

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *(9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida* Y *(9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida*, MEDIADA POR LA INTERLEUCINA 1- β EN CÉLULAS THP-1 EXPUESTAS A LIPOPOLISACARIDO

Tesis presentada por el Bachiller:

Chocano Coralla, Edward Joel

para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico

Asesor:

PhD. Nieto Montesinos, Rita Milagros

Arequipa – Perú

2021

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20190000040155

N° Trámite en Fac. 1801-2019

Fecha 12-11-2019

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: *CHOCANO CORALLA, Edward Joel*

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE (9Z,12Z)-N-BENCILOCTADEC-9,12-DIENAMIDA Y (9Z,12Z)-N-(3-METOXIBENCIL)-OCTADEC-9,12-DIENAMIDA, SOBRE CELULAS THP-1 INDUCIDAS EN LPS, POR DISMINUCION DE IL1- β "

DICTAMINADORES: 1) *Dr. Jaime Cárdenas García* 2) *Dra. Karin Vera López*

DICTAMEN DE PLAN:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por el recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Firmas:

Fecha 17/09/2020

ASESOR: *Dra. Rita Nieto Montesinos*

DICTAMEN DE ASESOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, se sugiere cambiar el título a: "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE (9Z, 12Z)-N-BENCILOCTADEC-9, 12-DIENAMIDA Y (9Z, 12Z)-N-(3-METOXIBENCIL)-OCTADEC-9, 12-DIENAMIDA, MEDADA POR LA INTERLEUCINA 1- β EN CELULAS THP-1 EXPUESTAS A LIPOPOLISACARIDO", luego de lo cual considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Firma

Fecha 23/09/2020

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Dr. Jaime Cárdenas García*
- 2) *Dr. Gonzalo Dávila del Carpio*
- 3) *Dra. Karin Vera López*

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por las recurrentes, debiendo cambiar el título a: "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE (9Z, 12Z)-N-benciioctadeca-9, 12-dienamida Y (9Z, 12Z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9, 12-dienamida, MEDADA POR LA INTERLEUCINA 1- β EN CELULAS THP-1 EXPUESTAS A LIPOPOLISACARIDOS", luego de lo cual y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Firma

Dr. Jaime Cárdenas García
Dr. Gonzalo Dávila del Carpio

Dra. Karin Vera López

Fecha 25/11/2020

JURADOS: PRESIDENTE - CARDENAS GARCIA JAIME DANTE

VOCAL - DAVILA DEL CARPIO GONZALO HERMILIO

SECRETARIO - VERA LOPEZ KARIN JANNET

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: Miércoles 13 de
Enero de 2021

Hora: 19 hrs.

Local: C- 402 (SUM)

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi madre Ernestina Coralla Suca, por todo lo que hizo por mí y de mí, gracias mamá.



Agradecimientos

A mi madre Enestina Coralla Suca por todo su apoyo incondicional en todos mis años de vida. Gracias por creer en mí.

Al PhD. Jaime Cárdenas García, por siempre extender su mano y darme su apoyo incondicional, por dejarme ser partícipe de todas las actividades académicas que potenciaron mi desarrollo y conocimientos.

Al PhD. José Villanueva Salas, por ser la mano firme que corregía mis errores, también por ser quien inculco en mí el desarrollo del pensamiento crítico.

A los PhD. Karin Vera López, Christian Lino Cárdenas y Rita Milagros Nieto por todos sus consejos y gran apoyo

Al Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, en especial al estudiante de PhD Alejandro Nico Rondón por todas sus enseñanzas y al PhD. Alejandro Pino Figueroa por la oportunidad que me dio de acceder a un plan de internado en Boston. Gracias por compartir su pasión por la ciencia

. Gracias.

RESUMEN

El presente estudio muestra la actividad antiinflamatoria de dos macamidas sintéticas, (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida y (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida, en células que proceden de paciente con leucemia monoclónica aguda (THP-1). Estas células son usadas como modelo en ensayos de inflamación. Las células fueron diferenciadas en macrófagos en presencia de Acetato de Forbol Miristato (PMA) 10ng/mL. Se indujo inflamación con Lipopolisacárido (LPS) 30ng/mL y subsecuentemente se trataron las células con las dos Macamidas en las concentraciones 3 y 10 μ M. Para evaluar la viabilidad celular se realizó el ensayo con el reactivo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium, (MTS). La citoquina proinflamatoria evaluada fue Interleucina 1 beta (IL-1 β), mediante la técnica de Elisa y se evaluó la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) del gen IL1B por PCR cuantitativa en tiempo real qPCR, Las macamidas a dichas concentraciones mostraron ser inocuas y presentaron actividad antiinflamatoria al disminuir los niveles de la citoquina IL-1 β y de los niveles del mRNA del gen IL1B. Se sugirió un posible mecanismo de acción por el cual dichas macamidas podrían ejercer dicho efecto anti inflamatorio.

PALABRAS CLAVE: Inflamación, IL-1 β , macamidas, THP-1, ELISA, qPCR.

ABSTRACT

The present study shows the anti-inflammatory activity of two synthetic macamides, (9z, 12z) -n-benzyloctadeca-9,12-dienamide and (9z, 12z) -n- (3-methoxybenzyl) -octadeca-9,12-dienamide, in cells from a patient with acute monolithic leukemia (THP-1). These cells are used as a model in inflammation assays. The cells were differentiated into macrophages in the presence of Phorbol Myristate Acetate (PMA) 10ng / mL. Inflammation was induced with Lipopolysaccharide (LPS) 30ng / mL and subsequently the cells were treated with the two macamides at concentrations 3 and 10 μ M. To evaluate cell viability, the cell viability test was performed with the reagent 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfofenyl) -2H-tetrazolium, (MTS). The proinflammatory cytokine evaluated was Interleukin 1 beta (IL-1 β), using the Elisa technique and the expression of messenger RNAs (mRNA) of the IL1B gene was evaluated by quantitative PCR in real time qPCR, macamides at these concentrations were shown to be safe and they showed anti-inflammatory activity by decreasing the levels of the cytokine IL-1 β and the levels of the mRNA of the IL1B gene. A possible mechanism of action was suggested, by which these macamides exert an anti-inflammatory effect.

KEY WORDS: Inflammation, IL-1 β , macamides, THP-1, ELISA, qPCR.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
CAPITULO I	4
MARCO TEORICO	4
1 MACAMIDAS	5
1.1. <i>Lepidium meyenii</i> (Maca)	5
1.2 Metabolitos primarios de la Maca	5
1.3 Metabolitos secundarios presentes en la Maca	5
1.4 Macamidas	6
1.5 Macamidas (9Z,12Z)-N-Benciloctadeca-9,12-dienamida, (9Z,12Z)-N-(3-Metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida	7
2.INFLAMACIÓN	8
2.1 inflamación	8
2.2 Mecanismo de la respuesta inflamatoria	8
2.3 Activación del receptor de reconocimiento de patrones	8
2.4 Activación de vías inflamatorias	9
2.5 Marcadores inflamatorios	10
2.6 Citoquinas inflamatorias	10
3 ROL DE IL-1β EN INFLAMACION	11
3.1. Inflamasoma, (<i>NOD</i> -, <i>LRR</i> - and <i>pyrin domain-containing protein 3</i>) <i>NLRP3</i>	11
3.2. IL-1 β Como marcador celular de inflamación	12
3.2.1. Producción y secreción de IL-1 β	12
3.3 Activación de Pro-IL-1 β	12
4. FUNDAMENTO DE LAS TECNICAS EXPERIMENTALES	13
4.1 Cultivos celulares	13
4.2 Células THP-1	14
4.3 Análisis morfológico de las células THP-1	14

4.4	Conteo de células	14
4.5	Prueba de viabilidad celular (MTS).....	14
4.6	Diferenciación de células THP-1 en macrófagos con PMA	15
4.7	Inducción de inflamación sobre células THP-1 diferenciadas con LPS.....	16
4.8	Inmuno ensayo de Elisa.....	16
4.9	ARN mensajero y su importancia en pruebas genéticas	17
4.10	Síntesis de cADN.....	17
4.11	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (pc en tiempo real).....	17
4.12	Análisis de variación en la expresión de los genes 2- $\Delta\Delta$ Ct.....	18
5.	Prueba de significancia estadística	19
5.1	Análisis de varianza (ANOVA).....	19
5.2	Tukey	19
5.3	Dunnett	19
CAPITULO II.....		21
MATERIALES Y METODOS.....		21
1. MATERIALES.....		22
1.1	Equipos de laboratorio.....	22
1.2	Materiales de laboratorio	22
1.3	Materiales biológicos.....	23
1.4	Reactivos químicos.....	23
2. DESCRIPCIÓN Y PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS USADAS.....		24
2.1	Cultivos celulares.....	24
2.2	Análisis morfológico de las células.....	25
2.3	Conteo de células	25
2.4	Pruebas viabilidad celular por MTS	25
2.5	Diferenciación de los THP-1	26
2.6	Inducción de inflamación	27
2.7	Tratamiento farmacológico con las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD	27
2.8	ELISA inmunoensayo	27
2.9	Extracción de RNA	28
2.10	Lavado del ARN	29
2.11	Solubilización del ARN.....	29

2.12 Cuantificación de ARN.....	29
2.13 Síntesis de cDNA.....	29
2.13.1 Preparación del master mix 1	30
2.13.2 Detalles de programación del cDNA:	30
2.14 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	31
2.14.2. Programación	32
2.15 Análisis estadístico	33
CAPITULO III	34
RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
1. Cultivo celular.....	35
2. Diferenciación de las células THP-1 en macrófagos	36
3. Inducción de inflamación con LPS	37
4. Efecto de las macamidas sobre la viabilidad celular de células THP-1 previamente tratadas con LPS.....	38
4.1 Efecto de macamidas sobre la viabilidad celular de THP-1 diferenciadas.....	40
4.2 Efecto de LPS sobre la viabilidad celular	41
5. Niveles de citoquina proinflamatoria IL-1 β	41
6. Efectos de las macamidas sobre los niveles de mRNA de IL1B	47
6.1 Disminución de los niveles de mRNA de IL1B por acción de Las macamida 9,12-NBD y 9,12-NMD	48
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	56
ANEXOS	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de algunas macamidas ⁽¹²⁾	6
Figura 2. Estructura química de las macamidas. Elaboración propia	7
Figura 3: Activación del receptor de reconocimiento de patrones. Elaboración propia.	9
Figura 4. Activación de caspasa 1 y secreción de IL-1 β mediada por el inflammasoma NLRP3. Elaboración propia.	13
Figura 5. Reducción del reactivo conteniendo tetrazolio (MTS) al producto denominado Formazán. Elaboración propia.	15
Figura 6. Elisa sándwich. Elaboración propia.	16
Figura 7. Kit de síntesis de cADN (Transcriptasa inversa del transcriptor).....	31
Figura 8. TaqMan Fast Advanced Master Mix	32
Figura 9. Células THP-1 diferenciadas por Phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA) Elaboración propia.....	35
Figura 10. Diferenciación de las células THP-1, por tratamiento con PMA. Elaboración propia. ..	36
Figura 11. Aumento de los niveles de mRNA del gen IL1B	37
Figura 12. Efecto de LPS y de la macamida 9,12-NBD sobre la viabilidad celular de las células THP-1	39
Figura 13. Efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NMD sobre la viabilidad celular de las células THP-1	40
Figura 14. Inhibición de la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β mediante tratamiento con la Macamida 9,12-NBD.....	42
Figura 15. Inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β mediante tratamiento con la Macamida 9,12-NMD.....	43
Figura 16. Secreción de IL-1 β por activación del inflammasoma NLRP3 a través del receptor nuclear NF- κ B. Elaboración propia.	45
Figura 17. Inhibición de la formación de subproductos del ácido araquidónico y aumento de endocannabinoides, por inhibición de la enzima FAAH. Elaboración propia.	46
Figura 18. Sub productos del endocannabinoide Anandamida, PGF2-EA como ligando de PPAR. Elaboración propia.	47
Figura 19. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS en presencia de Macamida 9,12-NBD frente a niveles del housekeeping ACTB.	49
Figura 20. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS en presencia de Macamida 9,12-NMD. Frente a niveles del housekeeping ACTB	50
Figura 21. Señalización de NF- κ B, que promueve la expresión de mARN de pro-IL-1 β y los subdominios del inflammasoma NLRP3. Elaboración propia.	52
Figura 22. Posibles productos formados a partir de la hidrólisis de las macamidas. Elaboración propia.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Data procesada. Aumento en los niveles de mRNA del gen IL1B, frente el housekeeping (gen ACTB). Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	59
Tabla 2. Data procesada. Efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NBD sobre la viabilidad celular de las células THP-1. Valores en porcentaje.	59
Tabla 3. Data procesada. Efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NMD sobre la viabilidad celular de las células THP-1. Valores en porcentaje.	60
Tabla 4. Data procesada: Inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β mediante tratamiento con las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD.	60
Tabla 5. Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB, Control. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	61
Tabla 6: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB, Control LPS 30 ng/mL. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	62
Tabla 7: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Control de LPS 30 ng/mL con DMSO 0.5%. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	62
Tabla 8: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NBD 3 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	63
Tabla 9: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NBD 10 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	63
Tabla 10: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NMD 3 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	64
Tabla 11: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NMD 10 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).	64
Tabla 12: Data procesada y acumulada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB en presencia de las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

9,12-NBD:	Macamida (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida
9,12-NMD:	Macamida (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida
AEA:	Anandamida
CB1:	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2:	Receptor cannabinoide tipo 2
cDNA:	DNA complementario
CM:	Medio completo
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
DAMP:	Patrones moleculares asociados a daño
DMSO:	Dimetil sulfoxido
FAAH:	Hidrolasa de amida de ácido graso
FSM:	Medio libre de suero
HRP:	Peroxidasa de rábano
IFN:	Interferón
IL-1 β :	Interleucina 1 beta
IL-6:	Interleucina 6
IL-6R:	Receptor de Interleucina 6
JAK:	Quinasa de Janus
LCR:	Factor de estimulación de colonias
LPS:	Lipopolisacárido
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno
mRNA:	RNA mensajero
MTS:	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium),
MTS:	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium),
NLR:	Receptor de tipo Nood
NLRP3:	Inflamasoma (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3)
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógeno

PBS:	Suero fetal bobino
PCR:	Reacción en cadena de la polimersa
PMA:	Acetato de forbol miristato Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
Pro IL-1 β :	Pro interleucina 1 beta
PRR:	Receptor de reconocimiento de patrones
qPCR:	PCR cuantitativa en tiempo real
RNAsa:	Ribonucleasa
STAT:	Traductor de señal y activador de transcripción
TGF:	Factor de crecimiento transformante
THP-1:	Células que proceden de paciente con leucemia monolítica aguda
TLR:	Receptor tipo Toll
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCIÓN

La inflamación es generalmente definida como una respuesta a estímulos tales como infecciones por patógenos o daños celulares y tisulares; a su vez es uno de los signos más frecuentes en las patologías. Desde el año 2000, varios estudios han aportado evidencia que muestra las propiedades biológicas de *Lepidium Meyenii* (Maca) y su importancia como nutraceutico (alimento funcional), además se identificaron dos de las principales familias de compuestos presentes en la Maca, Macamidas y Macaenos⁽¹⁾. Dentro de este marco se sabe que algunos compuestos presentes en la Maca, llamados macamidas, que son inhibidores de la enzima Hidrolasa de Amidas de Ácidos Grasos (FAAH), la cual es una diana terapéutica de enfermedades neurodegenerativas, debido a que su inhibición puede ejercer actividad antiinflamatoria y neuro protectora.

El presente estudio tiene como fin determinar la actividad antiinflamatoria de dos macamidas (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida y (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida, sintetizadas en los laboratorios del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS) Boston-USA y que fueron previamente identificadas en el extracto pentánico de la Maca. Este estudio hace uso de modelos de inflamación (líneas celulares THP-1) y determina los niveles de la citoquina IL-1 β por inmunoensayo Elisa y los niveles del gen IL1B por PCR cuantitativa en tiempo real.

** Por motivos prácticos las macamidas (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida y (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida, serán nombradas 9,12-NBD y 9,12-NMD respectivamente*

HIPÓTESIS

Ya que las macamidas sintéticas (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida (9,12-NBD) y (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida (9,12-NMD), son inhibidores de la enzima FAAH, la cual es usada como diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias. Es posible que estas ejerzan actividad antiinflamatoria.



OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad anti inflamatoria de las macamidas, (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida (9,12-NBD) y (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida (9,12-NMD), haciendo uso de células que proceden de pacientes con leucemia monolítica aguda (THP-1), como modelo de inflamación; mediante la cuantificación de la citoquina Interleucina 1 beta (IL-1 β) y del gen IL1B.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto anti inflamatorio de las macamidas (9,12-NBD y 9,12-NMD), por disminución de la expresión de IL-1 β mediante un ensayo de Elisa, en células THP-1 diferenciadas y tratadas con ambas macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD.
2. Determinar el efecto anti inflamatorio de ambas macamidas (9,12-NBD y 9,12-NMD), por disminución de la expresión del ARN mensajero (mRNA) del gen IL1B, mediante PCR cuantitativa en tiempo real.
3. Demostrar un posible mecanismo de acción por el cual las macamidas (9,12-NBD y 9,12-NMD) podrían tener actividad anti inflamatoria.



CAPITULO I

MARCO TEORICO

1 MACAMIDAS

1.1. *Lepidium meyenii* (Maca)

Lepidium meyenii (Maca) es una planta peruana de la familia de las Brassicaceae cultivada hace más de 2000 años, la cual crece exclusivamente en los Andes centrales entre 4000 y 4500 m.s.n.m. La Maca es usada como parte de la medicina tradicional, como suplemento alimenticio y por sus propiedades biológicas sobre la salud. ⁽²⁾ La población nativa en los Andes centrales usa los hipocotiledones después de que ha sido naturalmente desecada. No hay reportes de reacciones adversas después de consumir *Lepidium meyenii* en alimentos⁽³⁾.

1.2 Metabolitos primarios de la Maca

Los hipocotiledones secos de la Maca contienen aproximadamente 10.2% de proteínas, 57.3% carbohidratos, 2.2% de lípidos, 8.5% de fibra y cenizas 4.95%. Los ácidos grasos también están presentes, los más abundantes son ac. Linoleico, ac. Palmítico y ac. Oleico. Los ácidos grasos saturados representan un 52.7% de ácidos grasos totales⁽⁴⁾.

1.3 Metabolitos secundarios presentes en la Maca

Los metabolitos secundarios Macaridina, Macaenos, Macamidas y alcaloides de la Maca, están presentes solo en esta planta⁽³⁾. Los Macaenos son ácidos grasos insaturados. Otros compuestos incluyen esteroides como beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol⁽⁵⁾. Diferentes glucosinolatos como glucosinolatos aromáticos glucotropaelina han sido descritos en la Maca⁽⁶⁾. Se ha demostrado que la procedencia de la Maca o el color de esta, produce variaciones significativas en la cantidad de Macaenos, Macamidas, esteroides y glucosinolatos⁽²⁾.

1.4 Macamidas

La Maca presenta una clase de metabolitos secundarios llamados macamidas (alkilamidias), los cuales son N-bencilamidias de ácidos grasos de cadena larga⁽⁷⁾ (Figura 1). Las macamidas son las responsables de la actividad farmacológica de la Maca⁽⁸⁾. Son generadas después de desecar la Maca. Existe una similitud estructural entre el agonista endocannabinoide endógeno, anandamida (AEA), y las macamidas; ambos son amidias derivadas de ácidos grasos de cadena larga⁽⁹⁾. De esta manera las macamidas han mostrado ser inhibidores de la Hidrolasa de Amida de Ácido Graso (FAAH)^(8, 10); actuando sobre el sistema nervioso central por modulación de la liberación de neurotransmisores, para generar efectos analgésicos, antiinflamatorio o protector contra la neurodegeneración⁽⁸⁾. Ellas también pueden modular el metabolismo energético y mejorar la actividad antioxidante contra la fatiga inducida por ejercicio⁽¹¹⁾.

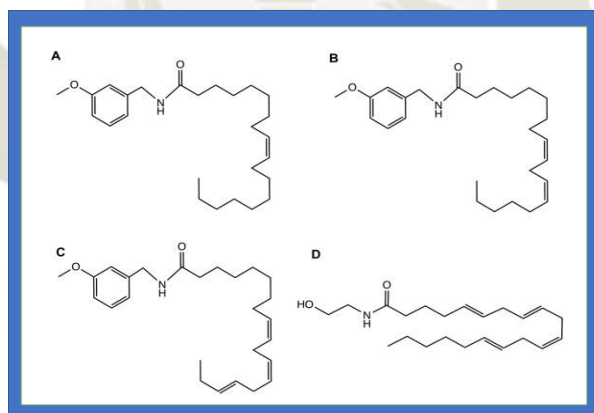


Figura 1. Estructura química de algunas macamidas⁽¹²⁾

En la figura 1 se muestra la estructura química de algunas macamidas. A. N-(3-metoxibencil) oleamida, B. N-(3metoxibencil) linoleamida, C. N-(3-metoxibencil) linolenamida, D. Anandamida (AEA).

1.5 Macamidas (9Z,12Z)-N-Benciloctadeca-9,12-dienamida, (9Z,12Z)-N-(3-Metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida

El (9Z,12Z)-N-Benciloctadeca-9,12-dienamida es una bencilamina de ácido linoleico, (9Z,12Z)-N-(3-Metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida es una metoxi-bencilamida de ácido linoleico⁽¹²⁾. Estos dos compuestos Figura 2, pueden tener actividad farmacológica antiinflamatoria, ya que han mostrado ser inhibidores de la enzima FAAH⁽¹²⁾.

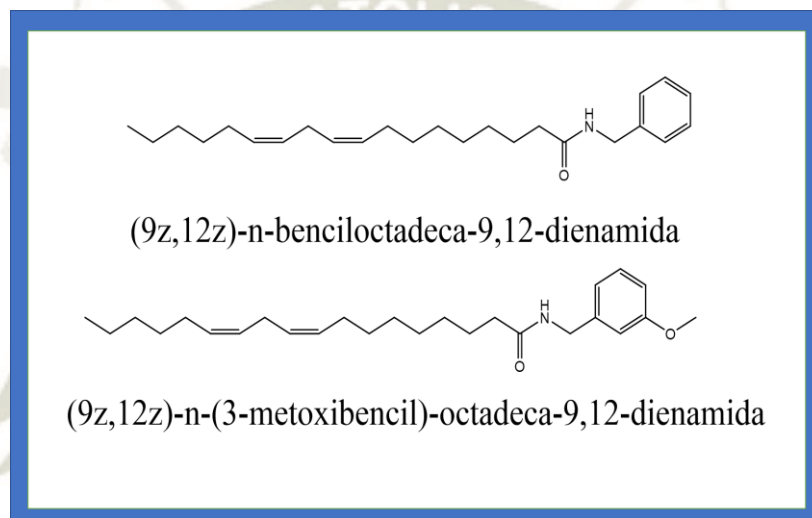


Figura 2. Estructura química de las macamidas. Elaboración propia

En la figura 2 se muestra la estructura química de las macamidas (9Z,12Z)-N-Benciloctadeca-9,12-dienamida (9,12-NBD) y (9Z,12Z)-N-(3-Metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida (9,12-NMD).

2.INFLAMACIÓN

2.1 inflamación

La inflamación es generalmente definida como una respuesta a estímulos tales como patógenos o señales endógenas de daño celular, que resulta en reparación celular o a veces en patologías. Cada tejido exhibe distintas características de inflamación como resultado de un proceso molecular, inmunológico y fisiológico. de antígenos específicos de célula⁽¹³⁾.

2.2 Mecanismo de la respuesta inflamatoria

El proceso inflamatorio envuelve 4 etapas.

1. Reconocimiento de estímulos perjudiciales a través de receptores en la superficie celular
2. Activación de las vías inflamatorias
3. Liberación de marcadores inflamatorios
4. Reclutamiento de células inflamatorias⁽¹⁴⁾.

2.3 Activación del receptor de reconocimiento de patrones

Las estructuras microbianas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), pueden desencadenar la respuesta inflamatoria a través de la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales están expresados en células inmunes y no inmunes Figura 3 (Células presentadoras de antígeno (APC) , Macrófagos, Polimorfonucleares (PMN) y Células T) ⁽¹³⁾. Algunos patrones de reconocimiento de receptores (PRR) también reconocen varias señales endógenas activadas durante el daño celular o tisular y se conocen como patrones moleculares asociados al daño (DAMP)⁽¹³⁾. Los DAMP son biomoléculas del huésped que pueden iniciar y perpetuar una respuesta inflamatoria no infecciosa⁽¹³⁾.

Las clases de familias de receptores de reconocimiento de patógenos PRR incluyen Receptores de tipo Toll (TLR), Receptores de lectina de tipo C (CLR), Receptores de tipo retinoico inducible por ácido (RIG) (RLR) y Receptores de tipo NOD (NLR))⁽¹³⁾. Los TLR son una familia de PRR de mamíferos altamente conservados que participan en la activación de la respuesta inflamatoria⁽¹⁵⁾.

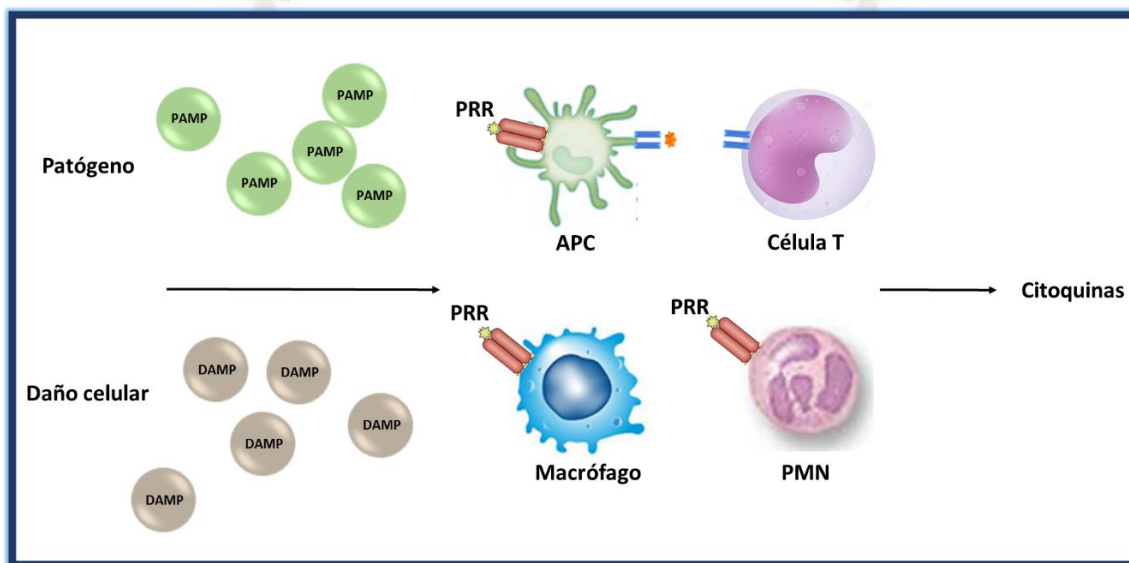


Figura 3: Activación del receptor de reconocimiento de patrones. Elaboración propia.

2.4 Activación de vías inflamatorias

Las vías inflamatorias afectan la patogénesis de una serie de enfermedades crónicas e implican mediadores inflamatorios comunes y vías reguladoras. Los estímulos inflamatorios activan vías de señalización intracelular que luego activan la producción de mediadores de inflamación⁽¹³⁾.

Los estímulos inflamatorios primarios son:

- Los productos microbianos.
- Las citoquinas como la interleucina-1 β (IL-1 β).
- La interleucina-6 (IL-6).

- El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).

Estos estímulos median la inflamación a través de la interacción con los receptores Toll (TLR), receptor de la interleucina 1 (IL-1R), receptor de la interleucina 6 (IL-6R) y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR)^(6, 16).

2.5 Marcadores inflamatorios

Los marcadores se utilizan en aplicaciones clínicas para indicar procesos biológicos normales contra patógenos. Los marcadores inflamatorios pueden ser predictivos de enfermedades inflamatorias⁽¹⁷⁾, y se correlacionan con las causas y consecuencias de diversas enfermedades inflamatorias, como enfermedades cardiovasculares, disfunciones endoteliales e infección⁽⁹⁾.

Los estímulos activan las células inflamatorias, como los macrófagos, e inducen la producción de citoquinas inflamatorias

- Interleucina 1 beta (IL-1 β)
- Interleucina 6 (IL-6)
- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)
- Proteínas y enzimas inflamatorias.

Estas moléculas pueden servir, potencialmente como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades, el pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas⁽¹⁴⁾.

2.6 Citoquinas inflamatorias

Las citoquinas se liberan predominantemente de las células inmunes, incluidos monocitos, macrófagos y linfocitos. Las citoquinas pro y antiinflamatorias facilitan e inhiben la inflamación, respectivamente. Las citoquinas inflamatorias se clasifican como:

- Interleucinas (IL's)

- Factores estimulantes de colonias (LCR)
- IFN (interferón)
- Factor de necrosis tumoral (TNF)
- Factor de crecimiento transformante (TGF)
- Quimiocinas.

Son producidas principalmente para reclutar leucocitos en el sitio de infección o lesión⁽¹⁸⁾. Las citoquinas modulan la respuesta inmune a la infección o inflamación y regulan la inflamación en sí a través de una compleja red de interacciones. Sin embargo, la producción excesiva de citoquinas inflamatorias puede provocar daño tisular, cambios hemodinámicos, insuficiencia orgánica y, en última instancia, la muerte⁽¹⁹⁾.

3 ROL DE IL-1 β EN INFLAMACION

3.1. Inflamasoma, (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*) NLRP3

El inflamasoma NLRP3 es un componente crítico del sistema inmune innato que media la activación de caspasa-1 y la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β /IL-18 en respuesta a la infección microbiana y el daño celular. Sin embargo, la activación aberrante del inflamasoma NLRP3 se ha relacionado con varios trastornos inflamatorios, que incluyen síndromes periódicos asociados a la enfermedad de Alzheimer, diabetes y aterosclerosis. El inflamasoma NLRP3 se activa por diversos estímulos y múltiples eventos moleculares y celulares, incluidos el flujo iónico, la disfunción mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno, y se ha demostrado que el daño lisosómico desencadena su activación⁽²⁰⁾.

NLRP3 actúa como un sensor intracelular que detecta una amplia gama de moléculas provenientes de microbios señales de peligro endógeno e irritantes ambientales, lo que resulta en la formación y activación del inflamasoma NLRP3. El ensamblaje del inflamasoma NLRP3 conduce a la liberación dependiente de caspasa 1 de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, así como a la muerte celular por pirolisis⁽²¹⁾.

3.2. IL-1 β Como marcador celular de inflamación

La citoquina-1 β (IL-1 β) es un mediador clave en la respuesta inflamatoria, a su vez es la citoquina más estudiada y mejor caracterizada de la familia de las interleucinas. Es producida y secretada por una gran variedad de células. La interleucina-1 β (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria potente que es crucial para las respuestas de defensa del huésped a la infección y la lesión^(22,23).

3.2.1. Producción y secreción de IL-1 β

Es producido y secretado por una variedad de tipos de células, aunque la gran mayoría de los estudios se han centrado en su producción dentro de las células del sistema inmune innato, como los monocitos y los macrófagos. Se produce como un precursor inactivo de 31 Kilo Daltons (kDa), denominado pro-IL-1 β , en respuesta a PAMP. Los PAMP actúan a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en los macrófagos para regular las vías que controlan la expresión génica⁽²³⁾.

La inducción de la expresión de pro-IL-1 β generalmente se conoce como un paso de cebado, posteriormente la célula cebada debe encontrar otro PAMP o DAMP para inducir el procesamiento y la secreción de una molécula activa de IL-1 β ⁽²³⁾.

3.3 Activación de Pro-IL-1 β

Pro-IL-1 β es escindido por la proteasa proinflamatoria caspasa-1. La activación de la caspasa-1 se produce mediante el reclutamiento a un complejo de múltiples proteínas denominado el inflamasoma NLRP3, se encarga de convertir la pro-IL-1 β en IL-1 β madura⁽²⁴⁾, la cual se secreta rápidamente de la célula. Sin embargo, no está claro cómo se secreta IL-1 β de la célula, se sugiere que existen múltiples mecanismos. Por supuesto, estos pueden no ser mutuamente excluyentes, pero cada uno puede hacer una contribución específica a la inflamación dependiente de IL-1 β ⁽²⁵⁾.

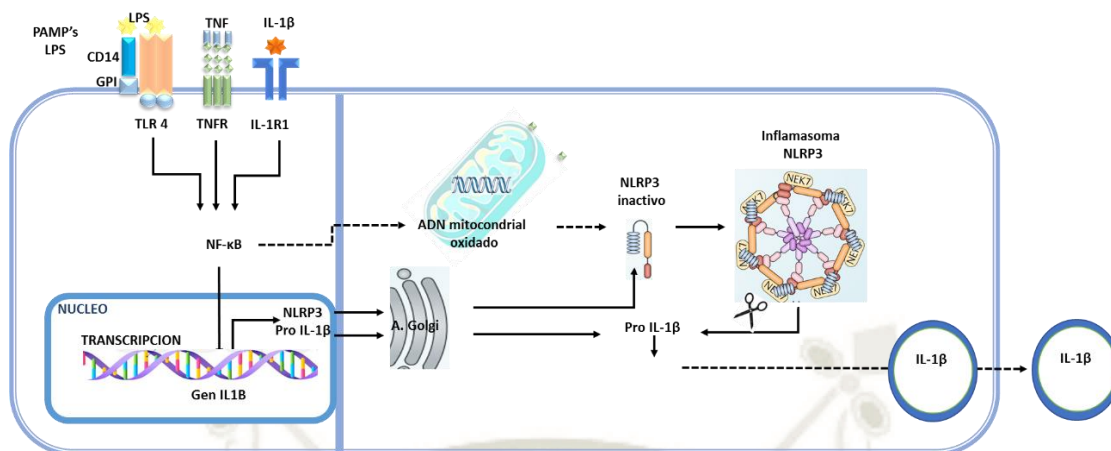


Figura 4. Activación de caspasa 1 y secreción de IL-1 β mediada por el inflamasoma NLRP3. Elaboración propia.

En la Figura 4 se muestran los componentes y la formación del inflamasoma, y de la vía convencional de secreción de proteínas. Después de la activación de una célula cebada por un estímulo apropiado se produce una serie de interacciones homotípicas entre una molécula adaptadora (ASC), una PRR citosólica (por ejemplo, una NLR) y pro-caspasa-1 para formar un inflamasoma. Esto da como resultado la activación de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β , mediante el aparato de Golgi.

4. FUNDAMENTO DE LAS TECNICAS EXPERIMENTALES

4.1 Cultivos celulares

Esta metodología es aplicada para estudios *in vitro*, en donde las células son aisladas de un portador. Requiere de condiciones específicas de temperatura, humedad y saturación de CO₂. Usando esta técnica se puede evaluar vías moleculares de enfermedades, mecanismos de acción molecular farmacológico de ciertos compuestos químicos, comportamiento de células frente a ciertos agentes químicos o citotóxicos. El presente estudio utiliza líneas celulares monocíticas de linfoma agudo (THP-1) como modelo de inflamación, para el estudio de la actividad anti inflamatoria de las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD.

4.2 Células THP-1

La línea celular THP-1, derivada de la sangre periférica de un caso infantil de leucemia monocítica aguda. Estas células son usadas en el estudio traslacional *ex vivo* de procesos inflamatorios y más comúnmente para estudiar la diferenciación y función de monocitos/macrófagos. Para obtener un fenotipo más maduro, se induce un proceso inflamatorio, mediante un tratamiento con LPS. Las células obtenidas poseen una tasa de proliferación más baja, niveles más altos de adherencia, una tasa más alta de fagocitosis y aumento de la expresión en la superficie celular de la integrina CD11b⁽²⁶⁾.

4.3 Análisis morfológico de las células THP-1

El estudio morfológico las células se lleva a cabo por microscopía de campo claro; esto permite buscar anomalías en la estructura de las células y posibles contaminantes.

4.4 Conteo de células

Se usó un (Cellometer, Auto T4 Bright Field Cell Counter Nexcelom Bioscience). Para realizar el conteo de células vivas, este aparato utiliza imágenes de campo brillante y el software (Nexcelom Bioscience) de reconocimiento de patrones para identificar y contar células de forma rápida y precisa. El recuento celular, la concentración, el diámetro y el porcentaje de viabilidad se calculan e informan automáticamente.

4.5 Prueba de viabilidad celular (MTS)

El método de MTS es usado para determinar la viabilidad celular de algunos compuestos sobre cultivos celulares. MTS es un ensayo colorimétrico para la detección cuantitativa de viabilidad celular de células mamíferas. El ensayo de MTS puede ser usado para determinar proliferación celular, viabilidad celular y citotoxicidad. El ensayo está basado en la

reducción del tetrazolium por células vivas para generar un cromógeno formazán, La reacción es catalizada por las coenzimas NADH+H⁺ y NADPH mitocondriales, y solo cuando las células son viables, es decir están vivas. Formazán es un cromógeno que absorbe luz a $\lambda = 490\text{nm}$ y puede ser cuantificado espectrofotométricamente.

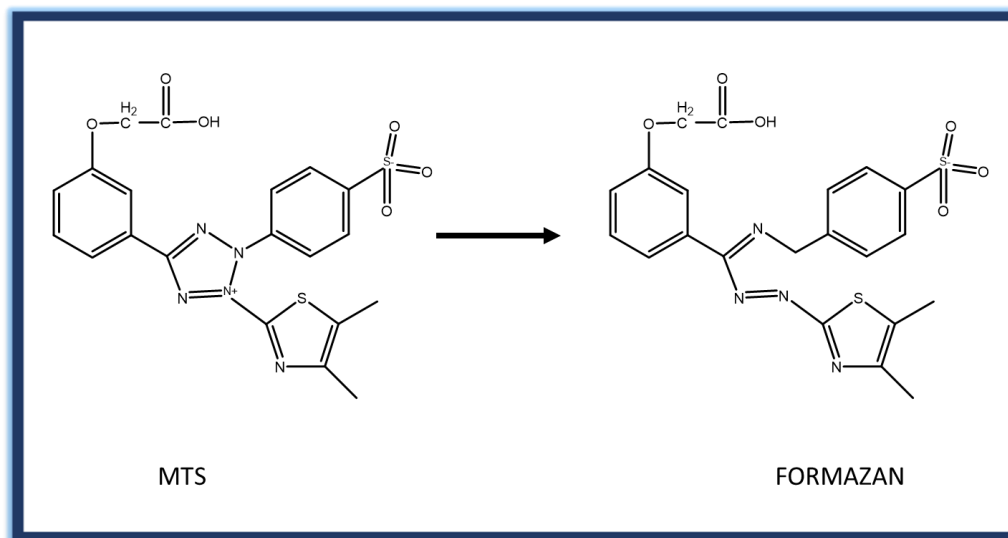


Figura 5. Reducción del reactivo conteniendo tetrazolio (MTS) al producto denominado Formazán. Elaboración propia.

4.6 Diferenciación de células THP-1 en macrófagos con PMA

Las células THP-1 son células no diferenciadas y por ello no expresan el receptor de LPS, llamado CD14. El PMA es la sustancia usada como tratamiento para que estas células produzcan el receptor CD14. La presencia de este receptor hace posible que en presencia de LPS se inicie una respuesta inflamatoria dentro de los monocitos. Los monocitos expresan integrinas en su superficie celular, pero estas se encuentran en un estado inactivo. El PMA induce la activación de estas integrinas, permitiendo que las células se unan a las proteínas de la matriz extracelular, haciendo que estas puedan diferenciarse en un fenotipo de macrófago que puede adherirse a las paredes del contenedor y sin la capacidad de proliferar⁽²⁷⁾.

4.7 Inducción de inflamación sobre células THP-1 diferenciadas con LPS.

El lipopolisacárido (LPS), es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas^(28, 29), además es un patrón molecular asociado a un patógeno (PAMP). Puede estimular el sistema inmune innato e iniciar una respuesta inflamatoria local o sistémica⁽³⁰⁾. El LPS es ampliamente reconocido como un potente activador de monocitos/macrófagos⁽¹⁶⁾. El LPS bacteriano se ha utilizado convencionalmente para estudiar la inflamación, debido a la abundancia de efectos inflamatorios.⁽³¹⁾ Amplios estudios han demostrado que en monocitos / macrófagos, LPS induce la producción de citoquinas, como $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$, $IL8$, $IL10$, $IL12$, $IL15$ y $TGF\beta$, con $TNF\alpha$ e $IL6$ ⁽³²⁾.

4.8 Inmuno ensayo de Elisa

El método Elisa se utiliza para detectar y cuantificar una sustancia específica, generalmente un antígeno, en una muestra Figura 6 A. El antígeno se inmoviliza en un pocillo de microplaca directamente o mediante un anticuerpo específico conocido como "anticuerpo de captura". **B.** Se agrega un "anticuerpo de detección primaria", formando un complejo antígeno-anticuerpo⁽³³⁾. **C.** Se agrega un anticuerpo secundario **D.** Este complejo se une a la peroxidasa de rábano (HRP), **E.** finalmente la peroxidasa reacciona con el sustrato. Entre cada paso, el pozo se lava con una solución tampón. La adición de un sustrato produce una señal de color, que puede cuantificarse espectrofotométricamente, esto indica la presencia del antígeno en la muestra. La medición de la absorbancia es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra⁽³³⁾.

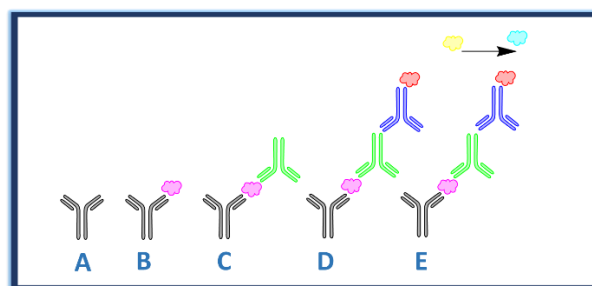


Figura 6. Elisa sándwich. Elaboración propia.

4.9 ARN mensajero y su importancia en pruebas genéticas

El ARN mensajero (mRNA) se sintetiza en el núcleo utilizando la secuencia de nucleótidos del DNA como plantilla. El proceso de hacer mRNA a partir del DNA complementario (cDNA), se llama transcripción y ocurre en el núcleo. El mRNA dirige la síntesis de proteínas, que ocurre en el citoplasma, a través de un proceso llamado traducción⁽³⁴⁾. El mRNA posee dos componentes importantes, conocidos como Intrones (porciones no codificantes) y Exones (porciones codificantes), de los cuales solo los intrones serán escindidos, dejando la porción codificante para la síntesis de proteínas (Exones).

4.10 Síntesis de cADN

El ADN complementario (cADN) es el ADN producido en una plantilla de ARN por la acción de la acción de una enzima transcriptasa inversa (ADN-polimerasa dependiente de ARN). La secuencia del cADN se vuelve complementaria a la secuencia de ARN. A diferencia del ARN, las moléculas de ADN se pueden clonar fácilmente (se denominan "clones de cADN") haciendo que el cADN se doble y se una a un vector de ADN. El análisis de secuencia del ADN es mucho más fácil que el del ARN, por lo tanto, el cADN es la forma esencial en el análisis del ARN, particularmente del mRNA eucariota⁽³⁵⁾.

4.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (pc en tiempo real)

Usando PCR, las secuencias específicas dentro de una plantilla de ADN o cADN pueden copiarse, o "amplificarse", de miles a millones de veces usando oligonucleótidos específicos de secuencia, ADN polimerasa termoestable y ciclos térmicos. En la PCR cuantitativa en tiempo real, la cantidad de ADN se mide después de cada ciclo mediante tintes fluorescentes, que producen una señal fluorescente creciente en proporción directa al número de moléculas de producto de PCR (amplicones) generadas. Los datos recopilados en la fase exponencial

de la reacción producen información cuantitativa sobre la cantidad inicial del objetivo de amplificación. Al trazar la fluorescencia frente al número de ciclo, se genera un gráfico de amplificación que representa la acumulación de producto durante la duración de la reacción de PCR completa⁽³⁴⁾.

La PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) se usa cuando el material de partida es ARN. En este método, el ARN se transcribe primero cADN mediante la transcriptasa inversa del ARN total o ARN mensajero (ARNm). El ADNc se usa luego como plantilla para la reacción qPCR⁽³⁴⁾.

4.12 Análisis de variación en la expresión de los genes $2^{-\Delta\Delta Ct}$

El método Delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), es una fórmula simple que se usa para calcular la expresión del gen de pliegue relativo de las muestras cuando se realiza una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)⁽³⁶⁾.

El objetivo de este método es comparar las medidas de expresión normalizadas de un gen de interés en diferentes condiciones y poder tener una estimación de cuán diferente es su expresión, en comparación con un gen de referencia. Ya que las condiciones ideales no son posibles es conveniente usar la expresión aparente de algunos otros genes (genes de referencia) que se sabe que no se expresan de manera diferencial entre las diferentes condiciones. Con los valores de expresión normalizados (valores delta-Ct) para cada condición, se puede comparar la diferencia entre dichos valores de delta-Ct (valor delta-delta-Ct).

El valor delta-delta-Ct es el logaritmo de la relación de concentraciones, también conocido como "cambio de pliegue logarítmico". Se utiliza el modelo matemático de la amplificación exponencial y se considera que el valor de Ct es el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar un umbral de señal fijo⁽³⁶⁾.

5. Prueba de significancia estadística

5.1 Análisis de varianza (ANOVA)

El Análisis de varianza (ANOVA) es una técnica estadística extremadamente poderosa que puede usarse para separar y estimar las diferentes causas de variación. Se puede usar para separar cualquier fuente de variación, sea por error aleatorio o por la variación de un factor de efecto controlado o fijo. En el primer caso el error aleatorio hace referencia a las variaciones en los resultados al repetir las mediciones con las mismas condiciones; y la variación de factores controlados hacen referencia a las condiciones de trabajo (ej. diferentes concentraciones, temperaturas, etc.). Por lo tanto, ANOVA puede probar si la alteración del factor controlado conduce a una diferencia significativa entre los valores medios obtenidos. ANOVA también se puede usar en situaciones donde hay más de una fuente de variación aleatoria⁽²²⁾.

5.2 Tukey

Este método crea intervalos de confianza entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado. La varianza se estima a partir de todo el conjunto de datos como una estimación agrupada. Si las variaciones de la población son las mismas en todos los grupos, dicha estimación agrupada es mucho más sólida y precisa que la estimación individual de solo una parte de todo el conjunto de datos. Además, el procedimiento de Tukey ajusta los valores “ p ” para múltiples pruebas, de modo que se controla la tasa de error dentro de una familia (probabilidad de obtener al menos un falso positivo entre la familia de pruebas realizadas)⁽²²⁾.

5.3 Dunnett

La prueba de Dunnett es una de varias pruebas a posteriori o post hoc, realizadas después de un análisis de varianza unidireccional significativo (ANOVA), para determinar qué

diferencias son significativas. Es aplicable cuando se realizan comparaciones múltiples de medias de tratamiento y la media del grupo de control ⁽²²⁾.





CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1 Equipos de laboratorio

- Cabina de bioseguridad, (*cell culture hoods, Class II Type A2 Kossodo*).
- Contador de células, (*Cellometer, Auto T4 Bright Field Cell Counter Nexcelom Bioscience*).
- Lector de microplacas, (*Microplate reader, Varioska LUX Multimode Thermo Scientific*).
- Microcentrífuga, (*Microcentrifuge Sirvall Legend Micro 17 and 21 Thermo scientific*).
- Espectrofotómetro UV-Vis (*Nanodrop Thermo Scientific*).
- Termociclador Applied Biosystems SimpliAmp (*Thermal cycler Fisher Scientific*).
- PCR en tiempo real (*StepOnePlus Real Time PCR System Fisher Scientific*)
- Microscopio de campo Luminoso (Oxion)

1.2 Materiales de laboratorio

- Frasco para cultivo celular de 75 cm² (Thermo Scientific).
- Placas para incubar células de 6 pozos (Thermo Scientific).
- Placas para incubar células de 96 pozos (Thermo Scientific).
- Pipetas serológicas de plástico de 5, 10, 25 mL
- Propipetas eléctricas.
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL.
- Tubos falcón de 15 y 50 mL.
- Pocillos para *qPCR*.
- Micropipetas de 2, 10, 20, 200, 1000 µL.
- Micropipetas eléctricas 1, 9 µL.

1.3 Materiales biológicos

- Células que proceden de paciente con leucemia monolítica aguda (THP-1) (American Type Culture Collection ATCC).
- Medio de cultivo RPM 1640 (American Type Culture Collection (ATCC)).
- Suero fetal bovino, (FBS) por sus siglas en inglés. (American Type Culture Collection ATCC).
- Antibióticos: 10.000 units/mL Penicilina y 10.000 µg/mL Streptomina. (Gibco).
- Kit ELISA (Human IL-1β/IL-1F2 DY201) (Anticuerpo de recubrimiento,
 - Buffer tampón de recubrimiento de placas ELISA
 - Estandar de IL-1β-humana
 - Biotina-conjugada (RDSsystem)
 - Estreptavidina-*HRP*
 - Anticuerpo de captura de IL-1B antihumano de ratón
 - Anticuerpo biotilado de detección de IL-1B antihumana de cabra
 - Estándar recombinante de IL-1B humana
 - Solución de parada
 - Reactivo de color A (substrato)
 - Reactivo de color B (substrato)
 - Concentrado de tampón de lavado: 0.05% Tween 20 en PBS pH 7.2-7.4
 - Microplacas transparentes
 - Selladores de placas ELISA
- Probes qPCR
- TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, 4444557. (Applied Biosystems)
- Kit de transcripción de cDNA, 04896866001 (Roche)

1.4 Reactivos químicos

- Buffer fosfato salino, PBS, por sus siglas en inglés. (American Type Culture Collection (ATCC)). Azul de tripan. (Sigma Aldrich).

- Dimetilsulfoxido (DMSO). (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION).
- Compuesto de Tetrazolio, Ensayo de proliferación celular MTS (Promega).
- Kit para ELISA (Human IL-1 β /IL-1F2 DY201) (RD system)
- PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma Aldrich)
- Lipopolisacárido LPS (Sigma Aldrich)
- Macamidas: Las macamidas usadas fueron sintetizados en el laboratorio del MCPHS. El nombre químico de las macamidas denominada en el presente trabajo como 9,12-NBD es (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida y el nombre para la macamida denominada 9,12-NMD es (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida

2. DESCRIPCIÓN Y PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS USADAS

2.1 Cultivos celulares

Las células THP-1, adquiridas de ATTC, fueron cultivadas en el medio RPM-1640, suplementado con suero fetal bobino 10%, 100 units/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin y subcultivadas en suspensión cada 2 días.

Las condiciones del cultivo fueron a 37°C, en un entorno humidificado con una concentración de CO₂ al 5%. Para realizar los ensayos se requirió una gran cantidad de células. Ya que las células crecen en suspensión, se aspiró 10mL de los frascos de cultivo celular que contenía las células del *pasaje 1*, cuya concentración es de aproximadamente 10⁶ células/mL. (contadas con el *cellometer*) y se transfirió a una placa de 75cm³, con 15 mL de medio completo (FSM, penicilina y suero fetal bobino). Las células ya cultivadas fueron almacenadas en una incubadora a 37°C, CO₂ 5%. Cada dos días se hizo un conteo celular, procurando que el número de células no exceda el millón adicionalmente se analizó la morfología de las células por microscopia, buscando posibles cambios morfológicos o la presencia de contaminantes, seguidamente se eliminó 10 mL del cultivo celular y se completó con 10 mL de medio completo.

2.2 Análisis morfológico de las células

Las células fueron examinadas diariamente por microscopia. El análisis se realizó antes y después de realizar el conteo, procurando descartar la posibilidad de tener contaminantes o células con una morfología anómala, lo que indicaría que las células no son aptas para continuar con los ensayos experimentales.

2.3 Conteo de células

Para contar y evaluar el porcentaje de viabilidad celular, se retiró 0.5 mL de la suspensión celular y se mezcló en un eppendorf con 0.5 mL de azul de tripán, en una proporción (1:1), de esta mezcla se tomó 0.2 mL y se colocó en una cámara de vidrio que se inserta en el contador celular.

2.4 Pruebas viabilidad celular por MTS

Se sembraron 50 000 células/pozo en placas. Se agruparon las células en los siguientes grupos:

- Control, este grupo solo contenía el medio de cultivo FSM
- Control DMSO 0.5%
- 9,12-NBD a una concentración de 3 μ M
- 9,12-NBD a una concentración de 10 μ M
- 9,12-NMD a una concentración de 3 μ M
- 9,12-NMD a una concentración de 10 μ M

Todas estas células fueron diferenciadas en macrófagos usando PMA, después de 48 horas de diferenciación, el medio de cultivo fue removido y remplazado con FSM, durante 24 horas, al término de las 24 horas el medio de cultivo fue removido y se dio el tratamiento a

los grupos de células con los controles de FSM, DMSO y macamidas. Las células fueron expuestas a este tratamiento durante 1 hora. Se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento y se dejó incubando a 37°C, con CO₂ 5 % durante 24 horas.

Posteriormente se agregó el reactivo MTS a cada uno de los pozos, hasta llegar a una concentración final de 10 µL de MTS/200 µL de medio, se incubo durante 4 horas. Al acabo de estas las placas son llevadas a un lector de placas y la data fue evaluada estadísticamente mediante el software (graphpad prism 7).

2.5 Diferenciación de los THP-1

Para obtener un rendimiento óptimo de células diferenciadas se recomienda trabajar con concentraciones bajas de *Phorbol Miristate Acetate* PMA (8-25 nM) y dar un tiempo de descanso de 24 horas en ausencia de PMA. En el presente trabajo se eligió una concentración de 16 nM (10ng/mL)⁽²⁷⁾. La concentración de PMA de 16 nM (10ng/mL) debe usarse para inducir un fenotipo consistente de macrófagos THP-1, sin interferir en la expresión y citoquinas que afecten los resultados de experimento posteriores⁽²⁷⁾.

Se sembraron 2 mL del cultivo celular en placas de 6 pozos, con una concentración de 10⁶/mL. Para la diferenciación, se utilizó (PMA) con una concentración de 10 ng/ml. Esta solución fue preparada a partir de una solución stock de PMA 100 µg/ mL, (100000 ng/mL) la cual se diluyo hasta una concentración de 100 ng/mL con medio completo (CM). Posteriormente se agregó 222µL de la solución de PMA (100ng/mL) a cada pozo. Se dejo incubando por 48 horas a 37°C, CO₂ 5% y después de este periodo de tiempo se analizó la morfología de las células con un microscopio. Al finalizar las 48 horas se removió el medio de cultivo (CM), para remplazarlo con 2mL/pocillo de medio de cultivo libre de suero bobino fetal (FSM free serum media) y de esta forma acondicionar a las células para los posteriores ensayos experimentales.

2.6 Inducción de inflamación

Después de haber diferenciado las células THP-1 con PMA, se les indujo inflamación con LPS, a una concentración de 30 ng/mL. El LPS fue preparado a partir de una solución stock 250000 ng/mL en FSM. Cabe resaltar que para las pruebas de expresión de mRNA en presencia de LPS, se usaron las siguientes concentraciones de LPS 10, 30 y 100 ng/mL. Este proceso duró 4 horas, después de las cuales el medio de cultivo que contiene LPS, fue removido y remplazado con medio de cultivo libre de suero bovino fetal FSM.

2.7 Tratamiento farmacológico con las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD

Después de inducir inflamación con LPS, se quitó el medio de las células y se reemplazó con FSM 24 horas y se dejó incubando a 37°C, CO₂ 5%; con el fin de adecuar las células para la aplicación del tratamiento con las macamidas. Después de las 24 horas se aplicó el tratamiento a concentraciones de 3 y 10 ng/mL durante 1 hora.

2.8 ELISA inmunoensayo

Para determinar los niveles de la citoquina (IL-1 β). Se sembraron 2x10⁶ células/2mL de las THP-1 diferenciadas con PMA e inducidas a inflamación con LPS, en placas de 6 pozos. Se trabajó con los siguientes grupos

- 9,12-NBD en las concentraciones de 3 y 10 μ M
- 9,12-NMD en las concentraciones de 3 y 10 μ M.
- Grupo control
- Control DMSO 5%

Se colectó el medio de crecimiento con el uso de una micropipeta, con la cautela de no desprender las células adheridas a la placa y se colectó un volumen de 1.5 mL de dicho medio que contenía la citoquina (IL-1 β). Los niveles de IL-1 β en el sobrenadante fueron

medidos usando un kit Comercial de ELISA para (IL-1 β), de acuerdo a las indicaciones del fabricante (ABCAM). Los valores de las absorbancias obtenidos por espectrofotometría UV-Vis, fueron procesados matemáticamente hasta obtener los valores de las concentraciones de IL-1 β en picogramos por mililitro pg/mL.

- Reconstitución de anticuerpos
- Preparación de la placa
- Lavado de la placa
- Bloqueo de la placa
- Reconstitución estándar (estándar recombinante de IL-1B humana)
- Muestra: Dilución 1 en 2: 100 μ l de sobrenadante en 200 μ l de diluyente reactivo.
- Preparación del Substrato
- Evaluación de resultados por espectroscopia

2.9 Extracción de RNA

Las células diferenciadas y adheridas en la placa, fueron lisadas con Trizol (800 μ L/pocillo) durante 2 minutos con contante agitación. El producto de la lisis fue colectado en tubos eppendorf. El contenido se almaceno a -20°C.

Se agregó 500 μ L de cloroformo en cada uno de los eppendorf, se mezcló gentilmente con ayuda de un vortex y posteriormente se centrifugo a 12000rcf, 4°C por 5 minutos. Se formaron 3 fases; la fase superior es la que contenía el ARN. Se colecto la mayor cantidad de la fase que contenía el ARN con una micropipeta, hasta un volumen final no mayor de 500 μ L y procurando no contaminar la muestra con las otras fases.

Para el caso se usó glicógeno (10 μ L) libre de ARNasas para precipitar el ARN, debido a la baja concentración de este, el contenido se dejó incubar por 5 minutos, posteriormente se agregó 500 μ L de isopropanol y se dejó reposar por 5 minutos, se centrifugo a 12500rcf y 4°C durante 15 minutos. El ARN total precipito con una consistencia gelatinosa, la que se evidencio en el fondo de los tubos eppendorf, el sobrenadante fue descartado con la ayuda de una micropipeta.

2.10 Lavado del ARN

El ARN fue resuspendido con un 1mL de Etanol 75%, La muestra fue mezclada gentilmente con un vortex, posteriormente fue centrifugada a 7500rcf 4°C por 5 minutos, el sobrenadante fue removido con una micropipeta, este proceso se repitió dos veces. Finalmente, la muestra fue desecada al vacío por 10 minutos.

2.11 Solubilización del ARN

Se resuspendió el pellet de ARN y glicógeno en 30µL de agua libre de ARNasa 0.1M EDTA, por pipeteo. Se almaceno a -70°C.

2.12 Cuantificación de ARN

Se colocó 1µL de ARN de cada una de las muestras en un espectroscopio (nanodrop), con el fin de medir la concentración de ARN. El sistema de retención de muestras patentado de los espectrofotómetros Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 y 2000c permite el pipeteo directo de muestras sobre la superficie de medición óptica.

2.13 Síntesis de cDNA

Se utilizo el kit de transcripción de primera cadena (Transcriptor First Strand cADN Synthesis Kit from Roche.). Todo el procedimiento se trabajó en hielo y se usaron tubos para PCR. Para la preparación de las muestras de ARN, se determinó la concentración del RNA por espectrofotometría.

El equipo permite la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de forma eficiente y rápida, mediante la realización automática y cíclica de los cambios de temperatura que se requieren para la amplificación de una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN), a partir de una

enzima termoestable. La PCR posibilita que una pequeña cantidad de moléculas de ADN sea amplificada muchas veces, de manera exponencial.

2.13.1 Preparación del master mix 1

En un tubo eppendorf se colocó el Oligo-dtp y Hexameros en proporción (1:2) respectivamente, de esta mezcla se extrajeron 3 μL y se colocaron en los tubos para PCR, junto con 10 μL de ARN (concentración aproximada de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Los tubos fueron llevados al termociclador por 10 min a 65°C. Durante este tiempo se preparó el segundo master mix.

En un tubo eppendorf se preparó la segunda solución master mix, para lo cual se colocó Buffer de reacción, inhibidor de ARNasa, Transcriptasa, DNT (deoxinucleotidos) en proporción (8:1:1:4) respectivamente. Se agregaron 7 μL de esta solución a cada tubo de PCR que contenía la solución master mix 1 con la muestra de ARN, se agito gentilmente por pipeteo y los tubos para PCR fueron llevadas al termociclador nuevamente.

La transcriptasa inversa de transcriptor se recomienda para RT-PCR debido a su alta sensibilidad en combinación con una alta termo estabilidad: la enzima sintetiza productos de ADNc largos (hasta 14 kb) y puede usarse a temperaturas de hasta 65°C, debido a su termo estabilidad,

2.13.2 Detalles de programación del cDNA:

- 65°C por 10 minutos
- 25°C por 10 minutos
- 55°C por 30 minutos
- 85°C por 5 minutos
- 4°C por 5 minutos
- Coverplate at 105.0°C



Figura 7. Kit de síntesis de cADN (Transcriptasa inversa del transcriptor)

El componente central del kit (Figura 7), es una transcriptasa inversa recombinante expresada en *E. Coli*. La enzima tiene actividad de ADN polimerasa dirigida por ARN, actividad de ADN polimerasa dependiente de ADN, actividad de desenrollado y actividad de ARNasa que degrada el ARN en ARN: híbridos de ADN.

2.14 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Debido a que todos los reactivos contienen enzimas las cuales pueden ser afectadas por cambios pequeños de temperatura u otros factores como la luz, se trabajó en hielo y se protegió los reactivos de la luz. En la Figura 8 se muestra el master mix TaqMan Fast Advanced Master Mix contienen tampón, dNTP, colorante de referencia pasivo, DNA polimerasa de inicio en caliente termoestable y otros componentes formulados para una PCR en tiempo real confiable basada en el ensayo TaqMan™.



Figura 8. TaqMan Fast Advanced Master Mix

2.14.1 Preparación

- Las muestras que contenían el cADN fueron puestas en hielo
- Se alisto un plato de 96 pozos (96-well plate)
- Preparación del master mix

En un tubo eppendorf se colocó la solución taqman master mix, el probe y agua libre de nucleasas en las proporciones (10:1:7) respectivamente. Se mezcló los componentes haciendo uso de un vortex. Se diluyó la muestra de cADN, por diluciones seriadas hasta llegar a una concentración de 50ng/ μ L. En los platos de 96 pozos se colocó 9 μ L de la solución master mix con 1 μ L de cADN (50ng). Una vez terminado este paso se cubrió el plato con un adherente y se llevó a centrifugar a 2000 rpm durante 2 minutos usando una centrifuga *Marathon 3000R*. Finalmente el plato fue llevado a un PCR en tiempo real (*Applied Biosystems Step OnePlus real time PCR*).

2.14.2. Programación

1. **Holding stage 1:**
 - a. 50C for 2 minutos
2. **Holding stage 2:**
 - a. 95C for 20 segundos

3. Cycling stage 1 (45 ciclos):

- a. Paso 1: 95C for 1 segundos
- b. Paso 2: 60C for 20 segundos

Esta programación se repitió por 45 ciclos, la data obtenida fue guardada y analizada por el método Delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), es una fórmula simple que se usa para calcular la expresión del gen de pliegue relativo de las muestras cuando se realiza una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

2.15 Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar (media \pm SE). Las comparaciones entre múltiples grupos se realizaron con análisis de varianza unidireccional (ANOVA), usando GraphPadPrism (GraphPad Software, La Jolla, CA). Los resultados con un valor (≤ 0.05 para algunos experimentos) se consideraron estadísticamente significativos. Cada experimento se realizó en repeticiones independientes. Se utilizó GraphPad Prism versión 7.04 para Windows (GraphPadSoftware, La Jolla, CA) para la representación gráfica de los datos. Si el valor en la prueba ANOVA fue significativo, se realizó la prueba post hoc de Tukey.



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del presente proyecto de investigación serán expuestos en los subsiguientes párrafos, en donde se ilustrará un posible mecanismo por el cual las macamidas usadas en este estudio, ejercen actividad antiinflamatoria

1. Cultivo celular

Al analizar los cultivos celulares se observó que las células THP-1 crecieron de manera homogénea sin variaciones en su morfología, hasta después de las primeras 24 horas y en un número aproximado de 6×10^5 células/mL. La morfología de las células cambió levemente pasadas las 48 horas y al exceder los 1.2×10^6 células/mL; ya que adoptan formas más alargadas. Basados en estos resultados se tuvo el cuidado de no sobrepasar el millón de células/mL y a su vez de suplementar a las células con medio completo (CM), cada 36 horas. En la Figura 9 puede apreciarse el cambio morfológico que experimentaron las células THP-1 (A), después de ser tratadas con PMA (B).

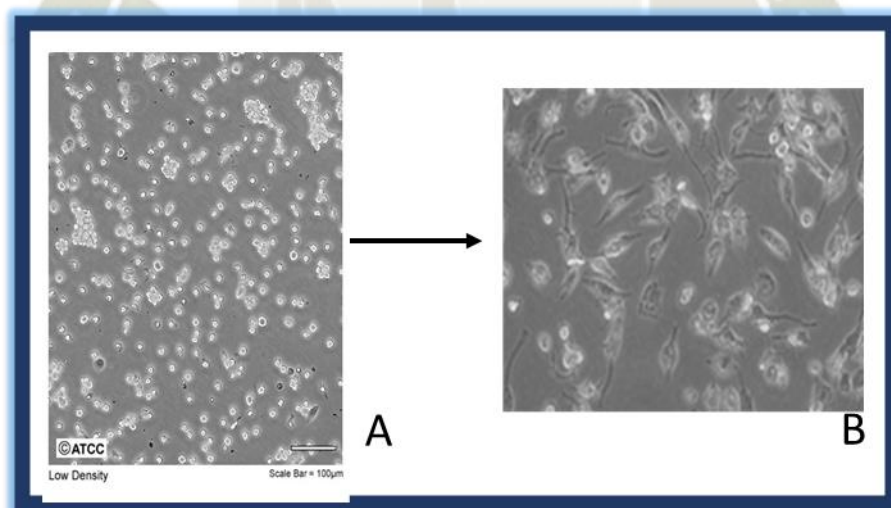


Figura 9. Células THP-1 diferenciadas por Phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA).

Elaboración propia

2. Diferenciación de las células THP-1 en macrófagos

Dependiendo de la concentración de (PMA), se puede regular las expresiones de algunos genes en macrófagos diferenciados. Se requiere una concentración que no abruma la expresión génica. Afortunadamente se ha establecido que el PMA en concentración de 10 ng/mL no afecta la regulación excesiva de otros genes⁽³⁷⁾. Así, después de tratar las células con PMA (10ng/mL) por 48 horas, estas fueron analizadas por microscopía. Se observó el cambio morfológico de los monocitos al adoptar una forma estrellada con múltiples prolongaciones. Además, se observó que las células quedaron adheridas en las placas en las que fueron cultivadas. Este acontecimiento tiene lugar cuando las proteínas de adhesión celular a superficies (integrinas) son activadas por el estímulo de PMA⁽²⁸⁾ (Figura 10).

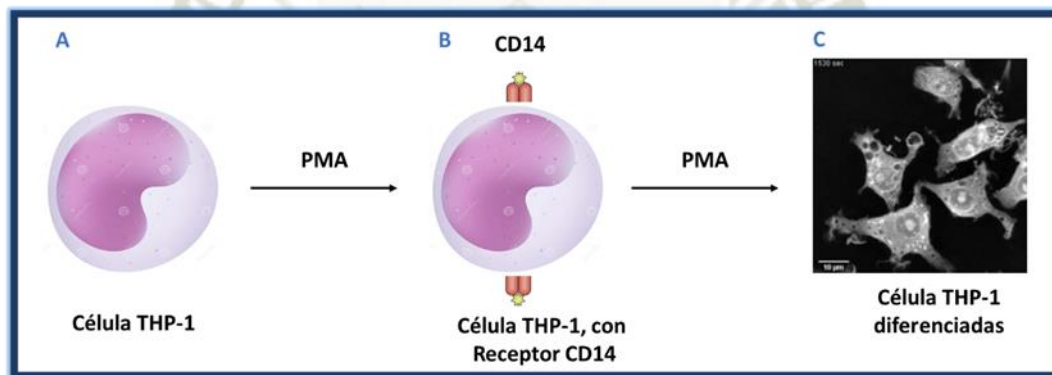


Figura 10. Diferenciación de las células THP-1, por tratamiento con PMA. Elaboración propia.

En la Figura 10 se muestra las células THP-1 tratadas con PMA (A). - Célula THP-1. (B). - Expresión de receptores CD14 en la superficie de los THP-1. (C). - Células THP-1 diferenciadas, que presentan prolongaciones y expresión de integrinas en la superficie de su membrana, la cual les permite estar adheridas en las placas de cultivo celular.

El número de células después de las 48 horas de diferenciación no aumentó, esto es producto del proceso de diferenciación el cual origina un importante reordenamiento a nivel de expresión de proteínas quinasa (MAP3K7/TAK1)⁽³⁸⁾ el cual es un potente regulador de la proliferación y diferenciación. El resultado de tal proceso fue la inhibición de la capacidad

proliferativa de las células THP-1. Es preciso resaltar que todos los ensayos posteriores fueron realizados con las células diferenciadas.

3. Inducción de inflamación con LPS

El pretratamiento con LPS inició un proceso inflamatorio en las células THP-1, previamente diferenciadas, ocasionando la expresión genética de diversas sustancias pro-inflamatorias, tales como citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α)^(32, 39), enzimas relacionadas con la inflamación (iNOS y COX-2) y factores de transcripción (NF- κ B, AP-1 y SP-1)⁽³⁹⁾⁽²⁹⁾. Entre estas sustancias liberadas se analizó la expresión del RNA mensajero (mRNA) de la proteína proinflamatoria IL-1 β , cuantificando el gen IL1B mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Las concentraciones de LPS a utilizar en los ensayos fueron determinadas mediante un ensayo en el que se sometió las células THP-1, a tres concentraciones de LPS 10, 30, y 100 ng/mL todas estas en comparación con un grupo control, el cual era medio libre de suero (FSM). Los resultados sugieren que la presencia de LPS inicia un proceso inflamatorio, cuya intensidad dependerá de su concentración sobre cada grupo de células THP-1 diferenciadas (Figura 11).

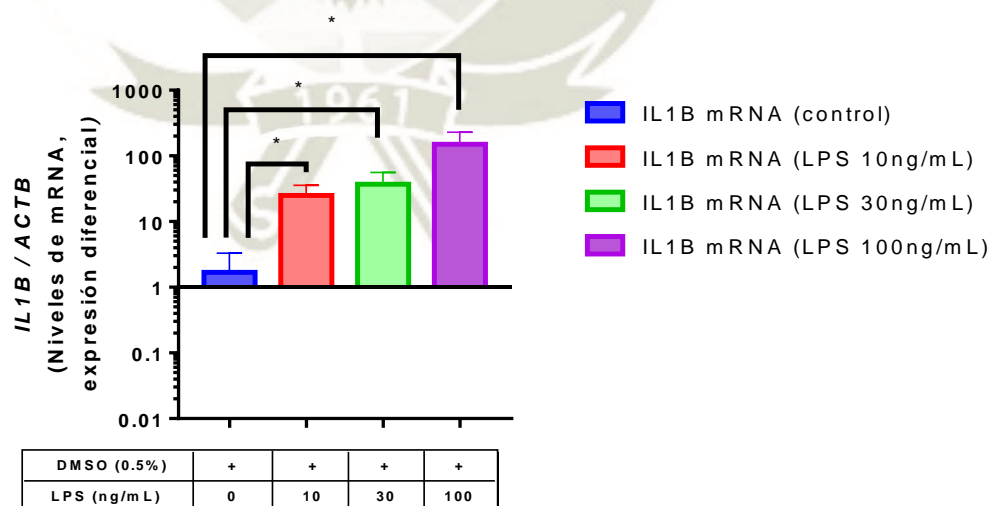


Figura 11. Aumento de los niveles de mRNA del gen IL1B

En la Figura 11 se aprecia el incremento del mRNA del gen IL 1B en células THP-1 expuestas a tres concentraciones de LPS, 10, 30, 100 ng/mL comparado con el un grupo control. Los niveles de mRNA se midieron por expresión diferencial en escala logarítmica; la cual expresa en cuanto cambian los niveles finales de mRNA en comparación con los iniciales. Para el análisis estadístico se usó ANOVA UNIFACTORIAL con un $p < 0.05$ como significativo y acompañado de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (*Dunnett's multiple comparisons test*) con un $p < 0.05$ como significativo.

En la Figura 11 se muestra el aumento en los niveles de mRNA del gen IL1B, frente el housekeeping (gen ACTB), por estímulo de diferentes concentraciones de LPS (0, 10, 30 y 100ng/mL), sobre células THP-1 diferenciadas. La prueba de comparaciones múltiples Dunnett, mostro que todos los grupos tratados con LPS incrementaron significativamente sus niveles de mRNA del gen IL1B. Con la intención de poder elegir una concentración de LPS adecuada para los experimentos posteriores se volvió a realizar la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet entre las concentraciones de 10 y 30 ng/mL de LPS y el grupo control. Así en adelante se trabajó con LPS a una concentración de 30 ng/mL, la cual conlleva a la expresión de citoquinas, sin llegar a ser toxica para las células ⁽²⁹⁾.

4. Efecto de las macamidas sobre la viabilidad celular de células THP-1 previamente tratadas con LPS

Las células (THP-1) una vez diferenciadas con PMA e inducidas a un proceso inflamatorio con LPS, fueron tratadas con dos macamidas denominadas con los códigos 9,12-NBD para (9z,12z)-n-benciloctadeca-9,12-dienamida y 9,12-NMD para (9z,12z)-n-(3-metoxibencil)-octadeca-9,12-dienamida, cada una a dos concentraciones, 3 y 10 μ M. Además, se consideró la presencia de LPS como una variable que pueda afectar los resultados, ya que esta sustancia podría llegar a ser toxica para las células. Por consiguiente, también se evaluó la viabilidad de las células frente a LPS, 30 ng/mL.

En todos los casos se usaron dos controles como referencia; el primero solo contenía medio libre de suero (FSM) y el segundo contenía DMSO 0.5%. Esto debido a que tanto las células

estaban suspendidas y las macamidas estaban disueltas en DMSO y este reactivo podría tener alguna implicancia en los resultados. La viabilidad celular fue determinada usando el método de MTS.

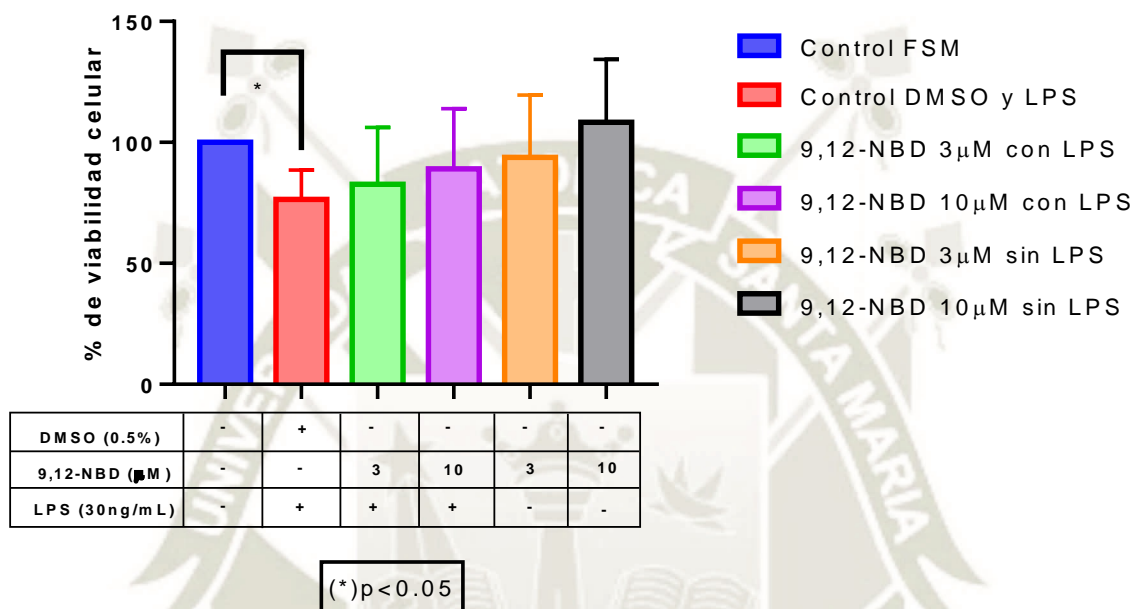


Figura 12. Efecto de LPS y de la macamida 9,12-NBD sobre la viabilidad celular de las células THP-1

En la Figura 12 se muestra el efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NBD sobre la viabilidad celular de las células THP-1. Cabe aclarar que el grupo control solo contiene las células y FSM. La viabilidad celular fue medida usando el ensayo de MTS. Las células fueron expuestas a la Macamida 9,12-NBD, DMSO y LPS durante 1 hora. Los valores son presentados como media \pm desviación estándar de diferentes experimentos (n=4) por duplicado analizados por ANOVA UNIFACTORIAL, seguido por la prueba de Tukey y comparado con el grupo control. $P < 0.05$ fue considerado significativo y esta denotado como (*).

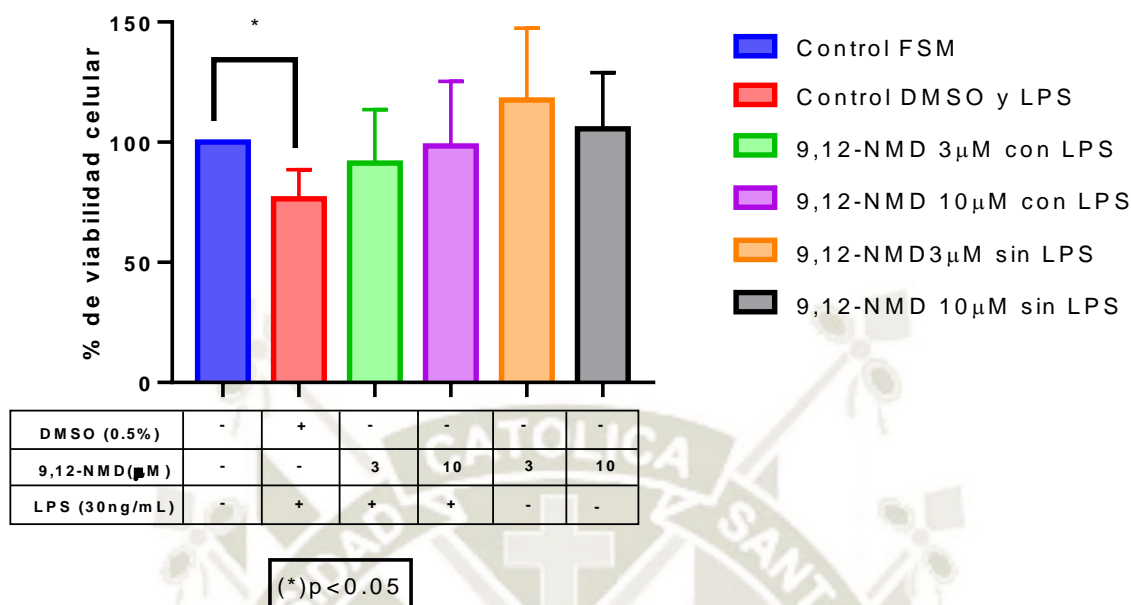


Figura 13. Efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NMD sobre la viabilidad celular de las células THP-1.

En la Figura 13 se muestra el efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NMD sobre la viabilidad celular de las células THP-1. La viabilidad celular fue medida usando el ensayo de MTS. Las células fueron expuestas a la Macamida 9,12-NMD, DMSO y LPS durante 1 hora. Los grupos tratados con la Macamida 9,12-NMD, no presentaron diferencia significativa, en otras palabras, no modificaron significativamente los valores de la viabilidad celular. Los valores son presentados como media \pm desviación estándar de diferentes experimentos ($n=4$) por duplicado, analizados por ANOVA UNIFACTORIAL, seguido por la prueba de Tukey y comparado con el grupo control. $P < 0.05$ fue considerado significativo y esta denotado como (*).

4.1 Efecto de macamidas sobre la viabilidad celular de THP-1 diferenciadas

Los resultados sugieren que las macamidas en las concentraciones de 3 y 10 μM son inocuas para las células, esto puede deberse a que estos compuestos no intervienen en los mecanismos de acción de algunos genes, proteínas o rutas moleculares involucradas en la

supervivencia o muerte celular. Así las células tratadas con las macamidas tanto en presencia como en ausencia de LPS no mostraron diferencia significativa.

4.2 Efecto de LPS sobre la viabilidad celular

El posible potencial citotóxico del LPS, Figura 12 y 13, fue evaluado usando el ensayo de MTS. Puede apreciarse que solo en las células expuestas a LPS 30ng/mL y DMSO 0.5%, sin las macamidas hay una disminución en el porcentaje significativo en la viabilidad celular, $P < 0.05$.

5. Niveles de citoquina proinflamatoria IL-1 β

Ambas macamidas atenúan la producción de IL-1 β en células THP-1 diferenciadas con PMA y posteriormente estimuladas con LPS. La estimulación de las células THP-1 diferenciadas con LPS (30 ng/ml) incrementó marcadamente la concentración de IL-1 β llegando a concentraciones próximas a 2000 pg/mL, en comparación con el control, cuyos niveles de IL-1 β eran prácticamente inexistentes (Figura 14 y 15) al igual que los niveles de ARNm que codifica IL-1 β . El postratamiento con ambas macamidas, por separado y en las concentraciones de 3 y 10 μ M atenuaron la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-1 β estimulada por LPS (Figura 14 y 15), usando un Kit de Elisa para IL-1 β humana y fueron expresados en pg/mL. Los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β fueron cuantificados a partir de los valores de absorbancia obtenidos por espectroscopia UV-Vis; A estos valores se les sustrajo el promedio de la absorbancia del blanco, posteriormente se obtuvo el logaritmo de cada valor, el cual se reemplazó en cada ecuación lineal obtenida a través de los valores del estándar IL-1 β , el antilogaritmo de estos datos fue obtenido y finalmente se le multiplico por el valor del factor de la dilución de cada muestra. De esta manera se pudo obtener los valores en picogramos por mililitro (pg/mL) de la citoquina IL-1 β .

En la Figura 14 se evidencia la diferencia significativa entre los grupos tratados con la Macamida 9,12-NBD en las concentraciones de 3 y 10 μ M, en comparación con los grupos

control. Esto debido a la marcada disminución de los niveles de IL-1 β mediante tratamiento con la Macamida 9,12-NBD, sobre células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación por LPS (30 ng/mL). La concentración de IL-1 β es expresada en pg/mL. Los valores finales de la citoquina en las células tratadas con Macamida 9,12-NBD, son 2.3 veces inferiores al valor del grupo tratado con LPS. Los valores son presentados como media \pm desviación estándar de diferentes experimentos (n=4) por duplicado y analizado con ANOVA UNIFACTORIAL, seguido por la prueba de Tukey. P<0.05 fue considerado significativo y está representada como (*).

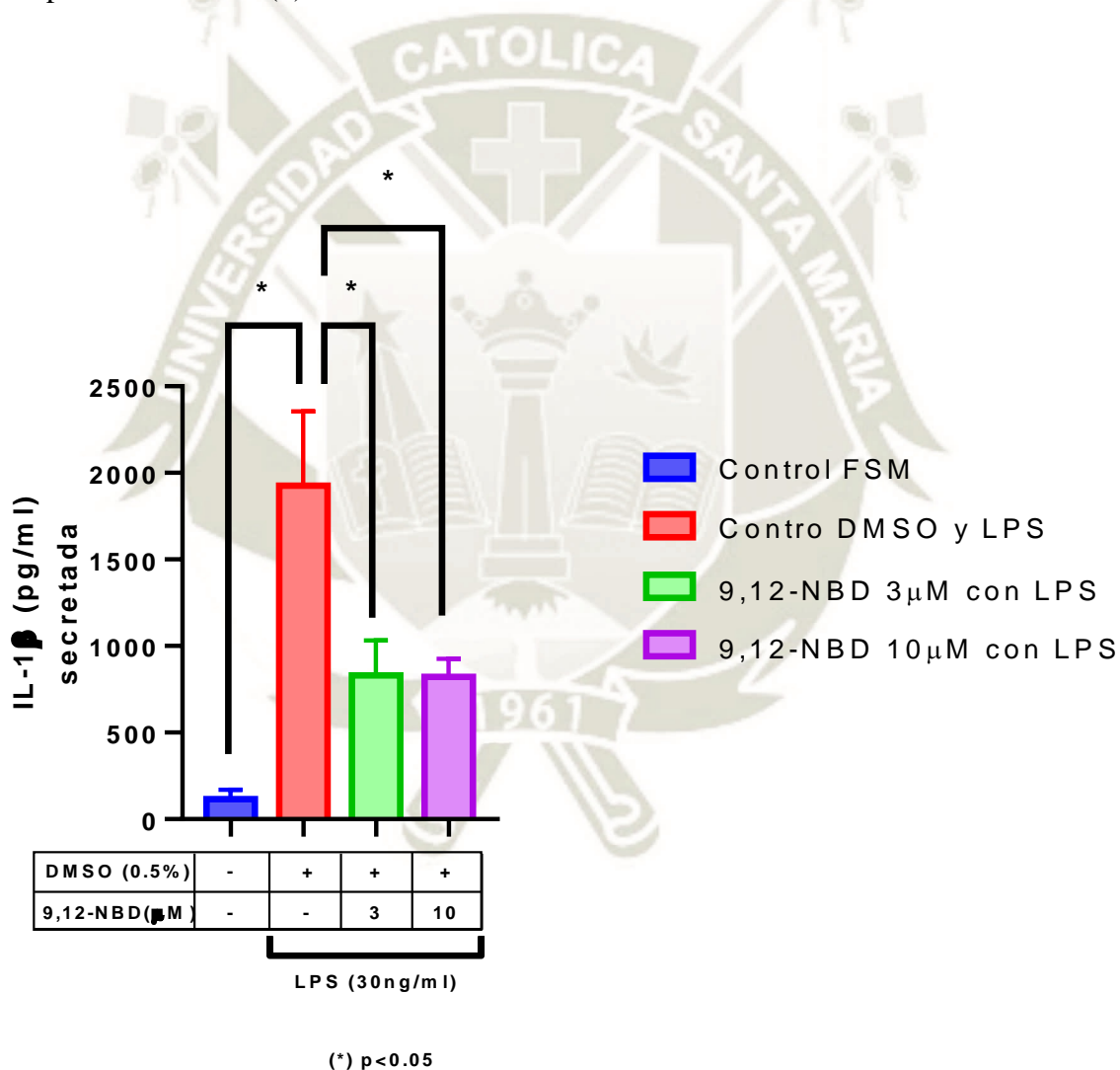


Figura 14. Inhibición de la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β mediante tratamiento con la Macamida 9,12-NBD.

En la Figura 15 se evidencia la diferencia significativa entre los grupos tratados con la Macamida 9,12-NMD en las concentraciones de 3 y 10 μM , en comparación con los grupos control. Esto debido a la marcada disminución de los niveles de IL-1 β mediante tratamiento con la Macamida 9,12-NMD, sobre células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación por LPS (30 ng/mL). La concentración de IL-1 β es expresada en pg/mL. Los valores son presentados como media \pm desviación estándar de diferentes experimentos (n=4) por duplicado y analizados con ANOVA UNIFACTORIAL, seguido por la prueba de Tukey. $P < 0.05$ fue considerado significativo y está representado como (*).

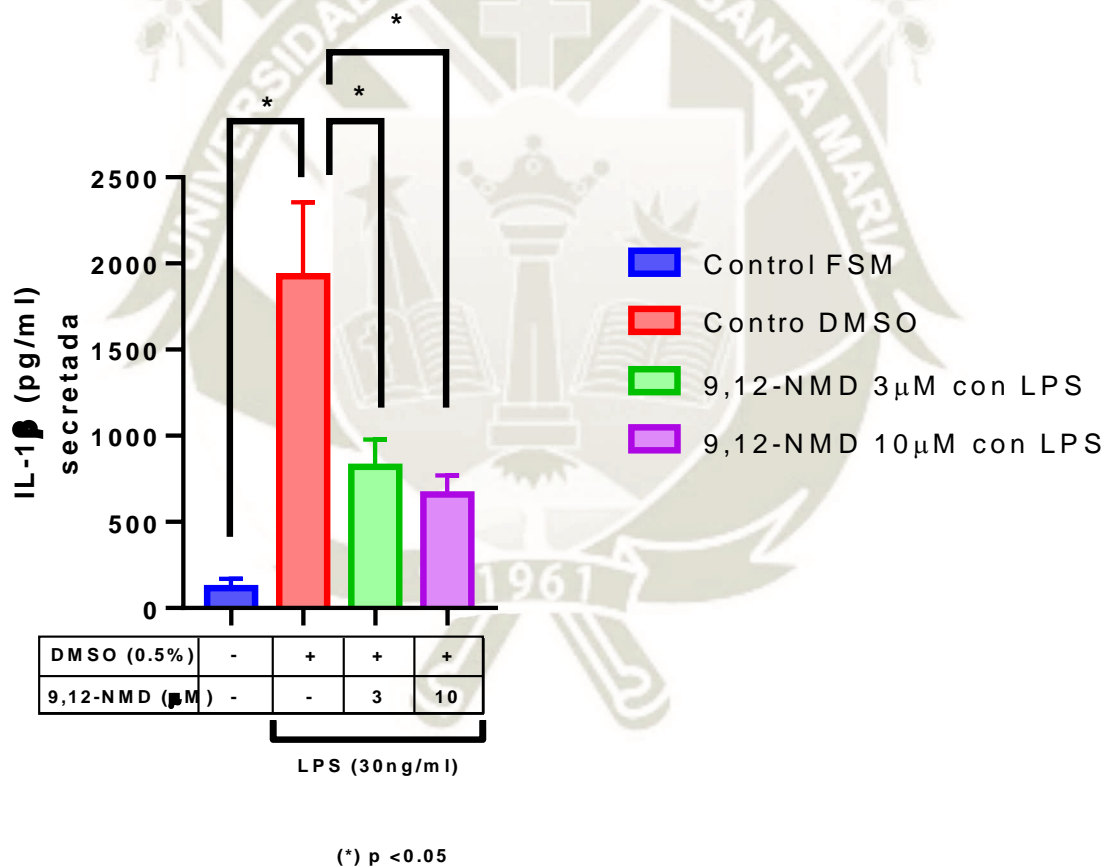


Figura 15. Inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β mediante tratamiento con la Macamida 9,12-NMD

En el presente estudio, se evidenció que el tratamiento con ambas macamidas en las concentraciones de 3 y 10 μM , suprimió eficazmente la secreción de IL-1 β y la expresión de ARNm del gen IL1B, en células THP-1 humanas diferenciadas con PMA y estimuladas con LPS. Esto proporciona evidencia directa que las macamidas que inicialmente fueron concebidas como antagonistas de FAAH, inhiben alguna de las rutas de señalización de TLR4 estimulada por LPS. De esta manera se llega a la conclusión que el estímulo con PMA origina la expresión de TLR4^(27,39) en las células THP-1 y estas TLR-4 fueron activadas con LPS⁽³⁹⁾. La activación de TLR4⁽⁴⁰⁾ por LPS provoca la liberación de las principales citoquinas pro-inflamatorias.

Las macamidas por sí solas pueden actuar como antagonistas de la enzima FAAH, debido a su estructura análoga al endocannabinoide Anandamida, además de poder ser sustratos para las enzimas Lipoxigenasas, ciclooxigenasa-2 y Citocromo P450. Por otro lado, los productos de la hidrólisis de las macamidas (ácidos grasos insaturados), podrían cumplir un rol de señalización importante relacionado con diferentes rutas inflamatorias (Figura 16 y 17).

Las citoquinas pro-inflamatorias (pro IL-1 β) liberadas por las células THP-1 diferenciadas, son producidas a través de la señalización de los receptores de la familia PRR (TLR4) acoplados al receptor CD14 (Figura 16), por estímulo con LPS. Esto origina el inicio de una cascada de señalización dentro las células THP-1 diferenciadas, que tiene como producto al factor de transcripción (NF- κ B). Este factor está implicado en la regulación del inflamasoma NLRP3 y la liberación de la pro IL-1 β . La primera señal para la activación del inflamasoma NLRP3 fue la unión de LPS a TLR4 acoplado a CD14, que conduce a la activación de la señalización de NF- κ B. En el núcleo, el NF- κ B promueve la transcripción de genes dependientes de NF- κ B, (NLRP3, Pro-IL-1 β y Pro-IL-18) para activar el inflamasoma. La segunda señal (daño mitocondrial) dentro de los THP-1 diferenciados pudo ser originada por NF- κ B, para desencadenar el ensamblaje del inflamasoma, el cual transforma pro IL-1 β en IL-1 β listo para su secreción (Figura 16).

Los resultados sugieren que las macamidas o los productos de su hidrólisis o metabolismo podrían suprimir la generación de citoquinas proinflamatorias al regular negativamente la expresión del gen IL1B y de esta manera la expresión de la citoquina IL-1 β , por inhibición de la vía de señalización NF-Kb⁽²¹⁾ (Figura 16-18).

Además de ser inhibidores de FAAH y no permitir la hidrólisis de endocannabinoides como Anandamida (AE) y 2-Araquidonilglicerol (2-AG), las macamidas dan lugar a un aumento de la concentración de endocannabinoides intracelulares, aumentando su disponibilidad para sufrir oxidación por las enzimas COX, CYP450 y LOX (Figura 17 y 18). Por lo tanto, los inhibidores de la hidrólisis endocannabinoide pueden tener un impacto más complejo que el previsto en la inhibición de FAAH. Esta posibilidad debería tenerse en cuenta en futuros estudios, especialmente al evaluar el potencial de los inhibidores de la hidrólisis de anandamida (AEA) en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o promover la resolución de la inflamación ⁽⁴¹⁾.

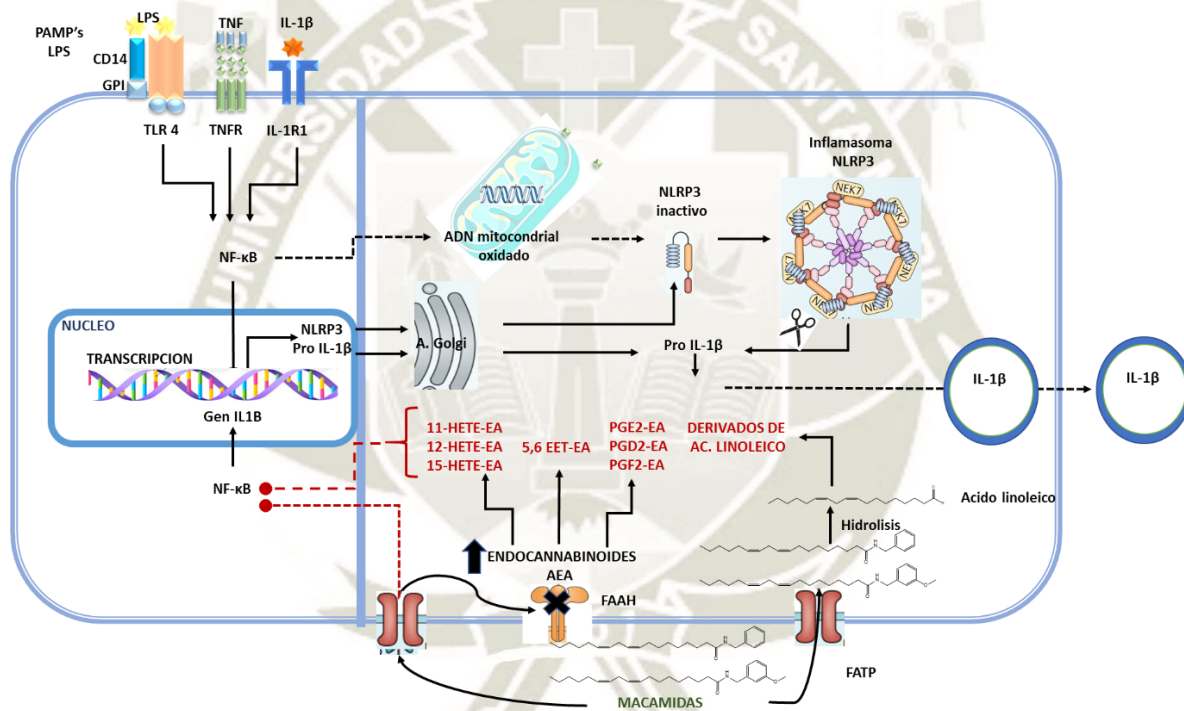


Figura 16. Secreción de IL-1 β por activación del inflamasoma NLRP3 a través del receptor nuclear NF- κ B. Elaboración propia.

En síntesis, podemos concluir que la secreción de IL-1 β por activación del inflamasoma NLRP3 se da a través del receptor nuclear NF- κ B, por estímulo de LPS en el receptor TLR4 y posible rol regulador de las macamidas. Las macamidas al inhibir la enzima FAAH, impiden que estas hidrolicen el endocannabinoide Anandamida y que se forme Ácido araquidónico AA, disminuyendo de esta manera los niveles de AA y sus productos de

oxidación por Ciclooxygenasa (COX1 y COX2), Lipoxigenasa (5-LOX, 12-LOX y 15-LOX) y Citocromo p450 (CYP4A, CYP2C y CYP2J) (Figura 17). Todos los subproductos poseen actividad pro-inflamatoria, con la excepción de la prostaglandina E2 y las lipoxinas que resuelven la inflamación⁽⁴²⁾. Por otro lado AEA y sus subproductos de oxidación e isomerización pueden jugar un rol importante en la regulación de la inflamación ya que algunos de ellos han demostrado ser ligandos del receptor nuclear: Receptor Gamma Activado por Proliferación de Peroxisomas (PPARgamma)⁽⁴³⁾ (Figura 17 y 18), el cual tiene un papel en la regulación inmune y la resolución de la inflamación⁽⁴³⁾.

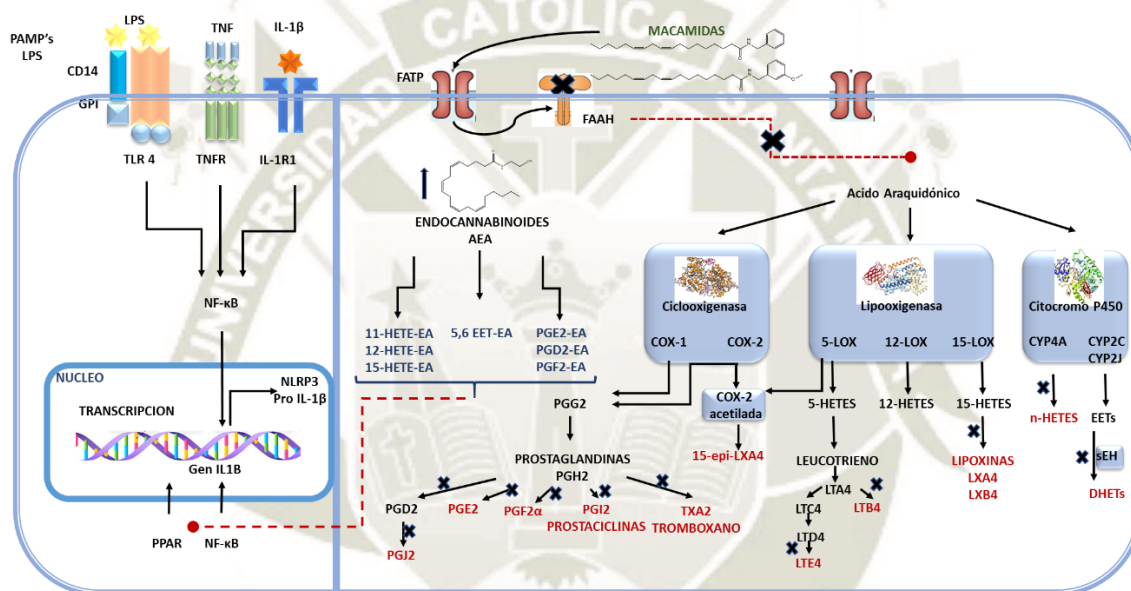


Figura 17. Inhibición de la formación de subproductos del ácido araquidónico y aumento de endocannabinoides, por inhibición de la enzima FAAH. Elaboración propia.

Las enzimas Ciclooxygenasa-2 (COX-2), Lipoxigenasa (LOX), así como varias Mono oxigenasas del citocromo P450, transforman AEA en diferentes subproductos (Figura 18). COX-2 convierte AEA en prostaglandina-etanolamidas (PGs-EA) (PGE2-EA, PGD2-EA, PGF2-EA), mientras que LOX la convierte en hidroxianandamidas o hidroxieicosatetraenoil-etanolamidas (HETEs-EA) (11-HETE-EA, 12-HETE-EA y 15-HETE-EA), y P450s en epoxieicosatrienoil-etanolamidas (EETs EA) (5,6 EET-EA) (Figura 18). De todos estos, 15-LOX (15- HETE-EA) ha demostrado tener un rol importante como ligando del receptor nuclear PPARgamma, y se ha demostrado que desempeña un papel en la regulación de procesos inflamatorios⁽⁴³⁾.

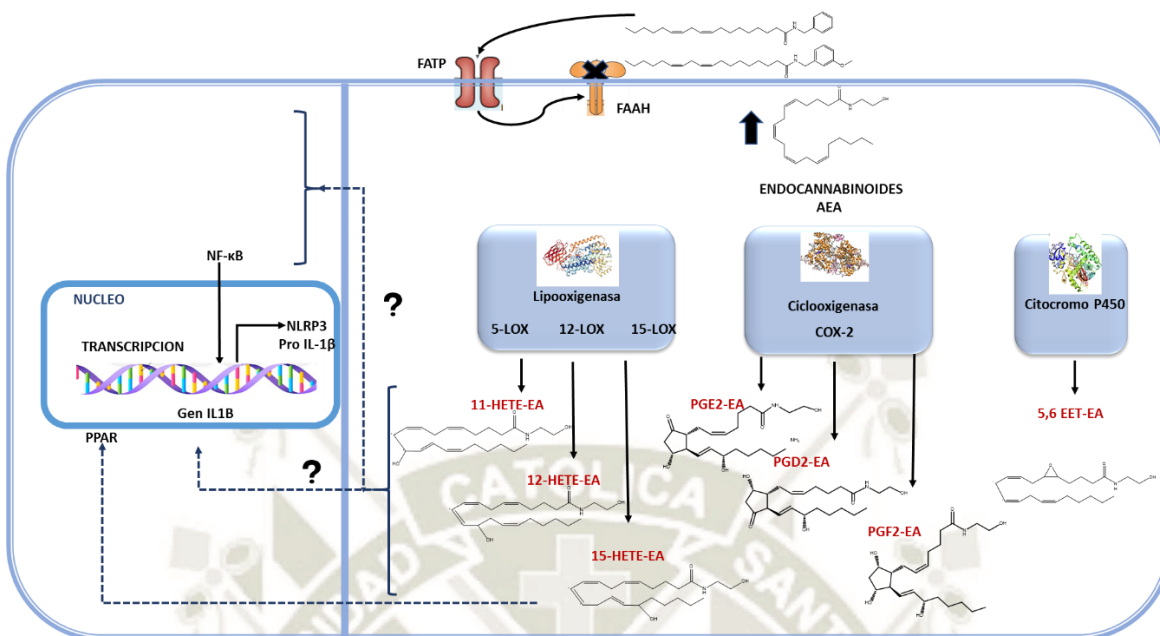


Figura 18. Sub productos del endocannabinoide Anandamida, PGF2-EA como ligando de PPAR. Elaboración propia.

6. Efectos de las macamidas sobre los niveles de mRNA de IL1B

Las células THP-1 después de ser diferenciadas con PMA (10 ng/mL, durante 48 horas) e inducidas a inflamación con LPS (30 ng/mL durante 4 horas), fueron expuestas y tratadas con las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD, durante 1 hora. Posteriormente fueron lisadas con trizol, para extraer el mRNA; a partir del cual se sintetizo cDNA para luego realizar una PCR cuantitativa en tiempo real qPCR y analizar la data a través del modelo matemático $\Delta\Delta CT$ que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia de pliegue relativo entre una muestra experimental y una de referencia (housekeeping gen ACTB).

6.1 Disminución de los niveles de mRNA de IL1B por acción de Las macamida 9,12-NBD y 9,12-NMD

Los niveles de mRNA del gen IL1B fueron detectados 24 horas después de tratar las células THP-1 con las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD, en concentraciones de 3 y 10 μM (Figura 19 y 20).

En la Figura 19 se aprecia una marcada disminución de los niveles de mRNA de IL1B de los grupos tratados con la Macamida 9,12-NBD, en comparación al grupo de células que solo fueron expuestas a LPS. Los valores son presentados como media \pm desviación estándar de diferentes experimentos (n=3) por duplicado, analizados con ANOVA UNIFACTORIAL, seguido por la prueba de Tukey. Así, se muestra que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en presencia de la Macamida 9,12-NBD, en las concentraciones de 3 y 10 $\mu\text{M/L}$, ya que estas disminuyen marcadamente los niveles del mRNA del gen IL1B. $P < 0.05$ fue considerado significativo y esta denotado como (*).

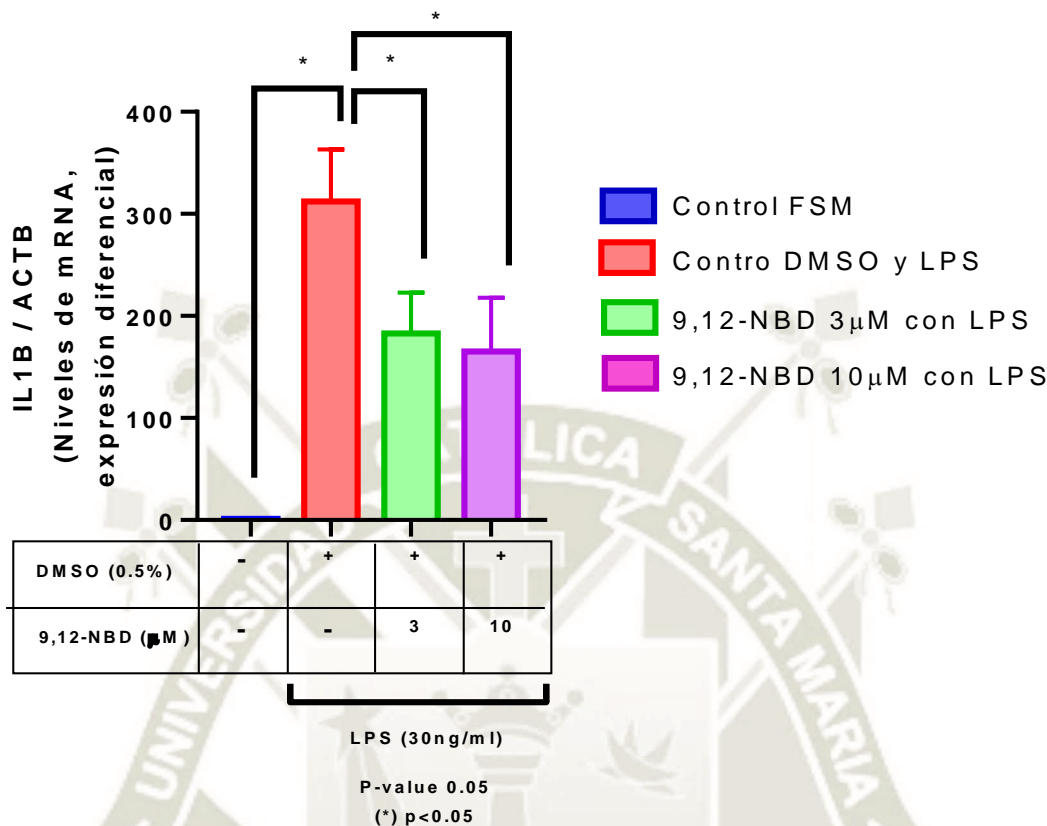


Figura 19. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS en presencia de Macamida 9,12-NBD frente a niveles del housekeeping ACTB.

En la Figura 20 se muestra los niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a un proceso inflamatorio con LPS y posteriormente tratadas con Macamida 9,12-NMD. Tales valores son 2.6 veces inferiores a los valores de mRNA presentes en el grupo que solo fue tratado con LPS. Los valores son presentados como media \pm desviación estándar de diferentes experimentos (n=3) por duplicado, analizados con ANOVA UNIFACTORIAL, seguido por la prueba de Tukey. Así, se muestra que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en presencia de la Macamida 9,12-NMD en las concentraciones de 3 y 10 $\mu\text{mol/L}$, ya que estas disminuyen marcadamente los niveles del mRNA del gen IL1B. $P < 0.05$ fue considerado significativo y esta denotado como (*).

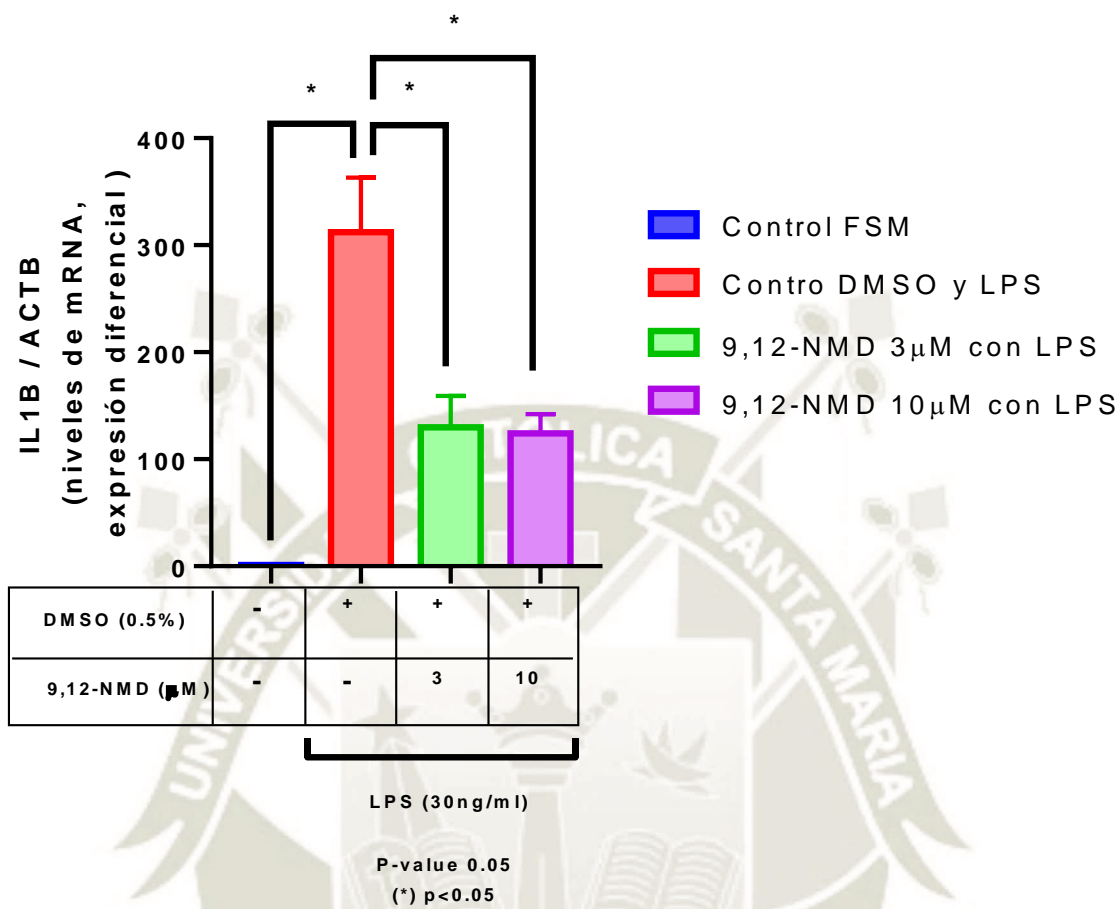


Figura 20. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS en presencia de Macamida 9,12-NMD. Frente a niveles del housekeeping ACTB

Los resultados sugieren que las macamidas o los productos de su hidrolisis o metabolismo podrían actuar a nivel de los factores de transcripción inducibles de la familia REL/NF-Kb, ya que el producto final de esta cascada de señalización es la expresión de varias citoquinas, dentro de ellas IL-1β, y quimiocinas, mediadas por la desfosforilación Ikbα, en presencia de IKKb, liberando el NF-kB (dímeros de RelA y p50). Los dímeros de NF-kB recién liberados se translocan al núcleo y se unen a una secuencia de consenso suelta (GGGRNWYYCC; R = purina, W = A o T, N = cualquiera, Y = pirimidina) en la cromatina abierta. NF-kB activa el gen IL1B, para la producción de mRNA de la citoquina pro-IL-1β; además de encargarse de la producción de los subdominios de los inflamomas (Figura 21).

Los subdominios de la familia Rel/NF- κ B poseen diferentes subunidades activadoras (RelA, RelB y c-Rel) y subunidades represivas (p50 y p52). El activador transcripcional c-Rel puede actuar como un represor selectivo de la expresión génica pro-inflamatoria. La ausencia de c-Rel aumenta la actividad transcripcional inducida por RelA⁽⁴⁴⁾. También se muestra que la supresión mediada por c-Rel depende de su capacidad de unión al ADN en los sitios de unión a RelA. Además, c-Rel⁽⁴⁴⁾ se une específicamente al correpresor HDAC1. Ya que los resultados muestran disminución del mRNA de IL1B, es posible que las macamidas puedan tener algún efecto sobre los activadores transcripcionales de la familia Rel en las células THP-1 diferenciadas.

Además, las macamidas al ser hidrolizadas podrían actuar como fuente de ácido linoleico, (ácido linoleico, bencilamida y metoxibencilamida). El ácido linoleico sufre oxidación hasta formar peróxidos y estos sirven como sustratos para enzimas isomerasas. Se conocen 8 subproductos⁽⁴⁵⁾ (Figura 22). Tanto el ácido linoleico como sus sub productos tienen roles importantes en la regulación de la inflamación ya que algunos de ellos actúan como ligandos naturales para el Receptor Nuclear: Receptor gamma Activado por Proliferación de Peroxisomas (PPARgamma) la cual está implicada en procesos regulatorios de la inflamación⁽⁴⁵⁾.

Finalmente, puede concluirse que las macamidas o los productos de su metabolismo están implicadas indirectamente con diferentes rutas moleculares que controlan los procesos inflamatorios, Por ello podrían ser considerados productos naturales (lípidos bioactivos) con múltiples dianas terapéuticas debido a la redundancia de su mecanismo de acción.

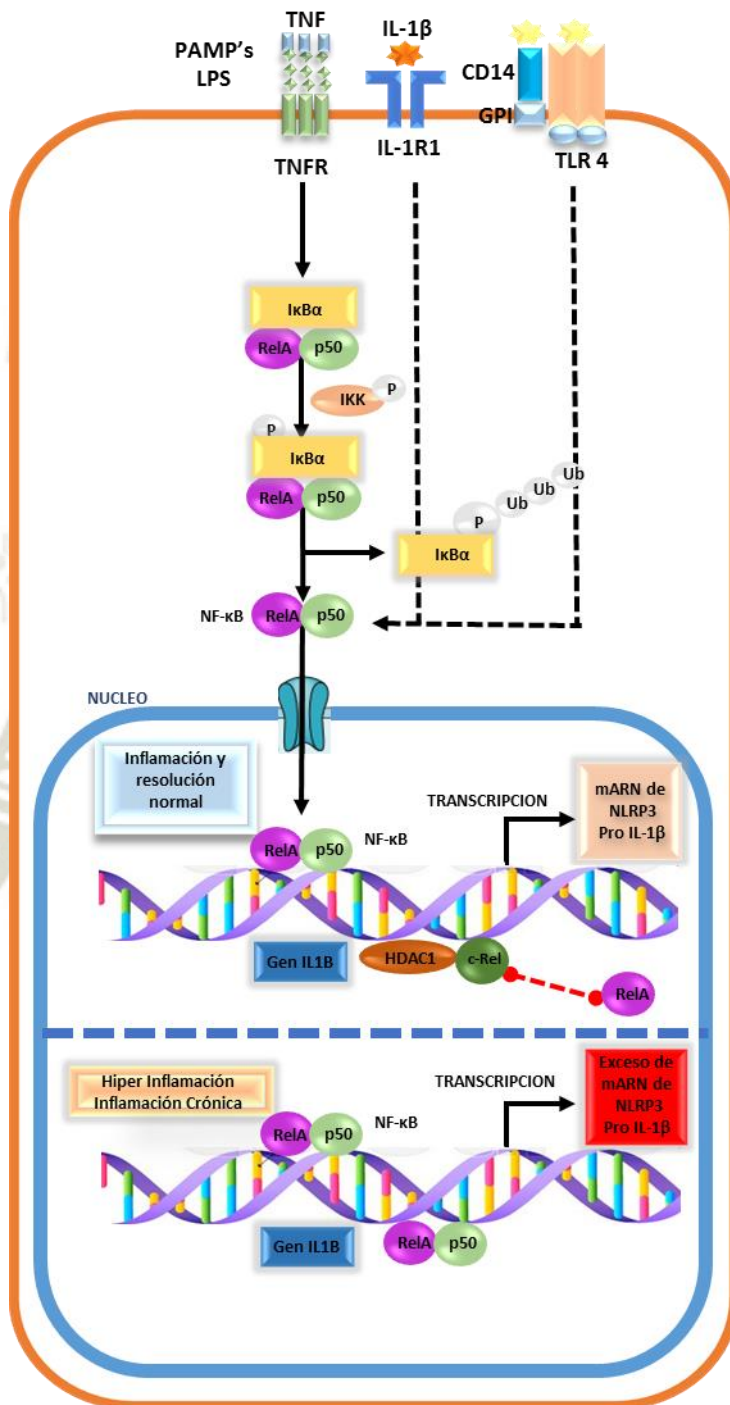


Figura 21. Señalización de NF-κB, que promueve la expresión de mARN de pro-IL-1β y los subdominios del inflamasoma NLRP3. Elaboración propia.

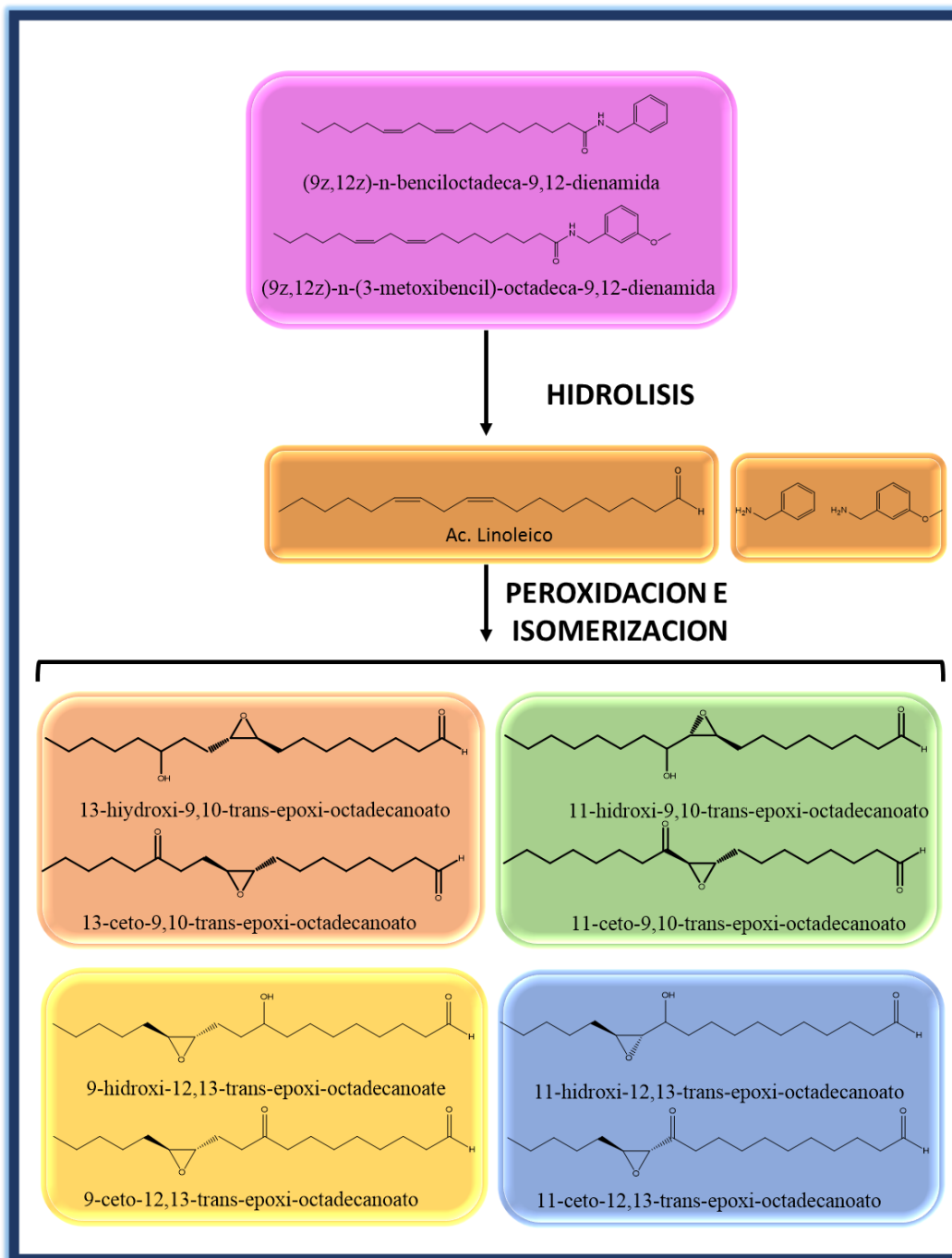


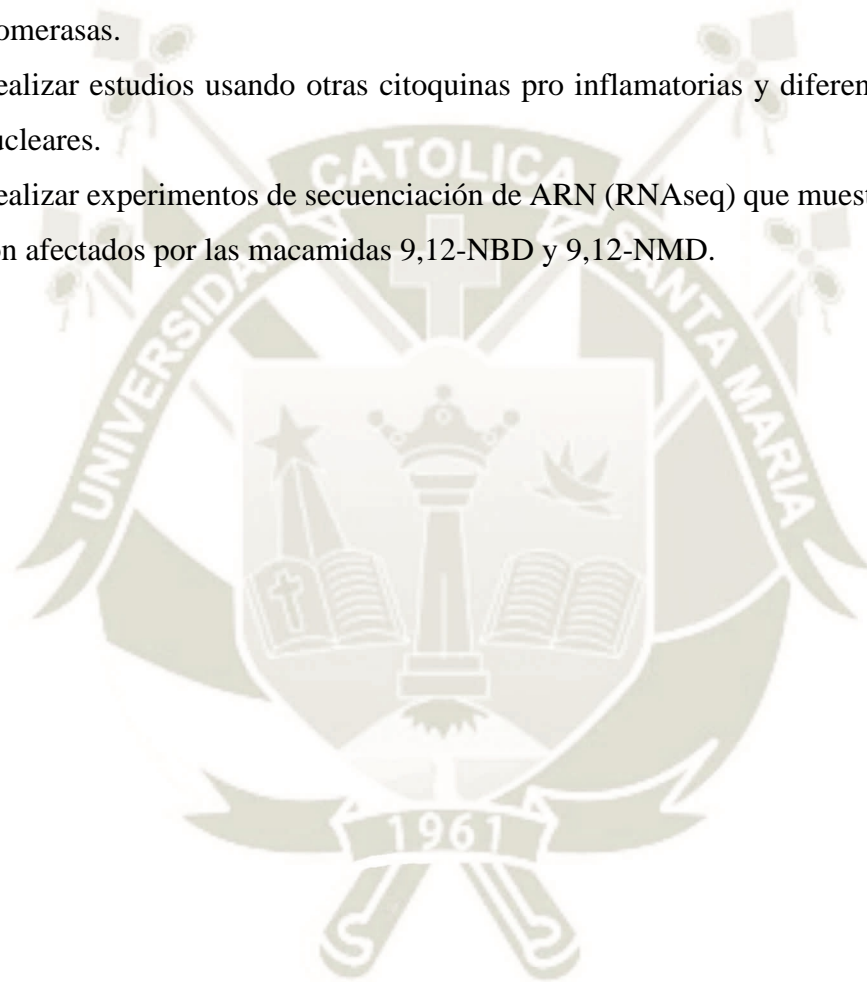
Figura 22. Posibles productos formados a partir de la hidrolisis de las macamidas.
Elaboración propia

CONCLUSIONES

1. Se demostró la acción antiinflamatoria de las macamidas o los productos de su metabolismo al reducir la expresión de citoquinas inflamatorias IL-1 β . También se probó que los efectos moduladores de las macamidas sobre la inflamación inducida por LPS dependían de los niveles de mRNA del gen IL1B.
2. Las macamidas podrían tener algún efecto regulador a nivel de la expresión génica, ya que estos mostraron una disminución de los niveles del mRNA del gen IL1B, el mismo que regula la expresión de la citoquina IL-1 β .
3. Las macamidas podrían inhibir las respuestas inflamatorias al regular la cascada de señalización del receptor TLR4 activada con LPS, o podría tener alguna implicancia a nivel de la expresión o activación del inflamasoma NLRP3, ya que tanto la expresión como activación de este son necesarios para la formación de la citoquina extracelular IL-1 β . Estos primeros resultados sugieren que las macamidas o los productos de su metabolismo juegan un papel esencial en la regulación inflamatoria a nivel de receptores nucleares. Además de poder ejercer algún efecto regulador sobre el receptor nuclear NF-kB, ya que este regula la transcripción del gen IL1B, el mismo que codifica la expresión de la citoquina citosólica pro inflamatoria pro-IL-1 β .

RECOMENDACIONES

1. Realizar experimentos futuros para dilucidar cuales pueden ser los productos del metabolismo de las macamidas.
2. Identificar si las macamidas pueden ser sustratos de enzimas oxidadas, peroxidasas o isomerasas.
3. Realizar estudios usando otras citoquinas pro inflamatorias y diferentes receptores nucleares.
4. Realizar experimentos de secuenciación de ARN (RNAseq) que muestren que genes son afectados por las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. McCollom MM, Villinski JR, McPhail KL, Craker LE, Gafner S. Analysis of Macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2005;16(6):463-9.
2. Chain FE, Grau A, Martins JC, Catalán CA. Macamides from wild 'Maca', *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae). *Phytochemistry letters*. 2014;8:145-8.
3. Cui B, Zheng BL, He K, Zheng QY. Imidazole alkaloids from *lepidium meyenii*. *Journal of natural products*. 2003;66(8):1101-3.
4. Clement AB, Hawkins EG, Lichtman AH, Cravatt BF. Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(9):3916-23.
5. Walker JM, Krey JF, Chu CJ, Huang SM. Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. *Chemistry and physics of lipids*. 2002;121(1-2):159-72.
6. Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20(1):197-216.
7. Gonzales GF, Ruiz A, Gonzales C, Villegas L, Cordova A. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian J Androl*. 2001;3(3):231-3.
8. Alasmari M, Böhlke M, Kelley C, Maher T, Pino-Figueroa A. Inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by Macamides. *Molecular neurobiology*. 2019;56(3):1770-81.
9. Carrero JJ, Yilmaz MI, Lindholm B, Stenvinkel P. Cytokine dysregulation in chronic kidney disease: how can we treat it? *Blood purification*. 2008;26(3):291-9.
10. Justinova Z, Panlilio LV, Moreno-Sanz G, Redhi GH, Auber A, Secci ME, et al. Effects of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitors in Non-Human Primate Models of Nicotine Reward and Relapse. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2015;40(9):2185-97.
11. Yang Q, Jin W, Lv X, Dai P, Ao Y, Wu M, et al. Effects of Macamides on endurance capacity and anti-fatigue property in prolonged swimming mice. *Pharmaceutical biology*. 2016;54(5):827-34.
12. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2013;21(17):5188-97.
13. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
14. Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *The Journal of clinical psychiatry*. 2009;70(8):1078-90.
15. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *The European respiratory journal*. 2006;28(1):219-42.
16. Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S, Murayama Y, Soskolne AW, Shapira L. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. *Infection and immunity*. 1999;67(11):5573-8.
17. Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chemical reviews*. 2008;108(5):1687-707.
18. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004;430(6996):213-8.
19. Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2515-32.
20. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature reviews Immunology*. 2019;19(8):477-89.

21. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(13).
22. Goldin J, Zhu W, Sayre JW. A review of the statistical analysis used in papers published in *Clinical Radiology and British Journal of Radiology*. *Clin Radiol*. 1996;51(1):47-50.
23. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(11):2563-82.
24. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992;356(6372):768-74.
25. Brough D, Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 5):772-81.
26. Au - Maeß MB, Au - Wittig B, Au - Lorkowski S. Highly Efficient Transfection of Human THP-1 Macrophages by Nucleofection. *JoVE*. 2014(91):e51960.
27. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of immunological methods*. 2016;430:64-70.
28. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood*. 2000;95(12):3823-31.
29. Tucureanu MM, Rebleanu D, Constantinescu CA, Deleanu M, Voicu G, Butoi E, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of G(i)-protein inhibitor. *International journal of nanomedicine*. 2018;13:63-76.
30. Yücel G, Zhao Z, El-Batrawy I, Lan H, Lang S, Li X, et al. Lipopolysaccharides induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Scientific reports*. 2017;7(1):2935.
31. Borzęcka K, Plóciennikowska A, Björkelund H, Sobota A, Kwiatkowska K. CD14 mediates binding of high doses of LPS but is dispensable for TNF- α production. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:824919.
32. Solomon KR, Kurt-Jones EA, Saladino RA, Stack AM, Dunn IF, Ferretti M, et al. Heterotrimeric G proteins physically associated with the lipopolysaccharide receptor CD14 modulate both in vivo and in vitro responses to lipopolysaccharide. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(11):2019-27.
33. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull World Health Organ*. 1976;54(2):129-39.
34. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
35. Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*. 2017;169(7):1187-200.
36. Rutledge RG, Stewart D. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2008;9:96-.
37. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2007;56(1):45-50.
38. Richter E, Ventz K, Harms M, Mostertz J, Hochgräfe F. Induction of Macrophage Function in Human THP-1 Cells Is Associated with Rewiring of MAPK Signaling and Activation of MAP3K7 (TAK1) Protein Kinase. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:21.
39. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G α dependent PI-3kinase signalling. *Journal of inflammation (London, England)*. 2012;9(1):1.
40. Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013;45(12):e66-e.

41. Turcotte C, Chouinard F, Lefebvre JS, Flamand N. Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites. *Journal of leukocyte biology*. 2015;97(6):1049-70.
42. Maccarrone M. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol Neurosci*. 29 de mayo de 2017;10:166-166.
43. Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab TEM*. julio de 2012;23(7):351-63.
44. PubMed entry [Internet]. [citado 13 de julio de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32062419>
45. Ramsden CE, Domenichiello AF, Yuan Z-X, Sapio MR, Keyes GS, Mishra SK, et al. A systems approach for discovering linoleic acid derivatives that potentially mediate pain and itch. *Sci Signal*. 22 de agosto de 2017;10(493):eaal5241.



ANEXOS

Tablas anexadas referidas a data procesada

Tabla 1. Data procesada. Aumento en los niveles de mRNA del gen IL1B, frente el housekeeping (gen ACTB). Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).

DMSO 0.5%	DMSO 0.5%, LPS 10ng/mL	DMSO 0.5%, LPS 30ng/mL	DMSO 0.5%, LPS 100ng/mL
0.34014	21.94395	61.52039	199.6863
0.315082	14.18514	51.26217	225.4121
0.385938	12.42074	48.4142	232.4755
1.988355	40.5438	20.22513	86.52567
4.144535	27.88781	18.3757	104.0951
2.934044	32.51357	22.21345	53.84184

Tabla 2. Data procesada. Efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NBD sobre la viabilidad celular de las células THP-1. Valores en porcentaje.

Control normalizado (%)	DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NBD 3 μ M, y LPS 30ng/mL	9,12-NBD 10 μ M, y LPS 30ng/mL	9,12-NBD 3 μ M	9,12-NBD 10 μ M
100	94.15047	93.3808	91.53358	105.742	109.9049
100	61.76061	87.25354	81.67696	119.287	145.0031
100	79.46487	92.69089	92.51686	141.3091	165.1636
100	76.106	87.60386	112.9351	102.6915	123.115
100	83.93723	117.1706	121.9709	80.82789	106.9717
100	91.87302	111.5132	120.8254	47.92899	73.17554
100	71.07291	92.57064	114.3845	64.48829	97.04069
100	71.12922	42.25844	57.15949	113.9697	89.75553
100	58.85714	41.48571	67.08571	96.25117	103.7488
100	78.58099	64.65863	88.21954	95.36232	109.2754
100	89.58032	86.10709	72.21418	88.73239	95.66631
100	60.76475	75.9039736	48.79468	68.59666	80.37291

Tabla 3. Data procesada. Efecto de LPS y de la Macamida 9,12-NMD sobre la viabilidad celular de las células THP-1. Valores en porcentaje.

Control normalizado (%)	DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NMD 3μM, y LPS 30ng/mL	9,12-NMD 10μM, y LPS 30ng/mL	9,12-NMD 3μM	9,12-NMD 10μM
100	94.15047	109.6979	122.3206	112.4888	108.7565
100	61.76061	103.3459	118.9604	161.158	99.50546
100	79.46487	95.47531	109.5715	189.6673	125.8194
100	76.106	100	129.6429	124.6982	111.7158
100	83.93723	88.7376	121.2324	108.7146	101.7429
100	91.87302	110.6667	111.6825	81.06509	90.53254
100	71.07291	97.31278	114.8587	100.9864	73.36621
100	71.12922	58.0908	90.68685	116.7637	107.4505
100	58.85714	62.51429	71.65714	92.50234	152.4836
100	78.58099	85.00669	64.65863	110.0483	127.0531
100	89.58032	127.7858	79.16064	102.6002	101.7335
100	60.76475	56.77473	47.46467	110.2061	66.24141

Tabla 4. Data procesada: Inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1β mediante tratamiento con las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD.

DMSO 0.5%	DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NBD 3μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NBD 10μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NMD 3μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NMD 10μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL
90.45021 pg/mL	2744.501 pg/mL	637.0914 pg/mL	821.9837 pg/mL	788.2026 pg/mL	890.485 pg/mL
62.63959 pg/mL	2735.601 pg/mL	570.6047 pg/mL	666.0811 pg/mL	614.7466 pg/mL	744.7708 pg/mL
72.30653 pg/mL	2398.015 pg/mL	487.6372 pg/mL	734.8273 pg/mL	1121.206 pg/mL	662.8457 pg/mL
37.40426 pg/mL	2282.058 pg/mL	583.1409 pg/mL	791.5663 pg/mL	1187.144 pg/mL	794.9333 pg/mL
150.5741 pg/mL	1843.934 pg/mL	959.5963 pg/mL	788.5714 pg/mL	734.151 pg/mL	507.6095 pg/mL
176.4647 pg/mL	1718.171 pg/mL	895.8134 pg/mL	825.6405 pg/mL	737.6784 pg/mL	568.6719 pg/mL
192.899 pg/mL	1685.277 pg/mL	795.7217 pg/mL	656.1994 pg/mL	774.3064 pg/mL	629.8164 pg/mL
218.0344 pg/mL	1825.869 pg/mL	725.9327 pg/mL	728.2791 pg/mL	661.9609 pg/mL	558.5938 pg/mL

86.31789 pg/mL	1622.411 pg/mL	1030.474 pg/mL	973.8712 pg/mL	835.303 pg/mL	699.3497 pg/mL
80.42722 pg/mL	1677.84 pg/mL	1069.312 pg/mL	961.4712 pg/mL	871.8092 pg/mL	703.8384 pg/mL
85.33732 pg/mL	1647.537 pg/mL	1080.775 pg/mL	939.3117 pg/mL	857.5707 pg/mL	645.3876 pg/mL
80.42722 pg/mL	1732.328 pg/mL	1072.84 pg/mL	887.8159 pg/mL	824.6058 pg/mL	734.3306 pg/mL
146.369 pg/mL	1502.617 pg/mL	893.1487 pg/mL	909.1393 pg/mL	758.507 pg/mL	537.7809 pg/mL
132.9186 pg/mL	1538.248 pg/mL	810.3336 pg/mL	826.389 pg/mL	709.2234 pg/mL	556.8315 pg/mL

Tabla 5. Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB, Control. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).

IL-1B Ct	dCT	ddCT	2 ^(-ddCT)	ACTB Ct
31.23815536	10.312	-0.01	1.00	20.92586136
31.42760658	10.511	0.19	0.88	20.91688919
31.35798073	10.395	0.08	0.95	20.96322823
31.37824059	10.445	0.13	0.92	20.93275833
31.95375824	10.091	-0.23	1.17	21.86227417
32.14029694	10.155	-0.16	1.12	21.98514175
	10.318	0.00	1.00	
		MEAN	1.01	21.33205833
		SD	0.12	0.512442191

Tabla 6: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB, Control LPS 30 ng/mL. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).

IL-1B Ct	dCT	ddCT	2 ^(-ddCT)	ACTB Ct
24.7044754	3.084	-7.23	150.55	21.62025261
24.37405205	2.823	-7.50	180.40	21.55078506
24.64097977	2.994	-7.32	160.28	21.64712143
24.70576668	3.123	-7.20	146.56	21.58278847
24.57810593	2.607	-7.71	209.64	21.97157097
24.91637802	2.935	-7.38	166.91	21.98099327
	2.928	-7.39	167.80	
		MEAN	169.06	21.7255853
		SD	23.26	0.196946588

Tabla 7: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Control de LPS 30 ng/mL con DMSO 0.5%. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta Ct$).

IL-1B Ct	dCT	ddCT	2 ^(-ddCT)	ACTB Ct
23.65332413	2.262	-8.06	266.26	21.3916893
23.61936951	2.084	-8.23	301.04	21.53488731
24.19210243	1.880	-8.44	346.96	22.31241035
24.94964218	2.321	-8.00	255.61	22.62910652
24.70248985	1.706	-8.61	391.47	22.99692917
24.84449577	2.033	-8.29	311.95	22.81135941
	2.048	-8.27	308.86	
		MEAN	312.21	22.27939701
		SD	50.85	0.672836188

Tabla 8: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NBD 3 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta$ Ct).

IL-1B Ct	dCT	ddCT	2 ^(-ddCT)	ACTB Ct
24.68572235	2.748	-7.57	190.08	21.93783569
24.48996162	2.916	-7.40	169.14	21.57369995
23.26018333	2.723	-7.60	193.44	20.5375843
24.10481834	3.542	-6.78	109.65	20.5632267
24.08842278	2.557	-7.76	216.93	21.53117943
23.93618965	2.554	-7.76	217.49	21.38266563
	2.840	-7.48	178.34	
		MEAN	182.79	21.25436529
		SD	40.18	0.575089731

Tabla 9: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NBD 10 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta$ Ct).

IL-1B Ct	dCT	ddCT	2 ^(-ddCT)	ACTB Ct
24.26846313	3.156	-7.16	143.24	21.11248016
24.3166256	3.284	-7.03	131.09	21.03276062
25.11278534	3.210	-7.11	137.99	21.90286636
25.10220718	3.230	-7.09	136.06	21.87200165
23.57304573	2.256	-8.06	267.25	21.31679726
24.02882957	2.857	-7.46	176.23	21.17184258
	2.999	-7.32	159.72	
		MEAN	165.31	21.4014581
		SD	52.48	0.387855206

Tabla 10: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NMD 3 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta$ Ct).

IL-1B Ct	dCT	ddCT	2 ^{^(-ddCT)}	ACTB Ct
24.71357346	3.536	-6.78	110.09	21.17779732
24.83473396	3.520	-6.80	111.31	21.31484604
25.27678108	3.432	-6.89	118.31	21.84490967
24.94912529	3.551	-6.77	108.91	21.39785385
24.57097626	2.822	-7.50	180.61	21.74938202
24.85684204	3.091	-7.23	149.81	21.76548767
	3.325	-6.99	127.38	
		MEAN	129.84	21.54171276
		SD	29.26	0.27918755

Tabla 11: Data procesada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB. Tratamiento con Macamida 9,12-NMD 10 μ M. Valores obtenidos del análisis por ($\Delta\Delta$ Ct).

IL-1B Ct	dCT	ddCT	2 ^{^(-ddCT)}	ACTB Ct
24.54695511	3.598	-6.72	105.47	20.94927025
24.37676811	3.371	-6.95	123.43	21.00595093
24.61246109	3.043	-7.28	154.89	21.56927872
24.49985695	3.399	-6.92	121.00	21.10036659
25.19260597	3.578	-6.74	106.90	21.61442375
25.22022629	3.269	-7.05	132.47	21.95144463
	3.376	-6.94	122.95	
		MEAN	124.03	21.36512248
		SD	18.28	0.404879615

Tabla 12: Data procesada y acumulada. Niveles de mRNA de IL1B en células THP-1 diferenciadas e inducidas a inflamación con LPS, en comparación del housekeeping ACTB en presencia de las macamidas 9,12-NBD y 9,12-NMD.

DMSO 0.5%	DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NBD 3μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NBD 10μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NMD 3μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL	9,12-NMD 10μM, DMSO 0.5% y LPS 30ng/mL
1.004182	266.2577	190.0753	143.244	110.0899	105.4656
0.875147	301.0443	169.1375	131.0932	111.309	123.4255
0.948396	346.9592	193.4364	137.9876	118.3112	154.8934
0.915627	255.6061	109.647	136.0609	108.9138	120.9967
1.170261	391.4688	216.9278	267.2536	180.6083	106.901
1.119736	311.9515	217.4877	176.2314	149.8069	132.471

