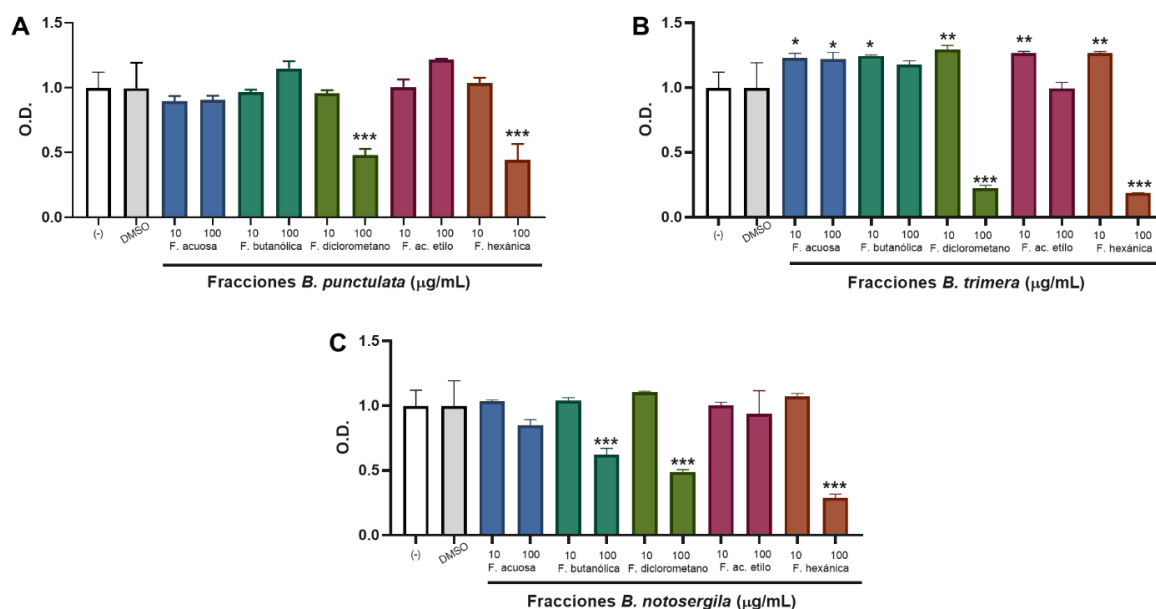


Figura 4. Efecto de las fracciones de las especies en estudio sobre la viabilidad de las células THP-1. Las células THP-1 (1×10^6 cél/mL) fueron tratadas o no (-) con DMSO (vehículo) o fracciones (acuosa, butanólica, diclorometánica, de acetato de etilo y hexánica) de los extractos metanólicos de *B. punctulata* **(A)**, *B. trimera* **(B)** o *B. notoserigila* **(C)** (10 y 100 µg/mL) por 24 h a 37°C y 5% CO₂. Las células tratadas con DMSO (vehículo) se utilizaron como control. n=3, ANOVA, post test de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos de las especies en estudio sobre la producción de CD14 soluble en células monocíticas humanas.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los extractos metanólicos de las especies en estudio sobre la producción de sCD14, un marcador de activación celular, se realizó un ensayo de ELISA utilizando sobrenadante de cultivo celular. Así, las células THP-1 fueron pretratadas con vehículo DMSO o extractos metanólicos de las especies estudiadas y luego estimuladas con 1 µg/mL de LPS.

Se detectó un aumento estadísticamente significativo en la producción de sCD14 en células tratadas con LPS, en comparación con las tratadas sólo con DMSO (vehículo). Esto indica que el estímulo LPS es capaz de inducir la activación de las células THP-1, generando un modelo de inflamación *in vitro* (**Fig. 5**).

Se observó una disminución estadísticamente significativa de la concentración de sCD14 producida por células pretratadas con los tres extractos metanólicos a las concentraciones de 10 y 50 µg/mL y estimuladas con LPS en comparación con las células tratadas sólo con DMSO y LPS (**Fig. 6 A, B, C**), sugiriendo un efecto anti- inflamatorio sobre estas células. Los extractos de *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* (50 µg/mL) produjeron una reducción de sCD14 inducido por LPS del 87,74%, 89,31% y 78,00%, respectivamente (**Anexo B**).

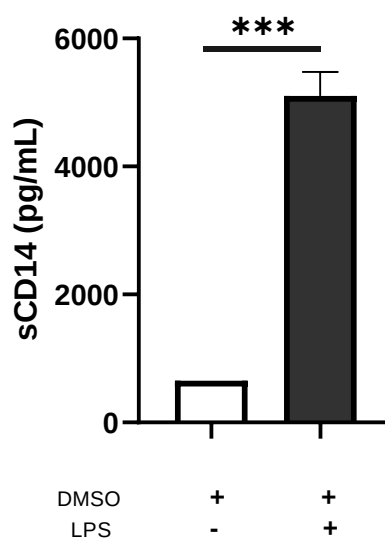


Figura 5. Efecto del LPS sobre producción de CD14 soluble (sCD14) en células THP-1. Las células THP-1 (1×10^6 cél/mL) fueron tratadas con DMSO (vehículo) o LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h a 37°C y 5% CO_2 . La producción de sCD14 se determinó mediante ensayo de ELISA. $n=3$, T test, *** $p < 0,001$.

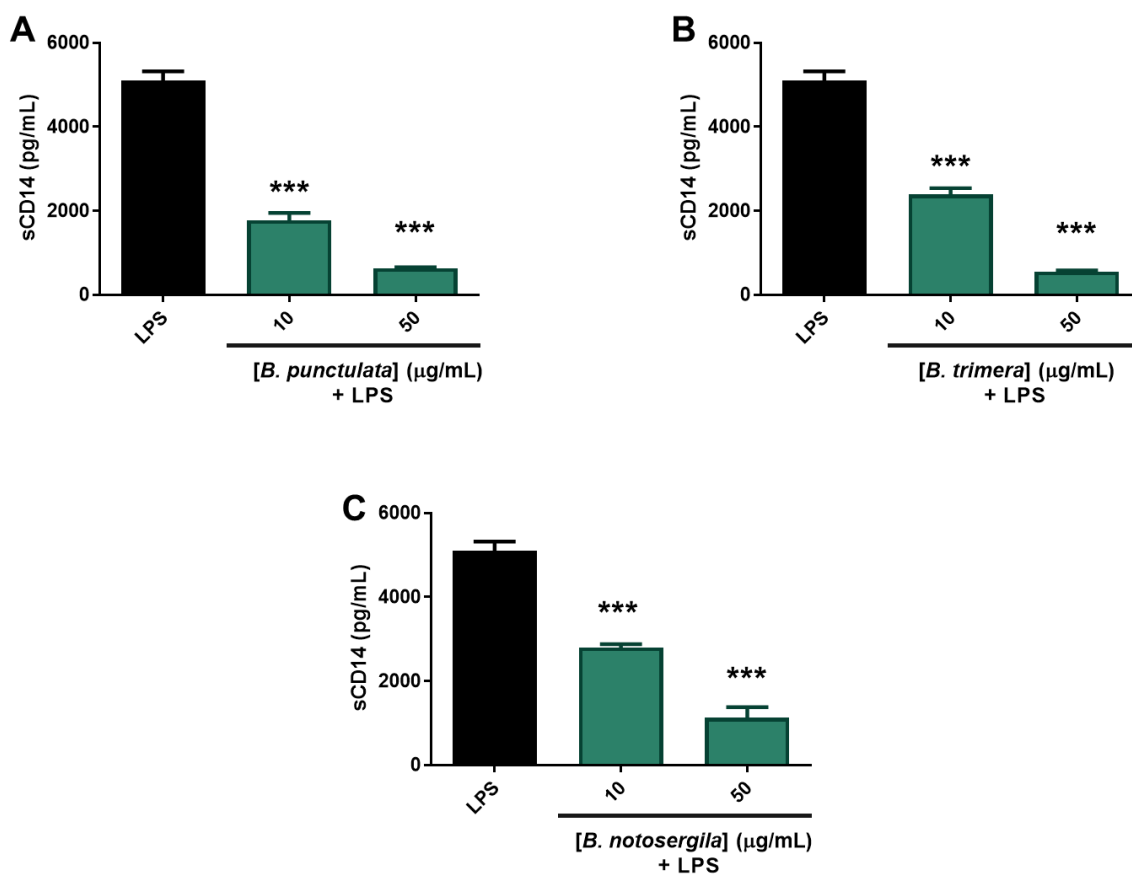


Figura 6. Efecto de los extractos metanólicos sobre producción de CD14 soluble (sCD14) inducida por LPS en células THP-1. Las células THP-1 (1×10^6 cél/mL) fueron tratadas con extracto metanólico de *B. punctulata* (**A**), *B. trimera* (**B**) o *B. notoserigila* (**C**) (10 y 50 µg/mL) en presencia de LPS (1 µg/mL) por 24 h a 37°C y 5% CO₂. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. La producción de sCD14 se determinó mediante ensayo de ELISA. n=3, ANOVA, post test de Dunnett, ***p<0,001.

4.3. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos y fracciones de las especies en estudio sobre el nivel de expresión génica de las citoquinas y quimocinas de la respuesta inmune en células monocíticas humanas.

Debido a que los extractos metanólicos de cada una de las especies en estudio demostraron inhibir la activación de las células THP-1, se evaluó el efecto de estos sobre el nivel de expresión génica de citoquinas y quimocinas inducido por LPS. También se evaluó la quinasa tipo 2 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-2), que participa en la vía de señalización celular inducida por LPS.

En primer lugar, se observó que en células estimuladas con el vehículo DMSO y LPS aumentó de forma significativa los niveles de mRNA de las citoquinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, de la quimocina MCP-1 y de IRAK-2, en comparación con el control de células tratadas sólo con DMSO, indicando la activación de las células frente al estímulo inflamatorio (**Fig. 7 A – F**).

B. punctulata

Al evaluar el efecto del extracto de la especie *B. punctulata* se determinó que fue capaz de reducir de forma significativa los niveles de mRNA de IL-6 y MCP-1 inducida por LPS en las células THP-1, con respecto al control de células estimuladas con LPS, sugiriendo un efecto anti- inflamatorio (**Fig. 8 C y D**).

En cuanto al efecto de las fracciones de *B. punctulata*, se observó que la fracción diclorometánica redujo los niveles de expresión de la citoquina IL-1 β (**Fig. 9 B**) y aumentó los niveles de mRNA de TNF- α (**Fig. 9 A**). En cuanto a la citoquina IL-6 (**Fig. 9 C**), se observó que las fracciones butanólica y diclorometánica de esta especie fueron capaces de reducir sus niveles de expresión inducido por LPS. Así también, la fracción diclorometánica disminuyó los niveles de mRNA de IL- 10 (**Fig. 9 D**) y de la quimocina MCP-1, observándose además con respecto a este último una disminución con las fracciones butanólica y de acetato de etilo (**Fig. 9 E**). La fracción diclorometánica redujo de forma significativa los niveles de mRNA de IRAK-2 inducida por LPS, mientras que se evidenció aumento de este mensajero en presencia de la fracción de acetato de etilo (**Fig. 9 E**).

B. trimera

Con respecto al efecto del extracto metanólico de la especie *B. trimera* sobre los niveles de expresión génica inducidos por LPS, se observó una reducción significativa de los niveles de expresión de los mensajeros IL-1 β , IL-6, IL-10 e IRAK-2 (**Fig. 10 B, C, D y F**).

Las fracciones obtenidas del extracto de *B. trimera* no indujeron cambios significativos en los niveles de expresión de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL10 e IRAK-2 inducidos por LPS (**Fig. 11 A, B, C, D y F**). Se evidenció un aumento significativo de los niveles de mRNA de MCP-1 por efecto de la fracción diclorometánica en comparación con el control de células tratadas con LPS (**Fig. 11 E**).

B. notoserghila

Se observó una disminución significativa de los niveles de expresión del mRNA de las citoquinas TNF- α , IL-6, IL-10 y de la quimocina MCP-1 inducido por LPS en células pretratadas con el extracto metanólico de *B. notoserghila*, en comparación con el control de células tratadas con LPS (**Fig. 12 A, C, D y E**).

En cuanto al efecto de sus fracciones, se observó que las fracciones butanólica, de acetato de etilo y hexánica redujeron los niveles de expresión de la citoquina TNF- α , en comparación con el control de células tratadas con LPS (**Fig. 13 A**). Por otro lado, se evidenció un aumento significativo de los niveles de mRNA inducido por LPS de la citoquina IL-1 β en presencia de las fracciones acuosa y butanólica (**Fig. 13 B**). La fracción hexánica redujo los niveles de mRNA de IL-6 y MCP-1 inducido por LPS (**Fig. 13 C y E**), en comparación con el control LPS. Además, la fracción diclorometánica aumentó los niveles de mRNA de la citoquina IL-10 inducido por LPS (**Fig. 13 D**).

En resumen, considerando los resultados en forma global, se observó una disminución de mRNA relacionados con la respuesta inflamatoria en las células tratadas con los extractos metanólicos de las tres especies de *Baccharis*, sugiriendo una actividad anti- inflamatoria de los extractos.

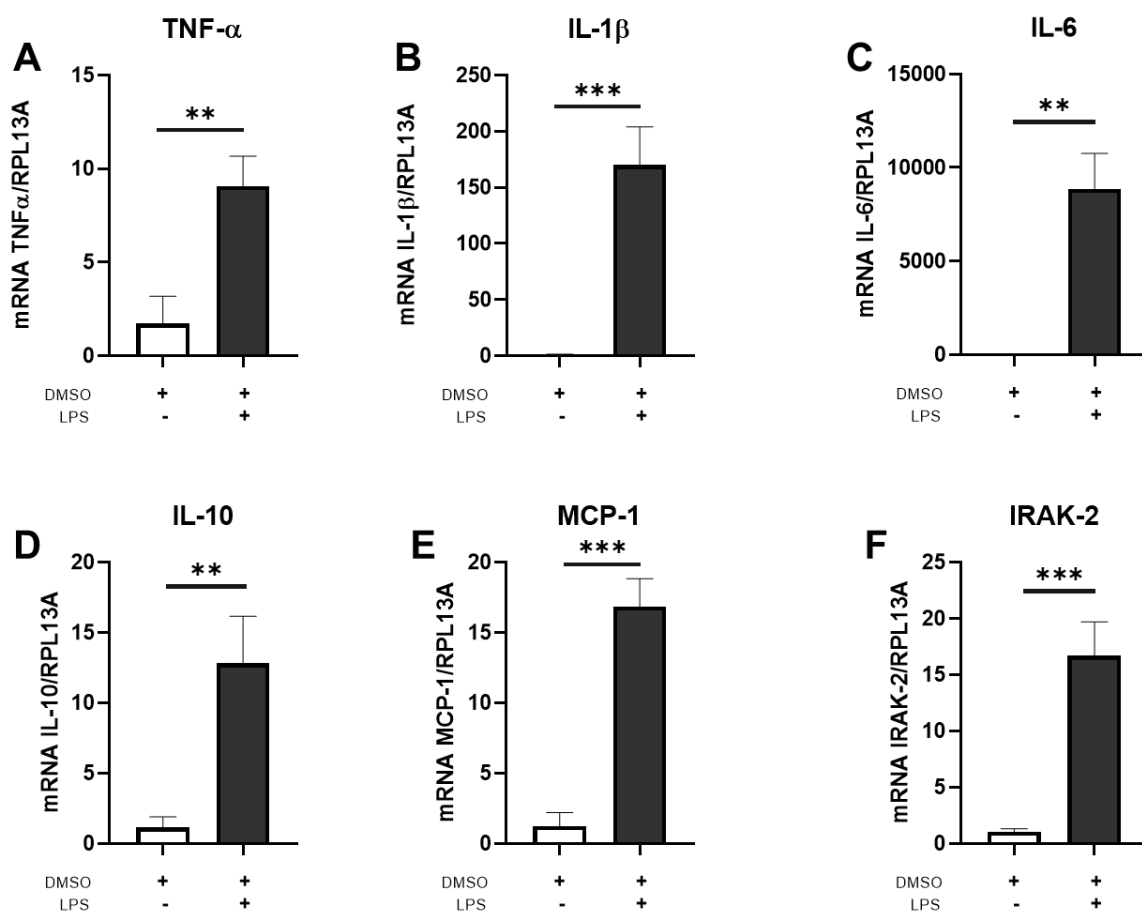


Figura 7. Efecto del estímulo inflamatorio LPS sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 en células THP-1. Células THP-1 fueron pretratadas con DMSO (vehículo) por 15 minutos y estimuladas con LPS (1 μ g/mL) por 4 h a 37°C y 5% CO₂. La expresión relativa de mRNA se determinó mediante RT-qPCR y el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizándose como normalizador RPL13A. n=3, T test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

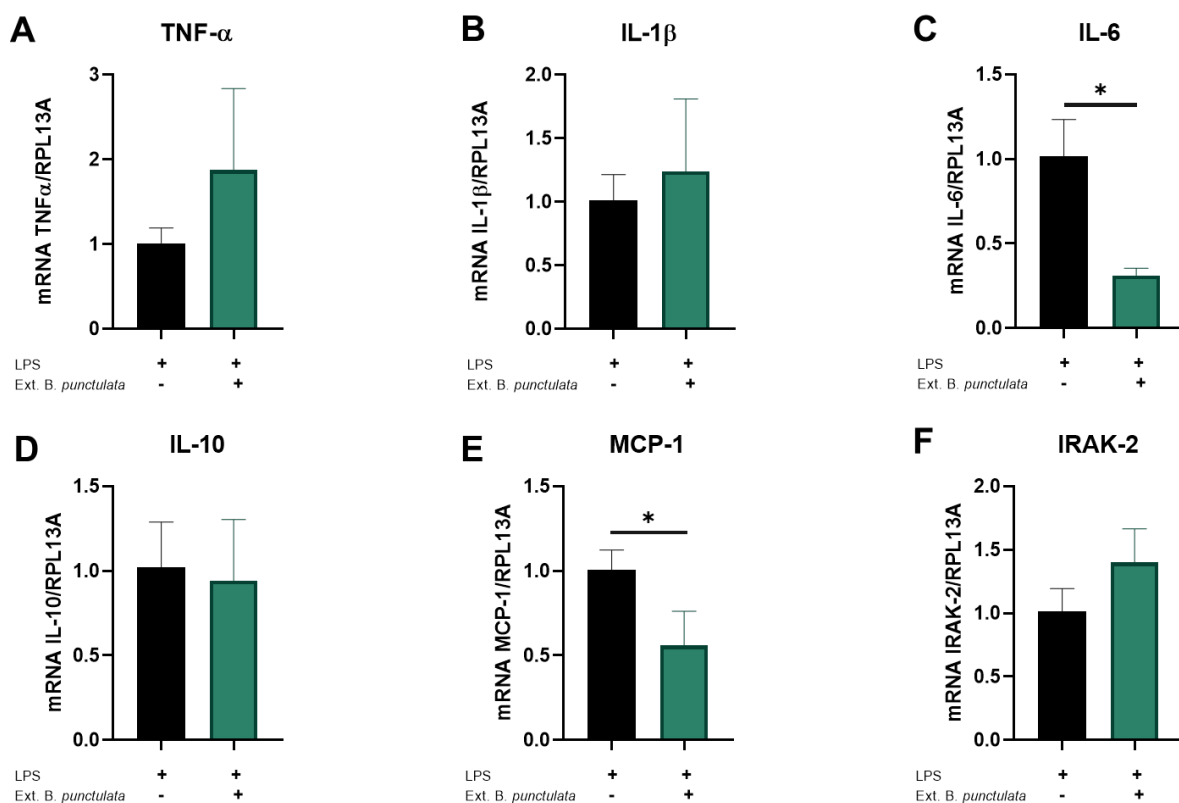


Figura 8. Efecto del extracto metanólico de *B. punctulata* sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1. Células THP-1 fueron pretratadas con DMSO o extracto metanólico de *B. punctulata* (50 μ g/mL) por 15 minutos y estimuladas con LPS (1 μ g/mL) por 4 h a 37°C y 5% CO₂. La expresión relativa de mRNA se determinó mediante RT-qPCR y el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizándose como normalizador RPL13A. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. n=3, T test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

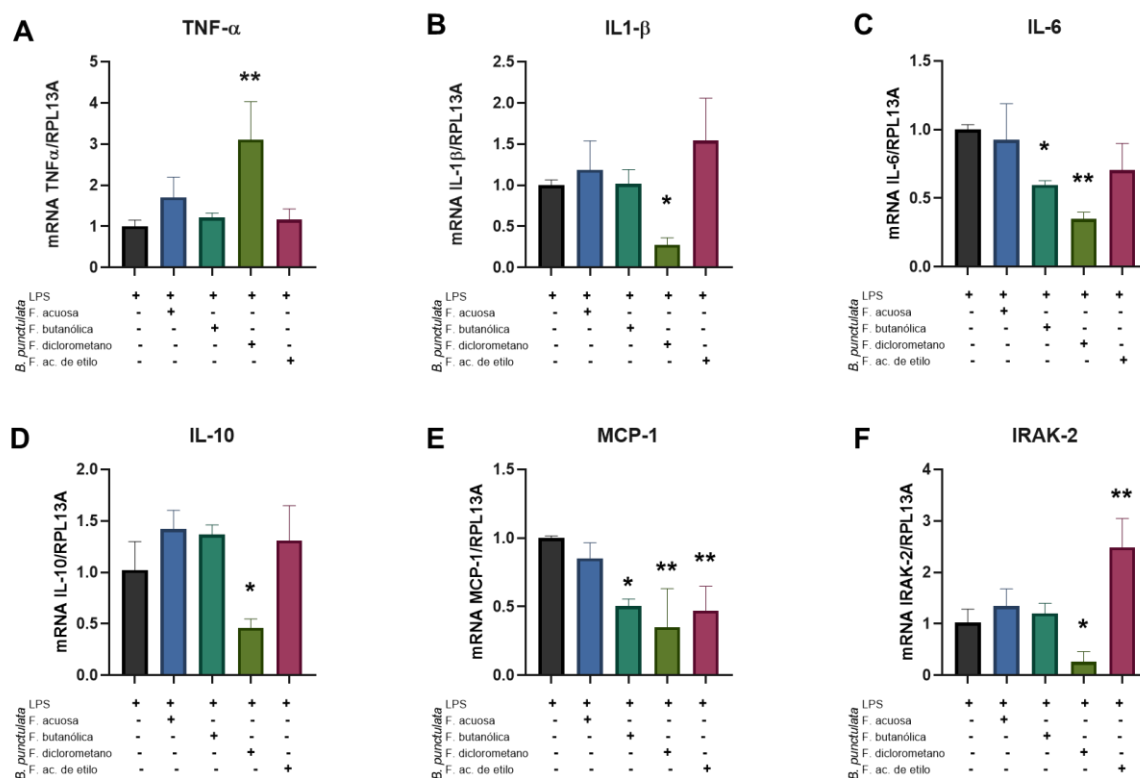


Figura 9. Efecto de fracciones del extracto metanólico de *B. punctulata* sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1. Células THP-1 fueron pretratadas con DMSO o fracciones del extracto metanólico de *B. punctulata* (10 μ g/mL) por 15 minutos y estimuladas con LPS (1 μ g/mL) por 4 h a 37°C y 5% CO₂. La expresión relativa de mRNA se determinó mediante RT-qPCR y el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizándose como normalizador RPL13A. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. n=3, ANOVA, post test de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

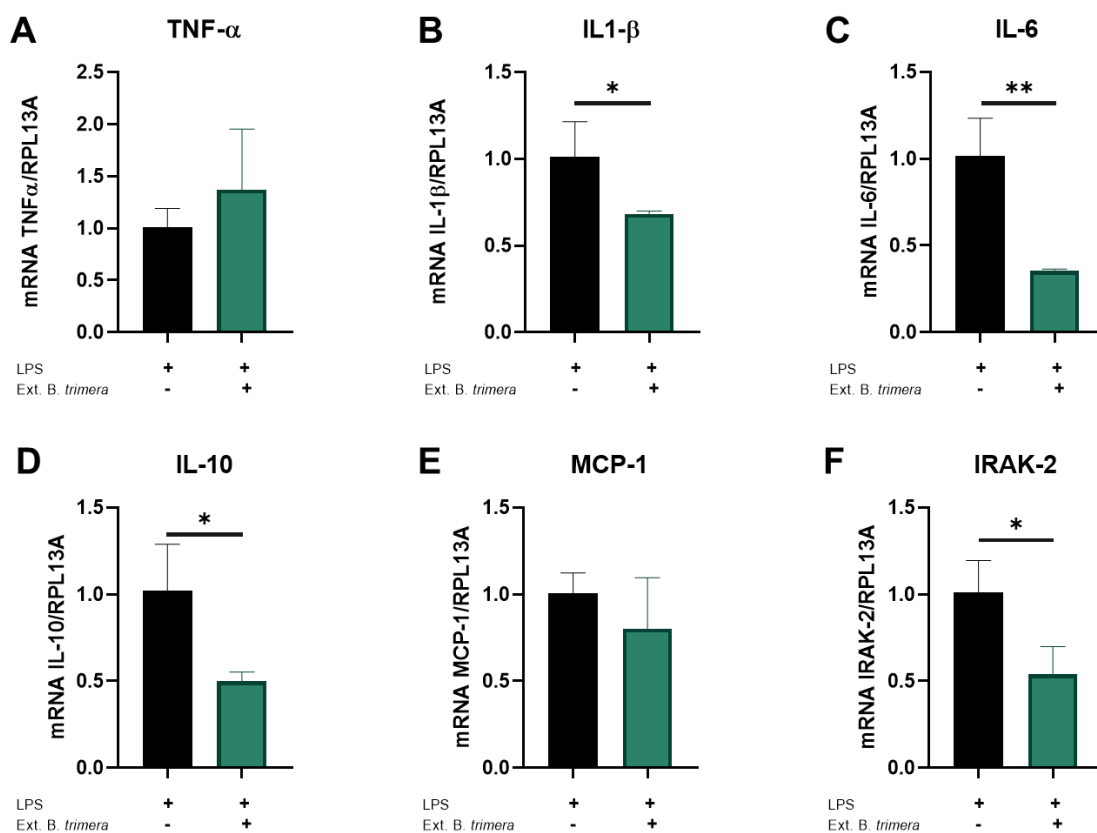


Figura 10. Efecto del extracto metanólico de *B. trimera* sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1. Células THP-1 fueron pretratadas con DMSO o extracto metanólico de *B. trimera* (50 $\mu\text{g/mL}$) por 15 minutos y estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 4 h a 37°C y 5% CO₂. La expresión relativa de mRNA se determinó mediante RT-qPCR y el método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, utilizándose como normalizador RPL13A. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. n=3, T test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

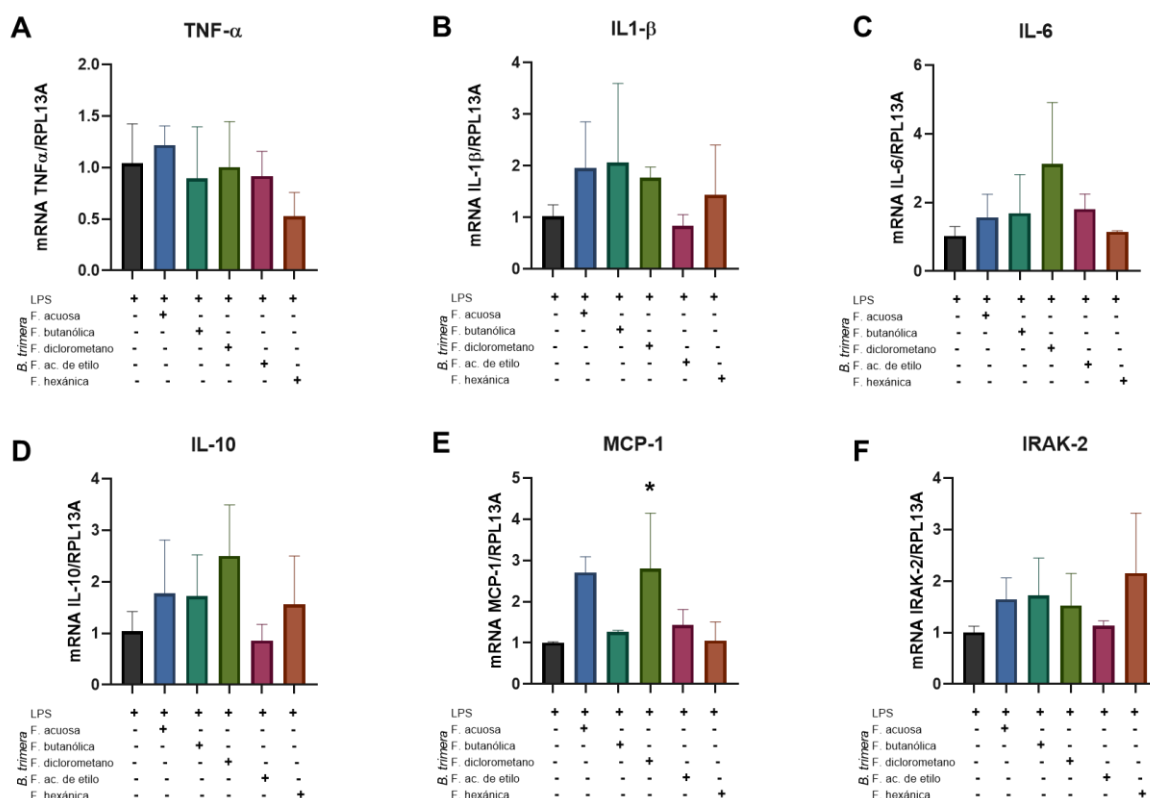


Figura 11. Efecto de fracciones del extracto metanólico de *B. trimera* sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1. Células THP-1 fueron pretratadas con DMSO o fracciones del extracto metanólico de *B. trimera* (10 μ g/mL) por 15 minutos y estimuladas con LPS (1 μ g/mL) por 4 h a 37°C y 5% CO₂. La expresión relativa de mRNA se determinó mediante RT-qPCR y el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizándose como normalizador RPL13A. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. n=3, ANOVA, post test de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

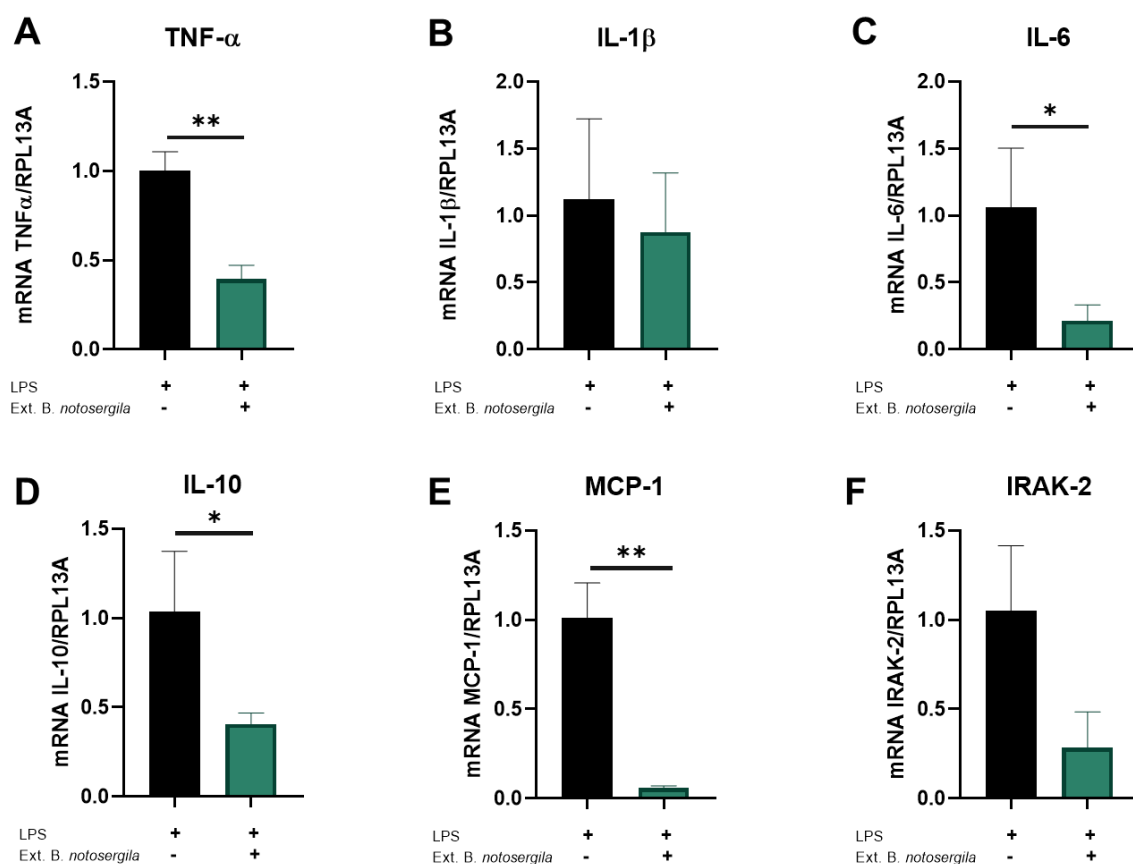


Figura 12. Efecto del extracto metanólico de *B. notosergila* sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1. Células THP-1 fueron pretratadas con DMSO o extracto metanólico de *B. notosergila* (50 μ g/mL) por 15 minutos y estimuladas con LPS (1 μ g/mL) por 4 h a 37°C y 5% CO₂. La expresión relativa de mRNA se determinó mediante RT-qPCR y el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizándose como normalizador RPL13A. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. n=3, T test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

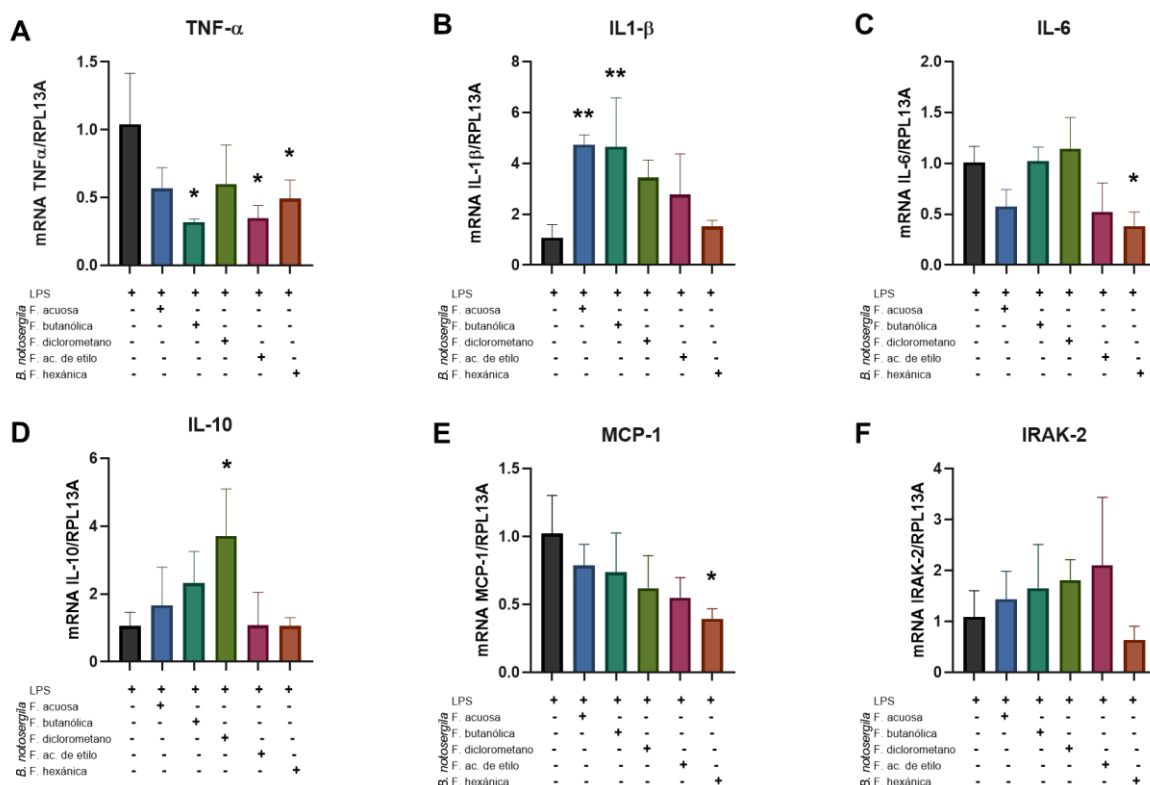


Figura 13. Efecto de fracciones del extracto metanólico de *B. notoserigila* sobre el nivel de expresión génica de citoquinas, quimocina MCP-1 e IRAK2 inducido por LPS en células THP-1. Células THP-1 fueron pretratadas con DMSO o fracciones del extracto metanólico de *B. notoserigila* (10 μ g/mL) por 15 minutos y estimuladas con LPS (1 μ g/mL) por 4 h a 37°C y 5% CO₂. La expresión relativa de mRNA se determinó mediante RT-qPCR y el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizándose como normalizador RPL13A. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. n=3, ANOVA, post test de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.4. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos de las especies en estudio sobre la vía de producción de óxido nítrico (NO) en células monocíticas humanas mediante la determinación del nivel de producción de NO y de expresión génica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Con el objetivo de evaluar el efecto de los extractos metanólicos y fracciones sobre la vía de producción de NO, se procedió primeramente a la estandarización de las condiciones adecuadas para llevar a cabo el ensayo.

Células THP-1 tipo monocito se trataron con DMSO en ausencia o presencia de 1 µg/mL de LPS. Análisis por qPCR mostraron valores de Ct muy altos y con poca diferencia entre las condiciones estimulada y no estimulada con LPS (**Tabla 3**). Se usaron dos pares de cebadores específicos para el gen iNOS, obteniéndose resultados similares con ambos. Por lo tanto, en células THP-1 tipo monocito el LPS indujo una expresión baja del gen iNOS.

Con base en estos resultados se decidió diferenciar a las células THP-1 al fenotipo macrófago utilizando acetato de forbol miristato (PMA) y estimularlas con 1 µg/mL de LPS, para así evaluar al fenotipo macrófago como modelo adecuado para el estudio de la vía del NO. Se buscó la detección de la enzima iNOS mediante *western blot*. Este análisis mostró una expresión similar de la proteína tanto en el grupo de células diferenciadas a macrófagos sin LPS como en aquellas estimuladas con el LPS (**Fig.14**).

Estos resultados tomados en conjunto indican que el modelo *in vitro* de células humanas THP-1 no es adecuado para el estudio de la vía de producción de NO en presencia del estímulo LPS, en coincidencia con lo reportado en el año 2021 por Ozleyen y cols. (49). Esto llevó a la búsqueda de otros modelos como alternativas, optando así por el modelo de esplenocitos murinos.

Esplenocitos murinos se pretrataron en presencia de DMSO o de cada uno de los extractos a la concentración de 50 µg/mL y posteriormente fueron estimulados con 10 µg/mL de LPS. Al cabo de las 18 h de incubación, se determinó la concentración de NO por el método de Griess.

Primeramente, se observó un aumento de la producción de NO estadísticamente significativo en células estimuladas con DMSO y LPS, en comparación con el control de células tratadas sólo con DMSO, indicativo de que el modelo de esplenocitos responde adecuadamente al estímulo LPS. (**Fig. 15**).

En cuanto a las células pretratadas con cada uno de los extractos metanólicos de las especies sometidas a estudio y estimuladas con LPS, se observó una disminución significativa de la concentración de NO, en comparación con las estimuladas con DMSO y LPS (**Fig. 15**). Los extractos de *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* (50 µg/mL) produjeron una reducción de la producción de NO inducido por LPS del 35,18%, 55,87% y 35,17%, respectivamente (**Anexo C**).

Tabla 3. Valores de Ct del gen iNOS en células THP-1 tratadas o no con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS

TRATAMIENTO	VALORES DE Ct (iNOS) 1	Valores de Ct (Normalizador)*
DMSO	33,51	20,52
DMSO + LPS	32,39	20,85

*gen de referencia: RPL13A

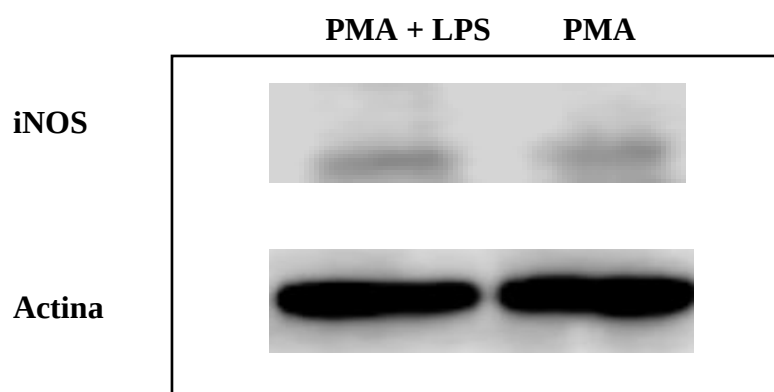


Figura 14. Análisis por *Western blot* de la enzima iNOS en células THP-1 tipo macrófago. Células THP-1 fueron tratadas con PMA por 48 h para inducir su diferenciación al fenotipo macrófago. Posteriormente se trataron en ausencia o presencia de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 18 h.

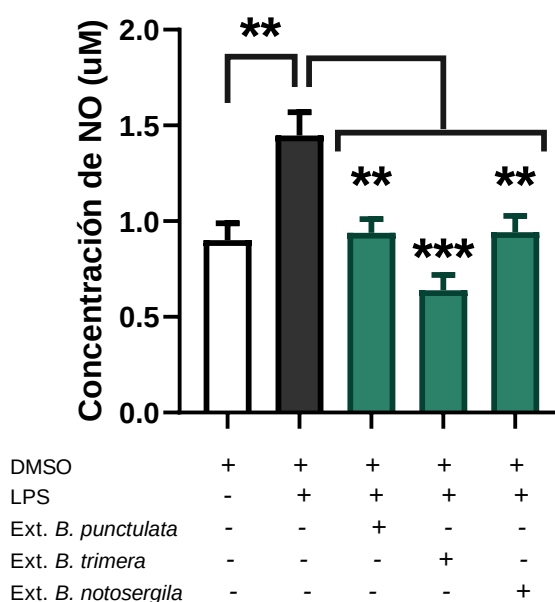


Figura 15. Efecto de los extractos metanólicos sobre el nivel de producción de NO inducido por LPS. Esplenocitos murinos fueron pretratados con DMSO o extracto metanólico (50 µg/mL) por 15 minutos y estimulados con LPS (10 µg/mL) por 18 h. Se midieron los niveles de NO producidos mediante ensayo de Griess. Las células tratadas con DMSO y LPS se utilizaron como control. n=3. ANOVA, post test de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5. DISCUSIÓN

La mayoría de los fármacos anti- inflamatorios o inmunomoduladores disponibles actualmente para uso clínico presentan efectos secundarios indeseables, por lo que existe un interés creciente en la búsqueda de nuevos compuestos que presenten esta actividad. El estudio de plantas de uso medicinal se presenta como relevante, ya que se ha reportado que diferentes constituyentes, que incluyen a flavonoides, polisacáridos, lactonas, alcaloides, diterpenoides y glicósidos, poseen actividad sobre el sistema inmune (50). La evaluación de la actividad de extractos y compuestos de origen vegetal sobre células del sistema inmune es un paso necesario para reconocer el potencial que presentan en el manejo de trastornos inflamatorios, infecciones y desórdenes inmunitarios (51).

Las plantas del género *Baccharis* son utilizadas popularmente para el tratamiento de heridas y úlceras, fiebre, infecciones, enfermedades gastrointestinales y como anti- inflamatorios, por lo que constituyen una fuente importante de compuestos con actividad inmunomoduladora (33).

Los monocitos son fagocitos mononucleares que participan en la generación de respuestas defensivas al ser rápidamente reclutados a los sitios de infección o inflamación ocasionados por agentes patógenos (52). Sin embargo, a pesar de que estas células están involucradas en la secreción de citoquinas y en la eliminación de agentes invasores como virus, bacterias y otros; una respuesta excesiva o inapropiada puede llevar al desarrollo de procesos patológicos como fibrosis hepática, aterosclerosis, esclerosis múltiple, entre otros. Debido a esto, representan un blanco terapéutico interesante en diversas enfermedades inflamatorias crónicas (26).

La línea celular THP-1 permite el estudio amplio de las funciones, mecanismos efectores y vías de señalización involucradas en las respuestas inmunes de los monocitos y macrófagos. Representa un modelo *in vitro* humano apropiado para el estudio de modulación de las actividades de estas células debido a la similitud que presentan en cuanto a sus respuestas con la fracción monocítica de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (53).

En este trabajo se evaluó la capacidad de los extractos metanólicos y fracciones de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notoserghila* de modular la respuesta inmune en células THP-1 frente al estímulo de LPS.

En primer lugar, se realizó una evaluación del efecto de los extractos y fracciones de las especies estudiadas sobre la viabilidad de las células THP-1. Concentraciones inferiores a 50 µg/mL del extracto metanólico de *B. punctulata* mantuvieron la viabilidad celular, mientras que las concentraciones por debajo de 100 µg/mL de los extractos de *B. trimera* y *B. notoserghila* no indujeron cambios en la viabilidad de las células THP-1 (**Fig. 3**). Estos resultados concuerdan con lo reportado en un trabajo publicado previamente por el equipo de investigación en células PBMC humanas (38).

Las fracciones diclorometánica y hexánica de las tres especies mostraron mayor capacidad citotóxica al reducir la viabilidad celular a la concentración de 100 µg/mL. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Abad y colaboradores en macrófagos peritoneales murinos al estudiar especies bolivianas de este género de plantas (54).

El LPS es el principal componente estructural presente en la membrana externa de bacterias gram- negativas, el cual es reconocido por los monocitos y macrófagos e induce la activación de estas células y la generación de respuestas pro-inflamatorias (55).

Los extractos de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* redujeron la concentración de sCD14 liberado en respuesta a LPS en las células THP-1 (**Fig. 6**). El CD14 es una glicoproteína que puede encontrarse anclada a membrana (mCD14) de células mieloides como monocitos o macrófagos, principalmente; o de forma soluble (sCD14) generada por escisión de la forma anclada a membrana por acción de proteasas o liberada a partir de *pooles* intracelulares (56). Ambas formas actúan como correceptor del LPS bacteriano unido a la proteína de unión a LPS (LBP) que finalmente activa la vía de transducción de señales del complejo del receptor tipo Toll 4 (TLR-4) y su proteína accesoria MD-2 (11). Se ha demostrado una disminución de los niveles de mCD14 expresados en monocitos y aumento de sCD14 posterior a la activación de monocitos, por lo que los niveles elevados de sCD14 son un reflejo de exposición a LPS y activación celular (11). *In vitro*, un exceso de sCD14 inhibe la unión de LPS a mCD14 y por lo tanto regula la activación celular y respuestas pro-inflamatorias desencadenadas por LPS (57).

En este trabajo se demostró que al estimular a las células THP-1 con LPS en ausencia de extractos, se indujo un aumento de la concentración de sCD14 en sobrenadante de cultivo, indicativo de activación celular (**Fig. 5**). El pretratamiento de las células con cada uno de los extractos metanólicos en combinación con LPS redujo en todos los casos los niveles de sCD14 producidos (**Fig. 6**). Esto podría deberse a que los extractos inhiben la activación celular al interactuar con alguno de los elementos de la vía de señalización del complejo TLR-4/MD-2, inhibiendo finalmente la activación de proteasas que escindan mCD14, y disminuyendo sCD14. Los resultados obtenidos muestran que los extractos metanólicos de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* podrían actuar como reguladores de la liberación de sCD14.

En un proceso inflamatorio, responden además células dendríticas, endoteliales y epiteliales, entre otras, que no expresan mCD14. Se ha demostrado que el sCD14 está involucrado en la activación de estas células vía TLR-4 (56), por lo que la disminución de su concentración mediada por los extractos metanólicos en estudio también influiría en la activación de células carentes de mCD14.

Una vez que los monocitos se activan en respuesta a LPS, se desencadena una respuesta pro- inflamatoria que induce la expresión de genes que codifican para mediadores inflamatorios como citoquinas y quimocinas. Las citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 son reconocidas como pro- inflamatorias, ya que promueven la inflamación (55).

TNF- α es producido principalmente por monocitos y macrófagos activados y presenta varios efectos pro- inflamatorios sobre varios tipos celulares; es un potente activador de macrófagos y estimula la expresión y producción de las citoquinas IL-1 β e IL-6, prostaglandina E2, moléculas de adhesión y factores de crecimiento para linfocitos B y T. Tanto TNF- α como IL-1 β son citoquinas relacionadas al desarrollo de desórdenes inflamatorios crónicos como artritis reumatoide. IL-6 es particularmente importante para estimular la producción de proteínas de fase aguda por el hígado (58).

La IL-10 media respuestas del tipo anti- inflamatorio y de regulación de la respuesta inmune, actuando principalmente en la contención de la respuesta inflamatoria para evitar una respuesta exacerbada que genere daño al huésped (55). Usualmente la producción de IL-10 se ve incrementada en monocitos activados por LPS, como un mecanismo para controlar la inflamación. De hecho, se ha asociado a la sepsis con una hiporreactividad de monocitos a LPS debido a la presencia de citoquinas anti- inflamatorias como IL-10 o el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (59).

MCP-1 es un potente quimioatrayente que regula la migración e infiltración de monocitos (60) y niveles elevados de esta quimocina se han relacionado con complicaciones relacionadas a la aterosclerosis, incluyendo accidente cerebrovascular, infarto miocárdico y mortalidad por enfermedades cardiovasculares (61), por lo que la identificación de algún antagonista obtenido de fuentes naturales como extractos vegetales podría prevenir la migración de monocitos al sitio de lesión y así contribuir al tratamiento de tales enfermedades.

En este estudio se demostró, primeramente, que el LPS es un estímulo inflamatorio que induce la expresión de las citoquinas pro- inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, además de la citoquina IL-10, la quimocina MCP-1 e IRAK-2 (**Fig.7**), demostrando el funcionamiento del modelo celular de inflamación *in vitro* utilizado.

En cuanto a la actividad de los extractos sobre este modelo, se encontró que el extracto metanólico de la especie *B. punctulata* redujo los niveles de expresión génica de IL-6 y MCP-1 (**Fig. 8**), indicando un efecto anti- inflamatorio. En el análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS) de los compuestos presentes en el extracto de *B. punctulata* se identificó la presencia de *trans*-phytol y ácido di-*O*-caffeoilquinico (**Anexo A**). Se ha reportado previamente la presencia de *trans*-phytol en otros miembros de este género (62) y su capacidad para inhibir la respuesta inmune al reducir la producción de citoquinas y el estrés oxidativo (63), por lo que este compuesto podría ser responsable del efecto observado.

Con el análisis de las fracciones del extracto de *B. punctulata* se detectó que las fracciones butanólica y diclorometánica, disminuyeron los niveles de mRNA de IL-6 y MCP-1 (**Fig. 9**), sugiriendo que compuesto/s presentes en estas fracciones son los responsables del efecto anti- inflamatorio observado. Adicionalmente, la fracción diclorometánica de esta especie redujo los niveles de mRNA de IL-1 β , IL-10 e IRAK-2, reforzando la hipótesis de la presencia de compuesto/s con actividad anti-inflamatoria.

El extracto metanólico de la especie *B. trimera* disminuyó los niveles de expresión génica inducida por LPS de IL-1 β , IL-6, IL-10 e IRAK-2 (**Fig. 10**). Esto indica actividad anti- inflamatoria del extracto.

En el extracto de *B. trimera* se identificó la presencia de los flavonoides apigenina y genkwanina (**Anexo A**). Apigenina ha demostrado disminuir la producción de las citoquinas pro- inflamatorias IL-6 e interferón gamma (IFN- γ) y aumentar los niveles de la citoquina anti- inflamatoria IL-10 en células humanas (64). Se ha reportado que genkwanina presenta también propiedades anti- inflamatorias, al ser capaz de reducir los niveles de secreción de IL-6 en macrófagos activados por LPS (65).

Al ensayar las fracciones de *B. trimera*, ninguna de ellas fue capaz de inducir cambios significativos sobre los niveles de mRNA producidos (**Fig. 11**). Esto podría deberse a que la mezcla compleja de compuestos de diferente naturaleza química presentes en el extracto metanólico actúa de forma sinérgica para modular la expresión de estos genes de la respuesta inflamatoria. Estos resultados son similares a lo observado con el extracto crudo de *B. dracunculifolia* y sus compuestos aislados sobre células HEp-2 (66).

Con respecto al extracto metanólico de *B. notoserghila*, este fue capaz de reducir los niveles de expresión inducido por LPS de TNF- α , IL-6, IL-10 y MCP-1 (**Fig. 12**), indicando un efecto anti- inflamatorio. Se identificó al flavonoide chrysoeriol en el extracto metanólico de esta especie (**Anexo A**), el cual es un flavonoide descrito con una actividad anti- inflamatoria moderada debido a que presenta una baja inhibición de la activación del factor NF-kB (67).

Las fracciones butanólica, de acetato de etilo y hexánica redujeron los niveles de mRNA de TNF- α . En cuanto a IL-6, es probable que la disminución observada en los niveles de mRNA se deba a algún compuesto presente en la fracción hexánica, ya que es la única que demostró capacidad de reducir los niveles de expresión de esta citoquina. A pesar de notarse una reducción significativa de los niveles de expresión de la citoquina anti- inflamatoria IL-10 por el extracto metanólico, llama la atención que la fracción diclorometánica aumentó sus niveles de expresión inducida por LPS. Esto podría deberse a una interacción entre los compuestos presentes en el extracto metanólico que inhibe la acción de el o los compuesto/s responsable/s de este aumento en la fracción diclorometánica. Así también, es probable que la disminución observada en los niveles de mRNA de MCP-1 por acción del extracto metanólico de *B. notoserghila* se deba principalmente a algún compuesto presente en la fracción hexánica (**Fig. 13**).

Tomados en conjunto, estos resultados indican que las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notoserghila* poseen actividad de disminuir la producción de mRNA de genes de la respuesta inmune inflamatoria.

El óxido nítrico (NO) es un importante mediador biológico y regulador de la inflamación. Cuando es sintetizado en respuesta a estímulos inflamatorios por la enzima iNOS, este se oxida rápidamente a nitrito o nitrato que actúan como moléculas efectoras de los monocitos en su tarea de destruir a agentes patógenos o células tumorales (68). Sin embargo, una liberación descontrolada puede también causar un daño o destrucción al propio tejido del huésped. Una inhibición de la actividad enzimática de iNOS o una regulación a la baja de la expresión de esta enzima podría ser beneficiosa para el tratamiento de patologías que cursan con el desarrollo de procesos inflamatorios (69).

Existe discrepancia en cuanto a reportes realizados sobre la vía de producción de NO en células monocíticas humanas. Autores como Kim y cols. (70) reportaron la expresión de la enzima iNOS y su modulación por el extracto de *Orostachys japonicus* en células THP-1, mientras que otros autores han indicado ser incapaces de detectar la expresión de iNOS en el modelo de células monocíticas activadas por LPS (39).

Esta discrepancia encontrada al realizar la búsqueda bibliográfica planteó en primer lugar la necesidad de estandarizar los ensayos para obtener un modelo *in vitro* útil para llevar a cabo las observaciones sobre la vía de producción del NO.

Se evaluó la utilidad de los modelos *in vitro* tanto de células THP-1 tipo monocito como diferenciadas al tipo macrófago. Se detectaron valores de Ct muy altos para mRNA de iNOS en células THP-1 tipo monocito. El análisis por *western blot* reforzó estas observaciones al detectarse poca expresión de la proteína en macrófagos tratados o no con LPS, notándose poca diferencia entre ambas condiciones. Estos resultados muestran que el modelo de THP-1 no es el más adecuado para el estudio de la vía del NO. Estos resultados coinciden con los reportados recientemente en el año 2021, en que se reportan Ct similares a los encontrados en este estudio en células THP-1 tanto tratadas o no con LPS (49).

Estos resultados podrían deberse a la baja expresión de la enzima iNOS y en consecuencia baja síntesis del producto NO en células humanas en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS debido a una regulación epigenética alrededor del sitio de inicio de transcripción de iNOS, lo que dificulta su detección en la línea celular THP-1 (71).

Las células murinas son capaces de aumentar los niveles de expresión de la enzima iNOS y producir cantidades detectables de NO en respuesta a estímulos inflamatorios, por lo que pueden servir como un modelo adecuado para evaluar el efecto de los extractos metanólicos sobre la actividad de iNOS y producción de NO (72).

Se observó una disminución de la concentración de NO en esplenocitos murinos tratados con los extractos y estimuladas con LPS en comparación con las estimuladas con LPS solamente (**Fig. 15**), indicando así actividad anti- inflamatoria de los extractos estudiados

Se ha relacionado al factor de transcripción NF-kB en la regulación transcripcional de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α e iNOS, mientras que AP-1 se asocia con la regulación de IL-8 y también TNF- α . La expresión de IL-10 está regulada por el factor de transcripción SP-1 (39). Aunque en este trabajo no se evaluó la activación de factores de transcripción, es posible que los compuestos presentes en los extractos metanólicos y fracciones interfieran con la vía del NF-kB. Algunos agentes anti-inflamatorios como dexametasona, prednisona y aspirina han sido asociados con la represión, total o parcial, de esta vía (59).

En conclusión, este trabajo demostró que las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notoserigila* inhiben la producción de productos relacionados con la respuesta inflamatoria, por lo tanto, poseen actividad anti- inflamatoria *in vitro* sobre células monocíticas humanas.

6. CONCLUSIONES

1. La viabilidad celular en células monocíticas humanas se mantiene hasta la concentración de 50 µg/mL del extracto metanólico de *B. punctulata*, y hasta la concentración de 100 µg/mL de los extractos de *B. trimera* y *B. notosergila*. Las fracciones diclorometánica y hexánica de las tres especies reducen la viabilidad celular a la concentración de 100 µg/mL.
2. Los extractos de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* poseen actividad anti- inflamatoria *in vitro* sobre células monocíticas humanas al reducir la concentración de sCD14 liberada en respuesta a LPS.
3. Las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* poseen actividad anti-inflamatoria *in vitro* sobre células monocíticas humanas al disminuir el nivel de expresión de mRNA de genes de la respuesta inmune inflamatoria.
El extracto metanólico de la especie *B. punctulata* reduce los niveles de expresión génica de IL-6 y MCP-1, siendo las responsables de esta disminución las fracciones butanólica y diclorometánica. El extracto metanólico de la especie *B. trimera* disminuye los niveles de expresión génica inducida por LPS de IL-1 β , IL-6, IL-10 e IRAK-2; mientras que el extracto metanólico de *B. notosergila* es capaz de reducir los niveles de expresión inducida por LPS de TNF- α , IL-6, IL-10 y MCP-1.
4. Los extractos metanólicos de las especies *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. notosergila* poseen actividad anti- inflamatoria *in vitro* al ser capaces de disminuir la producción de NO en esplenocitos murinos estimulados con LPS.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ma W, Gao F, Gu K, Chen D. The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases : A Comprehensive Review. *Front Immunol.* 2019;10(1140):1–24.
2. Chiu S, Bharat A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Curr Opin Organ Transpl.* 2016;21(3):239–45.
3. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):392–404.
4. Guillemins M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 2018;49(4):595–613.
5. Jakubzick C V., Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(6):349–62.
6. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Cioocca A, Campisi L, et al. Blood monocytes: Distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(5):398–408.
7. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2019;10(2035):1–13.
8. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017;12(4):1–20.
9. Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med.* 2015;4(5).
10. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweer M, et al. LPS-Induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):379–446.
11. Shive CL, Jiang W, Anthony DD, Lederman MM. Soluble CD14 is a

- nonspecific marker of monocyte activation. *Aids*. 2015;29(10):1263–5.
12. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145–51.
 13. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. Vol. 7, *Journal of Endotoxin Research*. 2001. 167–202 p.
 14. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002;4(9):903–14.
 15. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesth Clin*. 2007;45(2):27–37.
 16. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):1–31.
 17. Filella X, Molina R, Ballesta A. Estructura y función de las citocinas. *Med Integr*. 2003;39(2):63–71.
 18. de Oliveira C, Sakata R, Issy A, Gerola L, Salomao R. Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(2):137–42.
 19. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;
 20. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007;15(6):252–9.
 21. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001;15(5):831–45.
 22. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1397–406.
 23. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51(3):443–52.
 24. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides : Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol*. 2006;6:317–33.

25. Hirose S, Lin Q, Ohtsuji M, Nishimura H, Verbeek JS. Monocyte subsets involved in the development of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Int Immunol*. 2019;31(11):687–96.
26. Karlmark K, Tacke F, Dunay I. Monocytes in health and disease — Minireview. *Eur J Microbiol Immunol*. 2012;2(2):97–102.
27. Yeap SK, Rahman MBA, Alitheen NB, Ho WY, Omar AR, Beh BK, et al. Evaluation of immunomodulatory effect: Selection of the correct targets for immunostimulation study. *Am J Immunol*. 2011;7(2):17–23.
28. Choudhury SS, Bashyam L, Manthapuram N, Bitla P, Kollipara P, Tetali SD. *Ocimum sanctum* leaf extracts attenuate human monocytic (THP-1) cell activation. *J Ethnopharmacol*. 2014;154(1):148–55.
29. Allen-hall L, Cano P, Arnason JT, Rojas R, Lock O, Lafrenie RM. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 β and TNF- α . *J Ethnopharmacol*. 2007;109:312–7.
30. Varma RS, Guruprasad KP, Satyamoorthy K, Kumar S, Babu UV, Patki SP. IM-133N modulates cytokine secretion by RAW264 . 7 and THP-1 cells. *J Immunotoxicol*. 2016;13(2):217–25.
31. Buenz EJ, Verpoorte R, Bauer BA. The Ethnopharmacologic Contribution to Bioprospecting Natural Products. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2018;58(19):1–22.
32. Campos FR, Bressan J, Godoy V, Zuccolotto T, Silva LE da, Bonancio L. *Baccharis* (*Asteraceae*): Chemical Constituents and Biological Activities. *Chem Biodivers*. 2016;13:1–17.
33. Abad M, Bermejo P. *Baccharis* (*Compositae*): a review update. *Arkivoc*. 2007;(7):76–96.
34. Gonzaga L, Costa I, Pizzolatti M. Género *Baccharis* (*Asteraceae*): Aspectos químicos, económicos e biológicos. *Quim Nova*. 2005;28(1):85–94.
35. Pérez- Cano F, Castell M. Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients*. 2016;8–11.
36. Peluso I, Miglio C, Morabito G, Ioannone F, Serafini M. Flavonoids and

- Immune Function in Human : A Systematic Review. Food Sci Nutr. 2015;55(3):383–95.
37. Ribeiro VP, Arruda C, El-salam MA, Kenupp Bastos J. Brazilian medicinal plants with corroborated anti- inflammatory activities : a review. Pharm Biol. 2018;56(1):253–68.
 38. Burgos C, Alvarenga N, Villalba I, Giménez V, Carpinelli MM. Extractos vegetales de tres especies del género *Baccharis* inducen la proliferación de células mononucleares humanas. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2018;16(2):12–20.
 39. Chanput W, Mes J, Vreeburg RAM, Savelkoul FJ, Wichers HJ. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages : a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. Food Funct. 2010;1:254–61.
 40. Yamada S, Kotake Y, Demizu Y, Kurihara M, Sekino Y, Kanda Y. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. Sci Rep. 2014;4:1–8.
 41. Millán-linares C, Bermúdez B, Yust M, Millán F, Pedroche J. Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L .) protein hydrolysates in THP-1- derived macrophages. J Funct Foods. 2014;8:224–33.
 42. Yoon YK, Woo HJ, Kim Y. *Orostachys japonicus* inhibits expression of the TLR4, NOD2, iNOS, and COX-2 genes in LPS-stimulated human PMA-differentiated THP-1 cells by inhibiting NF- B and MAPK activation. Evidence-based Complement Altern Med. 2015;2015:1–10.
 43. Wolf K, Schulz C, Riegger GAJ, Pfeifer M. Tumour necrosis factor- α induced CD70 and interleukin-7R mRNA expression in BEAS-2B cells. Eur Respir J. 2002;20(2):369–75.
 44. Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BMJ, et al. IL-10 Induces IL-10 in Primary Human Monocyte-Derived Macrophages via the Transcription Factor Stat3. J Immunol. 2007;178(8):4779–85.
 45. Wang H, Yi T, Zheng Y, He S. Induction of monocyte chemoattractant

- protein-1 release from A549 cells by agonists of protease-activated receptor-1 and -2. *Eur J Cell Biol.* 2007;86(4):233–42.
46. Jiang ZL, Fletcher NM, Diamond MP, Abu-Soud HM, Saed GM. Hypoxia regulates iNOS expression in human normal peritoneal and adhesion fibroblasts through nuclear factor kappa B activation mechanism. *Fertil Steril.* 2009;91(2):616–21.
 47. Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Maurya R. Leptin induces the phagocytosis and protective immune response in *Leishmania donovani* infected THP-1 cell line and human PBMCs. *Exp Parasitol.* 2016;160:54–9.
 48. Lund ME, To J, Brien BAO, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods.* 2016;6–12.
 49. Ozleyen A, Berkay Y. Dataset on the differentiation of THP-1 monocytes to LPS inducible adherent macrophages and their capacity for NO / iNOS signaling. *Data Br.* 2021;35:106786.
 50. Jantan I, Ahmad W, Bukhari SNA. Plant-derived immunomodulators: An insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Front Plant Sci.* 2015;6(AUG):1–18.
 51. Nworu CS, Temchura V, Okoye FBC, Akah P a, Esimone CO, Uberla K. Activation of murine lymphocytes and modulation of macrophage functions by fractions of *Alchornea cordifolia* (*Euphorbiaceae*) leaf extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010;32(1):28–36.
 52. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 2018;49(4):595–613.
 53. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014;1–9.
 54. Abad MJ, Bessa AL, Ballarin B, Aragón O, Gonzales E, Bermejo P. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (*Compositae*). *J Ethnopharmacol.* 2006;103:338–44.
 55. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human

- monocytes. *Cell Signal*. 2001;13:85–94.
56. Landmann R, Müller B, Zimmerli W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect*. 2000;2(3):295–304.
 57. Nita IM, Serapinas D, Janciauskiene SM. a 1-Antitrypsin regulates CD14 expression and soluble CD14 levels in human monocytes in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1165–76.
 58. Rhule A, Navarro S, Smith JR, Shepherd DM. *Panax notoginseng* attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol*. 2006;106(1):121–8.
 59. Finato AC, Fraga-Silva TF, Carvalho Prati A, Alves de Souza A, Fonseca Mazzeu B, Gaspareto Felipe L, et al. Crude leaf extracts of *Piperaceae* species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. *PLoS One*. 2018;13(6):1–14.
 60. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res*. 2009;29(6).
 61. Gusman GS, Campana PRV, Castro LC, Castilho RO, Teixeira MM, Braga FC. Evaluation of the effects of some Brazilian medicinal plants on the production of TNF- α and CCL2 by THP-1 cells. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2015;2015.
 62. Suitisri R, Kinghorn AD, Wrrghrt AD, Stichert O. Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. *Phytochemistry*. 1994;35(2):443–6.
 63. O Silva R, Sousa F, Damasceno S, Carvalho N, Silva V, Oliveira F, et al. *Phytol*, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013;28(4):455–64.
 64. Ginwala R, Bhavsar R, Moore P, Bernui M, Singh N, Bearoff F, et al. Apigenin Modulates Dendritic Cell Activities and Curbs Inflammation Via RelB Inhibition in the Context of Neuroinflammatory Diseases. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2020;

65. Gao Y, Liu F, Fang L, Cai R, Zong C, Qi Y. Genkwanin inhibits proinflammatory mediators mainly through the regulation of miR-101/MKP-1/MAPK pathway in LPS-activated macrophages. PLoS One. 2014;9(5):1–10.
66. Búfalo M, Candeias J, Sousa J, Bastos J, Sforcin J. *In vitro* cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. Nat Prod Res Former Nat Prod Lett. 2010;24(18):1710–8.
67. Xie C, Kang J, Li Z, Schauss AG, Badger TM, Nagarajan S, et al. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: Blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. J Nutr Biochem. 2012;23(9):1184–91.
68. Naseri N, Kalantar K, Amirghofran Z. Anti-inflammatory activity of *Echium amoenum* extract on macrophages mediated by inhibition of inflammatory mediators and cytokines expression. Res Pharm Sci. 2018;13(1):73–81.
69. Saad B, AbouAtta BS, Basha W, Hmade A, Kmail A, Khasib S, et al. *Hypericum triquetrifolium* - Derived factors downregulate the production levels of LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α in THP-1 cells. Evidence-based Complement Altern Med. 2011;2011.
70. Kim Y Il, Park SW, Yoon YK, Lee KW, Lee JH, Woo HJ, et al. *Orostachys japonicus* inhibits the expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA and modulates the expression of iNOS and COX-2 genes in human PMA-differentiated THP-1 cells via inhibition of NF- κ B and MAPK activation. Mol Med Rep. 2015;12:657–62.
71. Gross TJ, Kremens K, Powers LS, Brink B, Knutson T, Domann FE, et al. Epigenetic Silencing of the Human NOS2 Gene: Rethinking the Role of Nitric Oxide in Human Macrophage Inflammatory Responses. J Immunol. 2014;192.
72. Naureckiene S, Edris W, Ajit SK, Katz AH, Sreekumar K, Rogers KE, et al. Use of a murine cell line for identification of human nitric oxide synthase inhibitors. J Pharmacol Toxicol Methods. 2007;55(3):303–13.

8. ANEXO A

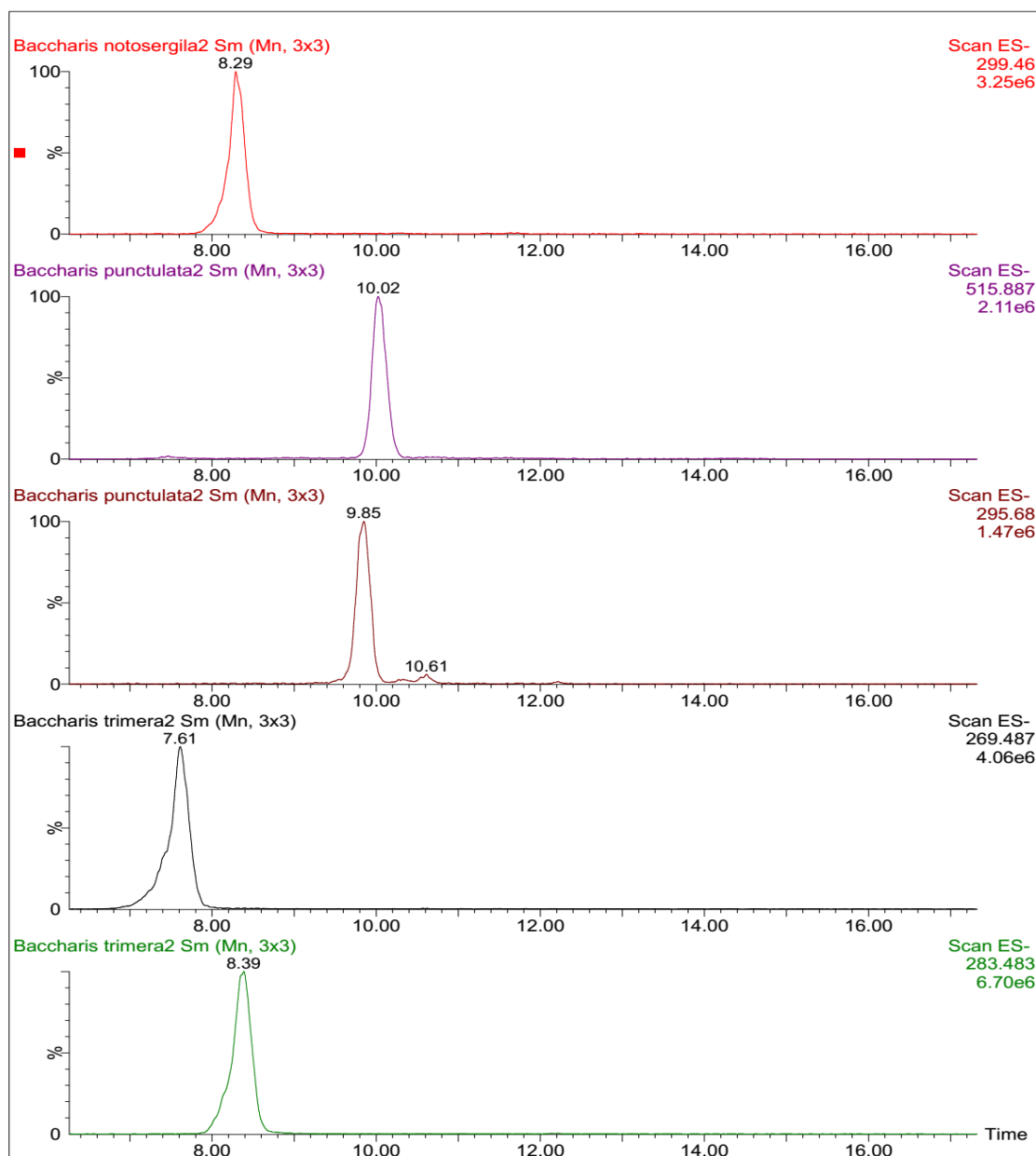


Figura A1. Análisis por LC-MS de extractos *Baccharis*: *B. notoserigila* (chrysoeriol, pico a 8.29 min y a m/z 299.46 molecular ion $[M-H]^-$), *B. punctulata* (*trans*-phytol y di-*O*-caffeoylquinic acid, dos picos con RT de 9.85 y 10.02 min, respectivamente y m/z 295.68 y 515.89 molecular ions $[M-H]^-$), *B. trimera* (apigenin y genkwanin, dos picos con RT de 7.61 y 8.39 min, respectivamente y sus molecular ions de m/z 269.48 y 283.48 $[M-H]^-$). Realizado por el Departamento de Fitoquímica, FCQ, UNA.

ANEXO B

Tabla A1. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos de las especies en estudio sobre la producción de CD14 soluble inducida por LPS en células monocíticas humanas.

Estímulo	Promedio Concentración de sCD14 (pg/mL)	Desviación estándar	% reducción Control: (DMSO + LPS)	valor de p
Control DMSO	651,30	1.15		
Control DMSO + LPS (1 µg/mL)	5103,60	372,59		
<i>B. punctulata</i> (10 µg/mL) + LPS (1 µg/mL)	1773,0	300,18	65,26	<0,001
<i>B. punctulata</i> (50 µg/mL) + LPS (1 µg/mL)	625,93	44,64	87,74	<0,001
<i>B. trimera</i> (10 µg/mL) + LPS (1 µg/mL)	2383,0	268,23	53,31	<0,001
<i>B. trimera</i> (50 µg/mL) + LPS (1 µg/mL)	545,67	51,24	89,31	<0,001
<i>B. notosergila</i> (10 µg/mL) + LPS (1 µg/mL)	2798,0	134,50	45,18	<0,001
<i>B. notosergila</i> (50 µg/mL) + LPS (1 µg/mL)	1122,93	437,84	78,00	<0,001

% de producción de sCD14 normalizado= sCD14 células estimuladas (extractos + LPS) * 100/ sCD14 células control (DMSO + LPS)

% de reducción de sCD14 inducido por LPS= 100 - % de producción de sCD14 normalizado

ANEXO C

Tabla A2. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre el nivel de producción de NO inducido por LPS en esplenocitos murinos.

Estímulo	Promedio Concentración de NO (μ M)	Desviación estándar	% reducción Control: (DMSO + LPS)	valor de p
Control DMSO	0,901	0,15		
Control DMSO + LPS (10 μ g/mL)	1,45	0,21		
<i>B. punctulata</i> (50 μ g/mL) + LPS (10 μ g/mL)	0,94	0,12	35,18	0,008
<i>B. trimera</i> (50 μ g/mL) + LPS (10 μ g/mL)	0,64	0,14	55,87	0,0003
<i>B. notosergila</i> (50 μ g/mL) + LPS (10 μ g/mL)	0,94	0,15	35,17	0,009

% de producción de NO normalizado= NO células estimuladas (extractos + LPS) * 100/ NO células control (DMSO + LPS)

% de reducción de NO inducido por LPS= 100 - % de producción de NO normalizado