



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE DOCENCIA

JEFATURA DE POSGRADO

**IDENTIFICACIÓN DE LAS SUBFRACCIONES EFECTIVAS
DEL EXTRACTO ACETATO DE ETILO DE *Bidens odorata*
EN CÉLULAS DE LA ARTICULACIÓN SINOVIAL CON
PERFIL INFLAMATORIO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR

P R E S E N T A

BIÓLOGA: GABRIELA CASTRO MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO, MAYO DEL 2018

El presente trabajo se realizó en Enero del 2016 a Diciembre del 2017 en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en el laboratorio de Inflamación y enfermedades crónicas degenerativas dirigido por la Dra. Gabriela Rosas Salgado y en el laboratorio de Fitoquímica del Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur (IBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) dirigido por el Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

Esta tesis fue dirigida por la Dra. Gabriela Rosas Salgado y asesorada por la M. en C. Celeste Trejo Moreno y el Dr Alejandro Zamilpa Álvarez

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dra. Gabriela Castañeda Corrales

Dra. Angélica Santana Calderón

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dra. Gabriela Castañeda Corrales

Dra. Angélica Santana Calderón

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

Esta tesis conto con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de posgrado con número de registro 19318, así como el apoyo económico para una estancia de Investigación en el Institute of Inflammation and Ageing (IIA) de la Universidad de Birmingham Inglaterra, dirigido por el Dr. Rowan Hardy a través del proyecto FOMIX 224236 "Apoyo y fortalecimiento del núcleo académico, base y de funcionalidad y permanencia de la Maestría en Medicina Molecular en el PNPC" en el rubro de "estancias académicas aparcipantes".

Dedicatoria

A Luis Fernando Castro Martínez

Te has convertido en un ángel, y como lo hiciste en vida, seguirás iluminando mi camino hacia lo mejor que me espera en la vida. Fuiste un gran ejemplo y tu perseverancia en la vida es digna de imitar.

Descansa en paz Hermano

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gabriela Rosas Salgado, por toda la confianza, apoyo, amistad, consejos, tiempo y enseñanzas. Gracias a usted por ser una gran Directora de tesis y compartir conmigo sus experiencias y conocimientos. A mi tutora personal, Dra. Gabriela Castañeda Corrales, gracias por el apoyo que me brindó desde el inicio del curso propedéutico y durante la maestría. Siempre estaré agradecida por los consejos y observaciones que hizo para mi desarrollo académico. Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, gracias por compartir sus conocimientos en fitoquímica así como , el tiempo, espacio y material que me proporcionó para el desarrollo de esta tesis. Dr. Enrique Jiménez Ferrer, agradezco todo el apoyo académico que me ha brindado desde el inicio de esta historia académica. Dra. Angelica Santana Calderón, le agradezco infinitamente todas las observaciones que me hizo a lo largo de mi trabajo de maestría , así como el apoyo brindado para mi crecimiento profesional. Dr. Joel Gerardo Barrita Cruz, gracias por estar siempre presente en cada uno de mis tutorales y por las observaciones que me realizo para mejorar académicamente. A mis padres por su apoyo, pero especialmente a mi madre Cenobia Martínez por comprender que a veces no había tiempo para compartir fechas especiales. Gracias a mis compañeros de laboratorio: Zimri, Paty, Marisol, Laura, Christian, Alejandro y Ricardo por su apoyo en los experimentos, pero especialmente quiero agradecer a: Ana Luisa Ocampo, Julieta Hernández, Brenda Hernández y Celeste Trejo por estar siempre presentes en mis experimentos. A mis amigos: Erika, Cit, Dulce, Ricardo, Luicito, yomari, Jorge, Paty, Mariela, Oscar y Cesar. A ti M. Antonio que siempre conte con tu apoyo incondicional de inicio a fin. A los Doctores y personal técnico que labora en la Facultad de Medicina, Dr. Gerardo Arrellin, M. en C. Juan Carlos Villegas. A los técnicos del CIBIs, Arturo Pérez y Jonathan Orduño.

Mil gracias a todos.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	VIII
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Artritis reumatoide.....	1
2.1.1 Epidemiología de la Artritis reumatoide	1
2.2 Articulaciones Sinoviales.....	2
2.2.1 Membrana Sinovial	4
2.3 Aspectos Inflamatorios y Crónico Degenerativos de la Artritis Reumatoide.....	6
2.3.1 Interleucinas Proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-17 Y TNF- α en el Curso de la Enfermedad	8
2.4 Tratamientos Convencionales.....	10
2.5 Tratamientos Alternos.....	13
2.5.1 Antecedentes del extracto acetato de etilo de <i>Bidens pilosa</i> para controlar la Inflamación asociada a la AR	14
2.5.2 <i>Bidens odorata</i>	20
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4 HIPÓTESIS.....	25
5 OBJETIVO.....	25
5.1 Objetivos Particulares	25
6 MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Obtención de la planta (<i>Bidens odorata</i>).....	26
6.2 Obtención de FAEBo.....	26
6.2.2 Determinación del perfil fotoquímica de las subfracciones de la FAEBo por Cromatografía en Capa Fina	27
6.2.2.1 Determinación del perfil fitoquímico de las reuniones por Cromatografía en Capa Fina	28
6.3 Animales de Experimentación	29

6.3.1	Grupos experimentales.....	29
6.3.2	Inducción de inflamación por aplicación tópica de TPA	30
6.3.2.1	Valoración de edema	30
6.3.2.2	Cuantificación de células sanguíneas.....	31
6.4	HPLC del extracto HA-Bo, FAEBo y FAEBo-R5	31
6.4.1	Obtención de las subfracciones de FAEBo-R5	32
	Evaluación antiinflamatoria de la FAEBO-R5 y de las subfracciones FAEBoR5-Sf20, FAEBoR5-Sf23, FAEBoR5-Sf30 Y FAEBoR5-Sf33 en la expresión de IL-6 por células de la membrana sinovial en estado proinflamatorio	33
6.5.1	Inducción de la inflamación articular rotuliana.....	34
6.5.2	Evaluación conductual	34
6.5.3	Aislamiento de células de la membrana sinovial	35
6.5.3.1	Incubación de las células de la membrana sinovial con FAEBo-R5 y sus subfracciones.....	36
6.5.3.2	Evaluación del tratamiento más efectivo para el control de la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α en medio de cultivo por ELISA	36
6.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
7	RESULTADOS.....	39
7.1	Los Flavonoides son los Principales Componentes de las Subfracciones de la FAEBo	39
7.2	HABo, FAcBO, FAEBo, FAEBo-R1 Y FAEBo-R5 controlan el edema auricular inducida por TPA en ratón.....	43
7.2.1	El Edema se relaciona con el porcentaje de neutrófilos en Circulación	45
7.3	Los acetilenos y las flavonas son los principales componentes de la FAEBo-R5.....	47
7.4	FAEBo-R5 fue más eficiente que sus subfracciones para el control de la expresión de IL-6 en células proinflamatorias de la articulación sinovial	53
7.5	FAEBo-R5 controla la expresión de IL-1 β E IL-17 pero no TNF α en células proinflamatorias de la articulación sinovial.....	57
8	DISCUSIÓN	59
9	CONCLUSIONES	63
10	REFERERENCIAS	64

11 ANEXOS75

1. RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica, inflamatoria y sistémica que afecta principalmente las articulaciones sinoviales. El proceso inflamatorio se da por la infiltración de células inflamatorias a la membrana sinovial, células que en conjunto participan en la generación de hiperplasia, angiogénesis y a la destrucción y degradación del cartílago y hueso, generando una discapacidad física que está asociada a un dolor e inflamación. En México se ha reportado entre un 0.4 a 1.6%, siendo el principal motivo de consulta en el Servicio de Reumatología. Hasta ahora no se ha encontrado cura para esta enfermedad, por lo cual los tratamientos convencionales están dirigidos a disminuir el dolor, la inflamación y el progreso de la enfermedad. Para que los pacientes obtengan estos tratamientos deben tener los recursos económicos, las redes de apoyo y el conocimiento de la patología. Los tratamientos para reducir las manifestaciones clínicas de la AR presentan efectos adversos como: hepatotoxicidad, náuseas, vómitos, inmunodeficiencia y en algunos casos linfoma. En un estudio preliminar, *Bidens odorata* Cav (Asteraceae), mostro tener propiedades antiinflamatorias al reducir el edema auricular en un modelo murino de TPA. El objetivo de este trabajo fue determinar *in vivo* el potencial antiinflamatorio de los extractos de *Bidens odorata* e Identificar *in vitro* las subfracciones efectivas provenientes de la FAEBo que controlan el estado proinflamatorio de células de la articulación sinovial provenientes de ratones con inflamación articular. Para esto, primero evaluamos la capacidad antiinflamatoria de la FAEBo y subfracciones en el modelo de Inflamación auricular murino inducido por TPA, usando como control positivo dexametasona. Evaluamos HA-Bo, FAcBo, FAEBo, FAEBo -R1 y R5 para inhibir el edema auricular, la FAEBo-R5 mostro tener el mejor efecto al inhibir el edema auricular en todas sus concentraciones evaluadas. La mejor concentración fue de 0.2 mg /oreja al inhibir en un 86 % el efecto del TPA mientras que dexametasona lo inhibio en un 40% a una concentración de 40 µg/oreja. Posteriormente la FAEBo-R5 fue subfraccionado para evaluar *in vitro* su capacidad antiinflamatoria en células provenientes de ratones con inflamacion articular. De este subfraccioanmiento se evaluaron 4 Sf (Sf20,23,30,33) además de la FAEBo-R5. Los resultados de esta evaluación indicaron que las moléculas presentes en el FAEBo-R5 tiene el mejor efecto

antiinflamatorio al disminuir la concentración de IL-6 , IL-1 β , y IL-17 mostrando el mejor efecto en la concentración de 0.08 μ g/ml, sin embargo en ninguna de sus concnentraciones logro disminuir la expresión de TNF- α comparado con TPA. Estos resultados evidencian que *Bo* si ejerce un fecto antiinflamatorio en la inflamación aguda y crónica. Un estudio previo a este (Zapata 2017) indico que un extracto etanolico de *Bo* redujo la inflamación inducida por TPA. Con estos resultados concluimos que la FAEBo-R5 tiene efecto antinflamatorio en el modelo de inflamación auricular inducido por TPA y en células de la articulación sinovial con perfil proinflamatorio.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica, inflamatoria y sistémica que afecta principalmente las articulaciones sinoviales y se caracteriza por una inflamación sistémica persistente de alto grado.^{27,4,6,43} En esta patología, la membrana sinovial juega un papel importante, ya que en ella se inicia el proceso inflamatorio.^{30,43} El proceso inflamatorio se da por la infiltración de células inflamatorias a la membrana sinovial. En la membrana sinovial, las células infiltrantes consisten en macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas (CD) y células NK,⁷⁶ que en conjunto conducen al crecimiento del tejido sinovial por el aumento de células (hiperplasia), al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) a la destrucción y degradación del cartílago y hueso por la síntesis de colágeno y proliferación de los sinoviocitos de tipo fibroblastos que conduce a la formación de un tumor conocido como pannus, que crece e invade tejidos cercanos generando la deformación de la articulación sinovial, y por lo tanto discapacidad física severa asociada a dolor e inflamación.^{87,55,86,25,31,45,80}

2.1.1 Epidemiología de la Artritis reumatoide

La AR afecta entre el 0,2% y el 5% de la población a nivel mundial.²⁰ Se presenta una incidencia anual del 0.02-0.05% y una relación mujeres: hombres de 3:1, la edad de inicio es entre los 40 y 50 años, pero puede presentarse a cualquier edad.^{58,6,32,40,81} La etiología de la AR aún se desconoce, sin embargo, entre los factores de riesgo asociados con el desarrollo de la AR se encuentran: factores ambientales como el tabaquismo e infecciones por microorganismos, el sexo femenino, la edad y la base genética como la presencia del epítipo HLA DRB 1 (más del 80% de pacientes con AR lo presentan).^{87,58,6,32,40,81} Durante el primer año de enfermedad, los costos atribuibles a la AR por paciente podrían alcanzar los 23.441 dólares, sumado a que después de algunos años el 40% de estos pacientes sufrirá de discapacidad física y por lo tanto discapacidad laboral.^{57,20} En los estudios realizados sobre prevalencia de la AR en el mundo, se encontró que el porcentaje varía poco entre países, En México se ha reportado entre un 0.4 a 1.6%, siendo el principal motivo de consulta en el

Servicio de Reumatología.^{58,34} En Norteamérica, datos de Canadá y Estados Unidos informan prevalencias entre el 0,8 y 1,1% aunque con incrementos en poblaciones especiales como nativos americanos, entre los cuales los estudios reportan prevalencias hasta del 5,3%. En Europa, en países como Inglaterra, Holanda, Finlandia, Suecia y Dinamarca se encuentran datos de prevalencia entre el 0,5 y el 1%, un poco más elevados que los países localizados al sur-oriental de este continente y los reportados en Asia y África, en donde la prevalencia se encuentra entre el 0,15 y el 0,35% con excepción de la república del Congo que presenta una prevalencia del 0,9%. En Latinoamérica hay estudios de prevalencia realizados en Argentina y en Brasil donde esta ha sido reportada en el 0,9 y el 0,45%, respectivamente.^{20,2}

2.2 Articulaciones Sinoviales

Las articulaciones sinoviales se encuentran entre los huesos de las extremidades superiores e inferiores y están formadas por el cartílago articular, estructuras intraarticulares de cartílago fibroso (discos articulares, rodetes articulares, y en ocasiones, almohadillas adiposas), estructuras accesorias (ligamentos, meniscos, bolsas y tendones), la cápsula articular y la cavidad articular.^{26,53,18,55} El cartílago articular permite la movilidad de los huesos conectados sin hacer contacto entre ellos y soporta fuertes tensiones mecánicas^{21,28,55}; está conformado por condrocitos rodeados por una matriz cartilaginosa extracelular y por una capa profunda de fibras de colágeno tipo II nutriéndose a través del líquido sinovial.⁵⁵ El cartílago carece de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos.^{44, 15,16} Los discos articulares se unen a la cápsula fibrosa y son capas de fibrocartílago que se disponen entre un hueso y otro dividiendo la cavidad articular en dos partes;⁵⁵ absorben las fuerzas de compresión y aumentan el rango de movimiento.^{26,18} Las almohadillas adiposas, que suelen encontrarse entre la membrana sinovial y la cápsula, que protegen el cartílago articular cuando las extremidades están en movimiento.^{55,18} Los ligamentos protegen, fortalecen y refuerzan la articulación sinovial delimitan la movilidad de la articulación⁵⁵ y unen a los huesos por una banda de tejido fibroso, se localizan dentro o fuera de la cápsula sinovial denominándose ligamentos intracapsulares y extracapsulares.^{26,51} Los meniscos facilitan el movimiento de rotación desplazándose hacia adelante o hacia atrás dependiendo del movimiento que estemos generando;⁵³ Las bolsas son pequeños sacos llenos de líquido sinovial que reducen la fricción

y absorben los choques.⁵⁵ Los tendones son la unión del músculo con el hueso y son los que limitan el movimiento y proporcionan soporte a la articulación sinovial a pesar de no formar parte de ella.⁵⁵ La capsula articular es una membrana que rodea y sella a la articulación sinovial,⁷⁵ ésta se divide en dos capas: la capa exterior que es resistente, gruesa, no elástica e integrada por fibras de colágeno tipo II, que se unen firmemente tanto a la articulación como al periostio de los huesos contribuyendo a la estabilidad articular^{75, 28,55} y la capa interior, también denominada membrana sinovial la cual se explicará en detalle en el siguiente segmento.^{75, 28, 29, 48, 15,16} Por último, la cavidad articular se encuentra después de la membrana sinovial y contiene el líquido sinovial.²⁶ **figura 1**

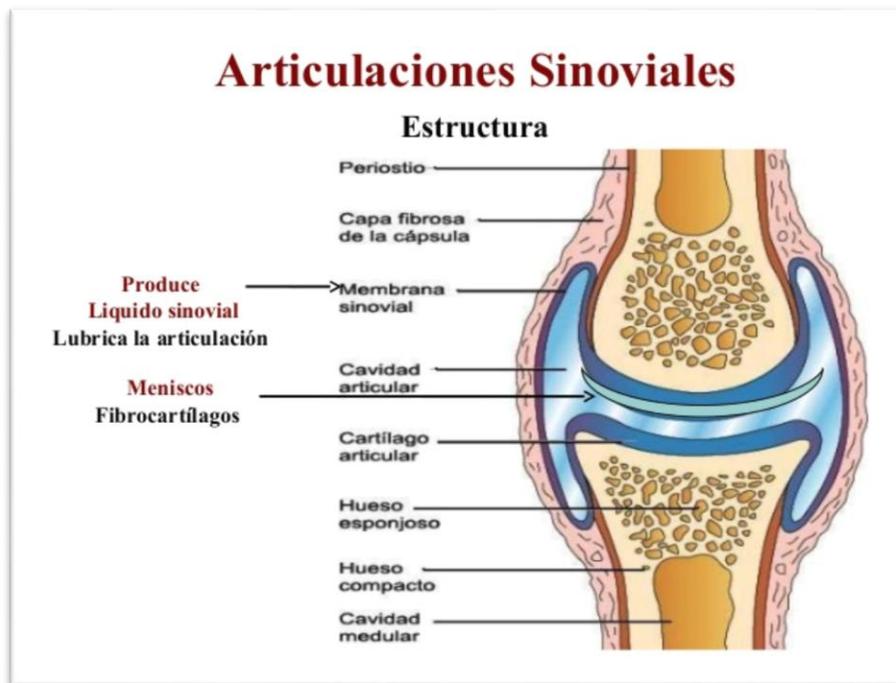


Figura 1. Estructura de las articulaciones sinoviales
(Anatomiamusculoesqueletica.wordpress.com)

2.2.1 Membrana Sinovial

La membrana sinovial (MS) es una fina membrana especializada que se sitúa entre la cavidad articular y la cápsula articular, cubre la cara interna de tendones y bolsas articulares.¹¹ Se encuentra entre el hueso y el cartílago, se prolonga hacia el periostio extraarticular, por su cara interna, se organiza en repliegues, está vascularizada e inervada, fabrica el líquido articular que lubrica y nutre al cartílago avascular, regula la presión y la temperatura local, además, participa en la defensa y la respuesta inmunitaria intraarticular.^{11,23,19} La MS está constituida por dos capas: La íntima, la capa íntima de la membrana sinovial consta de uno a cuatro estratos celulares intrincados en una red de matriz extracelular.¹⁹ Es la capa funcional de la membrana sinovial.⁵ No posee estructuras de uniones estrechas células-células, desmosomas ni membrana basal, lo que le confiere su propiedad semipermeable.^{75,15,16} La ausencia de membrana basal hace que las células sean más móviles para evitar las sobrecargas mecánicas en los movimientos articulares.^{28,43} Se ha observado que en la capa íntima, se encuentran células derivadas de macrófagos (sinoviocitos de tipo A) y fibroblastos (sinoviocitos de tipo B),^{52,43} tejido conjuntivo laxo subyacente donde predominan los fibroblastos y los macrófagos, que se acumulan inmediatamente por debajo de la capa superficial y alrededor de los vasos.¹⁹ Cabe señalar que estas células no tienen el mismo fenotipo que los de la capa íntima (Tabla 1).¹⁹ Por la estructura de la capa subíntima se han descrito tres tipos histológicos de membranas sinoviales que pueden coexistir: areolar, fibrosa y adiposa.⁵² No se conoce la especificidad funcional de cada una pero se sabe que la forma más especializada es la areolar, constituida por un tejido conjuntivo laxo rico en capilares (lado superficial) y otro más adiposo (lado profundo). La membrana sinovial adiposa está formada por una capa de células sinoviales y una red superficial de capilares que se apoyan en un tejido adiposo abundante.¹⁹ En la membrana sinovial de tipo fibroso, frecuente en las pequeñas articulaciones de los dedos, existe una capa discontinua de células sinoviales que descansa sobre un tejido fibroso que se confunde con los elementos capsuloligamentosos subyacentes.^{19,53,111}

2.2.1.1 Sinoviocito de tipo Macrófago

Los sinoviocitos de tipo A (macrófagos) tienen una gran superficie de membrana, con proyecciones citoplasmáticas delgadas (filopodios), y contienen numerosas vacuolas y lisosomas así como un aparato de Golgi desarrollado y abundantes mitocondrias.¹⁹ Su estructura está relacionada con su función fagocítica.^{5,92} Expresan numerosos antígenos de superficie de la serie monocitos-macrófagos como: CD11b (receptor de la fracción del complemento C3b), CD68 (glucoproteína lisosómica), CD14 (receptor del polisacárido), CD16 (receptor para la fracción Fc de la IgG, Fc-RI), CD18 (molécula de adhesión a las integrinas), CD64 (receptor para la fracción Fc de la IgG, Fc-RIIIa) y CD163.^{95,88,19} Los macrófagos de la capa íntima expresan el CD64 (Fc-RIIIa), mientras que los de la capa subíntima son negativos para este receptor.¹⁹ En la membrana sinovial normal existen escasos sinoviocitos macrofágicos (10-20%) que, sin embargo, predominan ampliamente (hasta un 80% de las células) en la inflamación, quizá por reclutamiento de los monocitos sanguíneos y los macrófagos de la capa subíntima.¹⁹

2.2.1.2 Sinoviocito de tipo Fibroblasto

Los sinoviocitos tipo B (Fibroblastos) contienen escasas vacuolas, pero numerosos retículos endoplásmicos rugosos y vesículas de secreción que reflejan su capacidad de síntesis proteica.^{29,21,48,61,43} Estas células se distinguen de los demás fibroblastos por la expresión de VCAM-1 (Moléculas de adhesión de las células vasculares -1), del CD44 (receptor principal del ácido hialurónico) y sobre todo, por la expresión de la UDPGD (Uridina Difosfoglucosa Deshidrogenasa) que permite la síntesis del ácido hialurónico (AH), constituyente principal del líquido articular.^{94,5} Expresan otras moléculas de adhesión como ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), integrinas $\beta 1$ y cadherina-11. La intensa expresión de las moléculas de adhesión hace que estas células puedan anclarse en la membrana sinovial sin desprenderse durante los movimientos articulares. La cadherina-11 es esencial: posibilita las interacciones fibroblastos-fibroblastos y es necesaria para que los sinoviocitos B se distribuyan de forma armoniosa a lo largo de la membrana sinovial.¹⁹ Los fibroblastos también expresan CD55

o FAD (Factor acelerador de la degradación).⁵² No se conoce con exactitud la función del DAF de los fibroblastos de la íntima, pero su codistribución con el Fcc-RIIIa en microfibrillas de fibrilina sugiere que participaría en la defensa inmunitaria.⁹³ También producen lubricina, elemento imprescindible, junto con el AH, para las propiedades lubricantes del líquido sinovial.⁹¹ Sintetizan las proteínas de la matriz extracelular y las proteasas necesarias para su renovación, como las catepsinas, las serinas proteasas y las metaloproteasas.¹⁹

Tabla 1. Diferencias de fenotipo de Sinoviocitos de la MS

Tipo de Sinoviocito		Capa Íntima	Capa Subíntima
Sinoviocito (Macrofago)	A	CD11b/CD18,CD16,CD32,CD64,CD68, CD14,CD163, Fcc-RIIIa, MHC II	No expresan Fcc-RIIIa.
Sinoviocito (Fibroblasto)	B	UPDGD,VCAM-1,DAF,Cadherina-11 Vimentina ,Thy-1	no expresan DAF ,VCAM-1 ni UDPGD

Ea H.-K. 2008

2.3 Aspectos Inflamatorios y Crónico Degenerativos de la Artritis Reumatoide

Como se mencionó anteriormente, el proceso inflamatorio de la AR se da por la infiltración de células inflamatorias a la MS , estas células, expresan moléculas inflamatorias como: Interleucinas (IL) , quimiocinas y factores de crecimiento, cuyo efecto final es la destrucción del cartílago y el hueso,⁸⁷ que dan lugar a manifestaciones extraarticulares como : nódulos reumatoides, vasculitis, pericarditis, queratoconjuntivitis, entre otras)^{73,87} y sistémicas como: producción de proteínas en fase aguda, anemia, enfermedad cardiovascular (ECV), osteoporosis, fatiga y depresión.⁷³ Entre las células que infiltran la membrana sinovial, se encuentran los linfocitos Th17, linfocitos que secretan la IL-17, IL inflamatoria que va a desempeñar un papel iniciador, interaccionando con células dendríticas (CD), macrófagos y

linfocitos B^{96,87}. Los linfocitos B contribuyen a la AR a través de la presentación del antígeno y de la producción de anticuerpos, autoanticuerpos e IL-6.⁷¹ Los linfocitos B expresan proteínas de la superficie celular, que incluyen inmunoglobulinas y antígenos de diferenciación como CD20 y CD22.^{62,97} Los autoanticuerpos pueden formar complejos inmunes más grandes que pueden estimular aún más la producción de IL proinflamatorias, como TNF- α , esto lo hacen a través del complemento y la activación del receptor Fc del linfocito B para el reconocimiento del antígeno.⁹⁸ La activación de los linfocitos T y B resulta en una mayor producción de IL y quimiocinas, lo que conduce a un circuito de retroalimentación para interacciones adicionales con otras células inflamatorias.^{99,100} Los macrófagos, además de la presentación del antígeno, están implicados en la osteoclasto génesis y son una fuente importante de agentes inflamatorios como: TNF- α , IL-1 e IL-6⁸⁷ metaloproteinasas (MMP) 9 y 12, el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (FEC-GM) y la trombospondina.¹⁰¹ Contribuyendo de manera importante al pannus, además de producir especies reactivas de oxígeno (ERO) que inducen a las células endoteliales a expresar las moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 que permiten la extravasación de los neutrófilos hacia el líquido sinovial y al cartílago articular.^{102,100} Los fibroblastos al ser activados aumentan dentro de la MS produciendo IL proinflamatorias, prostaglandinas (PG) y MMP contribuyendo a la destrucción del cartílago y el hueso.^{98,73} Los osteoclastos son células multinucleadas formadas por la fusión de progenitores mononucleares de la familia de monocitos / macrófagos son los mediadores primarios de la destrucción ósea, estas células invaden la MS y recubren el hueso.⁸⁷ El osteoclasto génesis inducida por macrófagos requiere del FEC-GM y de la interacción del RANK y el ligando RANK (RANKL).¹⁰⁵ La expresión de RANKL está regulada por IL proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-17, IL-6, IL-11 y FEC-GM.¹⁰⁶ La angiogénesis es un proceso clave en la formación y mantenimiento de pannus porque la invasión de cartílago y hueso requiere un aumento en el suministro de sangre.¹⁰¹ En pacientes con AR, muchos factores proangiogénicos se expresan en la membrana sinovial, pero el VEGF desempeña un papel central en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos.¹⁰¹ VEGF es un mitógeno de células endoteliales selectivo y un inductor de la permeabilidad.^{101,102} Las citoquinas también activan los condrocitos, lo que lleva a la liberación directa de MMP adicionales en el cartílago

2.3.1 Interleucinas Proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-17 Y TNF- α en el Curso de la Enfermedad

Dentro de la amplia gama de IL producidas por las células inflamatorias que participan en la AR, las que más destacan son: TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-17.⁵⁶

La IL-6 es una IL proinflamatoria producida por linfocitos T y B, monocitos, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, queratinocitos, células endoteliales, células mesangiales, adipocitos, miocitos esqueléticos, cardiomiocitos, células cerebrales (astroglia, microglía, neuronas).^{104,103,56} Esta IL es esencial para la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ a linfocitos TH17 e inhibe a los linfocitos T reguladores (Treg) inducidos por TGF- β , esta inhibición genera un aumento de la relación TH17 / Treg.^{104,12} Además, la IL-6 induce la diferenciación de células B a través de una acción directa sobre las células plasmáticas inmaduras, y estimula el desarrollo de linfocitos T auxiliares, que secretan el factor de diferenciación de para linfocitos B (IL-21).⁸⁴ Por consiguiente, en pacientes con AR, los niveles séricos de IL-21 se asocian con una mayor secreción de autoanticuerpos factor reumatoide (RF) y proteína cíclica citrulinada (PCC) y niveles más altos de marcadores de activación de células B.^{104,103,56} La IL-6, actúa directamente sobre los neutrófilos a través del receptor de IL-6 (IL-6R) unido a la membrana, que a su vez contribuye a la inflamación y destrucción articular mediante la secreción de enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS).¹⁰⁴ Los fibroblastos y macrófagos sinoviales activados representan una fuente importante de IL-6 en la articulación.⁸² El líquido sinovial también contiene altos niveles del IL-6R derivados principalmente de monocitos y linfocitos que se infiltran en la membrana sinovial. Por lo tanto, a través de la activación de la señalización clásica y, particularmente, de la vía de trans-señalización, IL-6 puede dirigirse a una amplia gama de células articulares en la sinovial, el cartílago y el hueso subcondral, principalmente involucradas en el desarrollo del daño articular de la AR.¹⁰⁴ Los pacientes con AR muestran niveles elevados de IL-6 niveles tanto en el líquido sinovial como en la sangre.^{41,33} La IL-6 circulante se encuentra en la sangre de humanos sanos a baja concentración (≤ 1 pg / ml) y aumenta significativamente durante condiciones inflamatorias, alcanzando concentraciones

en el rango de $\mu\text{g} / \text{ml}$) que se correlacionan con la actividad de la enfermedad y la progresión del daño estructural.⁵⁶ La IL-1 β : Es una IL proinflamatoria producida por los macrófagos, células dendríticas, células NK, el epitelio vascular, fibroblastos, algunas células del músculo liso y linfocitos T y B.⁴⁷ La IL-1 se ligan a dos receptores de la superficie celular y sólo el receptor de tipo I (IL-1 RI) tiene penetración citoplasmática y es capaz de transmitir la señal intracelular.¹⁷ El receptor de tipo II (IL-1 RII) no tiene dominio citoplasmático y es incapaz de transmitir la señal.^{47,17} El IL-1 RI se encuentra principalmente en los linfocitos T, mientras que el de tipo II se expresa principalmente en neutrófilos, monocitos y células B.¹⁷ La activación del IL-1 RI por la IL-1 β en las células del endotelio vascular produce un aumento en la expresión de moléculas de adhesión e inicia o incrementa la infiltración de linfocitos y monocitos hacia los tejidos inflamados.^{103,56} La IL-1 también aumenta la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, monocitos y la producción de PG y MMP por los macrófagos y fibroblastos sinoviales.^{77,78} La IL-1 se expresa en la unión al cartílago, y representa el mayor factor para la destrucción del hueso y del cartílago.⁵⁹ TNF- α (factor de necrosis tumoral α), es una IL proinflamatoria producida por macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, linfocitos TCD4⁺ Th1.¹⁰³ En estado inflamatorio tiene diferentes efectos como: la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado, el aumento en la permeabilidad vascular, el aumento de las moléculas de adhesión (como la selectina E) en el endotelio vascular, la proliferación de fibroblastos, la inducción de quimiocinas (como la IL-8), la inducción de IL-6, la activación de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B, 8) y la secreción de los factores estimulantes de colonias por los macrófagos.^{14,87,47,103} TNF- α es una de las muchas citocinas que se han identificado en la membrana sinovial de los pacientes con AR.⁹ TNF- α junto con IL-1 β son inductoras de la activación de los sinoviocitos tipo fibroblasto que producen el SDF-1 α (Factor derivado de células estromales 1 α) que a su vez estimula a los linfocitos T para que expresen CD40L.¹⁰ Los linfocitos T que expresan CD40L estimulan la expresión de SDF-1 α por los sinoviocitos, que protegen los linfocitos T y B de la apoptosis y atraen otras células proinflamatorias.⁵⁶ IL-17: Es una citocina proinflamatoria expresada por los linfocitos Th17.¹⁰³ En estado inflamatorio tiene diferentes efectos como: la expresión de IL-6, TNF- α por los macrófagos, el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, la secreción de factores estimulantes de colonias de manera indirecta por la síntesis de citocinas en células epiteliales, células endoteliales y células

estromales fibroblásticas y la expresión de ICAM-1 por las células epiteliales.¹²² En AR, la IL-17 parece ser la principal molécula a través de la cual los linfocitos T reclutan y activan a las células efectoras de la inmunidad innata y participa en la destrucción articular promoviendo la liberación MMP extracelulares como la MMP-1 y la MMP-9.^{103,122} La IL-17 también suprime la síntesis de proteoglicanos en los condrocitos articulares mediante el incremento de la producción de ON y estimula la diferenciación de los osteoclastos generando la reabsorción ósea en modelos de cultivo epiteliales.³⁶ Este efecto es dependiente de PG y parece estar mediado a través de la inducción del receptor activador del ligando del factor NF- κ B y el factor de diferenciación de osteoclastos (RANKL/ODF) sobre la superficie de los osteoblastos.⁸² Recientemente, la IL-17 se ha postulado como un factor angiogénico, ya que estimula la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en los sinoviocitos.¹²² Aunque el receptor de la IL-17 se expresa ampliamente en varias células, en los pacientes con AR está sobre expresado específicamente en los sinoviocitos tipo fibroblasto.¹²²

2.4 Tratamientos Convencionales

Los tratamientos farmacológico para la AR presenta dificultades de aplicación debido a la sintomatología variada que presenta la enfermedad.⁵⁴ El tratamiento temprano se ve dificultado por las siguientes circunstancias: Dificultad de diagnóstico de la AR, especialmente en fases iniciales debido a formas diferentes de presentación y a su similitud con otros procesos, como pueden ser infecciones virales, por la falta de respuesta en los marcadores serológicos estándar en algunos pacientes al principio de la enfermedad, y a la falta de sensibilidad de las radiografías para detectar la lesión estructural inicial.^{120,85} En los últimos años, el tratamiento de la AR se ha modificado, apartándose de los enfoques tradicionales para pasar a una aplicación temprana de fármacos que detengan o modifiquen el curso de la enfermedad y así poder evitar las anomalías que puedan producirse en las articulaciones en los dos primeros años de evolución⁸⁵. El tratamiento farmacológico regula los factores inflamatorios e inmunológicos que intervienen en la patogénesis de la AR.⁶⁸ Los

objetivos del tratamiento son los siguientes: Alivio del dolor , conservación de la fuerza y la función articular, prevención de la destrucción articular y las deformidades, alivio de las complicaciones sistémicas, mantenimiento de la función física y educación sanitaria del paciente y de quienes lo atienden. ^{68,66}

La terapia farmacológica utilizada en el tratamiento de la AR incluye 4 tipos de fármacos: los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides (AES) y los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad o DMARDs (por sus siglas en inglés *Disease Modifying anti- rheumatic Drugs*) y los llamados agentes biológicos. Tabla 2. ⁶⁹

Tabla 2 Fármacos para el tratamiento de la AR

Fármaco	Ventajas terapéuticas	Mecanismo de acción	Efectos adversos
AINES	Antiinflamatorios Analgésicos Antipiréticos	Inhiben la actividad de COX-1 como de la COX-2. por lo tanto, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. ⁶⁸	Debilitan la mucosa del estomago provocando úlcera péptica, daño cardíaco, daño renal y transtornos del SNC, ⁶⁸
AES (Glucocorticoides)	Antiinflamatorios Analgésicos	Suprimen la transcripción de ARN mensajero en algunas células (ejemplo, linfocitos) ⁸⁹	Pérdida de masa ósea, lo cual puede derivar en osteoporosis, inmunodeficiencia, favorecimiento infecciones oportunistas ⁸⁹
DMARDs (tradicionales)	Modifican la respuesta inmune. Inhiben la secreción de IL inflamatorias	Se desconoce sus mecanismos de acción exactos para inhibir la respuesta inmune. ⁸⁵	hepatotoxicidad, fibrosis cirrosis, náuseas y vómito. además pueden ocasionar daño a retina, tuberculosis y probable linfoma. ^{68,121,89}

Continuidad de la tabla 2. **AGENTES BIOLÓGICOS**

Inhibidores de TNF-α		
Agente Biológico	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Infliximab	Se une con alta afinidad al TNF- α soluble y unido a la membrana e inhibe su efecto mediante el bloqueo de las interacciones del receptor TNF- α	Trombocitopenia Reacciones de hipersensibilidad y anafilaxia Infecciones Tuberculosis
Etanercept	Se une al TNF- α , evitando que interactúe con su receptor	Insuficiencia cardiaca Linfoma Hepatitis B
Adalimumab	Se une al TNF- α humano con alta afinidad y evita que se una a sus receptores	
Certolizumab	Selectivamente neutraliza el TNF- α humano soluble y asociado a la membrana	
Golimumab	Forma complejos estables de alta afinidad con formas bioactivas solubles y transmembrana de TNF- α , evitando la unión de TNF- α a sus receptores	
Inhibidores de IL-1 β e IL-6		
Anakinra	Neutraliza la actividad tanto de IL-1 α como de IL-1 β	Trombocitopenia Reacciones de hipersensibilidad y anafilaxia
Tocilizumab	Se une específicamente a sIL-6R y mIL-6R; inhibe la señalización mediada por sIL-6R y mIL-6R	Infecciones Tuberculosis Insuficiencia cardiaca Linfoma Hepatitis B
Inhibidores de células B y T		

Rituximab	Decremento de células B uniéndose a CD20	Trombocitopenia Reacciones
Abatacept	Inhibe la activación de células T uniéndose a CD80 y CD86	de hipersensibilidad y anafilaxia Infecciones Tuberculosis Insuficiencia cardiaca Linfoma Hepatitis B

Choy 2012, Kwon HJ,

2.5 Tratamientos Alternos

En la medicina tradicional de México, existen diferentes plantas capaces de controlar diversas enfermedades, una de estas plantas son la familia asterácea. Las asteráceas (Asteráceae), también conocidas como “compuestas” reúnen más de 23,500 especies repartidas en 1600 géneros, por lo que es la familia de angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica.¹⁰ Algunos ejemplos de estas plantas con bondades medicinales son: *Matricaria chamomilla*, conocida comunmente como “manzanilla” esta planta es una de las mas usadas y conocidas plantas medicinales.¹²³ El té de las flores es usado contra enfermedades gastro-intestinales, como sedante y contra trastornos menstruales. Se aplica manzanilla externa contra inflamación de la mucosa, inflamación de la piel, infecciones bucales y contra enfermedades en el área anal y genital.¹²³ *Arnica montana*, conocida comunmente como “árnica” es una planta medicinal usada para tratar dolores musculares, articulares, esguinces y contusiones, sus propiedades medicinales se le atribuyen a sus flores.⁴⁶ *Bidens pilosa* comúnmente conocida como ‘romerillo blanco’ o ‘aguja española’ es una hierba utilizada para el tratamiento de trastornos tales como inflamación, trastornos inmunológicos, trastornos digestivos, enfermedades infecciosas, cáncer, síndrome metabólico, heridas, y muchos otros.^{3,7} *B. pilosa* suele ser ingerida en té, sin embargo, también puede utilizarse la planta fresca para tratar las mordeduras de animales y heridas.⁷ Se han identificado 201

compuestos a partir de *B. pilosa*, que comprenden 70 alifáticos, 60 flavonoides, 25 terpenoides, 19 fenilpropanoides, 13 aromáticos, 8 porfirinas y otros 6 compuestos, a partir de esta planta (F. L. Silva *et al.*, 2011). La asociación entre los fitoquímicos de *B. pilosa* y sus bioactividades aún no está completamente establecida.⁸⁴

2.5.1 Antecedentes del extracto acetato de etilo de *Bidens pilosa* para controlar la Inflamación asociada a la AR

Una investigación realizada por Herrera en el 2013 en nuestro laboratorio mostró que la fracción de acetato de etilo de *Bidens pilosa* (FAEBp) tiene la capacidad de controlar la inflamación asociada a la AR. Para evaluar esta capacidad utilizaron células de bazo de ratones C57Bl/6J, a las cuales se les indujo una diferenciación hacia un fenotipo th17 (proinflamatorio). Las células se incubaron con Anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 para su activación y se mantuvieron en cultivo por 6 días con una mezcla de IL que favoreció su diferenciación hacia un fenotipo TH17 (TGF- β , IL-6, IL-23, IL-1 β y TNF- α) adicionalmente se añadió anti-IFN γ - e IL-4 para evitar su polarización hacia un fenotipo TH1 y TH2, respectivamente. Paralelamente, otro grupo de células se expusieron a las mismas condiciones sólo que en presencia de diferentes concentraciones del FAEBp (0.4, 2, 10, 50 y 250 $\mu\text{g/ml}$), seis días después del cultivo se colectaron las células y se evaluó el porcentaje de células CD4⁺ que expresaron el factor de transcripción Foxp3 en comparación a las células CD4⁺ que expresaron la IL-17 intracelular en presencia o ausencia de cada uno de los tratamientos por citometría de flujo. (Primera evaluación). En la figura 2 y 3 se puede observar que las concentraciones de 0.4 y 2 μg del FAEBp fueron las que disminuyeron más los % de células productoras de IL-17 (0.82% y 2.92% respectivamente) con respecto al grupo sin tratamiento (4.02%), mientras que las dosis de 2 y 10 μg fueron las que incrementaron el % de células Foxp3 positivas (1.85% y 2.08% respectivamente) con respecto al grupo Inflamado (0.12%). La relación de Células CD4⁺ IL-17⁺/ Células CD4⁺ Foxp3⁺ puede observarse que las dosis de 0.4 y 2 μg fueron las que disminuyeron de manera

muy importante la relación de Células CD4+ IL-17+/Células CD4+ Foxp3+ con respecto al grupo que no recibió ningún tratamiento. Cabe señalar que las concentraciones de 50 y 250 µg/ml del FAEBp ya resultaron tóxicas para las células.

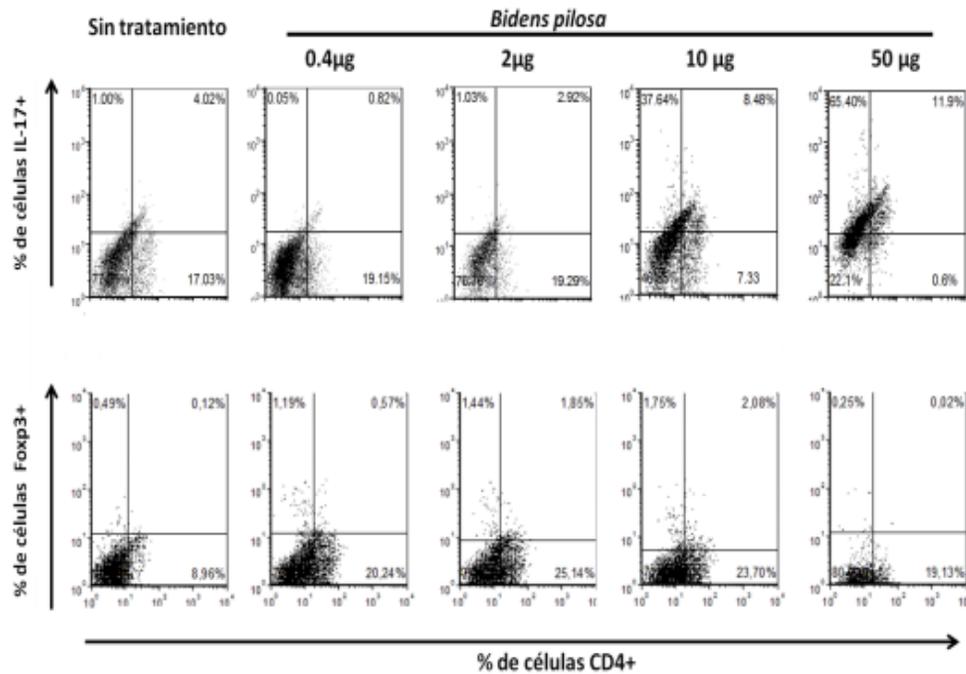


Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un subtipo TH17 o Treg por citometría de flujo. Datos del primer experimento.

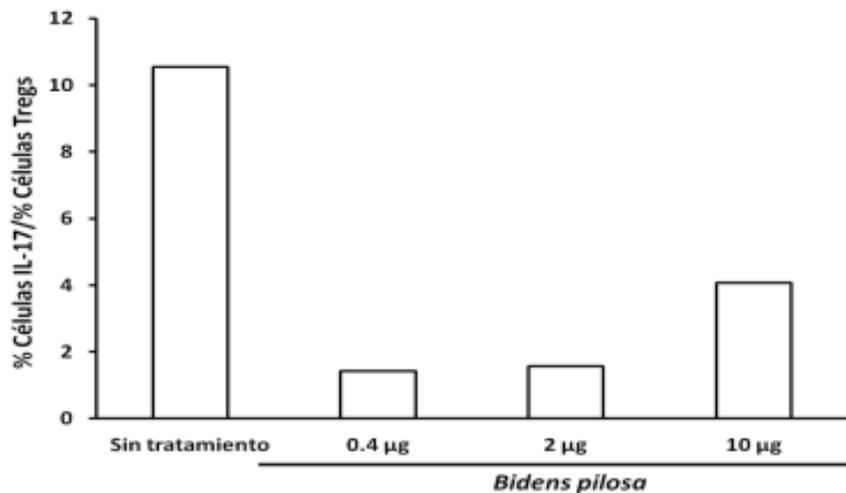


Figura 3. Efecto entre las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un sapito TH17 o Treg, la cuantificación se realizó por isometría de flujo. No se incluyen las concentraciones de 50 y 259 µg/ml.

Posteriormente, se realizó una repetición de este experimento, pero con otras dosis del FAEBp (para identificar la dosis de cada uno de los tratamientos que era capaz de controlar la polarización de las células hacia el fenotipo Th17): Las concentraciones que se probaron fueron de 0.4, 1, 2 y 5 µg/ml del FAEBp (las cuales cayeron en el intervalo de las dosis que demostraron ser más efectivas para inducir células Tregs en el primer experimento). Figura 4 y 5 se observa que las concentraciones de 1 y 2 µg/ml fueron las que disminuyeron más el porcentaje de células CD4⁺ IL17⁺ (1.15% y 1.11%, respectivamente) mientras que las concentraciones de 1 a 5 µg/ml fueron las que incrementaron más el porcentaje de células CD4⁺ Foxp3⁺ (3.33% y 3.40%, respectivamente) sin embargo en la dosis de 5 µg/ml se observó un incremento importante en la población CD4⁺ IL-17⁺; lo cual ocasiona que casi quede en equilibrio la relación % de células CD4⁺ IL-17⁺/ % de células CD4⁺ Foxp3⁺ (2.48% y 3.40%, respectivamente); similar a lo que pasa en la concentración de 0.4 µg/ml.

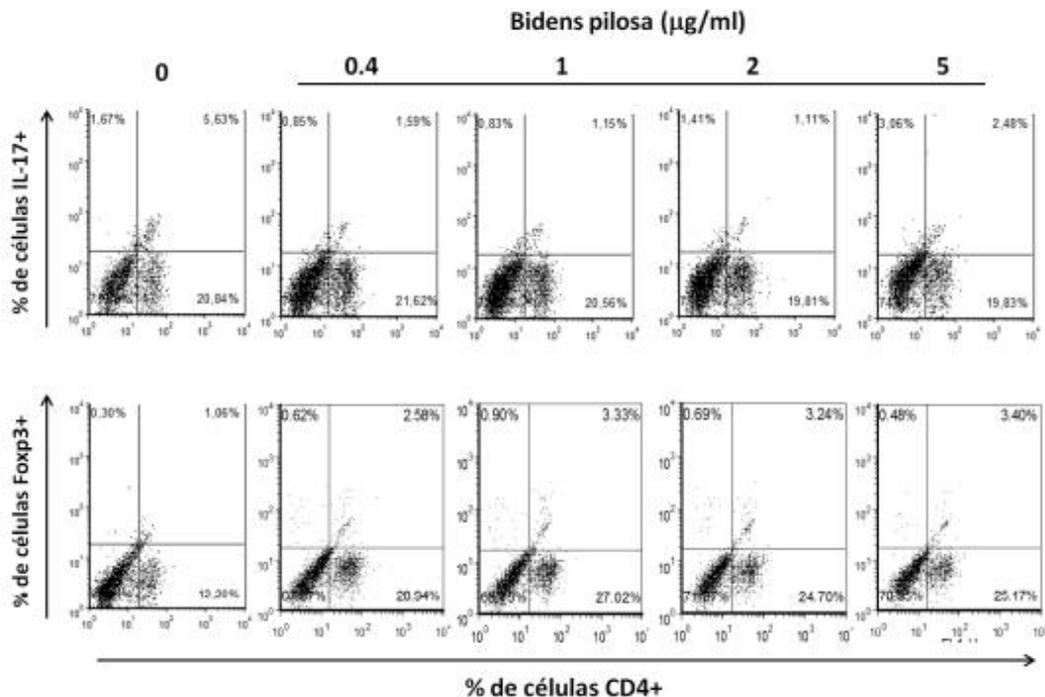


Figura 4. Efecto de las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un subtipo TH17 o Treg por citometría de flujo. Datos del segundo experimento realizado.

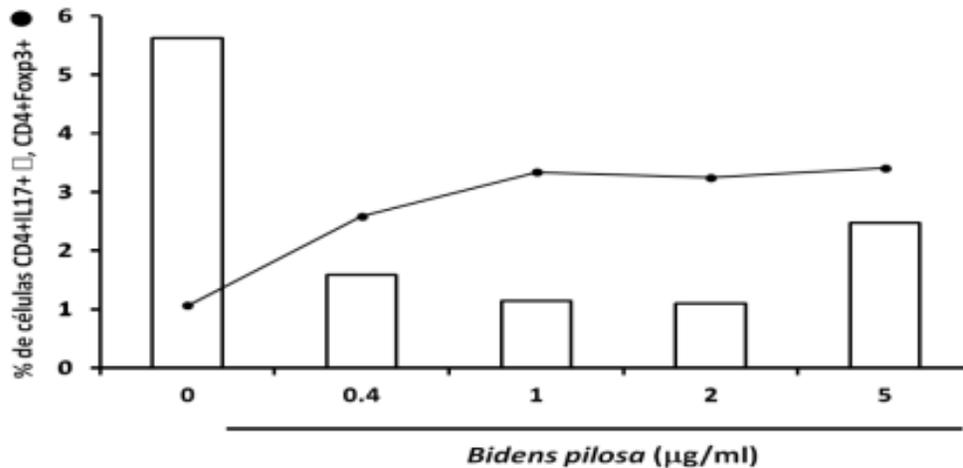


Figura 5. Relación del efecto entre las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un subtipo TH17 o Treg, la cuantificación se realizó por citometría de flujo. Segundo experimento.

Cabe señalar que además de esta evaluación, también se colectaron los sobrenadantes del cultivo para determinar los niveles de IL presentes por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Durante el primer experimento de polarización in vitro hacia Th17, se realizaron mediciones de las IL, IL-17 e IL-10 en los sobrenadantes del cultivo de células polarizadas hacia TH-17 en presencia y ausencia de diferentes concentraciones del FAEBp. En el segundo experimento se realizó nuevamente la medición de estas dos IL, anexando la medición de TGF- β . En la figura 6 se observa que la concentración de 50 µg/ml disminuyó de manera significativa la producción de IL-17 ($p < 0.01$) cuando se comparó con el resto de los grupos, así mismo se observó que todas las concentraciones probadas fueron capaces de incrementar de manera significativa la producción de IL-10 con respecto al IL-17 y que la concentración más efectiva fue la de 2 µg/ml ya que es la que presentó una mayor producción de IL-10 y una menor producción de IL-17.

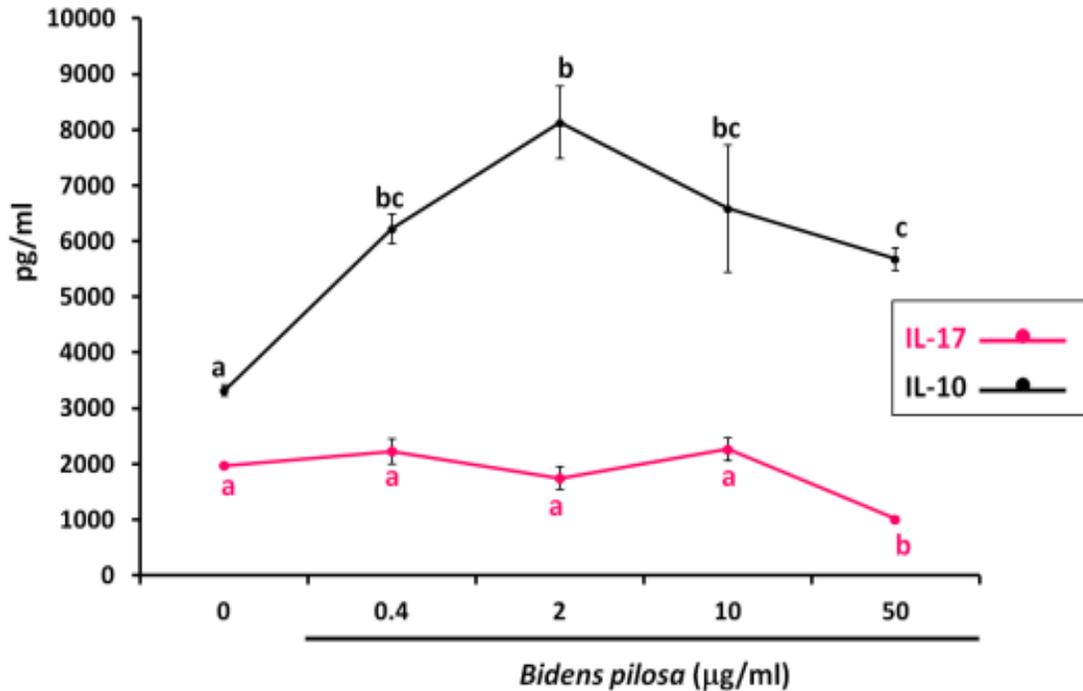


Figura 6. Comparación de los niveles de IL-17 e IL-10 de los sobrenadantes del primer cultivo tratados con diferentes concentraciones de la FAEBp. Los valores son presentados con media \pm SEM (n=2) y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p < 0.01$)

Nuevamente, para caracterizar el ambiente pro inflamatorio/ anti inflamatorio inducido por las diferentes concentraciones de la FAEBp se realizaron mediciones de las IL-17, IL-10 y TGF- β mediante ELISA en los sobrenadantes del segundo cultivo; encontrando que la concentración de 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ disminuyeron de manera significativa la producción de IL-17, cuando se compararon con el resto de los grupos presentando un mayor efecto la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ (figura 7) En cuanto a la producción TGF- β se encontró que las dosis de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ incrementaron la producción de TGF- β de manera significativa con respecto a los demás grupos (figura 8) la relación entre la producción de IL-10 e IL-17 y entre la producción de TGF- β e IL-17 que se presentaron con las diferentes concentraciones se pudo observar que en la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ se presentó una menor producción de IL-17 y un mayor incremento en la producción de TGF- β .

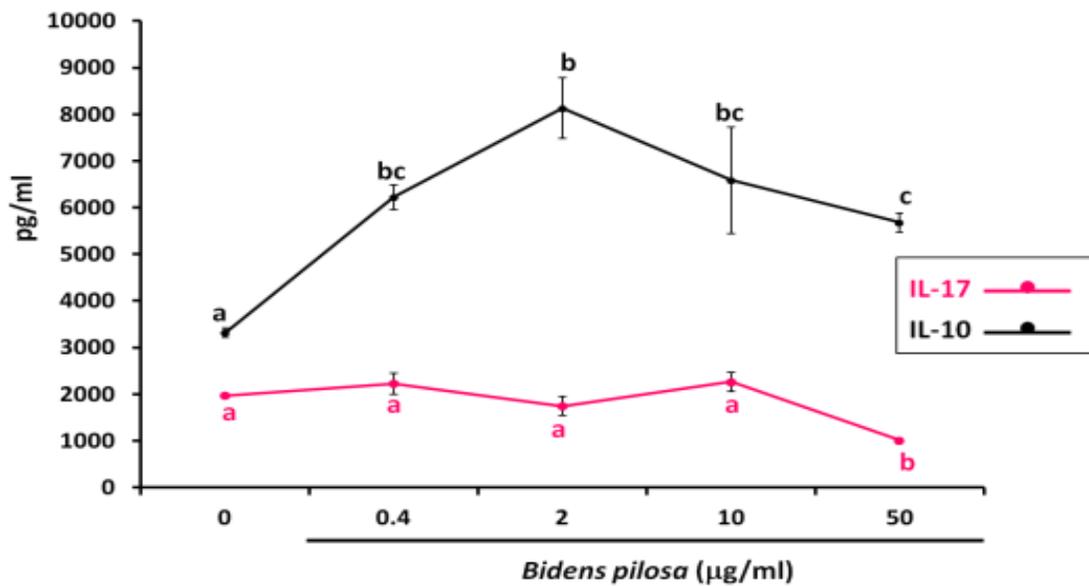


Figura 7. Comparación de los niveles de IL-17 e IL-10 de los sobrenadantes del primer cultivo tratados con diferentes concentraciones de la FAEBp. Los valores son presentados con media \pm SEM (n=2) y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p < 0.01$)

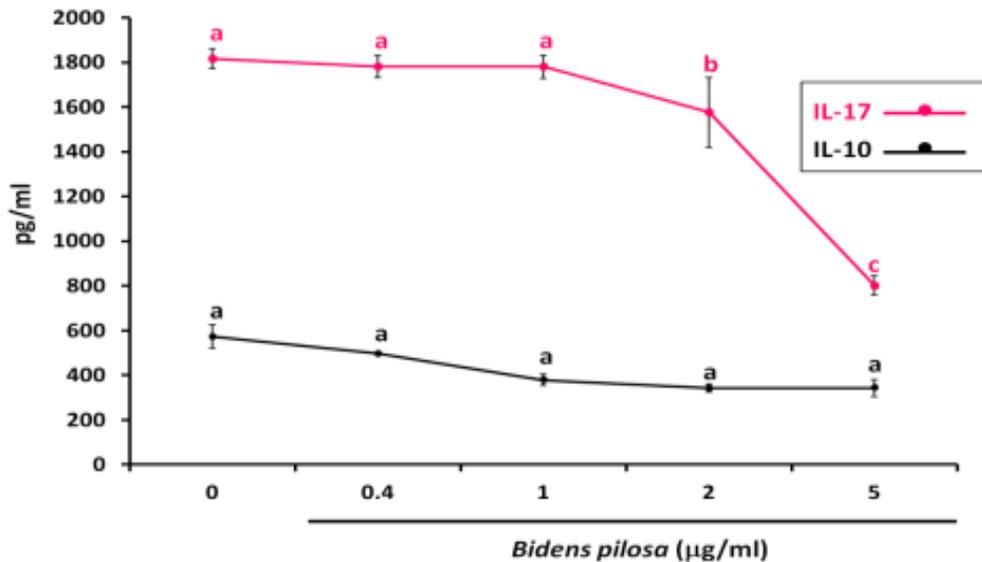


Figura 8. Comparación de los niveles de IL-17 e IL-10 de los sobrenadantes del segundo cultivo tratados con diferentes. Los valores son presentados con media \pm SEM (n=2) y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común. (p<0.01)

Con los resultados obtenidos de esta evaluación del FAEBp, Herrera sugiere hacer un fraccionamiento del FEBp para poder agrupar solo aquellas moléculas que tengan actividad antiinflamatoria.

2.5.2 *Bidens odorata*



Foto: CONABIO 2009

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia : Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Genero: *Bidens*

Especie : *Bidens odorata* (cav)

Figura 9. Clasificación taxonómica de *Bidens odorata* (CONABIO 2009)

Bidens odorata cav. Se conoce comúnmente como “Aceitilla, Acahual, acahual blanco, amor seco, cadillo, cruceta, mozote blanco, mozoquelite, mozote, roció, rosilla, té de milpa blanco”⁸ Es una de las especies arvenses más comunes en el occidente de México, principalmente entre 1000 y 2200 m y en el Valle de México de los 2250 a 2900 m de altitud.⁹ Forma parte de un conjunto de especies que se parecen, pero que son distintas genéticas y ecológicamente⁸. Es una especie nativa de México y se encuentra

prácticamente en todo el país excepto en la península de Yucatán ⁴⁶. *Bidens odorata* (*Bo*) es una especie muy variable, pero se puede identificar con la combinación de las siguientes características: hierba anual con cabezuelas, con 5 flores liguladas blancas a rosadas, y flores tubulares amarillas; brácteas exteriores 7-9 casi siempre ensanchadas en el ápice; tallo cuadrangular; hojas con 3 -5 foliolos y raíz delgada ^{3,7}. Se puede encontrar en campos de cultivo, orillas de caminos, lugares en construcción.⁹. Su propagación, dispersión y germinación es por medio de sus semillas que se pegan al pelaje de los animales y a la ropa del hombre, la mayoría de las semillas germinan en el primer centímetro del suelo donde hay buena humedad, luz y oxígeno. *Bo* tiene algunos usos comerciales como forraje para ganado bovino, las hojas se consumen como quelite y también es utilizada en la medicina popular mexicana. En Veracruz, el principal uso medicinal que se le da a las hojas es en el tratamiento de diversos desórdenes del aparato digestivo, tales como diarrea, vómito, dolor e infección estomacal. ^{107,9}. También se ha utilizado contra la ictericia, como tranquilizante y antipirética. Además, se le usa en la cura de la enfermedad cultural denominada "asombro" la cual se caracteriza por pesadez en el cerebro, uñas moradas, dolor de huesos, mucha tristeza, rostro amarillo y pérdida del apetito. Al igual que en el susto, el enfermo duerme mucho, principalmente al medio día. Se prescribe el aceitillo en otras alteraciones orgánicas como dolor de huesos, de cabeza y dolor de riñón, así como heridas, diabetes, mal de orín, anemia, irritación de la piel, contra la caída del cabello⁹. Sin embargo, principalmente se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitusiva, catártica y hemostática ¹. Su estatus de conservación no es amenaza ⁹.

2.5.2.1 Antecedentes Farmacológicos de *Bidens odorata*

Bidens odorata ha sido utilizada en la medicina tradicional de México para el tratamiento empírico de la diarrea, bronquitis, tos, fiebre, dolor de estómago y dolor. ¹⁰⁷. Existe poca información científica sobre esta planta, sin embargo, hay reportes científicos donde se demuestra su actividad, diurética, antidiarreica y por primera vez en el 2017 un estudio

dirigido a inflamación. El efecto diurético se evaluó en un extracto acuoso ³⁵. El extracto acuoso de esta planta se probó las dosis de 41 y 166 mg / kg , usando como tratamiento farmacológico furosemida a 2 mg / kg. Se evaluó el sodio, potasio y equilibrio de agua. Los extractos acuosos en ambas dosis y la furosemida produjeron incrementos importantes y significativos en la excreción urinaria de sodio, potasio y agua en ratas con respecto al grupo de control. Este aumento fue dependiente de la dosis y el extracto acuoso en la dosis más alta indujo una excreción más marcada de sodio y agua que la furosemida, la excreción de potasio aumentó pero fue menor que la inducida por furosemida. Estos resultados sugieren que el extracto acuoso de *Bidens odorata* induce una respuesta diurética. Su análisis fitoquímico mostró moléculas como: alcaloides, azúcares y taninos ³⁵. Su actividad antidiarreica, fue evaluada en el extracto acuoso, metanólico y de cloroformo, además de su composición química de dos fracciones obtenidas del extracto con cloroformo que mostraron tener el mejor efecto al inhibir en un 72.9% la diarrea inducida. ¹¹⁰. Se encontró que las fracciones que tienen este efecto tienen componentes, cuyos principales compuestos son ácido palmítico (9,14%), ácido linoleico (13,12%), Ácido trans-oleico (9,24%), ácido esteárico (3,39%), ácido lignocérico (3,55%), ácido octacosanoico (3,14%) y ácido behénico (3,23%). ¹¹⁰. Recientemente se evaluó por primera vez, su efecto antiinflamatorio en un modelo murino inflamación auricular inducido por TPA, su actividad antioxidante, efectos antinociceptivos y toxicidad *in vitro* e *in vivo*, así como la identificación química de algunos compuestos presentes en el extracto etanólico. ¹⁰⁹. Para evaluar su efecto antiinflamatorio , utilizaron concentraciones de 2 mg/oreja del extracto etanólico (BoE) y como tratamiento farmacológico indometacina a 2 mg/oreja, los resultados obtenidos muestran que la inflamación disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) en un $63.8 \pm 2.47\%$ y $36.1 \pm 3.66\%$., Respectivamente, en comparación con el grupo de vehículos. Los compuestos químicos identificados en el BoE se muestran en la tabla 3, cabe señalar que algunos de estos compuestos coinciden con lo reportado en investigaciones pasadas. ^{110,109}

Tabla 3. Composición fitoquímica de *Bidens odorata*

Nombre de la Molécula	Clasificación	Actividad biológica
ácido benzoico	compuestos fenólicos	Anti-inflamatorio
ácido cafeico	compuestos fenólicos	Anti-inflamatorio
stigmasterol	fitosteroles	
β -Sitosterol	fitosteroles	Anti-inflamatorio
α -tocoferol	éteres de glicol	Anti-inflamatorio
ácido linolénico	ácidos grasos	Antioxidantes
ácido linoleico	ácidos grasos	Antioxidantes
ácido palmítico	ácidos grasos	Antioxidantes
Ácido trans-oleico	ácidos grasos	Antioxidantes
ácido esteárico	ácidos grasos	Antioxidantes
ácido lignocérico	ácidos grasos	Antioxidantes
ácido octacosanoico	ácidos grasos	Antioxidantes
ácido behénico	ácidos grasos	Antioxidantes
escualeno	terpenos	Anti-inflamatorio
cariofileno	terpenos	Anti-inflamatorio
β -amirina	terpenos	Anti-inflamatorio

Zavala 2013, Zapata 2017

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica, inflamatoria y sistémica que afecta principalmente las articulaciones sinoviales, y se caracteriza por una inflamación sistémica persistente de alto grado. Esta enfermedad produce dolor, inflamación, rigidez y disminución de la movilidad y, al cabo de los años, destrucción y deformación de las articulaciones sinoviales generando discapacidad física. La prevalencia de artritis reumatoide es de 0.2 al 5 % a nivel mundial, mientras que en México se presenta una prevalencia del 0.4 al 1.6 % afectando frecuentemente a personas mayores de 50 años, más a mujeres que a hombres, más a fumadores que a no fumadores. La etiología de esta enfermedad es desconocida, así que los tratamientos convencionales se enfocan en reducir la intensidad de las manifestaciones clínicas, la inflamación y el dolor. Para que los pacientes obtengan estos tratamientos deben tener los recursos económicos, las redes de apoyo y el conocimiento de la patología. En México el costo de los recursos consumidos por paciente para controlar la artritis reumatoide es de \$30,000.00 MN anuales, esto incluye los medicamentos, pruebas diagnósticas, hospitalización, terapias alternativas y cirugías. En años recientes se ha propuesto que productos derivados de plantas con propiedades medicinales puedan emplearse para el control de estos procesos crónicos-degenerativos. *B.o* es una planta medicinal originaria de México que por sus antecedentes etnobotánicos se sabe tienen efectos medicinales, ha sido utilizada para tratar distintas enfermedades, así como inflamación, sin embargo, pese a sus antecedentes etnobotánicas solo se ha realizado una investigación científica para probar su efecto antiinflamatorio (Zapata 2017) en un modelo de inflamación auricular inducida por TPA. Por otro lado, de *B.p.* que es una planta perteneciente al mismo género, pero diferente especie se le ha reportado tener múltiples actividades entre las que destaca su efecto antiinflamatorio. Un ejemplo es la investigación que realizó Herrera en el 2013 donde evaluó el EAEBp en células de ratón con un fenotipo TH17, los resultados observados sugieren que esta fracción puede contener moléculas pro y antiinflamatorias, por lo que sería recomendable continuar con el su fraccionamiento que agrupen aquéllas sólo con propiedades antiinflamatorias. Con base en lo anterior, este proyecto se realizó con la

intención de sentar las bases para generar un fitomedicamento a partir de *B.o.* que controle la inflamación articular minimizando los efectos adversos. De este planteamiento surge la siguiente pregunta de investigación. ¿*B.o.* tendrá efecto antiinflamatorio? ¿Cuáles subfracciones obtenidas de la fracción acetato de etilo de *Bidens odorata* (FAEBo) son efectivas para controlar el estado proinflamatorio de las células de la articulación sinovial?

4 HIPÓTESIS

Las subfracciones efectivas obtenidas de la FAEBo controlan el estado proinflamatorio de las células obtenidas de la articulación sinovial provenientes de ratones con inflamación articular

5 OBJETIVO

Determinar *in vivo* el potencial antiinflamatorio de las fracciones de *B.o.* e Identificar *in vitro* las subfracciones efectivas provenientes de la FAEBo que controlan el estado proinflamatorio de células obtenidas de la articulación sinovial provenientes de ratones con inflamación articular.

5.1 Objetivos Particulares

- 1.- Identificar las fracciones y subfracciones efectivas de FAEBo en el modelo de Inflamación Auricular Murino inducido por TPA.
- 2.- Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de las subfracciones efectivas del FAEBo-R5, en células de la articulación sinovial de ratones con inflamación articular.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de la planta (*Bidens odorata*)

B.o. se colectó en la comunidad de Chamilpa, Cuernavaca, Morelos en los alrededores de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (18°59'01.8" Latitud Norte 99° 14'23.6" Longitud Oeste, durante el mes de febrero del 2016. El material vegetal fue identificado con el folio número 34101 por el M. en C. Gabriel Flores Franco del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) y un espécimen se conservó en esas instalaciones para referencia.

6.2 Obtención de FAEBo

Las partes aéreas de la planta (flor, hojas y tallos) secas y pulverizadas se sometieron a un proceso de extracción por maceración a una concentración 1:6 (Peso/volumen) en etanol/agua 60:40 (v/v) a temperatura ambiente durante 24 horas para la obtención de un extracto hidroalcohólico (HA, 120 gr). Posteriormente se concentró por destilación a presión reducida en un rotavapor para su posterior secado por liofilización. Con la intención de obtener una fracción de acetato de etilo (FAEBo), fracción a evaluar con base a los antecedentes antes mencionados, se utilizaron 250 ml del extracto y se suspendió con acetato de etilo (AE) en un embudo de separación para obtener dos fases, la acuosa y la orgánica (fase de AE). Ambas fases se concentraron en la rota vapor y se sometieron a liofilización para su completo secado obteniendo así una fracción acuosa con un 65.8% de rendimiento (FAcBo, 79 gr peso seco) y FAEBo con 32.5 % de rendimiento (39 gr en peso seco) figura 10.

6.2.1 Obtención de las subfracciones de la FAEBo

Para obtener diferentes subfracciones de la FAEBo, esta se fraccionó en una columna con sílica gel (Merck) que se eluyó con un sistema de diclorometano: metanol (CH₂Cl₂: MeOH) a diferentes proporciones (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20 y 0:100) como se muestra en la

tabla 4. Las subfracciones obtenidas se concentraron por destilación a presión reducida en un rota vapor para su posterior secado por liofilización.

Tabla 4. Subracciones de *B.o.* y las concentraciones de sus eluyentes.

Sistema	Subracciones de FAEBo.
100 CH₂Cl₂	Sf1, Sf 2, Sf 3, Sf 4, Sf5, Sf 6, Sf 7
95/5 CH₂Cl₂ – MeOH	Sf 8, Sf 9, Sf 10, Sf 11, Sf 12
90/10 CH₂Cl₂ – MeOH	Sf 13, Sf 14, Sf 16, Sf 17
85/15 CH₂Cl₂ – MeOH	Sf 18, Sf 19, Sf 20, Sf 21, Sf 22
80/20 CH₂Cl₂ – MeOH	Sf 23, Sf 24, Sf 25, Sf 26, Sf 27
100 MeOH	Sf 28, Sf 29, Sf 30, Sf 31, Sf 32

6.2.2 Determinación del perfil fotoquímica de las subfracciones de la FAEBo por Cromatografía en Capa Fina

Con la finalidad de determinar el perfil químico de las subfracciones obtenidas, se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF) de fase normal. Para ello, se utilizaron fases estacionarias recubiertas de sílica gel (Cromatofolio de sílica gel 60 F₂₄₅, Merck), así como diferentes sistemas de la fase móvil y reveladores como : el Reactivo de Productos Naturales- Polietilenglicol (RPN-PEG), que consiste en una solución metanólica de difenilboriloxietilamina al 1 % seguida de una solución de polietilenglicol (USP, 1546580) al 5 %. ⁶⁷Este reactivo es útil para la detección de varios compuestos fitoquímicos, especialmente flavonoides mediante el cambio de coloración de la muestra sobre la placa, ⁷⁹ sulfato cérico (359009, Aldrich) al 1 % en ácido sulfúrico (339741, Aldrich) 2N para la detección de compuestos fitoquímicos en general (y reactivo de komarowsky que conciste

en una solución etanólica al 50% en ácido sulfúrico más una solución metanólica al 2% en 4-hidroxibenzaldehído (Revelador universal, excepto flavonoides)

6.2.2.1 Determinación del perfil fitoquímico de las reuniones por Cromatografía en Capa Fina

Después de determinar el perfil fitoquímico de las subfracciones se hizo una comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por CCF de las subfracciones. Las subfracciones que presentaron un perfil fitoquímico similar se reunieron entre sí dando como resultados 8 reuniones. Las cromatoplasmas se obtuvieron como se describió en la sección anterior.

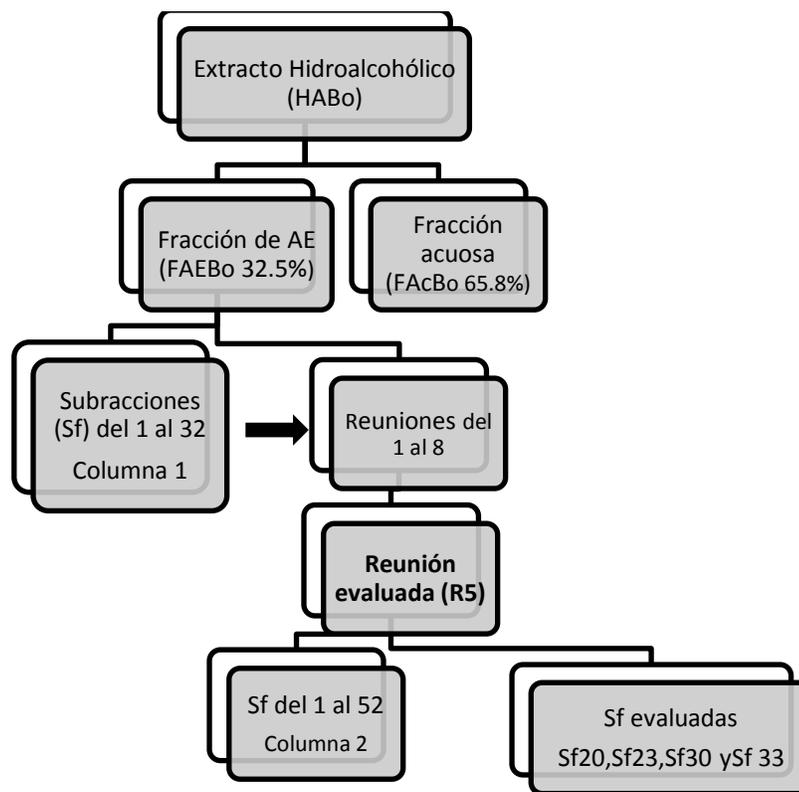


Figura 10.- Esquema general del fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de Bo. Para la obtención de los tratamientos experimentales.

Evaluación antiinflamatoria de las reuniones en el modelo de inflamación auricular murino inducido por TPA

6.3 Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de 8 a 10 semanas de edad y hembras de la cepa DBA de 8 semanas de edad que se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* bajo condiciones controladas de luz/obscuridad (12/12 h), temperatura y humedad en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM, con la supervisión y cuidados del médico veterinario responsable. Los animales se trataron con estricto apego a la NOM-062-ZOO-1999 (Aluja, 2002).

6.3.1 Grupos experimentales

Para evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto, las fracciones y reuniones de la FAEB0, se hicieron grupos de ratones que se agruparon de acuerdo con el tratamiento que recibieron tal y como se muestra en la tabla 5 (n= 3).

Tabla 5. Grupos experimentales para determinar el efecto antiinflamatorio *de B.o.* (N=3)

Naïve	TPA	TPA/DEXA	TPA/HA	TPA/FAcBo	TPA/FAEB0	TPA/FAEB0-R1	TPA/FAEB0-R5
Sin TX	10 µl	10 µl de c/u	10 µl de c/u	10 µl de c/u	10 µl de c/u	10 µl de c/u	10 µl de c/u
	[25 µg/oreja]	[40 µg/oreja]			[0.2 mg/oreja]		
					[0.8 mg/oreja]		
					[3.2 mg/oreja]		
					[12.8 mg/oreja]		
					[51.2 mg/oreja]		

6.3.2 Inducción de inflamación por aplicación tópica de TPA

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria del Extracto HA-Bo, fracción acuosa (AcBo), FAEBo y de las reuniones con mayor rendimiento 1 (0.056gr) y 5 (0.050gr) de la FAEBo, se indujo inflamación auricular a través de la aplicación tópica de TPA (12 - O - tetradecanoilforbol-13-acetato). Los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal (pentobarbital sódico a una dosis de 63 mg/Kg). Posteriormente se aplicaron 10 µl de TPA en el centro de la cara externa e interna de la oreja izquierda del ratón. Quince minutos después del TPA, se aplicaron el extracto, fracciones y reuniones a diferentes concentraciones en la oreja izquierda (0.2, 0.8, 3.2, 12.8, 51.2 mg/oreja), las concentraciones se eligieron con base a experimentos previos realizados para el mismo modelo de inflamación pero con diferente planta. Se usaron 40 µg/or de dexametasona como control positivo. La oreja derecha de cada ratón se le considero como control negativo, para cual solo se le aplico el vehículo para disolver el TPA (acetona), el extracto, fracciones y reuniones (agua, acetona). Los tratamientos se dejaron durante 6 horas para posteriormente determinar su actividad anti-inflamatoria.

6.3.2.1 Valoración de edema

Seis horas después de la aplicación del TPA y de los tratamientos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se tomó una muestra de la parte central donde fueron aplicados los tratamientos. Con un sacabocado se obtuvieron muestras circulares de 6 mm de diámetro de cada oreja, las cuales fueron pesadas en una balanza analítica para que a través del peso se valore el grado de edema. El porcentaje de inhibición del edema se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición del edema} = \frac{Ic - It}{Ic} \times 100$$

Ic = 100% de inhibición (naïve)

It = Promedio del tratamiento

6.3.2.2 Cuantificación de células sanguíneas

Para conocer un poco más el estado de los ratones con inflamación auricular inducida por TPA, anesteciados, se les tomo 4 muestras sanguíneas a través de vena caudal de la cola. Para esto se realizó una pequeña incisión con ayuda de un bisturí. Antes de aplicar el TPA se tomó una gota de sangre que fue colocada en un portaobjetos esmerilado de 26 x 76 mm, previamente identificado y se procedió a realizar un frotis. Este procedimiento se realizó en 4 tiempo, es decir: 1 frotis basal (0 horas) y los siguientes 3 frotis se realizaron cada 2 horas post TPA (2, 4 y 6 horas), los frotis fueron teñidos por la tinción de Wright para identificación de células sanguíneas como: linfocitos, monocitos, neutrofilos, eosinofilos y basofilos. Se realizo el contó del 100% de las células sanguíneas visualizándolas con aceite de inmersión en un microscopio óptico en el objetivo de 100 X.

6.4 HPLC del extracto HA-Bo, FAEBo y FAEBo-R5

Despues de evaluar el extracto HA-Bo, FAcBo, FAEBo, FAEBo-R1 y FAEBo-R5 en la oreja de Ratón con inflamación inducida por el TPA, se observó que el mejor tratamiento para inhibir el edema auricular fue FAEBo-R5 . La reunión, la fracción y el extracto madre se sometieron a un análisis cromatográfico por HPLC, para realizar una comparación fitoquímica. La reunion , la fraccion y el extracto madre se sometieron a un analisis cromatografico mediante HPLC, para realizar una comparacion fitoquímica.

El análisis se realizó mediante HPLC utilizando un sistema cromatográfico que consiste en un módulo de separación Waters 2695 equipado con un detector de fotodiodos Waters 996 y el software Empower Pro (Waters Corporation, EE.UU.). La separación química se consiguió usando una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm x 250 mm i.d., tamaño de partícula de 5 µm) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, EE.UU.). La fase móvil consistió en una solución acuosa de

ácido trifluoroacético al 0,5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El sistema de gradiente fue como sigue: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% de B, 4 - 7 min, 30% de B; 8-22 min, 50% B 23 min. 80% de B; 24-26 100% B; 27-30 min, 0% B. El caudal se mantuvo a 0,9 ml min-1, y el volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl. La absorbancia se midió a 254 nm.

6.4.1 Obtención de las subfracciones de FAEBo-R5

Con la intención de identificar que las moléculas están presentes en la FAEBo-R5, la cual mostro tener el mejor efecto al reducir el edema auricular, se fraccionó en una columna con sílica gel, fase reversa (Merck) que se eluyó con un sistema de elución de agua/acetonitrilo a diferentes concentraciones (Tabla 6) Las subfracciones (Sf) obtenidas se concentraron por destilación a presión reducida en un rota vapor para su posterior secado por liofilización.

Tabla 6. Sf de R5 de FAEBo y las concentraciones de sus eluyentes.

SISTEMA	SUBFRACCIONES
100 % agua	Sf1,Sf2,Sf3,Sf4,Sf5,Sf6
95% agua 5 % acetonitrilo	Sf7,Sf8,Sf9,Sf10,Sf11
90% agua 10% acetonitrilo	Sf12,Sf13,Sf14,Sf15,Sf16
80% agua 20% acetonitrilo	Sf17,Sf18,Sf19,Sf20,Sf21,Sf22
70% agua 30% acetonitrilo	Sf23,Sf24,Sf25,Sf26,Sf27,Sf28
60% agua 40% acetonitrilo	Sf29,Sf30,Sf31,Sf32,Sf33
50% agua 50% acetonitrilo	Sf34,Sf35,Sf36,Sf37,Sf38
40% agua 60% acetonitrilo	Sf39,Sf40,Sf41,Sf42,Sf43,Sf44
30% agua 70% acetonitrilo	Sf45,Sf46,Sf47,Sf48,Sf49,Sf50
100 % acetonitrilo	Sf51
100 % MeOH	Sf52

6.4.2 Determinación del perfil fitoquímico de las FAEB0-R5 por cromatografía en capa fina

Con la finalidad de determinar el perfil químico de las subfracciones obtenidas, se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF) de fase reversa. Para ello, se utilizaron fases estacionarias recubiertas de sílica gel (Cromatofolio de sílica gel 60 F₂₄₅, Merck), así como diferentes sistemas de la fase móvil y reveladores como el reactivo de Komarowsky que es un revelador universal (excepto flavonoides). Una vez reveladas las placas se observaron los patrones de manchas bajo luz UV y luz visible, y se compararon entre subfracciones.

Evaluación antiinflamatoria de la FAEB0-R5 y de las subfracciones FAEB0R5-Sf20, FAEB0R5-Sf23, FAEB0R5-Sf30 Y FAEB0R5-Sf33 en la expresión de IL-6 por células de la membrana sinovial en estado proinflamatorio

6.5 Grupos experimentales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa DBA de 8 semanas de edad. Los ratones fueron agrupados de acuerdo al tratamiento que recibieron tal y como se muestra en la tabla 7. N= 6 animales por grupo.

Tabla 7 Grupos experimentales

Condición experimental	Tratamiento/vía
Naïve	Sin TX
inflamación articular	ACF/membrana sinovial

6.5.1 Inducción de la inflamación articular rotuliana

Con la intención de obtener células de la membrana sinovial con características inflamatorias sobre los cuales se pudieran probar las diferentes fracciones, se inducirá inflamación articular a través de cuatro inmunizaciones con Adyuvante Completo de Freund (ACF) en la membrana sinovial de la rodilla cada 7 días (). Las inmunizaciones se realizarán bajo anestesia quirúrgica (10 mg/Kg de ketamina intramuscular y 20 mg/Kg xilacina intraperitoneal) semanalmente.

6.5.2 Evaluación conductual

Para conocer la condición del ratón previa a la obtención de las células de la membrana sinovial, se evaluaron dos características , la inflamación (edema) y pérdida de la funcionalidad (levantamientos) de la articulación rotuliana izquierda y derecha de cada ratón, ya que se ha reportado que se relaciona directamente con el estado inflamatorio de las articulaciones.¹⁰⁸

6.5.2.1 Cuantificación levantamientos verticales

Para conocer la funcionalidad de la articulación del ratón, se contarán los levantamientos que realice sobre sus patas traseras durante 5 minutos. , Para lo cual se colocará el ratón en una superficie lisa dentro de un cilindro de acrílico transparente (30 cm de largo por 20 cm de ancho). Esto se realizará antes de la primera inmunización y 4 días después de cada inmunización

6.5.2.2 Medición del edema articular

Con la ayuda de un vernier digital (Riva Importaciones ^{MR}) y con el ratón bajo anestesia quirúrgica se midió tanto el ancho como el largo de ambas rodillas. Valores que se utilizaron para calcular el diámetro de la articulación y el % de incremento de la articulación.

6.5.3 Aislamiento de células de la membrana sinovial

Una semana después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se les retiró la piel de las extremidades inferiores y se separó la pelvis del fémur para obtener la pata completa del ratón. A la extremidad se le retiró el músculo de los huesos en PBS 1X frío. Para obtener las células de la membrana sinovial se dobló la pata en la región de la articulación (rodilla) en donde se le hizo una pequeña incisión entre fémur y tibia-peroné para separarlos. Ambos huesos se colocaron en un tubo con 1 ml de solución de digestión (colágenasa IV más medio DMEM suplementado) y se incubaron por una hora a 37°C en un Thermo Shaker (primera obtención de células de la membrana sinovial). Pasado este tiempo se recuperó la solución de digestión con las células y se pasó a un tubo 2 al que se le agregó 1 ml de PBS-Suero fetal Bovino (SFB) al 10% para detener la reacción de la colagenasa, y al tubo 1 se le agregó nuevamente 1 ml solución de digestión y se incubó por una hora a 37°C en un Thermo Shaker (segunda obtención de células de la membrana sinovial). El tubo 2 se centrifugó a 1200 rpm por 8 min a 4°C para obtener el botón celular, esto también se realizó con el tubo 1 una vez terminado su tiempo de incubación. Para conocer la viabilidad de la primera y segunda extracción de células de la membrana sinovial, se tomaron 10 µl de la suspensión celular de éstas y se mezclaron en una concentración 1:1 con azul tripano. Este colorante de exclusión tiñe a las células muertas con un color azul intenso, mientras que las vivas se mantienen blancas. Para realizar el conteo celular se tomaron 10 µl de la mezcla de células con azul tripano y se colocaron en una Cámara de Neubauer. El conteo se realiza en los 4 cuadrantes de cada esquina y el cuadrante

central. Para conocer el número total de células el total de los cuadrantes se multiplicó por 1×10^6 y por el volumen de PBS: SFB 10% (Sigma-Aldrich) en que se encontraban. Posteriormente se calculó el porcentaje de viabilidad tomando el total de células como 100% con base en el cual se calculó el porcentaje de células vivas para su posterior evaluación.

6.5.3.1 Incubación de las células de la membrana sinovial con FAEBo-R5 y sus subfracciones

Con la finalidad de evaluar la capacidad antiinflamatoria de las diferentes concentraciones (0.08, 0.4, 2, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$) de FAEBo-R5 y sus subfracciones, éstas se dejarán incubar con la primera y segunda obtención celular de la membrana sinovial. Las células se sembrarán en cajas de 24 pozos a una concentración de 1×10^6 de células por pozo en medio DMEM completo y se dejarán incubar durante 48 horas a 37°C y en 5% de CO_2 .

6.5.3.2 Evaluación del tratamiento más efectivo para el control de la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α en medio de cultivo por ELISA

Pasado el tiempo de incubación, se recupero el medio de cultivo y se evaluo por medio de ELISA la concentración de IL-6, una IL que esta estrechamente relacionada con la inflamación articular de bajo y alto grado. Se realizo una evaluacion de IL-6 para dirigirnos hacia el tratamiento con el mejor efecto antiinflamatorio (la FAEBo-R5 y las subfracciones de esta Sf20, Sf23, Sf30, Sf33). Los tratamientos se eligieron con base a los resultados obtenidos en el modelo de TPA (FAEBO-R5) y al perfil fitoquímico que se encontró en cada una de las Sf. Posteriormente a esta evaluación y con los resultados obtenidos se determinó a evaluar FAEBO-R5 para la expresión de IL-1 β , IL-17 y TNF- α . Las IL se para lo cual se

utilizaron los Kits Mouse para IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α BD siguiendo las instrucciones descritas por los proveedores. Brevemente se realizará una ELISA en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Immuno Plate Maxisorp, Rosekilde, Denmark). Las microplacas se sensibilizaron por 18 horas a 4°C con los anticuerpos de captura. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 (0.05%) y se bloquearon por 1 hora a T.A. con PBS-SFB al 10%. Las placas se volvieron a lavar 3 veces con PBS-Tween 20 (0.05%), y se incubaron por otras 2 horas con los estándares de citocinas para la curva estándar, y con las muestras de medio de cultivo. Después se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 (0.05%) y se incubaron con el conjugado anticuerpo de detección y *horseradish peroxidase* o HRP correspondientes por 1 hora a T.A. Las placas se volvieron a lavar 7 veces y se añadió el sustrato TMB (3, 3', 5,5'-tetraMethyBenzidine). Pasados 30 minutos, se paro la reacción con H₂SO₄ y la lectura de densidad óptica se realizo en un lector de ELISA a 450 nm y a 37°C.

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los parámetros (farmacológicos e inmunoinflamatorios) fueron recopilados en una base de datos utilizando el programa Excel. Utilizando el programa INSTAT, diferentes análisis uní y multivariados fueron realizados para evaluar cada uno de los parámetros estudiados, y determinar diferencias significativas y correlaciones entre los grupos tratados. Los resultados se presentarn como medias \pm desviación estándar y se analizarón con el software INSTAT a través de un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba post-Hoc Dunnet con una significancia $p \leq 0.05$.

7 RESULTADOS

7.1 Los Flavonoides son los Principales Componentes de las Subfracciones de la FAEBo

Con la finalidad de identificar el perfil químico de las subfracciones obtenidas de la FAEBo, se realizaron CCF utilizando quercetina (Flavonoide de tipo flavonol) como estándar y la FAEBo como referencia, así como diferentes reveladores que permitieron identificar el tipo de moléculas presentes. En la figura 11 se muestra el contenido químico de las Sf 1 a la Sf 23 (resultados de la Sf24 a la Sf32 no mostrados). En panel A se muestra el resultado de la CCF de las Sf 1 a la Sf10, de la FAEBo y del estándar de referencia quercetina después del revelado con sulfato cérico. La cromotopla muestra la presencia de moléculas como: ácidos grasos (Sf1 a Sf3) y terpenos (Sf3 a Sf8) que pueden ser observados gracias al revelado de color café que se genera al ser expuestos al revelado con sulfato cérico (revelador universal). En el Panel B y C se observa la presencia de flavonoides no glicosilados (Sf10 a Sf20) y flavonoides glicosilados que revelan en color amarillo y naranja (Sf15 a Sf23) al ser expuestos a RPN/PEG.

Después de comparar las semejanzas del perfil químico de las Sf, se hicieron las diferentes reuniones que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Reuniones de las fracciones de FAEBo de acuerdo con su perfil químico

Reunión	Subfracción
R1	Sf1, Sf 2
R2	Sf 5, Sf 6, Sf 7, Sf 8
R3	Sf 11, Sf 12, Sf 13, Sf 14
R4	Sf 16, Sf 17
R5	Sf 19, Sf 20
R6	Sf 21, Sf 22, Sf 23
R7	Sf 26, Sf 27, Sf 28, Sf 29, Sf 30, Sf 31, Sf 32
R8	Sf 24, Sf 25

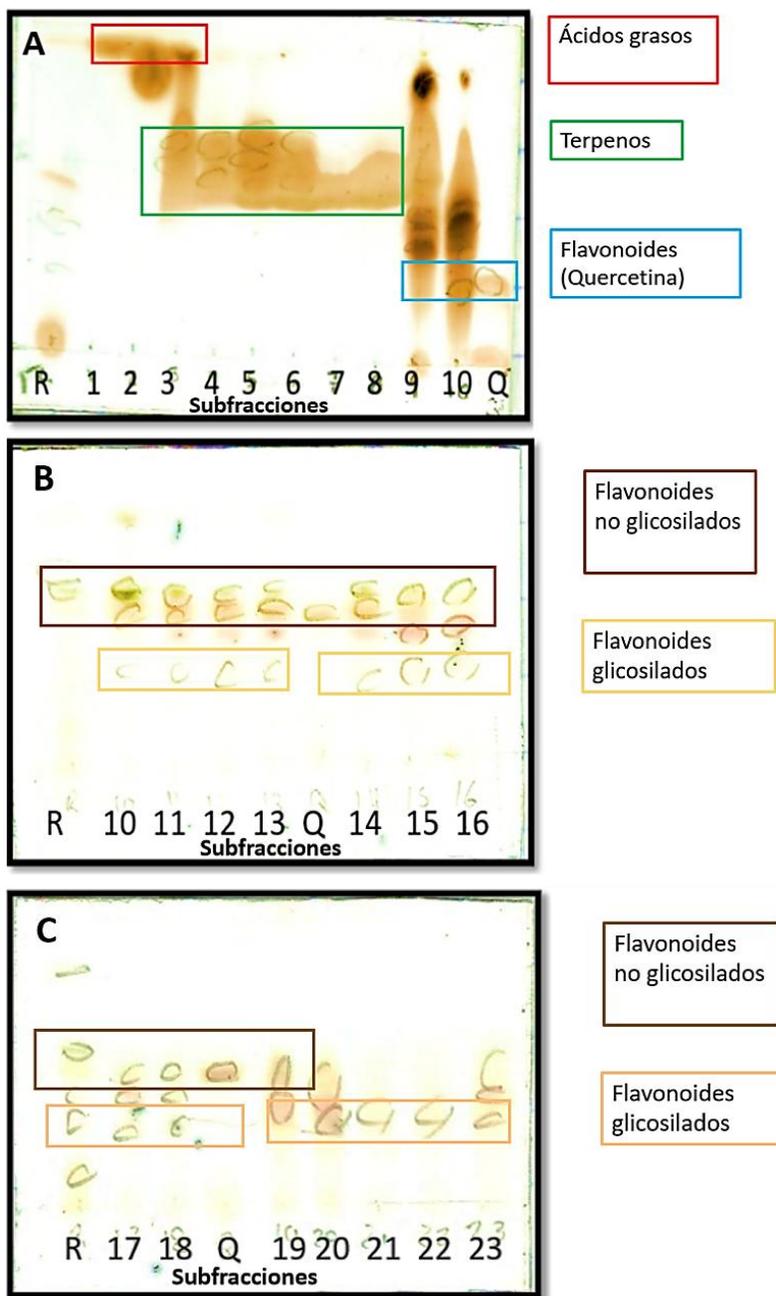


Figura 11.- CCF en fase normal del subfraccionamiento de la FAEBo Panel A= fase móvil CH_2Cl_2 : MeOH 95/5, revelador: sulfato cérico. Panel B y C= Fase móvil CH_2Cl_2 : MeOH 85:15, revelador RPN/PEG. Abreviaturas: R: Referencia (FAEBo)1: Sf1 2: Sf2 3: Sf3 4: Sbf4 5: Sf5 6: Sf6 7: Sf7 8: Sf8 9: Sf9 10: Sf10, 11: Sf11, 12: Sf12, 13: Sf13, 14: Sf14, 15: Sf15, 16: Sf16, 17: Sf17, 18: Sf18, 19: Sf19, 20: Sf20, 21: Sf21. 22: Sf22, 23: Sf 23, Q.- Quercetina.

En la figura 12 se muestran las CCF de las reuniones que fueron realizadas bajo las mismas condiciones que las anteriores. Los diferentes sistemas de revelado corroboraron la presencia de moléculas como: ácidos grasos (panel C, R1) terpenos (panel B, R2) flavonoides (panel A) no glicosilados (R3 a R8) y glicosilados (R3 Y R5), cabe mencionar que la R7 presenta moléculas que podrían estar asociados a otro tipo de flavonoides. Con estos resultados podemos inferir que los principales compuestos presentes en la FAEBo son los flavonoides, a los que se les ha reportado actividad antiinflamatoria.³⁷

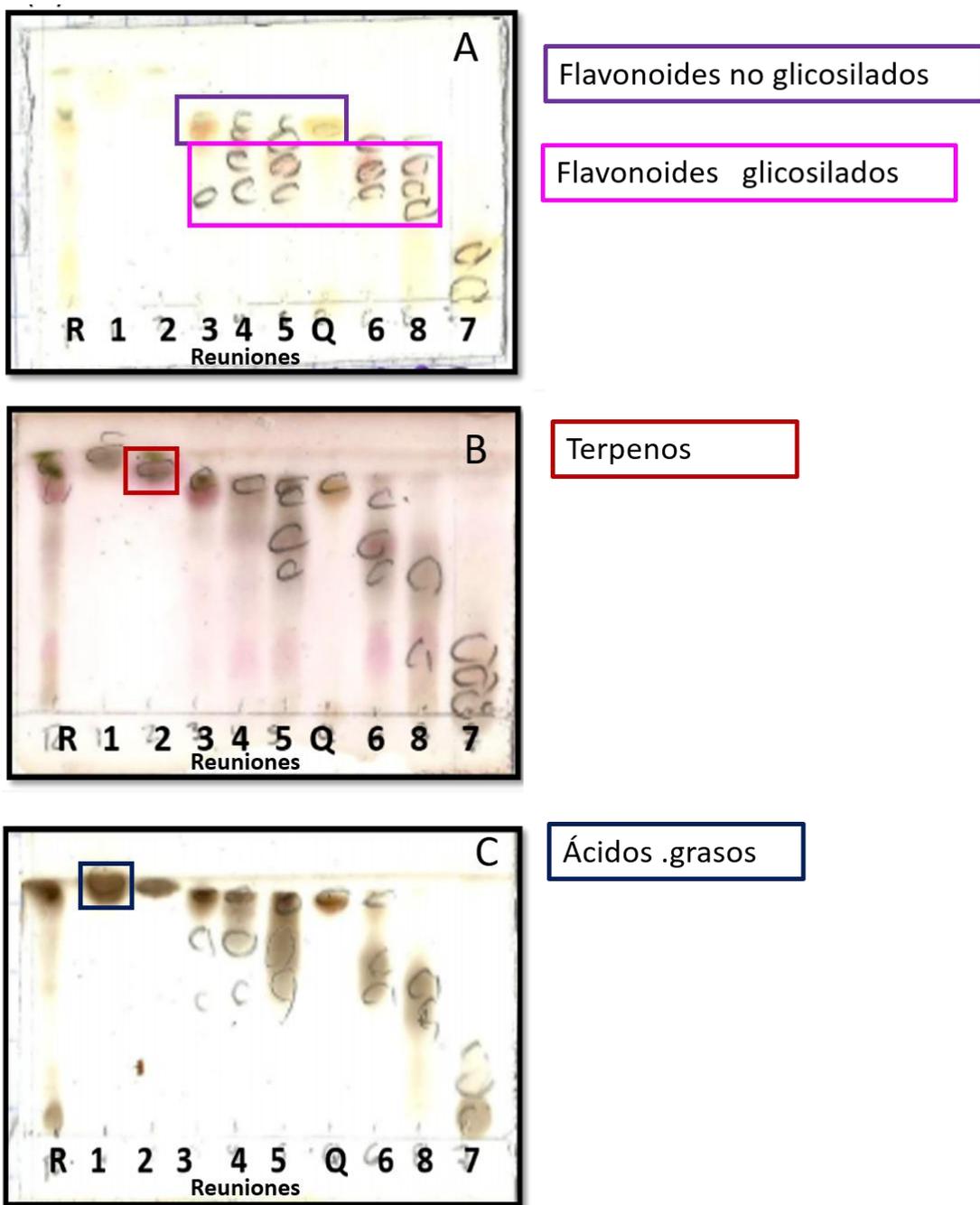


Figura 12.- CCF en fase normal de las reuniones del subfraccionamiento de la FAEBo, Fase móvil CH_2Cl_2 : MeOH 85/15. Panel A: revelador: RPN/PEG, panel B: revelador, reactivo de komarowsky y panel C: revelador, Sulfato cérico. Abreviaturas: R: Referencia (FAEBo), Q: Quercetina. Reuniones: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R8, R7.

7.2 HABo, FAcBo, FAEBo, FAEBo-R1 Y FAEBo-R5 controlan el edema auricular inducida por TPA en ratón

Los estudios fitoquímicos permiten encontrar dentro de las fracciones de una planta, aquellas que sean responsables de una determinada actividad. En este caso, se buscaron las fracciones con actividad antiinflamatoria. Para ello, se utilizó el modelo de inflamación auricular inducido por TPA ya que permite hacer un primer tamiz para encontrar aquellas fracciones, o reuniones de subfracciones que presenten dicha actividad.

Para lo cual, el extracto HA-Bo, las FAcBo, FAEBo y las reuniones con mayor rendimiento R1 (ac. grasos) y R5 (flavonoides glicosilados, no glicosilados y terpenos) de la FAEBo, se probaron en el modelo de inflamación auricular murino inducido por TPA. En la figura 13 se muestra el efecto de los vehículos utilizados para disolver los tratamientos (acetona y agua) comparados con el TPA, en los resultados obtenidos se muestra que los vehículos no ejercen ningún efecto para potenciar el edema auricular al presentar una % de inhibición del 99 a 100% respectivamente. En la figura 14 (Panel A) se muestra que el tratamiento farmacológico con dexametasona inhibió significativamente ($p < 0.001$) en un 40% ($7.74 \pm \text{sem}$) la inflamación inducida por el TPA. De los tratamientos experimentales, el extracto HA-Bo en las concentraciones de 3.2 (30%) y 12.8 (39%) mg/oreja también presentaron diferencias significativas con respecto al TPA ($7.13 \pm \text{sem}$ y $4.61 \pm \text{sem}$ respectivamente), esto mismo ocurrió con la FAcBo (27%) Panel B y la FAEBo (40%) Panel C en la dosis de 51.2 mg/oreja ($4.04 \pm \text{sem}$ y $4.27 \pm \text{sem}$ respectivamente). Por otro lado, las reuniones resultaron tener más eficacia que los tratamientos anteriores para inhibir el edema auricular (panel D, E), de manera que todas las concentraciones aplicadas tuvieron eficacia como el tratamiento farmacológico. R1 inhibió significativamente el edema ($p < 0.001$) en un 82% en la concentración de 3.2 mg/oreja ($4.82 \pm \text{sem}$) y R5 entre un 67% (0.8mg/oreja) 74% (3.2 mg/oreja) y un 86 % (0.2mg/oreja) ($5.01 \pm \text{sem}$, $1.81 \pm \text{sem}$ y $5.86 \pm \text{sem}$ respectivamente), indicando que, esta última reunión era la más efectiva para el control de la inflamación auricular inducida por TPA.

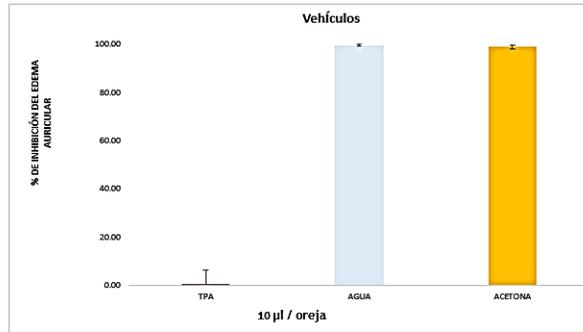


Figura 13. Porcentaje de inhibición de los vehículos utilizados para disolver los tratamientos experimentales. (Agua y acetona.) Comparado con el agente inductor de la inflamación auricular (TPA).

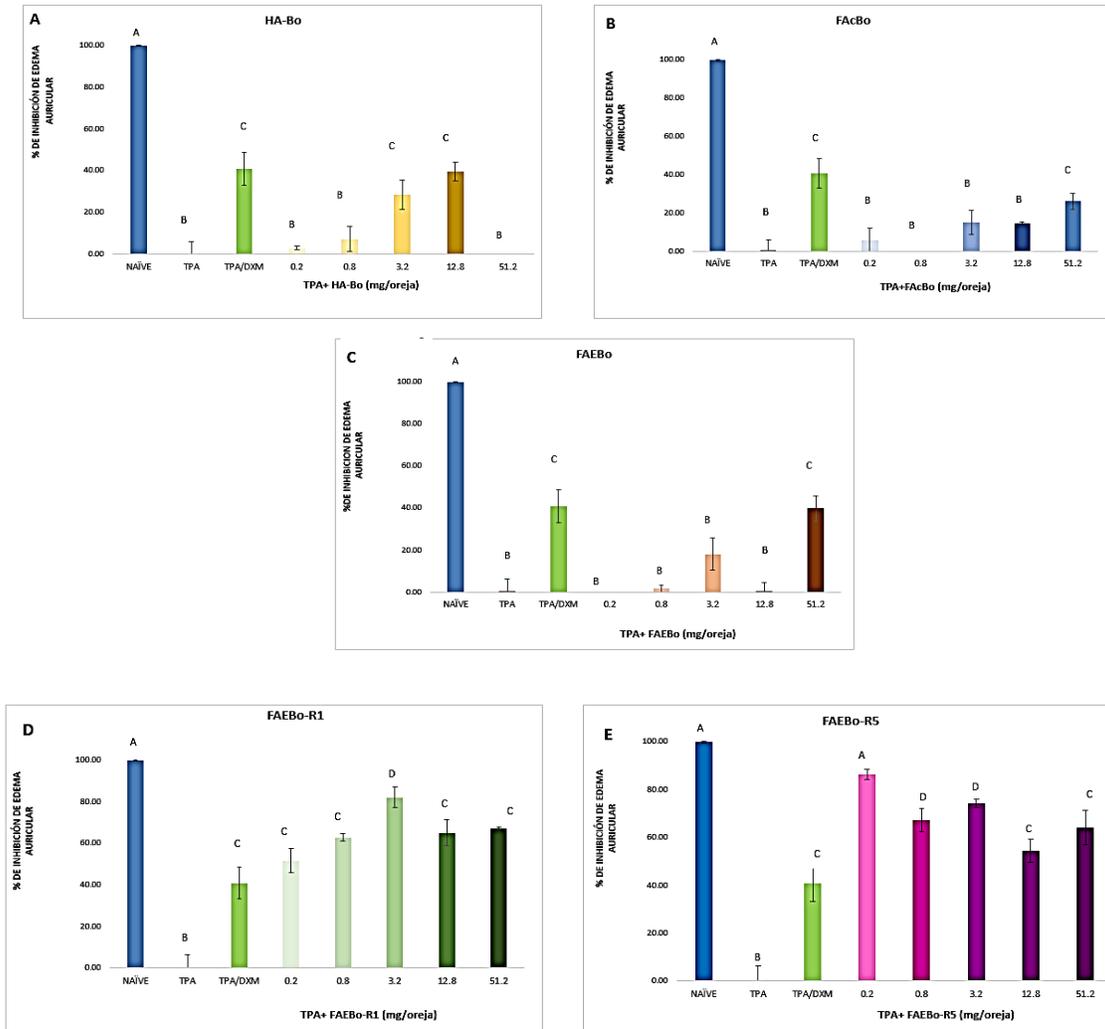


Figura 14. Porcentaje de inhibición en la oreja izquierda de ratones con edema auricular por la aplicación tópica de TPA. A) Extracto HA, B) FAcBo C) FAEB0 D) FAEB0 - R1 E) FAEB0 - R5. Azul (Naïve), Rojo (TPA), Verde (Dexametasona). Los valores son representados con media \pm SEM (n=3) y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p \leq 0.05$)

7.2.1 El Edema se relaciona con el porcentaje de neutrófilos en Circulación

Durante los procesos inflamatorios, existe una comunicación importante entre el sitio de la inflamación y la médula ósea a través de factores de crecimiento, y quimiocinas que dirigen

a las células de neoformación hacia el lugar de la inflamación. Una manera de analizar la actividad antiinflamatoria de los tratamientos experimentales es a través de las células sanguíneas circulantes durante el tiempo experimental (6 horas). Los resultados de los conteos celulares indicaron que las células que cambian sus proporciones son 2, los neutrófilos y los linfocitos. Las proporciones entre ambas células se muestran en la tabla 9, en donde se observa que el tratamiento con TPA indujo 3.11 más neutrófilos que linfocitos, a diferencia del grupo naïve que tenía 2.1 neutrófilos por linfocito, valor semejante al inducido por la dexametasona (2.32). Por otro lado, de los tratamientos experimentales, las dosis de 0.2 y 3.2 mg/or de FAEB0-R5 presentaron proporciones de 2.29 y 2.11 respectivamente, valores que están entre los del grupo naïve y la dexametasona. Sin embargo las concentraciones de 0.8, 12.8 y 51.2 mg/or disminuyeron aún más la proporción entre estas células, siendo de 1.98, 1.4 y 1.65 respectivamente.

Tabla 9 Proporción de neutrófilos / linfocitos a diferentes tiempos [mg/oreja]

Tratamientos	0 horas	2 horas	4 horas	6 horas
Blanco	0.60	1.58	2.16	2.10
TPA	0.81	2.24	2.86	3.11
DXM	0.60	1.14	2.68	2.32
R5 0.2	0.42	0.84	1.74	2.29
R5 0.8	0.52	0.86	2.39	1.98
R5 3.2	0.66	1.23	1.76	2.11
R5 12.8	0.75	1.21	2.83	1.4
R5 51.2	0.64	1.21	1.96	1.65

En la figura 15 se observa el porcentaje de cambio de neutrófilos que están en tránsito a las 6 horas de la aplicación tópica del TPA . El grupo que solo recibió TPA muestra un incremento significativo del 8% ($1.76 \pm \text{sem}$) de neutrófilos con respecto al grupo naïve ($P < 0.05$), y a su vez el grupo naïve no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto al porcentaje del grupo tratado con dexametasona y las concentraciones de 0.2, 0.8 y 3.2 mg/or de FAEB0-R5 (1.76 ± 4.48 , sem , $4.37 \pm \text{sem}$, $\pm 2.03 \pm \text{sem}$ respectivamente) lo que quiere

decir que el antiinflamatorio usado como control puede influir en el porcentaje de las células en tránsito llevándolas al nivel de los ratones naïve a pesar de la presencia del TPA. Por otro lado, las de 12.8 y 51.2 mg/oreja ($6.03 \pm \text{sem}$, $2.85 \pm \text{sem}$) mostraron un decremento de neutrófilos aun más que el grupo naïve.

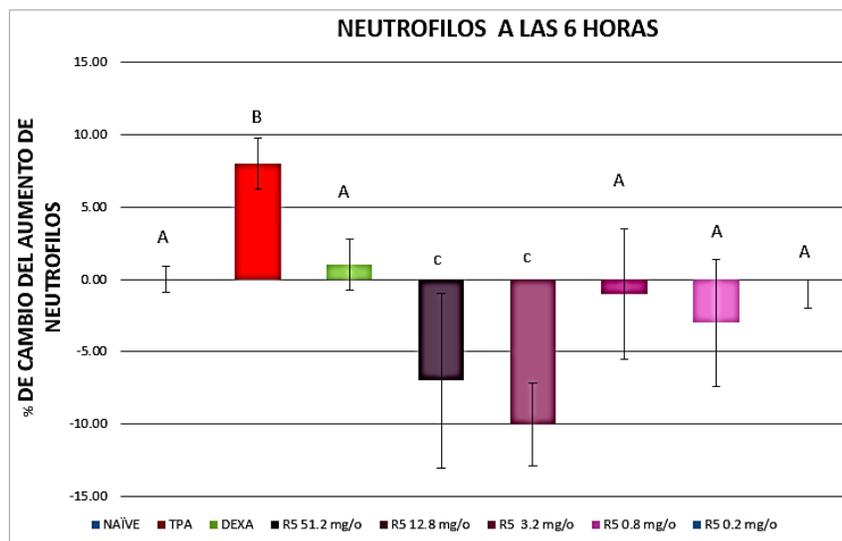


Figura 15. Porcentaje de cambio de neutrófilos circulantes en sangre a las 6 horas experimentales a diferentes concentraciones. Los valores son representados con media \pm SEM (n=3) y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p \leq 0.05$)

7.3 Los acetilenos y las flavonas son los principales componentes de la FAEBo-R5

Identificar los grupos moleculares presentes en FAEBo-R5 es crítico para comprender la forma en que la reunión actúa, para lo cual tanto la FAEBo-R5 como FAEBo y HA-Bo de los que se deriva, fueron analizadas por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Este

procedimiento permitió, no solo identificar las familias de las moléculas principalmente representadas en la reunión, sino también la pureza de estos.

En la Figura 16 se observan los cromatogramas del extracto madre (HA-Bo), de FAEBo y de la FAEBo-R5, en donde su composición se ve representada a manera de picos, entre los que se pudieron identificar Compuestos fenólicos como: flavonoides en un tiempo de retención (RT) de 8.55 y 11.03, Fenilpropanoides (ácido cafeico, cafelito y feruláceo) con un RT de 8.84, 9.4 y 10.55 así como acetilenos con RT de 9.51, 9.11, 13.1, 14.9 y 27.4. Sin embargo, es necesario realizar estudios más precisos que nos permitan identificar el o los compuestos activos.

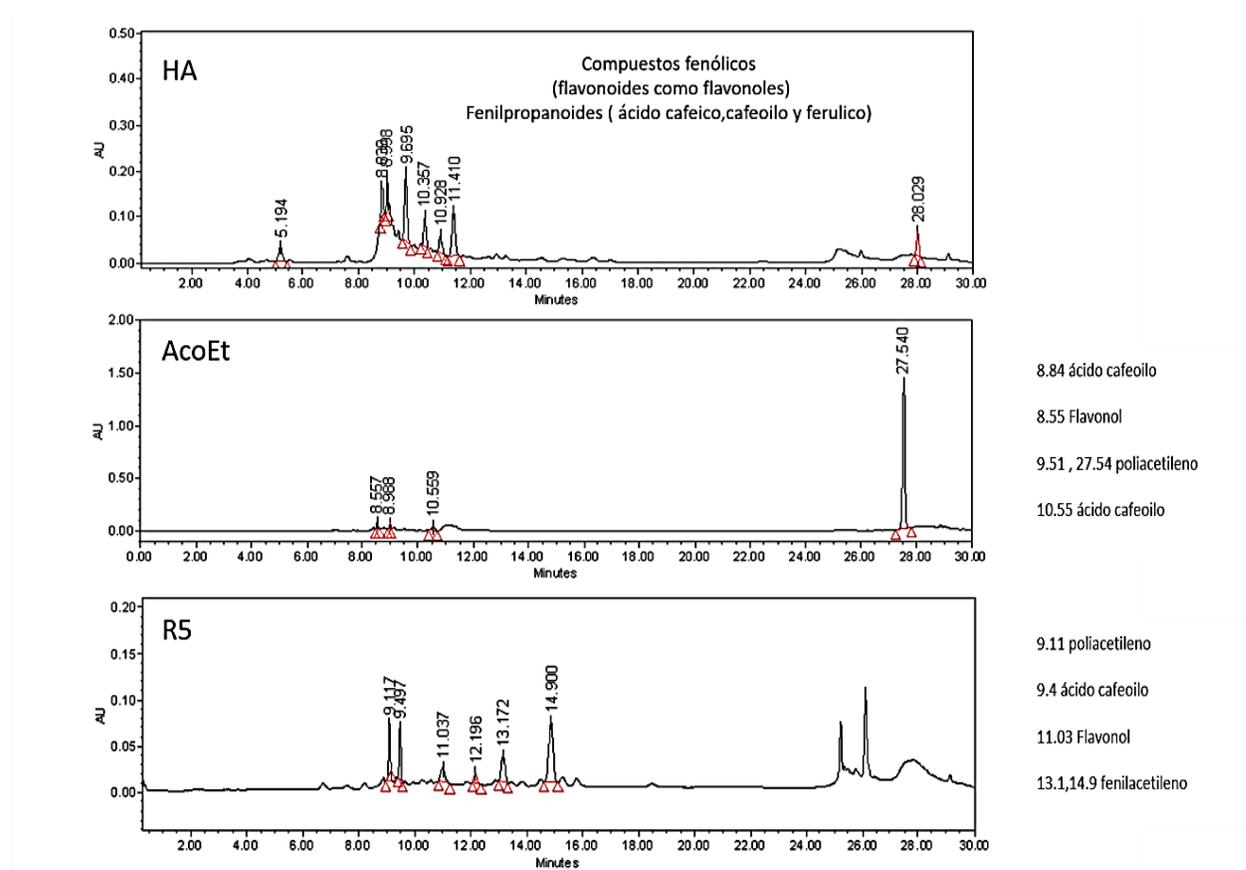
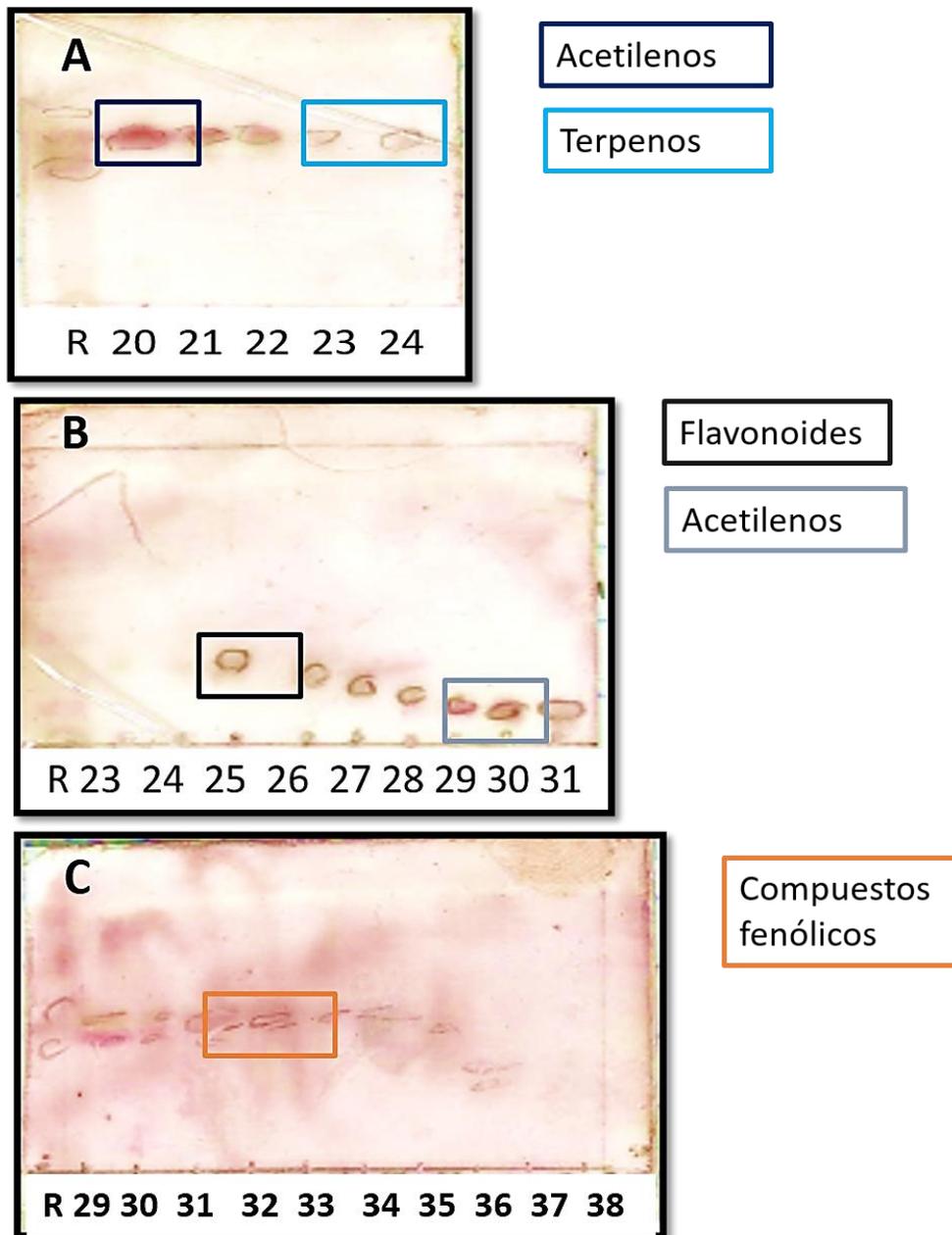


Figura 16. comparación de los cromatogramas y espectros UV a 254nm del HPLC del extracto HABo, FAEBo y FAEBo-R5.

Con la intención de continuar con el proceso de identificación de los grupos moleculares responsables de la capacidad antiinflamatoria de *Bo*, se realizó un subfraccionamiento de la FAEBo-R5 de la cual se obtuvo 52 subfracciones, con el fin de separar las moléculas presentes en la reunión con base en su polaridad. Nuevamente la CCF permitió identificar semejanzas y diferencias de las separaciones a través del perfil químico. Las CCF en la figura 17 (Panel A) indica la presencia de moléculas como: acetilenos (Sf20) revelan en color rosado, terpenos en color café claro (Sf23, Sf24), en el Panel B también se observan acetilenos (Sf29, Sf30) y flavonoides que revelan en color amarillo-naranja y en el panel C se observa la presencia de compuestos de tipo fenólico (Café) color que marcan al ser expuestos al reactivo de 4-hidroxibenzaldehído.



Subfracciones de la FAEB0-R5

Figura 17.- CCF en fase reversa del subfraccionamiento de la FAEB0-R5, Fase móvil: agua/acetonitrilo 7:3, revelador: reactivo de komarowsky, Abreviaturas: R.- Referencia: FAEB0-R5.

A partir de estos resultados se eligieron 4 subfracciones de FAEBo-R5 (Sf20, Sf23, Sf30, Y Sf33) a las que se les realizó un UPLC (Cromatografía líquida de ultra rendimiento) lo que permitió evaluar la pureza de los compuestos contenidos en ellas y corroborar por medio de sus espectros UV, los resultados obtenidos por HPLC. El análisis del espectro de UV de las fracciones 20 y 30 (Figura 18 panel A y C) son similares (λ 206, 212, 240, 250, 290, 310,33 nm). Este tipo de poli-absorción es característico de los compuestos de tipo acetileno y concuerda con el color rosado de las manchas al revelar con 4-hidroxibenzaldehído que es para la identificación de este tipo de moléculas. Por otro lado, la Sf23 (panel E) presentó una sola mancha que revela de color café con este mismo revelador, lo que indicó la presencia de terpenos. En el caso de las F25 (panel B) a la Sf28 en el análisis de cromatografía en capa fina, se observaron manchas de color amarillo-naranja y el espectro de UV de la fracción 25 (λ = 200, 265,346 nm) es característico de los flavonoides de tipo flavona. Esto indica la presencia de al menos tres flavonas en R5 siendo Sf25 la más abundante. El análisis de UPLC y CCF indicaron que la Sf33 (Panel F) está constituida principalmente por compuestos de tipo fenólico.

Con base en estos resultados se puede decir que la FAEBo-R5 (panel D) está compuesta por: acetilenos, flavonoides (flavonas), terpenos y otros compuestos fenólicos.

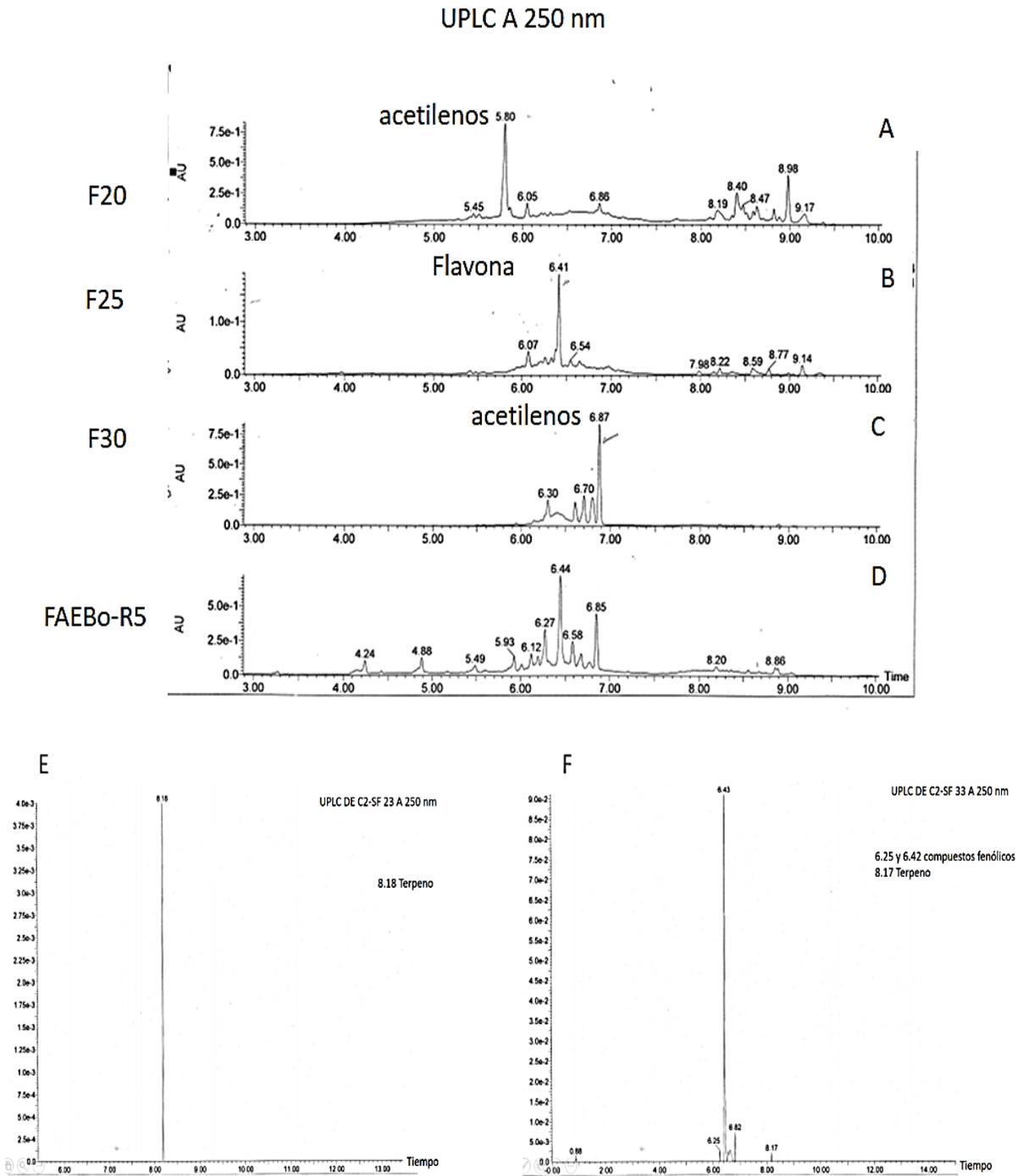


Figura 18. Resultados del análisis cromatográfico por HPLC (A-D) y UPLC (E-F) de R5, Sf20, Sf23, Sf25, Sf 30 y Sf 33 A 250 nm.

7.4 FAEBo-R5 fue más eficiente que sus subfracciones para el control de la expresión de IL-6 en células proinflamatorias de la articulación sinovial

Dado que el principal objetivo de este trabajo es dirigir la capacidad antiinflamatoria de *Bo* hacia el tratamiento de la artritis reumatoide, se elaboró un procedimiento experimental en el que se pudiera evaluar esta capacidad en células en estado proinflamatorio provenientes de la articulación rotuliana de ratones a los que se les indujo inflamación articular por medio de la aplicación directa de ACF. Para la inducción del modelo de inflamación articular se realizaron 4 inmunizaciones con ACF. Posteriormente, el modelo fue evaluado a través el estado funcional de los ratones, (conteo del no. de veces que el ratón se levanta sobre sus dos patas traseras en un periodo 5 minutos) e inflamación de la articulación rotuliana. En la figura 19 se observa el promedio del área bajo la curva (ABC) obtenida de las cinéticas realizadas a los ratones de ambos grupos con una n de 6 (naïve e inmunizados) durante 4 semanas en donde se graficó el número de levantamientos realizados por el ratón una vez a la semana. Los resultados mostraron que en los ratones inmunizados el número de levantamientos disminuyó un 63 % ($P < 0.0001$) con respecto al grupo naïve.

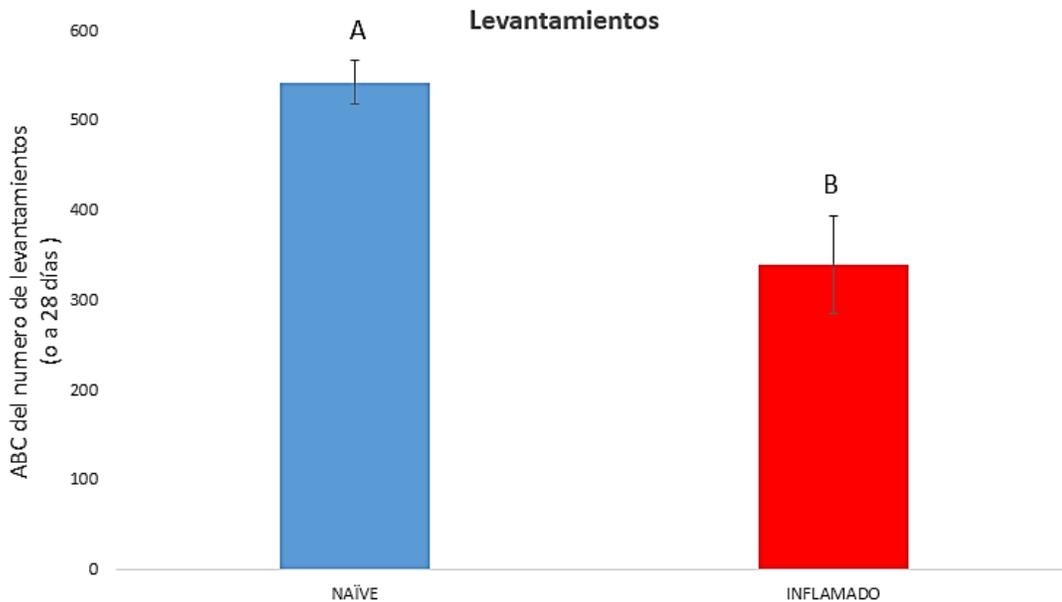


Figura 19. Disminución del no. de Levantamientos en ratones a los que se les realizó la administración intraarticular de ACF comparados con el grupo naïve. Los valores son presentados con media \pm SEM (n=6) y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p \leq 0.05$)

La inflamación de la articulación se evaluó a través de la medición del diámetro de la articulación rotuliana en ambos grupos. La figura 20 muestra el ABC del promedio del porcentaje de incremento del diámetro de las rodillas a lo largo de 5 semanas. Se observó que tanto la rodilla izquierda como la derecha del grupo inmunizado aumentaron entre un 126 a 128% respectivamente ($P < 0.0001$) en el edema respecto al grupo control. Esto ratones fueron sacrificados y se obtuvieron las células de ambas articulaciones en las que posteriormente se evaluaron la FAEBo-R5 y las subfracciones de esta (Sf20, Sf23, Sf30, Sf33).

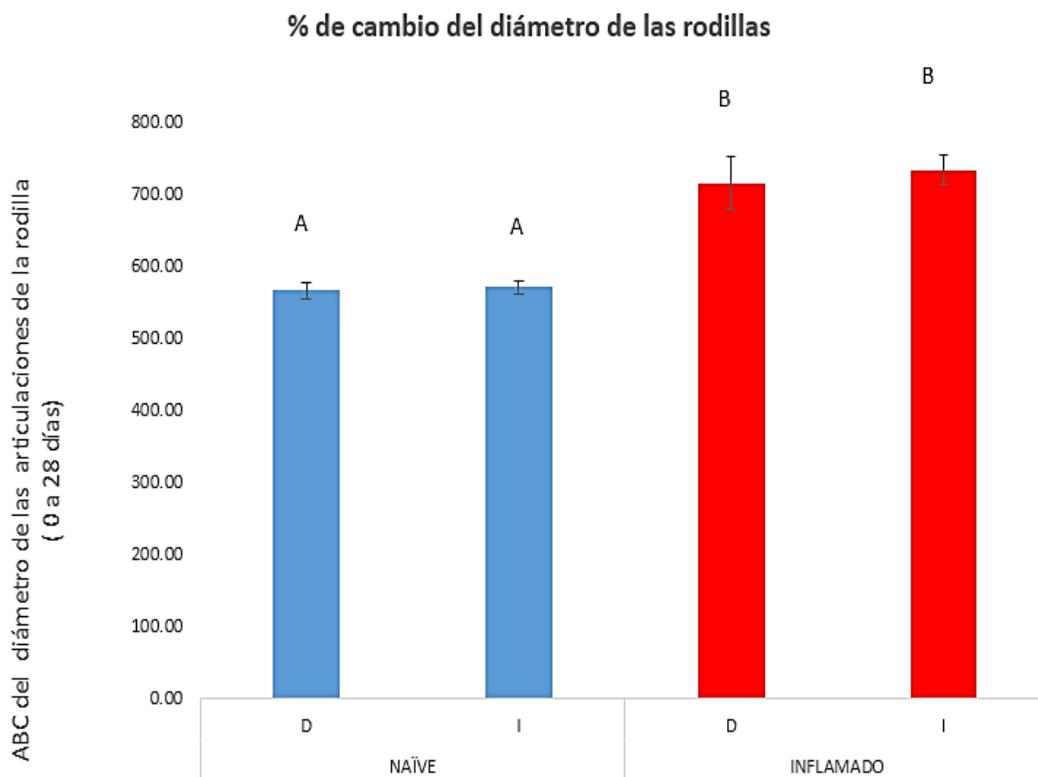


Figura 20. ABC del diámetro de las articulaciones de ambas rodillas de ratones a los que se les realizó la administración intraarticular de ACF comparados con el grupo naïve. Los valores son presentados con media \pm SEM (n=2) y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p \leq 0.05$)

En la figura 21 (Panel A) se observa que la FAEB0-R5 fue tan efectiva como dexametasona para controlar la expresión de IL-6 en las concentraciones de 0.4, 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0.05$). Sin embargo, en las concentraciones de 0.08 ($P < 0.05$) y 50 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.001$) disminuye significativamente la concentración de esta IL en el medio en un 43 a 63 % respectivamente más que el grupo no inflamado. La F20 (panel B) resultó ser muy efectiva en todas sus concentraciones para controlar la expresión de IL-6 al igual que F23 (panel C) y F31 (panel D) al no presentar diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto a dexametasona. En el panel E se muestra el resultado para F33, esta subfracción la concentraciones de 0.08 $\mu\text{g/ml}$ fue tan efectiva como la dexametasona, pero de manera interesante se puede observar que a partir de la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ empieza a mostrar diferencias significativas respecto al control,

($p < 0.05$) diferencias que van aumentando conforme aumenta la concentración y aumento que llega a valores similares al grupo inflamado. Pese a que la mayoría de las subfracciones tuvieron la capacidad de controlar la producción de IL-6 en el medio, ninguna fue tan eficiente como la FAEBo-R5.

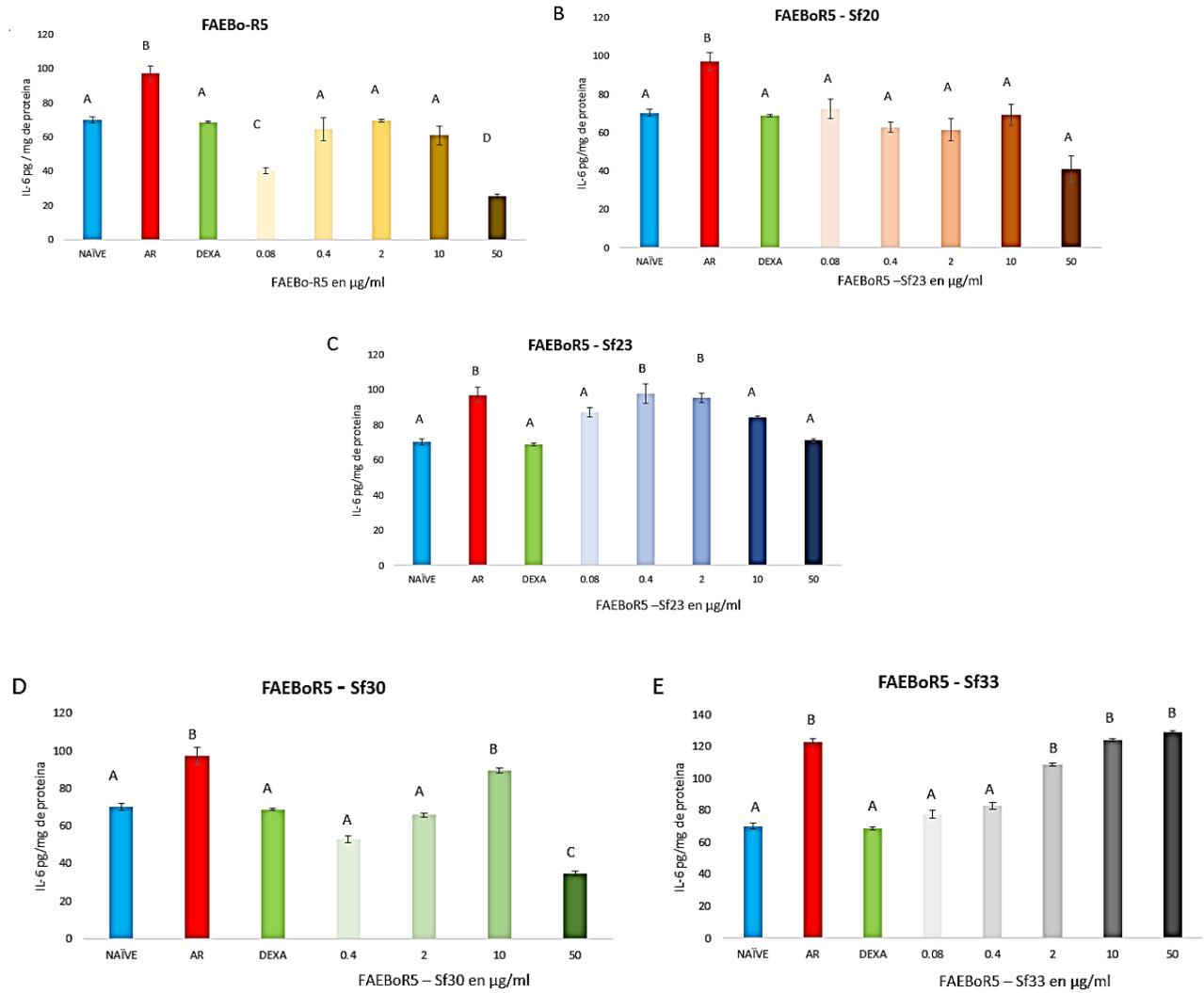


Figura 21. ELISA de la Cuantificación de la expresión de IL-6 en sobrenadante de cultivo de células con un perfil proinflamatorio incubadas con la FAEBo-R5 y sus subfracciones. Los valores son presentados con media \pm SEM y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p \leq 0.05$)

7.5 FAEBo-R5 controla la expresión de IL-1 β E IL-17 pero no TNF α en células proinflamatorias de la articulación sinovial

Dado que la FAEBo-R5 fue la más eficiente para controlar la expresión de IL-6 por las células con características proinflamatorias provenientes de las articulaciones rotulianas tratados con ACF, era importante saber si también sería capaz de controlar la expresión de otras interleucinas importantes en la patología de la AR. En la figura 22 (Panel A) se observa que R5 fue muy efectiva para controlar la expresión de IL-17 en sus concentraciones de 10, 2 y 0.08 $\mu\text{g/ml}$ ya que no presenta diferencias significativas ($P>0.05$) respecto al control farmacológico (Dexametasona). Igualmente fue eficiente para el control de la IL-1 β (panel C) en donde se puede observar que todas sus concentraciones fueron tan efectivas como la dexametasona, a excepción de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ que no mostró diferencias significativas con respecto al grupo inflamado ($p<0.001$). Sin embargo, la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ fue la mejor al llevar los niveles de IL-1 β a niveles similares del grupo naïve. Sin embargo, la reunión no controló la expresión de TNF α (panel B) ya que en todas las concentraciones evaluadas no mostró tener efecto alguno para controlar esta molécula, Es importante hacer notar que tampoco lo hizo el tratamiento farmacológico.

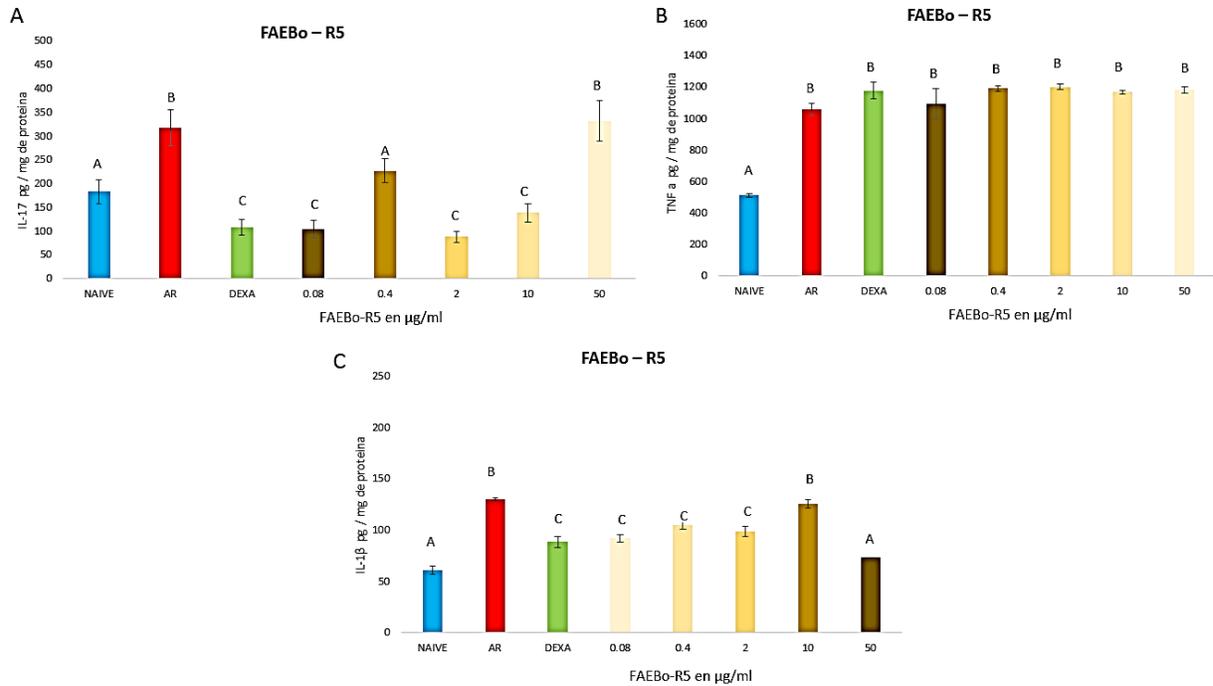


Figura 22. ELISA de la Cuantificación de la expresión de IL-1,17 y TNF α en sobrenadante de cultivo de células con un perfil proinflamatorio incubadas con la FAEB0-R5 y sus subfracciones. Los valores son presentados con media \pm SEM y son significativamente diferentes entre sí en ausencia de una letra en común ($p \leq 0.05$)

8 DISCUSIÓN

En la medicina tradicional mexicana se ha reportado que *Bidens odorata* puede actuar como un antiinflamatorio ¹, sin embargo, es muy poca la información científica que sustenta esta capacidad. En este trabajo de investigación se realizó un estudio partiendo del extracto HA de *Bidens odorata* con el fin de encontrar la familia de moléculas responsables de su capacidad antiinflamatoria. La primera evaluación se realizó en el modelo de inflamación auricular murino inducido por TPA, el cual es un modelo animal de inflamación aguda, El TPA sobre expresa la COX2, una enzima que es requerida para la síntesis de agentes inflamatorios como: prostaglandinas y tromboxanos ^{57,13}, que conllevan a la infiltración de células como: neutrófilos y macrófagos, así como la inducción de IL proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β) y la generación de ROS ¹¹³. En esta evaluación el efecto tanto del TPA como de los tratamientos experimentales y la dexametasona se realizó de 2 maneras, a través de la inhibición del edema y de las células sanguíneas en tránsito. En los resultados obtenidos con la primera evaluación del extracto HA-Bo, la FAcBo, FAEBo, FAEBo-R1 y FAEBo-R5 se observó que los tratamientos inhibieron significativamente el edema inducido por la aplicación tópica del TPA (HA-Bo [3.2, 12.8 mg/oreja], FAcBo, FAEBo [51.2 mg/oreja], FAEBo-R1 [0.2 a 51.2 mg/oreja]). Sin embargo, el mejor tratamiento fue FAEBo-R5 que inhibió el edema en un 86% en la concentración de 0.2 mg/oreja, mientras que dexametasona inhibió en un 40% a una concentración de 40 μ g/oreja (figura 14 E). La FAEBo-R5 en su perfil fitoquímico (CCF, UPLC), mostró en su mayoría tener compuestos como flavonoides de tipo flavona y acetilenos (Figura 17 y 18), de acuerdo con la bibliografía se ha reportado que, los compuestos acetilados actúan inhibiendo la COX2 ¹¹⁵ Rukiyah en el 2005 observo que células tratadas con TPA y aisenina (Flavona) inhibían la expresión de COX-2 correlacionándolo con la inhibición de la activación de Akt. Estos datos muestran que flavonas como apigenina inhiben la expresión de COX2 mediada por TPA bloqueando la transducción de señales de Akt. ⁵⁷ En procesos inflamatorios los neutrófilos son las primeras células que son reclutadas al sitio de daño y son producidas por la médula ósea en respuesta a los factores de crecimiento producidos en el sitio mismo de inflamación ⁶⁰. Cuantificar las proporciones de las células sanguíneas durante un proceso inflamatorio permite conocer la

respuesta de la médula ósea y cómo esta participa en la generación de la respuesta celular ante el proceso. A lo largo del experimento el número de neutrófilos aumento principalmente en el grupo tratado con TPA (Figura 15), llegando a ser 3.1 veces más neutrófilos que linfocitos a las 6 horas (Tabla 9) resultado que concuerda con los resultados reportados por Susunaga y colaboradores en el 2014. En el modelo de TPA, la infiltración de neutrófilos se asocia con la producción de prostaglandinas^{50,47} efecto que fue minimizado por el tratamiento farmacológico y por la FAEBo-R5, esto se puede deber a la presencia de compuestos acetilados y de flavonas, las que se reportado actúan sobre la COX2 llevando la proporción de estas poblaciones celulares al nivel del control sin tratamiento. Por otro lado, los resultados de edema concuerdan con el conteo de neutrófilos a las 6 horas, siendo que el grupo tratado con FAEBo-R5 (86% de inhibición) en este tiempo presento valores de edema semejantes al del grupo naïve. El edema es uno de los resultados principales inducidos por la activación de la COX2, la cual es modificada por las flavonas y los acetilenos⁶³. Estos resultados indican que la capacidad antiinflamatoria de la FAEBo-R5 no solo se limita al control del edema, sino que también influye en el reclutamiento celular, lo que se puede ver a través de la concentración de los neutrófilos en tránsito, siendo que estas células son las primeras que responden ante la inducción de los procesos inflamatorios como el que induce el TPA.^{115,47}

Previamente se sabía que *Bp* controlaba la inflamación en ratones con inflamación articular, sin embargo, se desconocía si *Bo* tendría también esta capacidad, fue por lo que partiendo de células con fenotipo inflamatorio obtenidas de la articulación rotuliana de ratones tratados con ACF directamente en la articulación, se evaluó tanto la capacidad de la FAEBo-R5 como de sus fracciones para controlar la expresión de IL-6 como manifestación de inflamación. , La IL-6 está estrechamente relacionada con el desarrollo de la AR,¹⁰⁴ se ha reportado que ratones con deficiencia de IL-6 no desarrollaron artritis inflamatoria experimental, tanto en modelos inducidos por antígeno como por colágeno. Estos experimentos no solo permitieron saber que esta especie de *Bidens* es tan efectiva como la primera para controlar el estado inflamatorio de las células, sino también para conocer las familias de las moléculas presentes en ella que tuvieran ese efecto que estarían separadas por polaridad en las diferentes fracciones. A través de este estudio se hizo evidente que las fracciones por separado de R5 no fueron tan eficientes como todas ellas juntas para el control de la expresión de IL-6, la

FAEBo-R5 mostro un efecto similar a dexametasona en la expresión de IL-6, ya que la primera disminuyó su expresión en un 99 % en s concentración más eficaz, mientras que dexametasona en un 97% (figura 21A) aunque cabe señalar que todas las fracciones fueron eficientes en las diferentes concentraciones evaluadas. Este efecto probablemente se deba a la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides de tipo flavona y compuestos acetilados presentes en FAEBo-R5 ¹¹⁵. Xagorari y colaboradores en el 2001 demostraron que flavonas como luteolina inhibe la liberación de interleucinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6. El mecanismo antiinflamatorio fundamental de los acetilenos y luteolina (Flavona) es a través de la inactivación de Akt y NF- κ B. ^{33, 59,49} La activación del factor de transcripción NF- κ B, es a través de Akt, se genera inicialmente mediante la fosforilación y consecuente activación de IKK α B (kinasa inhibidora de NF- κ B), que fosforila y marca a I κ B (inhibidor de NF κ B), dejando libre a NF- κ B, favoreciendo tanto su translocación al núcleo, como su actividad de transcriptor de genes proinflamatorios ⁴⁹. Además, se informó que las flavonas confieren actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la expresión de iNOS ¹². Se ha reportado que el bloqueo selectivo de IL-6 con Tocilizumab (TCZ) produce beneficios clínicos inequívocos en pacientes con AR como resultado de una marcada reducción de la afectación articular y las manifestaciones sistémicas ¹⁰⁴ además hay evidencias que indican que la IL-6 media activamente el proceso inmunológico que subyace a la enfermedad promoviendo la transición de la respuesta inmune innata a la adquirida, así como la producción de autoanticuerpos. Además, se ha demostrado que el tratamiento con TCZ restaura el desequilibrio TH17 / Treg, y reduce la expresión de IL-21 por las células T CD4⁺ e inhibió la producción de FR y anti-PCC.¹⁰⁴ Estos datos indican que probablemente los mecanismos de acción de los compuestos presentes en la FAEBo-R5 actúan de manera similar a TCZ. Dado que FAEBo-R5 controló eficientemente la expresión de IL-6, era importante saber si de igual manera controlaba la expresión de IL-1 β , IL-17 y TNF α , interleucinas presentes en la AR y que actúan de manera importante en su patología. IL-1 β en la AR tiene diferentes funciones, pero una de las principales es la proliferación de fibroblastos, así como la inducción de quimiocinas como la IL-8 (que favorece la infiltración de neutrófilos) y la activación de linfocitos T y B ^{103, 56,38}. La IL-17 participa en inducir a los FLS a que liberen más IL-17 y MMPs, inducir a los macrófagos a que expresen IL-6, TNF- α , el reclutamiento y supervivencia de los neutrófilos. Su sobreexpresión acelera el desarrollo

de la inflamación sinovial y la destrucción del hueso cuando se convierte en una inflamación crónica ^{87,113} En los resultados obtenidos de esta evaluación se encontró que la FAEBo-R5 también controla la expresión de estas interleucinas en diferentes concentraciones (Fig. 22) mostrando un efecto similar a la dexametasona , la presencia de estas interleucinas en este modelos de inflamación articular, concuerdan con lo reportado por Jiang y colaboradores en el 2000 y por Haringman en el 2005 que indicaron que en pacientes con artritis reumatoide se han encontrado niveles altos de IL-1 β como lo muestra el grupo de TPA de este trabajo. Kellner en el 2013, indicó que la IL-17 se produce tardíamente en la artritis reumatoide y se relaciona con la hiperplasia de los sinoviocitos encontrados en la íntima demostrando que esta IL es secretada por los linfocitos Th17, neutrófilos y FLS que se encuentran en la cavidad articular y en la membrana sinovial ^{45,72} La FAEBo-R5 control con la misma eficacia que la dexametasona la expresión de IL-1 β y de IL-17, sin embargo, ninguna controló la expresión de TNF α , una de las principales moléculas que favorecen el desarrollo de la AR temprana al estimular células como neutrófilos y fibroblastos que conllevan a una hiperplasia sinovial ¹¹³. TNF- α es una de las muchas IL que se han identificado en la membrana sinovial de los pacientes con AR ^{119,56,74,87} produce daño en el cartílago y reabsorción ósea, induce liberación de prostaglandinas y colagenasa por las células sinoviales, favorece el influjo celular sinovial facilitando la adhesión de las células inflamatorias al endotelio de los vasos sinoviales ¹⁷ e induce la producción de IL-1 β y GM-CSF ^{24,39}. Todo esto indica que no sólo posee capacidad inflamatoria, sino que también es capaz de regular la producción de otros mediadores proinflamatorios ¹⁷. Los experimentos con células sinoviales en cultivo han demostrado que los anticuerpos neutralizantes anti-TNF α disminuyen la producción de otras citocinas como IL-1 β o IL-6 ^{41,22}. Estos datos indican claramente que el TNF α desempeña un papel importante como regulador del proceso inflamatorio en la AR. La mayoría de las acciones producidas por TNF α son mediadas por uno de sus dos receptores, TNF-R1 y TNF-R2 que están ampliamente distribuidos en todos los tejidos. ¹⁴. A través de esos dos receptores se generan dos vías diferentes de señalización; una que induce la transcripción de nuevos genes y otra que conduce a la muerte celular. En estas funciones se produce la activación de los factores de transcripción NF-kB y AP-1, mediante la fosforilización por las cinasas I κ B o

PAM (Proteína activada por mitógeno) ¹⁴. Como se mencionó anteriormente, los acetilenos y flavonas de la FAEBo-R5 podrían estar inhibiendo la activación de NF- κ B a través de la inactivación de AKT pero no AP-1, una de las vías por la que es mediada TNF- α , la inhibición de NF- κ B estaría evitando producción de interleucinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , IL-6 e IL-17; además de otros mediadores y enzimas pro-inflamatorias como las prostaglandinas (PGE2) y ciclooxigenasas (COX-2) que participan activamente en la artritis reumatoide.^{114,117,116,118}

9 CONCLUSIONES

El perfil fitoquímico de las partes aéreas *Bidens odorata* presenta moléculas con propiedades antiinflamatorias.

La FAEBo-R5 inhibe el edema auricular por la aplicación tópica del TPA en todas sus concentraciones evaluadas.

La FAEBo-R5 logró disminuir la concentración de IL-1 β , IL-6 e IL-17 y la mejor concentración fue de 0.08 μ g/ml sobre células de la articulación sinovial rotuliana con perfil inflamatorio in vitro.

La FAEBo-R5 tiene efectos antiinflamatorios sobre células de la articulación sinovial rotuliana con perfil inflamatorio in vitro.

10 REFERENCIAS

1. Del Amo S. 1979; Evangelista V. y cols. 1991; Fernández M. y Gutiérrez M. A. 1990; Flores N. y Gutiérrez M. A. 1988 c; García G. 1988; González M. 1984; Gutiérrez M. A. 1985 ; Gutiérrez M. A. 1989; Hernández J. 1988; López E. 1988; Morales G. y Toledo G. 1987; Paredes y Gutiérrez M. A. 1989; Reyes M. 1989; Suárez C. 1990; Torres J. 1984. “Etnobotánica”
2. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005; 4(3): 130-136.
3. McVaugh, R., 1984 *Compositae. Flora Novo-Galiciana. A. Descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, vol. 12. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.*
4. Bae, S.-C. (2010). Epidemiology and etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of the Korean Medical Association.* 53(10):843-852
5. Barland P, Novikoff AB, Hamerman D. Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol* 1962; 14: 207-20.
6. Boissier, M.-C., Semerano, L., Challal, S., Saldenberg-Kermanac’h, N., Falgarone, G. (2012). Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *Journal of Autoimmunity.* 39(3):222–228
7. Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2001. *Flora fanerogama del valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, michoacán, México.*
8. Basurto F. 1982; Castro A. 1988; Evangelista V. y cols. 1991; Fernández L. y Gutiérrez G. 1990; Flores N. y Gutiérrez G. 1988; García G 1988; González M. 1984; Gutiérrez G 1985; 1989; Hernández A. 1988; López E. 1988; Morales G. y Toledo 1987; Paredes R. y Gutiérrez A. 1989; Reyes G. 1989; Rodríguez F. s/a; Suárez C. 1990; Torres F. 1984 “Botánica.”

9. CONABIO.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/bidens-odorata/fichas/ficha.htm
2009
10. Bliiblioteca digital de la Medicina tradicional mexicana.unam
11. Canoso JJ, Stack MT, Brandt KD. Hyaluronic acid content of deep and subcutaneous bursae of man. *Ann Rheum Dis* 1983; 42:171-5.
12. J.-K. Kim, S.-M. Oh, H.-S. Kwon, Y.-S. Oh, S. S. Lim, and H.K. Shin, "Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 345, no. 3, pp. 1215–1223, 2006.
13. Ki Rim Kim, Chan-Kwon Jeong, Kwang-Kyun Park, Jong-Hoon Choi, Jung Han Yoon Park, Soon Sung Lim, y Won-Yoon Chung. "Anti-Inflammatory Effects of Licorice and Roasted Licorice Extracts on TPA-Induced Acute Inflammation and Collagen-Induced Arthritis in Mice" *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2010, Article ID 709378, 8 pages* .
14. Liz Graña M, Gómez-Reino JJ. Factor de necrosis tumoral. Genética, mecanismo de acción celular y su implicación en la inflamación. *Alergol Inmunol Clin* 2001;16:140-50.
15. Cormack, D.H. (2001). *Essential Histology*. Lippincott Williams y Wilkins. EUA. 201-207
16. Cormack, D.H., Ham, A.W. (2007). *Histología de Ham*. Oxford University Press. México. 528-530
17. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*. 1985 Dec 1;162(6):2163-8.
18. Drake, R. L., Vogl, A. W., Mitchell, A. W. M. (2010). *Anatomía para estudiantes*. España. Elseiver Churchill Livingstone. 20
19. Ea H.-K., Bazille C., Lioté F. *Histologie et physiologie de la membrane synoviale*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-004-A-10, 2008.
20. *Epidemiology of rheumatoid arthritis* (2015) *rev colomb reumatol*. 22(3):145–147.

21. Fawcett, D.W. (1995). Tratado de histología. McGraw-Hill Interamericana. España. 956-958 pp
22. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures: comparison of monoclonal anti TNF- α antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw* 1995;6:225-30.
23. Forest M, Laoussadi S. Histologie et physiologie de la synoviale normale. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-004-A-10, 1982 : 14p.
24. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin-1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8749-53.
25. Fu, Y., Zhou, H., Wang, M., Cen, J., Wei, Q. (2014). Immune Regulation and Anti-inflammatory Effects of Isogarcinol Extracted from *Garcinia mangostana* L. Against Collagen-Induced Arthritis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(18):4127-4134 pp
26. García-Porrero, J.A., Hurlé, J.M. et al. (2005). Anatomía humana. España. McGraw-Hill Interamericana. 463-465
27. Lazzerini PE, Capecchi PL, Acampa M, Galeazzi M, Laghi-Pasini F. Arrhythmic risk in rheumatoid arthritis: the driving role of systemic inflammation. *Autoimmun Rev*. 2014;13(9):936-44
28. Gartner, L.P. Hiatt, J. (1997). Histología texto y atlas. McGraw-Hill Interamericana. España. 851-853
29. Gartner, L.P. Hiatt, J. (2011). Histología básica. Elsevier España. España. 74-80
30. Gierut, A., Perlman, H., Pope, R. (2010). Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*. 36(2):271-96
31. Goëb, V., Aegerter, P., Parmar, R., Fardellone, P., Vittecoq, O., Conaghan, P., Emery, P. (2013). Progression to rheumatoid arthritis in early inflammatory arthritis is associated with low IL-7 serum levels. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 72(6):10326
32. Goronzy, J.J., Shao, L., Weyand, C. (2010). Immune aging and rheumatoid Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North América*. 36(2):297-300

33. CHIANG YM, CHUANG DY, WANG SY, GUO YH, TSAI PW, SHYUR LF. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *J Ethnopharmacol* 2004; 95(2-3): 409-419.
34. Guadalupe -Mendoza,V, Alberto Daniel -Rocha,M, Antonio de Jesús- Guerra,S, Melissa -Ramírez,V, Alicia Guadalupe -González,S,Jorge Iván -Gámez,N,Arnulfo -Nava. (2013). Artritis reumatoide y dislipidemias, Medigraphic Artemisa. Volumen 8, Número 1. p. 12-22.
35. Meléndez, E., Reyes, J.L., Meléndez, M.A., 1991. Effects of furosemide on the renal functions of the unanesthetized newborn rat. *Developmental Pharmacology and Therapeutic* 17, 210–219.
36. Haynes DR. Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(3): 104-106.
37. Bartolome, A.P., Villaseñor, I.M., Yang, W.C., 2013. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 340215
38. Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, et al. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2501-12.
39. Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-. *Eur J Immunol* 1991;21:2575-9.
40. Hohensinner, P., Goronzy, J., Weyand, C. (2014). Targets of immune regeneration in rheumatoid arthritis. *Mayo Clinic Proceedings.* 89(4):563–75
41. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF antibodies on synovial cell interleukin1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989;ii:244-7.
42. Choi, Y.; Jeong, H.S.; Lee, J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem.* 2007, 103, 130–138

43. Izquierdo, E., Pablos, J. (2013). Fibroblastos sinoviales. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología. 14(4):121-128
44. Jarmey, C. (2008). Libro conciso del cuerpo en movimiento. España. Editorial Paidotribo. 79-94
45. Jiang, C.-P., He, X., Yang, X.-L., Zhang, S.-L., Li, H., Song, Z.-J., Zhang, C.-F. (2014). Anti-rheumatoid arthritis activity of flavonoids from *Daphne genkwa*. *Phytomedicine. International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 21(6):830-837
46. Villaseñor Ríos J.L. y E.J. Espinosa García 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario, Fondo de cultura Económica.
47. Griffiths, R.J.; Wood, B.E.; Li, S.; Blackham, A. Pharmacological modification of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation and epidermal cell proliferation in mouse skin. *Agents Actions* 1988, 25, 344–351
48. Junqueira, L.C. Carneiro, J. (2005). Histología básica texto y atlas. España. Masson. Sexta edición. Capítulo 5. 399-402 pp
49. Wen-Chin Lee Chiung-Chi Peng, Chi-Huang Chan, Shiau-Huei Huang, Charng-Cherng Chyau. “Extraction of Antioxidant Components from *Bidens pilosa* Flowers and Their Uptake by Human Intestinal Caco-2 Cells”. *Molecules* 2013, 18, 1582-1601.
50. Ana del Carmen Susunaga-Notario, Salud Pérez-Gutiérrez, Miguel Ángel Zavala-Sánchez, Julio Cesar Almanza-Pérez, Atilano Gutiérrez-Carrillo, Daniel Arrieta-Báez, Ana Laura López-López, Rubén Román-Ramos, José Luis Eduardo Flores-Sáenz y Francisco Javier Alarcón-Aguilar. Bioassay-Guided Chemical Study of the Anti-Inflammatory Effect of *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-Induced Ear Edema “ *Molecules* 2014, 19, 10261-10278.
51. Latarjet, M. Liard, A. R. (2008). Anatomía Humana. España. Editorial Médica Panamericana. 12
52. Lee DM, Kiener HP, Brenner MB. Synoviocytes. In: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Sergent JS, Ruddy S, Sledge CB, editors. *Kelley’s textbook of rheumatology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 175
53. Lippert, H. (2006). Anatomía con orientación clínica. España. Marbán. 706- 708

54. Marián Carretero. Tratamiento de la artritis reumatoide, avances farmacológicos, Marzo 2001.
55. Martini, F. M., Nath, J.L., Bartholomew, E.F. (2012) Fundamentals of Anatomy and Physiology. EUA. Pearson. 193-195
56. McInnes, I., Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*. 7(6):429–442
57. Rukiyah T. Van Dross ,Xiaoman Hong ,Jill C. Pelling. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin through downregulation of Akt signal transduction in human keratinocytes.2005. *Molecular Carcinogenesis*. Vol. 44. Pag.83-91.
58. Mould-Quevedo, J., Peláez-Ballestas, I., Vázquez-Mellado, J., Terán-Estrada, L., Esquivel-Valerio, J., Ventura-Ríos, L., Aceves-Ávila, F.J., Bernard-Medina, A.G., Goycochea-Robles, M.V., Hernández-Garduño, A., Burgos-Vargas, R. (2008). El costo de las principales enfermedades reumáticas inflamatorias desde la perspectiva del paciente en México. *Medigraphic Artemisa*. 144(3):225-231
59. Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jan; 296(1):181-7.
60. Xianjin Zhu¹, Lianbo Xiao, Rongfen Huo, Jie Zhang, Jinpiao Lin, Jun Xie , Songtao Sun , Yong He , Yue Sun , Zhou Zhou , Baihua Shen y Ningli Li. Cyr61 is involved in neutrophil infiltration in joints by inducing IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2013, 15:R187.
61. Niedermeier, M., Pap, T., Korb, A. (2010). Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. Vol. 24, No. 4, 527–40 pp
62. Nigrovic, P. Lee, D. (2005). Mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. Biomedcentral. 7(1):1-8
63. De las Heras B, Abad MJ, Silván AM, Pascual R, Bermejo P, Rodríguez B, Villar AM. Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sci*. 2001 Dec 7; 70(3):269-78.

64. Fonseca, J.E., Santos, M.J., Canhão, H., Choy, E. (2009). Interlukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity Reviews*. 8(7):538-542
65. Cascão, R., Rosário, H., Souto-Carneiro, M., Fonseca, J. (2010). Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*. 9(8):531–535
66. Pincus T y Callahan L. 1993. The side effects of rheumatoid arthritis: Joint destruction disability and early mortality. *British Journal of Rheumatology*. 32 (28-379).
67. Pirrung MC. Following the reaction. En: *The Synthetic Organic Chemist's Companion*. 1a ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2007. p. 93–106
68. Quan L. Thiele G. Tian J y Wang D. 2008. The Development of Novel Therapies for Rheumatoid arthritis. *Expert opinion on therapeutic patents*. 18(7):723-738.
69. Krumholz, H., Ross, J. S., Presler, A. H., & Egilman, D. S. (2007). What have we learnt from Vioxx?. *British Medical Journal*, 7585, 120.
70. Herrera Aco D.R. “Efecto inmuno regulador de la alfa mangostina y del extracto acetato de etilo de *Bidens pilosa* en un modelo de artritis murina. Tesis de maestria,2013,UNAM.
71. Smith JB, Haynes MK. Rheumatoid Arthritis-A Molecular Understanding. *Ann Intern Med* 2002; 136(12): 908-922.
72. Haringman, J.J., Gerlag, D.M., Zwinderman, A.H., Smeets, T.J.M, Kraan, M.C., Baeten, D., McInnes, I.B. (2005). Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 64:834-838
73. Smolen, J., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M., Emery, P. (2007). New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 370:1861-1874
74. Dong, W., Zhu, P. (2012). Functional niche of inflamed synovium for Th17-cell expansion and activation in rheumatoid arthritis: implication to clinical therapeutics. *Autoimmunity Reviews*. 11(12):844–51
75. Spence, A. P. (1990). *Basic Human Anatomy*. Third edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. 423-428

76. Takuji,I.,Hiroshi, O.,Yoshiaki,T., Shigeki,M. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients, *FEBS Journal* 275 (2008) 4448–4455.
77. Van der Berg WB Joint inflammation and cartilage destruction way occur uncoupled. *Springer Semin Immunopathology*, 20 (1998), pp. 149-64
78. Van der Berg WB. Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 30 (2001), pp. 7-16
79. Wagner H, Bladt S. Flavonoid Drugs. En: *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2a ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1996. p. 195–244.
80. Wang, H., Jia, X., Sui, C., Zhao, Y., Mei, Y., Zheng, Y., Zhang, Z. (2014). Effects of Thapsigargin on the Proliferation and Survival of Human Rheumatoid Arthritis Synovial Cells. *The Scientific World Journal*. 1-4
81. Widdifield, J., Paterson, J., Bernatsky, S., Tu, K., Tomlinson, G., Kuriya, B., Thorne, J., et al. (2014). The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. *Arthritis & Rheumatology*. 66(4):786–793
82. RYU S, LEE JH, KIM SI. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin Rheumatol* 2006; 25(1): 16-20.
83. JIANG DJ, DAI Z, LI YJ. Pharmacological effects of xanthones as cardiovascular protective agents. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22(2): 91-102.
84. GROMBONE-GUARANTINI MT, SILVA-BRANDAO KL, SOLFERINI VN, SEMIR J, TRIGO JR. Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil. *Biochem System Ecol* 2005; 33: 479-486.
85. Visser, H. (2005). Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 19(1):55-72
86. Zhang, W., Dai, S.-M. (2012). Mechanisms involved in the therapeutic effects of *Paeonia lactiflora* Pallas in rheumatoid arthritis. *International Immunopharmacology*. 14(1):27–31.
87. Choy, E. (2012). Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 51:1-9

88. Athanasou NA, Quinn J. Immunocytochemical analysis of human synovial lining cells: phenotypic relation to other marrow derived cells. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:311-5.
89. Gaffo, A., Saag, K. G. y Curtis, J. R. (2006). Treatment of rheumatoid arthritis. *American journal of health-system pharmacy*, 63(24).
90. Choy, E. y Panayi, G. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344(12):907-916.
91. Jay GD, Lane BP, Sokoloff L. Characterization of a bovine synovial fluid lubricating factor. III. The interaction with hyaluronic acid. *Connect Tissue Res* 1992; 28:245-55.
92. Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:392-4.K
93. Bhatia A, Blades S, Cambridge G, Edwards JC. Differential distribution of Fc gamma RIIIa in normal human tissues and co-localization with DAF and fibrillin-1: implications for immunological microenvironments. *Immunology* 1998; 94: 56-63.
94. Edwards JC, Wilkinson LS, Jones HM, Soothill P, Henderson KJ, Worrall JG, et al. The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J Anat* 1994; 185(Pt2): 355-67.
95. Walsh DA, Mapp PI, Wharton J, Polak JM, Blake DR. Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed human synovium. *Am J Pathol* 1993;142:1610-21.K
96. Beatrix Bartok y Gary S. Firestein. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010 January; 233(1): 233–255.
97. Kinne, R. W., Stuhlmüller, B., y Burmester, G.-R. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Macrophages. *Arthritis Research & Therapy.* 9(6):224-226
98. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2007; 370:186174.
99. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289:15048.
100. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how ‘high-grade’ systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003; 108: 295763.
101. Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4:S8190.
102. Koch AE. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:ii607.

103. Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L. Sexta Edición. 60-68
104. Lazzerini, P. E., Capecchi, P. L., Guidelli, G. M., Selvi, E., Acampa, M., and Laghi-Pasini, F. (2016). Spotlight on sirukumab for the treatment of rheumatoid arthritis: the evidence to date. *Drug Des. Dev. Ther.* 10, 3083–3098. doi: 10.2147/DDDT.S99898
105. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:15048.
106. Schett G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 2007;9:203
107. Bello-González, M.A., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez, M.B.N., Salgado-Garciglia, R., 2015. Plantas utiles de la comunidad indígena nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacan, Mexico. *Polibotanica* 39, 175–215.
108. Morado-Urbina CE, Alvarado-Vázquez, P.A., Montiel-Ruiz, R.M., Acosta-González, R.I., Castañeda-Corral, G., Jiménez-Andrade, J.M. (2014). Early, middle, or late administration of Zoledronate alleviates spontaneous nociceptive behaviour and restore functional outcomes in a mouse model of CFA-induced arthritis. *Drug Dev Res.* 75(7):438-48
109. Zapata-Morales, J.R., Alonso-Castro, A.J., Domínguez, F., Carranza-Álvarez, C., IsirdiaEspinoza, M., Hernández-Morales, A., Solorio-Alvarado, C., 2017. The antinociceptive effects of a standardized ethanol extract of the *Bidens odorata* Cav (Asteraceae)
110. Zavala-Mendoza, D., Alarcon-Aguilar, F.J., Pérez-Gutierrez, S., Escobar-Villanueva, M.C., Zavala-Sánchez, M.A., 2013. Composition and antidiarrheal activity of *Bidens odorata* Cav. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, 170290. Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigations on experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109.
111. Souteyrand-Boulenger JD, Amouroux J. La synoviale et le liquide synovial à l'état normal et pathologique. Structure et ultrastructure de la synoviale. *Nouv Presse Med* 1972; 1:331-6.
112. Jiang, C.-P., He, X., Yang, X.-L., Zhang, S.-L., Li, H., Song, Z.-J., Zhang, C.-F. (2014). Anti-rheumatoid arthritis activity of flavonoids from *Daphne*

- genkwa. *Phytomedicine. International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 21(6):830-837
113. Kellner, H. (2013). Targeting interleukin-17 in patients with active rheumatoid arthritis: rationale and clinical potential. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 5(3):141-152
 114. Vivancos, M., Moreno, J.J. (2008). Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br J Nutr*. 99(6):1199-207
 115. Yoshida, Y., Niki, E. (2003). Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nutri Sci Vitaminol (Tokyo)*. 49(4):277-80
 116. Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, Malik SG. 2013. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *BMC Res Notes*. 6:275
 117. Lee, I.A., Kim, E.J., Kim, D.H. (2012). Inhibitory effect of β -sitosterol on TNBS-induced colitis in mice. *Planta Med*. 78(9):896-8
 118. Morgan MJ, Liu ZG. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 21(1):103-15
 119. Kumar, V., Sharma, A. (2010). Neutrophils: cinderella of innate immune system. *Int Immunofarmacol*. 10(11):1325-34
 120. Tarner, I. H., Muller-Ladner, U. y Gay, S. (2007). Emerging targets of biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 3(6):336-45.
 121. Malysheva, O. A., Wahle, M., Wagner, U., Pierer, M., Arnold, S., Haentzschel, H. y Baerwald, C. G. (2008). Low-dose prednisolone in rheumatoid arthritis: adverse effects of various disease modifying antirheumatic drugs. *The Journal of rheumatology*, 35(6), 979-985.
 122. STAMP LK, JAMES MJ, CLELAND LG. Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis, *Immunol Cell Biol* 2004; 82(1): 1-9.

123. plantasmedicinalesmich.blogspot.mx/2017/10/aceitilla-bidens-odorata-cav-planta.html

11 ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las articulaciones sinoviales

Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un subtipo TH17 o Treg. Datos del primer experimento.

Figura 3. Efecto entre las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un subtipo TH17 o Treg.

Figura 4. Efecto de las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un subtipo TH17 o Treg. Datos del segundo experimento.

Figura 5. Relación del efecto entre las diferentes concentraciones del FAEBp sobre la polarización a las CD4⁺ hacia un subtipo TH17 o Treg. Segundo experimento.

Figura 6. Comparación de los niveles de IL-17 e IL-10 de los sobrenadantes del primer cultivo tratados con diferentes concentraciones de la FAEBp

Figura 7. Comparación de los niveles de IL-17 e IL-10 de los sobrenadantes del primer cultivo tratados con diferentes concentraciones de la FAEBp

Figura 8. Comparación de los niveles de IL-17 e IL-10 de los sobrenadantes del segundo cultivo tratados con diferentes concentraciones de la FAEBp

Figura 9. Clasificación taxonómica de *Bidens odorata*.

Figura 10. Esquema general del fraccionamiento del extracto hidroalcohólico de Bo. Para la obtención de los tratamientos experimentales.

Figura 11.- CCF en fase normal del subfraccionamiento de la FAEBo.

Figura 12.- CCF en fase normal de las reuniones del subfraccionamiento de la FAEB0.

Figura 13. Porcentaje de inhibición de los vehículos utilizados para disolver los tratamientos experimentales.

Figura 14. Porcentaje de inhibición en la oreja izquierda de ratones con edema auricular por la aplicación tópica de TPA.

Figura 15. Porcentaje de cambio de neutrófilos circulantes en sangre a las 6 horas experimentales a diferentes concentraciones.

Figura 16. comparación de los cromatogramas y espectros UV a 254nm del HPLC del extracto HAB0, FAEB0 y FAEB0-R5.

Figura 17.- CCF en fase reversa del subfraccionamiento de la FAEB0-R5.

Figura 18. Resultados del análisis cromatográfico por HPLC (A-D) y UPLC (E-F) de R5, Sf20, Sf23, Sf25, Sf 30 y Sf 33 A 250 nm.

Figura 19. Disminución del no. de Levantamientos en ratones a los que se les realizó la administración intraarticular de ACF comparados con el grupo naïve. .

Figura 20. ABC del diámetro de las articulaciones de ambas rodillas de ratones a los que se les realizó la administración intraarticular de ACF comparados con el grupo naïve

Figura 21. ELISA de la Cuantificación de la expresión de IL-6 en sobrenadante de cultivo de células con un perfil proinflamatorio incubadas con la FAEB0-R5 y sus subfracciones.

Figura 22. ELISA de la Cuantificación de la expresión de IL-1,17 y TNF α en sobrenadante de cultivo de células con un perfil proinflamatorio incubadas con la FAEB0-R5 y sus su fracciones.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias de fenotipo de Sinovicitos de la MS

Tabla 2. Fármacos para el tratamiento de la AR

Tabla 3. Antecedentes farmacológicos de *Bo*

Tabla 4. Subracciones de *Bo* y las concentraciones de sus eluyentes.

Tabla 5. Grupos experimentales para determinar el efecto antiinflamatorio de *B.o.*

Tabla 6. Sf de R5 de FAEB0 y las concentraciones de sus eluyentes.

Tabla 7 . Grupos experimentales

Tabla 8. Reuniones de las fracciones de FAEB0 de acuerdo con su perfil químico

Tabla 9 Proporción de neutrófilos / linfocitos a diferentes tiempos [mg/oreja]

ABREVIATURAS

ACF Adyuvante Completo de Freund

ANOVA Análisis de Varianza

COX Ciclooxygenasas

DMARD Medicamentos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad

ICAM Moléculas de Adhesión Intercelular

ON Óxido Nítrico

Ig Inmunoglobulina

IL Interleucina

Th Linfocito T helper

Treg Linfocito T regulador

MMP Metaloproteinasa

NF-kB Factor de Nuclear Potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK Natural Killer

PBS Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos

PG Prostaglandinas

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

SFB Suero Fetal Bovino

TNF Factor de Necrosis Tumoral

TPA 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato

FAEBo Fracción acetato de etilo de *Bidens odorata*

FAcBo Fracción acuosa de *Bidens odorata*

HA Hidroalcohólico

FAEBo-R5 Reunión 5 de la Fracción acetato de etilo de *Bidens odorata*

R Reunión

Sf Subfracción

CCF Cromatografía en capa fina

GLOSARIO

Angiogénesis: transformación y crecimiento de vasos sanguíneos.

Articulaciones sinoviales: conexiones entre los huesos que conforman las extremidades superiores e inferiores.

Hiperplasia: aumento de tamaño que sufre un órgano debido al incremento en el número celular que lo forma.

Membrana sinovial: membrana interna de la cápsula articular; capa delgada de tejido conectivo laxo.

Pannus: destrucción y degradación del cartílago y hueso por la síntesis de colágeno y la proliferación de los sinoviocitos. Tumor que tiene la habilidad de prolongar e invadir tejidos

Íntima: es la primera capa celular de la membrana sinovial, conformada por sinoviocitos de tipo fibroblasto y macrófagos de tipo fibroblasto.