



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

**Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
Departamento de Farmacia
Laboratorio de Neuroquímica**

T E S I S

**Determinación de la actividad antiinflamatoria del derivado
colestánico BSS-4 en un modelo de inflamación aguda**

Para obtener el título de
LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta

pQFB Marisol Casimiro Rosas

Directoras de Tesis

Dra. María Isabel Martínez García

Dra. Liliana Martínez Mendieta

Diciembre 2021

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por haber sido parte de mi formación académica y profesional, además de contribuir a mi crecimiento personal a través de todas las personas que ahí conocí.



A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado.



La presente tesis fue apoyada parcialmente por la Vicerrectoría de Investigación y estudios de posgrado BUAP a través del programa “Haciendo Ciencia en la BUAP, Otoño IX”

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A las directoras:

D.C. María Isabel Martínez García

D.C. Liliana Martínez Mendieta

Por su absoluto apoyo durante el desarrollo de este trabajo, las observaciones, los consejos y las oportunidades que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio de Neuroquímica.

A la comisión revisora:

D.C. Victorino Alatraste Bueno

M.C. Félix Luna Morales

D.C. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Por las aportaciones y críticas a este trabajo desde su inicio, cada observación contribuyó a la mejora de este.

Al director del bioterio Claude Bernard de la BUAP:

M.V.Z Carlos Escamilla Weinmann

Por haber proporcionado los animales de experimentación para la realización de esta tesis, así como la capacitación para el manejo de estos.

ÍNDICE

RESUMEN

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Respuesta inflamatoria.....	1
1.2 Mecanismos moleculares de la inflamación	2
1.3 Citocinas	3
1.4 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)	6
1.5 Interleucina 1 beta (IL-1 β).....	8
1.6 Fármacos antiinflamatorios	10
1.6.1 Antiinflamatorios esteroideos.....	10
1.6.2 Mecanismo de Acción	12
1.6.3 La dexametasona	15
1.7 La Diosgenina.....	16
1.8 El derivado Colestánico BSS-4	22
1.9 Modelos de inflamación	26
1.10 Modelo de inflamación de la pata inducido por carragenina en rata	26
2 JUSTIFICACIÓN	28
3 HIPOTESIS	29
4 OBJETIVO GENERAL	29
4.1 Objetivos generales.....	29
5 DIAGRAMA DE TRABAJO	30
6 METODOLOGÍA	31
6.1 Animales	31
6.2 Preparación de soluciones.....	31
6.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria	32
6.3.1 Pletismometro	32
6.3.2 Inducción de la inflamación plantar	33
6.3.3 Obtención de tejido plantar.....	35
6.4 Inmunohistoquímica HRP/DAB.....	35
6.5 Tinción de hematoxilina-eosina.....	37
6.6 Análisis estadístico de los datos	39

7 RESULTADOS	40
7.1 Efecto antiinflamatorio del derivado colestánico BSS-4 en el modelo de inflamación de la pata con carragenina	40
7.2 Efecto del derivado colestánico BSS-4 sobre la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1-beta (IL-1 β) en el tejido plantar	45
7.3 Estudio histopatológico de tejido inflamado	50
8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
9 CONCLUSIONES	61
10 REFERENCIAS	62
11 OTROS	69

RESUMEN

La inflamación es considerada un importante factor de riesgo en diversas patologías que afectan al ser humano. La inflamación aguda esta autorregulada y es necesaria para defender al sistema frente a organismos patógenos y así preservar la homeostasis en los tejidos, sin embargo, un proceso inflamatorio crónico predispone a una progresión del daño, caracterizado por una infiltración de células inflamatorias, una producción excesiva de citocinas y la desregulación de rutas de señalización celular. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular secretadas por numerosos tipos de células, tienen funciones muy importantes en la regulación del sistema inmunológico y en el proceso de inflamación. La desregulación de la secreción de citocinas y sus consecuentes redes de señalización son un componente importante en la patogenia de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Por otra parte, los fármacos antiinflamatorios inducen sus efectos terapéuticos al atenuar los efectos nocivos de la respuesta inflamatoria y uno de los más importantes son los glucocorticoides (GC), un grupo de fármacos estructural y farmacológicamente similares a los corticoides naturales, no obstante, las modificaciones estructurales en los GC sintéticos mejoraron su potencia y extendieron la duración del efecto, proporcionando fármacos con diferentes afinidades y tiempos de unión al receptor de glucocorticoides. A pesar de los grandes beneficios terapéuticos, el uso de los GC se asocia con efectos secundarios graves, por lo que se buscan nuevas moléculas con efecto terapéutico y menos efectos adversos. La Diosgenina, una sapogenina esteroidal y principal compuesto precursor en la fabricación de esteroides sintéticos, ha demostrado tener efectos preventivos/terapéuticos en diversas afecciones médicas. Además, se ha demostrado que la síntesis de análogos estructurales, generan derivados colestánicos con mayor actividad. El BSS-4 es un derivado colestánico de la Diosgenina, ambas estructuras químicas son similares a las de los antiinflamatorios esteroideos y la relación estructura química-actividad biológica, abre la posibilidad de que el BSS-4 tenga efectos en el proceso inflamatorio. La evaluación de este derivado de la diosgenina en un modelo experimental de inflamación aguda demostró que dosis de 0.5 y 1 mg/kg ejercen un efecto antiinflamatorio además de disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias, el TNF-alfa y la Interleucina 1-beta consideradas como importantes dianas terapéuticas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Respuesta inflamatoria

La inflamación es una respuesta adaptativa que garantiza la supervivencia de los organismos ante una variedad de estímulos y condiciones nocivas, como infección y daño tisular (**Kumar y cols., 2013**). El tipo de vía inducida en determinadas condiciones dependerá de la naturaleza del desencadenante inflamatorio, el tipo de células y mediadores moleculares implicados, los cuales serán determinados por diferentes mecanismos de inducción, regulación y resolución; por lo que, la inflamación puede presentarse en diversas formas que pueden ser clasificadas según su duración, en aguda o crónica y de acuerdo con el lugar de lesión, en local o sistémica (**Okin y Medzhitov, 2012**).

La inflamación aguda es un proceso de corta duración (minutos a horas). Tiene tres componentes principales: **1)** la dilatación de vasos pequeños, **2)** aumento en el flujo sanguíneo y **3)** aumento de la permeabilidad capilar, permitiendo así, que las proteínas plasmáticas y los leucocitos de la microcirculación migren hacia el sitio de lesión. Esta respuesta es de naturaleza local, es decir, solo está presente en el sitio afectado, cesa cuando se ha eliminado el daño y finalmente se inicia la reparación del tejido, pero si la respuesta inicial no logra eliminar el estímulo, la reacción progresa a un tipo prolongado (semanas, meses o años) conocido como inflamación crónica, en la que coexisten la inflamación, la lesión tisular y los intentos de reparación, en diversas combinaciones (*Figura 1*). Como se ha mencionado anteriormente, puede seguir a una inflamación aguda o bien puede comenzar insidiosamente, como un proceso latente, a veces progresivo, sin ningún tipo de señales de una reacción aguda anterior y se asocia con una mayor destrucción del tejido, la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos y la fibrosis.

A pesar de esta complejidad, todas las respuestas inflamatorias se pueden dividir en cuatro componentes comunes de la vía inflamatoria: inductores, sensores, mediadores y efectores (**Medzhitov, 2008**). Los inductores son las señales que inician la respuesta inflamatoria, activan sensores especializados, que provocan la producción de conjuntos específicos de mediadores. Los mediadores, a su vez, alteran los estados funcionales de los

tejidos y órganos (que son los efectores de la inflamación) de una manera que les permite adaptarse a las condiciones inducidas por la inflamación.

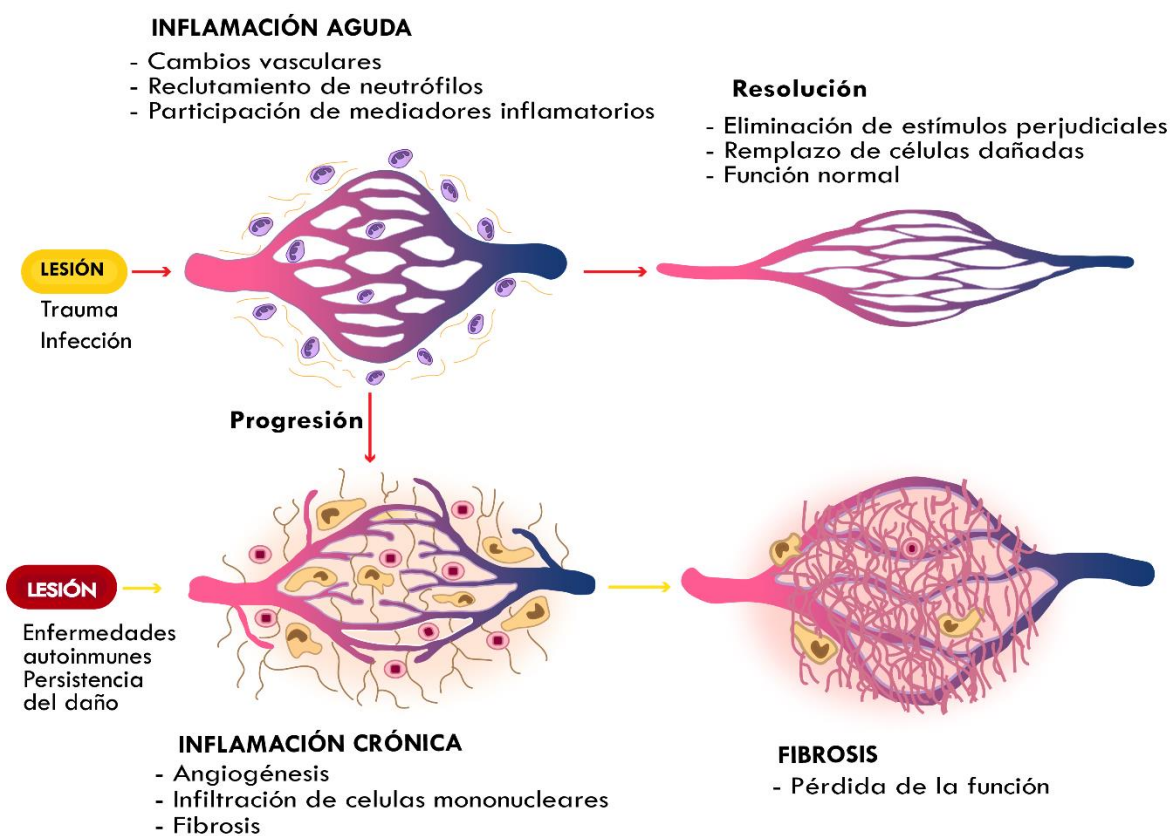


Figura 1. Características de la inflamación aguda y crónica. La inflamación crónica se asocia con una mayor destrucción del tejido, la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos y la fibrosis. Tomado y modificado de Kumar y cols., 2013.

1.2 Mecanismos moleculares de la inflamación

La inflamación aguda desencadenada por infección o daño tisular involucra la liberación coordinada de componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) al sitio de infección o daño.

Esta respuesta resulta en una cascada estrictamente regulada de procesos inmunológicos y fisiológicos (*Figura 2*). El primer paso de la cascada involucra el reconocimiento de la infección o daño, logrado por la detección de las moléculas de patrón molecular asociadas a patógenos (PAMPs) que se derivan de microorganismos y se reconocen por las células que llevan el receptor de reconocimiento de patrón (PRR) del

sistema inmune, así como por muchas células epiteliales. Por el contrario, las moléculas de patrón molecular asociadas a daños (DAMPs) son derivadas de células huésped e inician y perpetúan la inmunidad en respuesta a traumas y daño tisular (**Tang y cols., 2012**).

Las señales de daño son reconocidas por receptores del sistema inmune innato, como los receptores tipo Toll (TLRs) y NOD (NLRs) (**Barton, 2008**). Tras el reconocimiento de los ligandos, los TLRs activan vías de señalización comunes que culminaran en la activación del factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Este factor de transcripción se encuentra en prácticamente todos los tipos de células en una forma inactiva unida a su inhibidor, I κ B. Al recibir una señal apropiada, se libera NF- κ B de I κ B y se transloca hacia el núcleo donde puede regular la transcripción de genes específicos. El factor NF- κ B no requiere una nueva síntesis de proteínas, permitiendo así, que la señal se transmita rápidamente (**Ghosh y cols., 1998**).

Las diversas vías que desembocan en la transcripción y la traducción de genes que conducen a la expresión inducible de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), entre otros; así, junto con las quimiocinas (atrayentes) y diversas moléculas estimuladoras, estos mediadores aceleran rápidamente la progresión de la inflamación a través de la modificación de la permeabilidad endotelial vascular, así como el reclutamiento de neutrófilos y filtración de plasma (que contiene anticuerpos y factores del complemento) hacia el tejido afectado (**Medzhitov, 2010**). Los neutrófilos reclutados de la circulación, los macrófagos de los tejidos y los mastocitos son los encargados de reparar el daño.

Los neutrófilos también conocidos como leucocitos polimorfonucleares (PMN) crean un ambiente citotóxico al liberar sustancias químicas nocivas de los gránulos citoplasmáticos que incluyen especies altamente reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) y varias proteinasas (**Ashley y cols., 2012**), pero además responden a múltiples señales y responden produciendo varias citocinas y otros factores inflamatorios que influyen y regulan la inflamación (**Nauseef y Borregaard, 2014**). El efecto neto de estas interacciones culmina en los signos esenciales típicos de la inflamación local: calor, hinchazón, enrojecimiento y dolor.

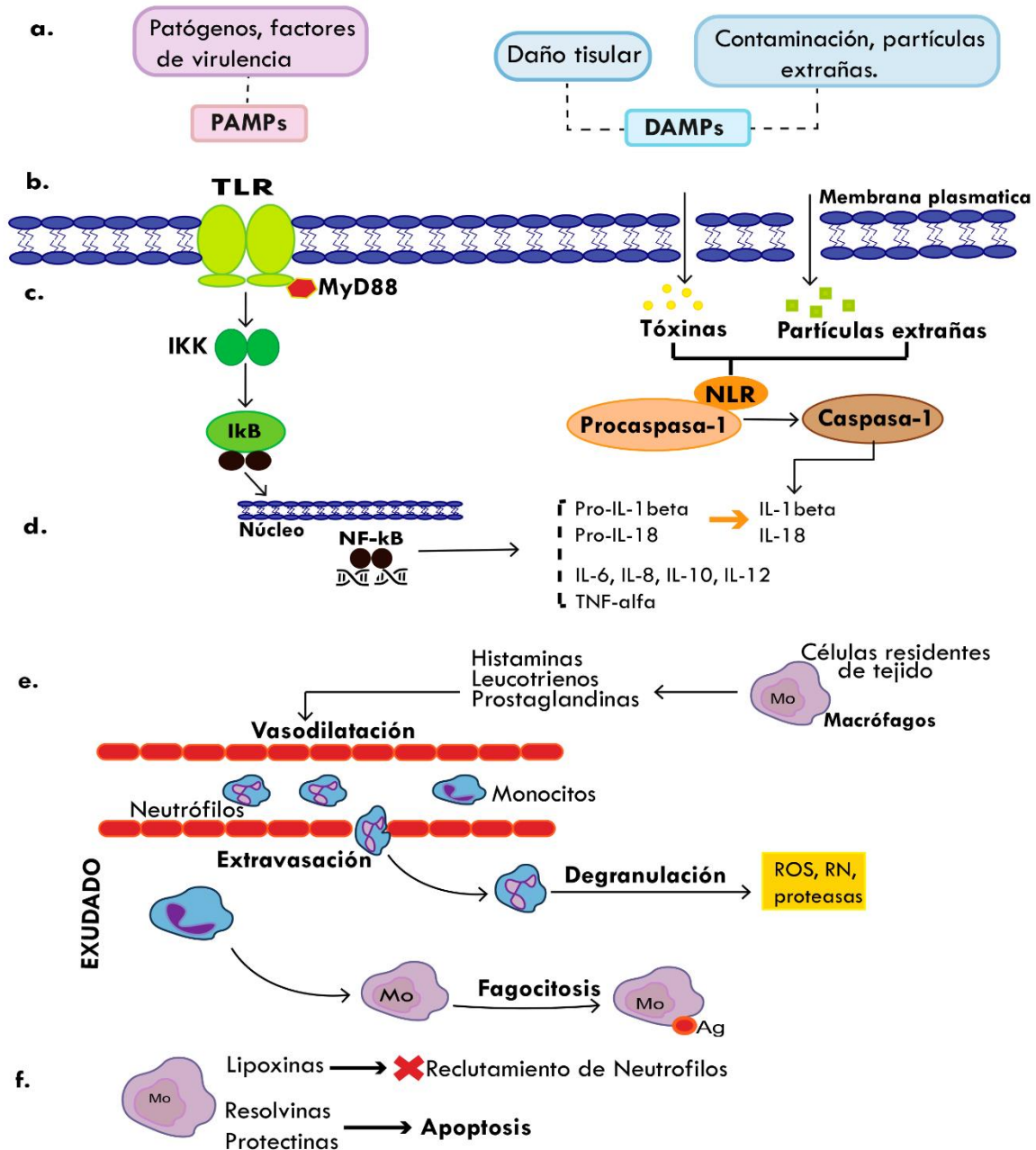


Figura 2. Cascada de la inflamación. **a.** Inductores de la inflamación. **b.** Reconocimiento a través de los TLR transmembrana y NLR intracelulares que unen a PAMP o DAMP, respectivamente. **c.** Transducción de la señal, los TLR activan una ruta dependiente de MyD88 que implica la fosforilación de la proteína inhibitoria IκB por IKK. NF-κB se libera de IκB y se transloca al núcleo donde la transcripción se regula positivamente mediante la unión a genes inflamatorios. A través de los NLR se activa la caspasa-1 para convertir las citocinas en formas activas (IL-1β e IL-18), que provocan inflamación después de ser liberadas. **d. e.** Las citocinas y quimiocinas proinflamatorias promueven las funciones efectoras de la inflamación. **f.** La resolución de la inflamación ocurre cuando los neutrófilos promueven el cambio de los leucotrienos producidos por los macrófagos y otras células a las lipoxinas, lo que inicia la terminación de la inflamación. Tomado y modificado de Ashley y cols., 2012.

la función fisiológica. Los objetivos principales de resolución implican la limitación o el cese de la extravasación de células sanguíneas, la regulación de las quimiocinas y las citocinas, la desactivación de las vías de señalización asociadas con la supervivencia de los leucocitos, la inducción de apoptosis leucocitaria y su posterior eliminación por macrófagos (**Sugimoto y cols., 2016**).

1.3 Citocinas

Las citocinas controlan la supervivencia, la muerte y la diferenciación celular, que son procesos integrales necesarios para el desarrollo y la homeostasis de los tejidos, por lo que juegan un rol importante en los procesos inflamatorios; se trata de proteínas solubles no estructurales de bajo peso molecular que tienen una influencia reguladora compleja sobre la inflamación (aguda y crónica) y la inmunidad. Son secretadas y liberadas por muchas poblaciones celulares, siendo los productores predominantes las células T colaboradoras (Th) y los macrófagos, que tienen efecto específico sobre la interacción y comunicación entre las células (**Stenken y Poschenrieder, 2015**).

Citocina es un nombre general; otros nombres incluyen linfocina (producidas por linfocitos), monocina (producidas por monocitos), quimiocina (con actividades quimiotácticas) e interleucina (producidas por un leucocito y que actúan sobre otros leucocitos) (**Zhang y An, 2007**); pueden actuar sobre las células que las secretan (acción autocrina), sobre las células cercanas (acción paracrina) o, en algunos casos, sobre las células distantes (acción endocrina). Estas citocinas pueden ser proinflamatorias o antiinflamatorias, estando así involucradas no solo en el inicio de la inflamación sino también en la reparación del tejido dañado; el equilibrio entre estos dos grupos es crucial para llevar a cabo una respuesta eficiente, pues la ruptura de este balance involucrado a las citocinas en diversos padecimientos como la enfermedad inflamatoria intestinal (**Guan y Zhang, 2017**), artritis reumatoide (**Wojdasiewicz y cols., 2014; Alunno y cols., 2017**), arterosclerosis y cáncer (**Gulati y cols., 2016**); razones por las que el estudio de sus vías de señalización y regulación toman importancia al poder considerarlas como posibles biomarcadores útiles para la salud y la enfermedad, actuando así, como agentes de diagnóstico y pronóstico, para ser finalmente blancos terapéuticos.

1.4 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una de las citocinas más importantes y mejor conocidas en los procesos inflamatorios; se identificó en 1975 como una glicoproteína inducida por endotoxinas, que causaba necrosis hemorrágica de sarcomas que habían sido trasplantados en ratones (**Carswell y cols., 1975**). En 1985 se clonó el factor de necrosis tumoral humano (**Pennica y cols., 1985**), y desde su descubrimiento hasta ahora se acepta que esta citocina está implicada en una amplia gama de afecciones inflamatorias.

Es una potente citocina proinflamatoria que ejerce efectos pleiotrópicos sobre diversos tipos de células; es producida predominantemente por macrófagos activados, neutrófilos y linfocitos T, aunque también puede ser secretada por otros tipos de células, incluidos los monocitos, los mastocitos, las células NK, los queratinocitos, los fibroblastos y las neuronas (**Tracey y cols., 2008**).

El TNF- α es sintetizado como una forma precursora llamada TNF- α transmembrana (mTNF α) que se expresa como una proteína que consta de 233 residuos aminoácidos (26 kDa) (**Horiuchi y cols., 2010**). Los monómeros de TNF α se asocian a la membrana plasmática como trímeros no covalentes antes de ser escindidos al dominio extracelular por las metaloproteinasas, específicamente la enzima convertidora de TNF- α (TACE) (**Moss y cols., 1997**) que actúa entre los residuos de alanina y valina, liberando la forma soluble de TNF- α (sTNF α) de 157 residuos de aminoácidos (17 kDa).

Los trímeros de sTNF- α constituyen el ligando potente que activa los receptores de TNF. Las acciones moleculares de sTNF- α extracelular y mTNF- α típicamente ocurren a través de la unión a uno de dos receptores: TNFR1 y TNFR2 (*Figura 3*). Los receptores se expresan en diferentes tipos de células, TNFR1 se expresa ampliamente, mientras que TNFR2 se expresa predominantemente en leucocitos y células endoteliales. Estos dos receptores son capaces de unirse a proteínas adaptadoras intracelulares que conducen a la activación de complejos procesos de señalización intracelular y median los efectos pleiotrópicos de TNF- α , sin embargo, el TNF- α transmembrana en la superficie celular de las células productoras de TNF- α se une a los receptores de TNF en las células diana y ejerce diversas funciones biológicas que contribuirán a la modulación de la inflamación local en una forma de contacto de célula a célula (**Horiuchi y cols., 2010**). La expresión de TNF- α

transmembrana en varios tipos de células contribuiría a las respuestas fisiológicas y patológicas en la salud y las enfermedades.

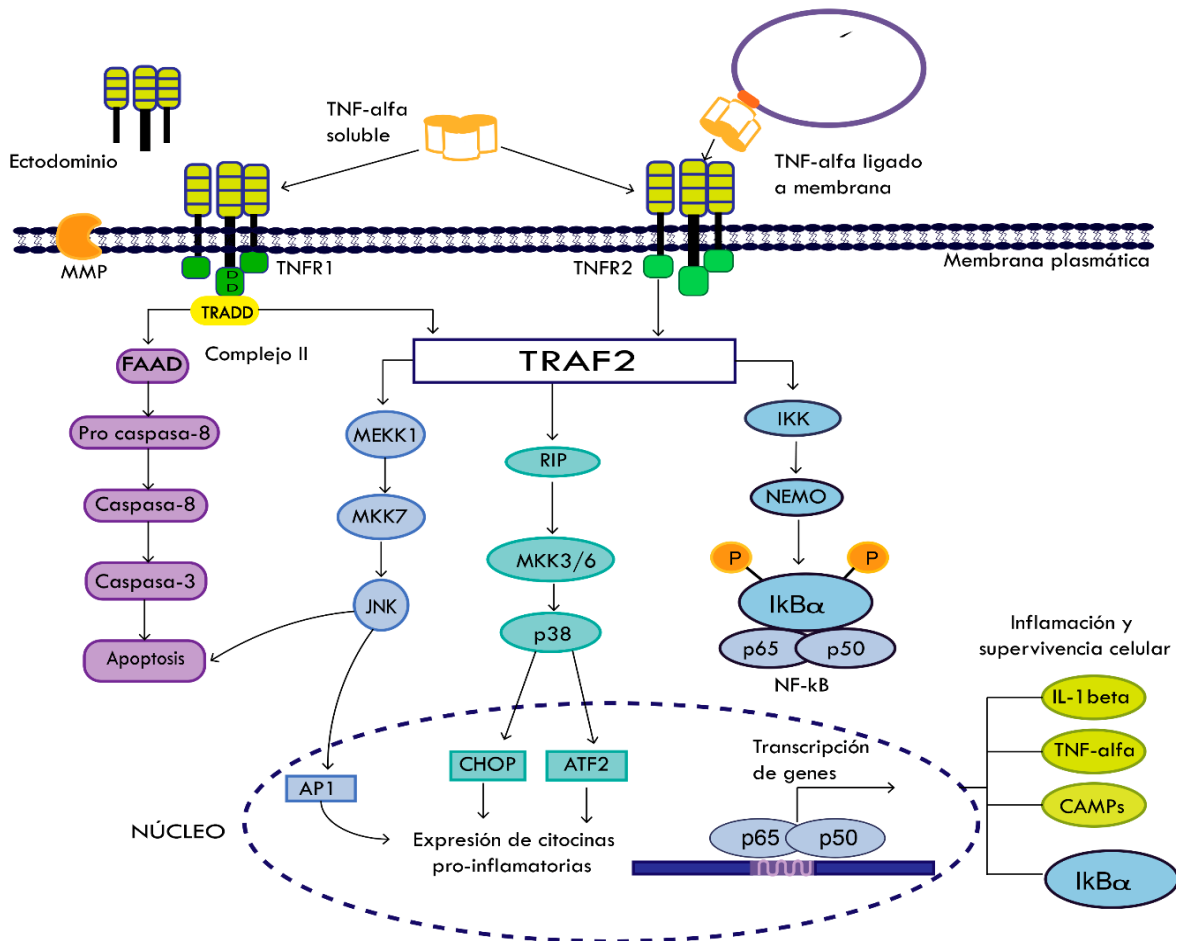


Figura 3. Señalización a través de los receptores TNFR. Después de la unión de TNF α a TNFR1, el receptor experimenta eliminación de ectodominio e internalización. La señalización después de la internalización del receptor se considera señalización pro-apoptótica mediante la formación del complejo II (TRADD / FADD / Pro-Caspase-8). Alternativamente, también existe la vía a través del complejo I (TRADD / TRAF2 / RIP). JNK activa el heterodímero AP1, mientras que p38 activa numerosos factores de transcripción (CHOP y ATF2). La señalización del complejo I conduce a la activación de IKK, este a su vez al heterodímero NF- κ B formado por las subunidades p65 / p50 que puede luego migrar al núcleo, unirse a elementos de respuesta e inducir la expresión de genes proinflamatorios, es decir, favorecen la expresión de citocinas proinflamatorias y la supervivencia celular. Tomado y modificado de Turner y cols., 2014.

1.5 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

La familia de citocinas IL-1 incluye en la actualidad 11 miembros (pro y antiinflamatorios): IL-1 β , IL-1 α , antagonista de IL-1R (IL-1Ra), IL-18, IL-33, antagonista de IL-36R (IL-36Ra), IL-36a, IL-36b, IL-36c, IL-37 e IL-38 (**Boraschi y cols., 2011**).

La interleucina-1 β (IL-1 β) es crucial para las respuestas de defensa del huésped frente a la infección y la lesión. También es la mejor caracterizada y estudiada de los 11 miembros de la familia IL-1. La producción de la IL-1 β se induce principalmente por bacterias, aunque también puede estimular su propia expresión (**Dinarello, 2009**). Al igual que el TNF- α , IL-1 β es una potente citocina proinflamatoria, la cual se encuentra como un precursor biológicamente inactivo (31kD) en el citoplasma (*Figura 4*), por lo que debe escindirse mediante la enzima convertidora de IL-1 (ICE) o caspasa-1 que está contenida en un complejo intracelular especializado denominado inflamosoma, y así generar una citocina activa (17 kD) (**Turner y cols., 2014**); posteriormente IL-1 β actúa mediante la unión al receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1R1) en células diana, que luego interactúa con la proteína accesoria del receptor IL-1 (IL-1RAP) para inducir la activación celular mediante el reclutamiento de moléculas de señalización intracelular, incluyendo el factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88), quinasa 4 asociada a receptor de IL-1 (IRAK-4) y el factor 6 asociado a receptor de TNF. La señalización a través de estas vías dará como resultado la activación del factor nuclear κ B (NF κ B), así como p38, quinasa c-Jun N-terminal (JNK), quinasa regulada por señal extracelular (ERK) y proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK).

La escisión de pro-IL-1 β se puede lograr mediante dos mecanismos distintos (*Figura 4*): el primero, que se produce típicamente en monocitos y macrófagos, es dependiente del inflamosoma y la segunda vía, mediada por neutrófilos o independiente del inflamosoma. Los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas (DC), así como los neutrófilos, se encuentran entre las células inmunes capaz de producir grandes cantidades de IL-1 β (**Schett y cols., 2015**).

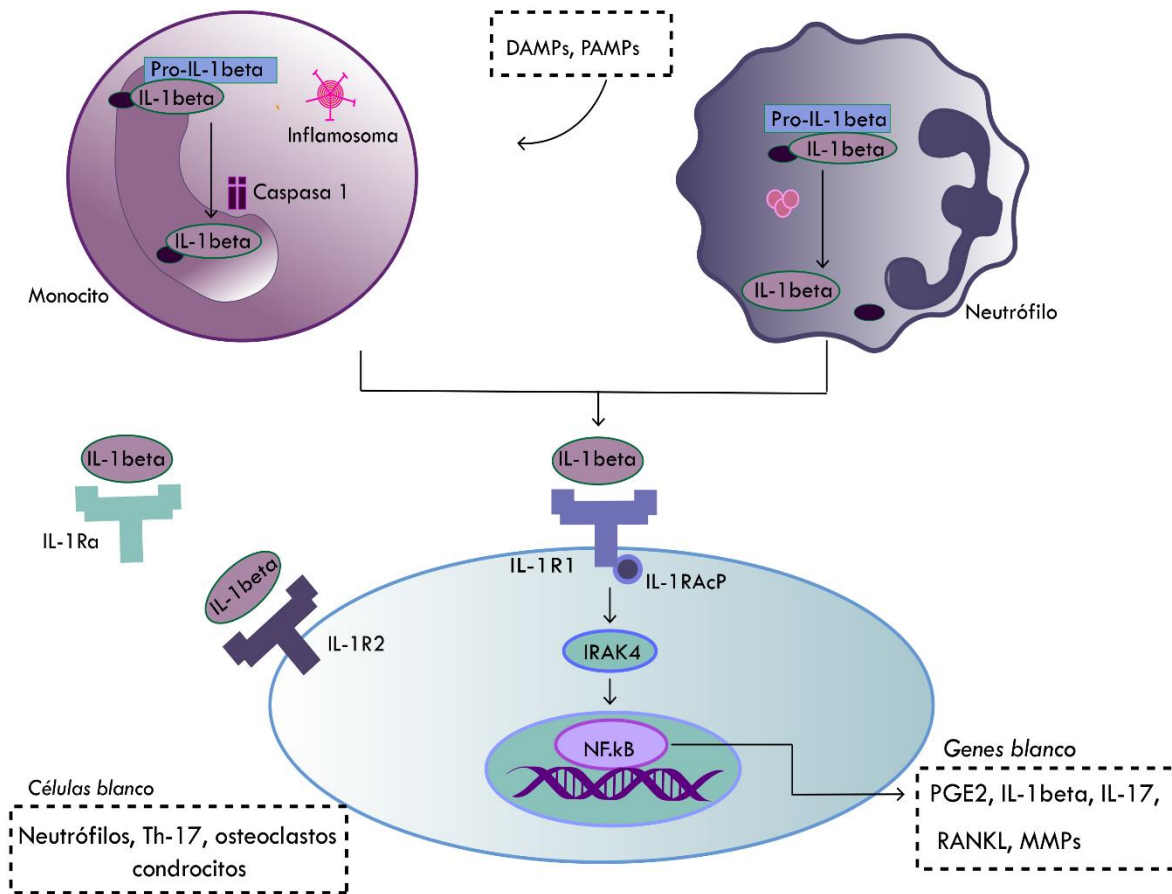


Figura 4. Activación y señalización de IL-1. La liberación de IL-1 β a partir de monocitos, macrófagos y neutrófilos requiere un procesamiento enzimático de su proteína precursora intracelular (pro-IL-1 β). El corte mediado por caspasa-1 de pro-IL-1 β depende de la activación de un complejo de proteína intracelular llamado inflammasoma (activación de IL-1 β dependiente de inflammasoma). El inflammasoma es inducido por patrones moleculares asociados a daños (DAMP) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Alternativamente, pro-IL-1 β puede escindirarse mediante serina proteasas derivadas de neutrófilos en un proceso independiente de la activación de inflammasoma. Tomado y modificado de Schett y cols., 2015.

Las citocinas como TNF- α e IL-1 β son potentes mediadores de los procesos inflamatorios y el mantenimiento de su equilibrio homeostático en el sistema, es vital. Un desequilibrio en la producción de estas citocinas o la expresión y/o desregulación de los receptores y las vías de señalización, contribuye a diversos procesos patológicos autoinmunes e inflamatorio, sin embargo, en la actualidad, muchos fármacos antiinflamatorios inducen sus efectos terapéuticos al atenuar las acciones perjudiciales de las citocinas, y nuevas investigaciones dirigen su interés hacia estas moléculas y sus dianas.

1.6 Fármacos antiinflamatorios

Los fármacos antiinflamatorios reducen los signos de la inflamación (enrojecimiento, hinchazón y dolor), mediante el bloqueo de ciertas sustancias en el cuerpo causantes de esta; actualmente existen dos grandes grupos de fármacos antiinflamatorios: esteroideos y no esteroideos (AINES).

Los antiinflamatorios esteroideos mejor conocidos como glucocorticoides son un grupo de fármacos estructural y farmacológicamente similares a los corticoides naturales (producidos por la corteza adrenal), aunque en general, son más potentes y con varias funciones, como efectos antiinflamatorios, inmunosupresores, antiproliferativos y vasoconstrictores. Sus acciones se utilizan médicamente para el tratamiento de diversas afecciones, sin embargo, su uso se ve limitado por sus importantes efectos secundarios **(Ronchetti y cols., 2018)**. Por otra parte, los AINE, son un grupo químicamente heterogéneo de fármacos que además de sus propiedades antiinflamatorias actúan en mayor o menor medida como analgésicos y antipiréticos; a pesar de ello, el uso prolongado de estos también ha sido relacionado con afectos adversos, cardiovasculares y gastrointestinales **(Harirforoosh y cols., 2013)**.

Antiinflamatorios esteroideos

La molécula precursora de todas las moléculas esteroideas es el colesterol, cuya estructura química (*Figura 5*) está conformada por un esqueleto de esterol, formado por tres anillos de hexano y un anillo de pentano **(Johannes y Johannes, 2013)**, de esta derivan por medio de diferentes vías metabólicas, el cortisol y la aldosterona, esteroides endógenos que desempeñan un papel fundamental en la homeostasis de casi todos los sistemas corporales. Los esteroides se han clasificado en glucocorticoides (GCs), moléculas que preferentemente

tienen acción sobre los carbohidratos y la inflamación, y los mineralocorticoides (MCs) relacionados con el sodio y el potasio.

Al igual que los esteroides endógenos, los glucocorticoides sintéticos tienen innumerables aplicaciones terapéuticas; la cortisona, fue el primer glucocorticoide sintético sintetizado en 1946, y en 1948 fue utilizado por primera vez por Hench y Kendall en el tratamiento de la artritis reumatoide; acontecimiento que los hizo acreedores del premio nobel de fisiología en 1950, sin embargo, surgieron efectos secundarios desfavorables, limitando su uso terapéutico, por lo que, en ese mismo año iniciaron, los cambios en la estructura de la cortisona dando lugar a la fabricación de nuevos fármacos, como la prednisona y la prednisolona (**Burns, 2016**). Las modificaciones estructurales posteriores de los glucocorticoides sintéticos mejoraron su potencia y extendieron la duración del efecto, también proporcionaron fármacos con diferentes afinidades y tiempos de unión al receptor de glucocorticoides (RG).

La modificación química de glucocorticoides naturales reveló numerosas características estructurales esenciales para actividades biológicas específicas y desde la demostración hace más de sesenta años de su capacidad para suprimir la inflamación, han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como asma, rinitis alérgica, colitis ulcerosa y varias otras enfermedades dermatológicas, oftálmicas, neurológicas y autoinmunes; atribuyendo sus acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras directa o indirectamente a los efectos transcripcionales del agonismo de los receptores de glucocorticoides (RGs) que altera la transcripción de numerosos genes (**Cruz-Topete y Cidlowski, 2015**).

La eficacia clínica depende de la farmacocinética y farmacodinámica de los corticoides, y las características farmacocinéticas de los diversos corticoides dependen de sus propiedades fisicoquímicas (**Czock y cols., 2005**).

A pesar de sus beneficios terapéuticos, el uso de glucocorticoides se asocia con efectos secundarios graves, como diabetes, hipertensión, glaucoma, atrofia muscular, obesidad y osteoporosis (**Rhen y Cidlowski, 2005**), sin embargo, la magnitud de los efectos

positivos o negativos de los glucocorticoides dependerá de la dosis, la duración del tratamiento, la biodisponibilidad del fármaco y los niveles de receptores de glucocorticoides (He y cols., 2014).

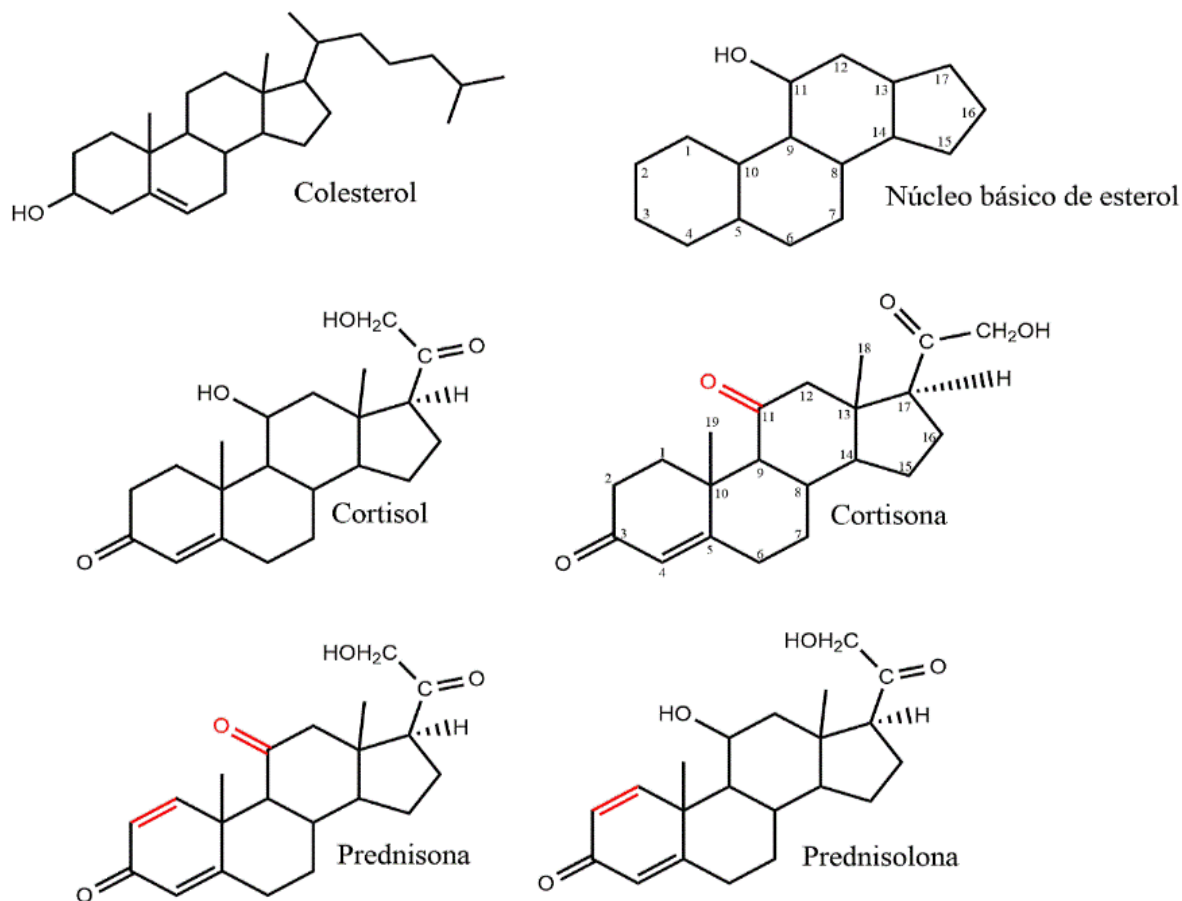


Figura 5. Estructura del colesterol y configuración básica de esteroides. Diferencias estructurales de los glucocorticoides (rojo) en comparación con el cortisol y la cortisona, glucocorticoides activos naturales.

Mecanismo de Acción

Los mecanismos a través de los cuales actúan los GCs se pueden dividir en mecanismos genómicos y no genómicos (Figura 6). Los GCs ejercen sus acciones uniéndose a su receptor, el receptor de glucocorticoides (RGs), un factor de transcripción inducido por ligando, miembro de la superfamilia de receptores nucleares. El receptor inactivo de glucocorticoides reside principalmente en el citoplasma como parte de un complejo proteico

que incluye a las proteínas de choque térmico hsp90 y hsp70; tras la unión al ligando este sufre un cambio conformacional, lo que resulta en la disociación del complejo de proteínas para después translocarse hacia el núcleo (**Ramamoorthy, S. y Cidlowski, J., 2016**). Una vez en el núcleo, el complejo RG-GC se une a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), desencadenando así el mecanismo clásico de los receptores nucleares, que implica la transcripción de genes (transactivación) o bien la alteración directa o indirecta de la transcripción de otros factores de transcripción (transrepresión); el modelo de transactivación mejor conocido implica la dimerización de RG después de la unión de complejos monoméricos de RG-GC a GRE, induciendo así cambios conformacionales de GR para reclutar cofactores que facilitan la expresión génica. Por otra parte, existen varios mecanismos de transrepresión, como la unión de RG a los GRE negativos (nGRE) suprimiendo así la expresión de genes; la interacción proteína-proteína de GR con otros FT, mejor conocido como mecanismo de anclaje, por ejemplo, la unión al factor nuclear κ B (NF- κ B) y la proteína activadora-1 (AP-1), reprimiendo su capacidad para inducir la transcripción de genes proinflamatorios (**Cruz-Topete, D. y Cidlowski J. A., 2015; Scheschowitsch, K. y cols., 2017**).

Los mecanismos no genómicos se caracterizan por un rápido inicio del efecto (<15 minutos) porque no se necesita tiempo para la transcripción y traducción de genes pues, los RG unidos a membrana o RG citosólicos señaliza mediante la modulación de la actividad de varias quinasas, incluida la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), PI3K, AKT y las quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) (**Ayroldi y cols., 2012**).

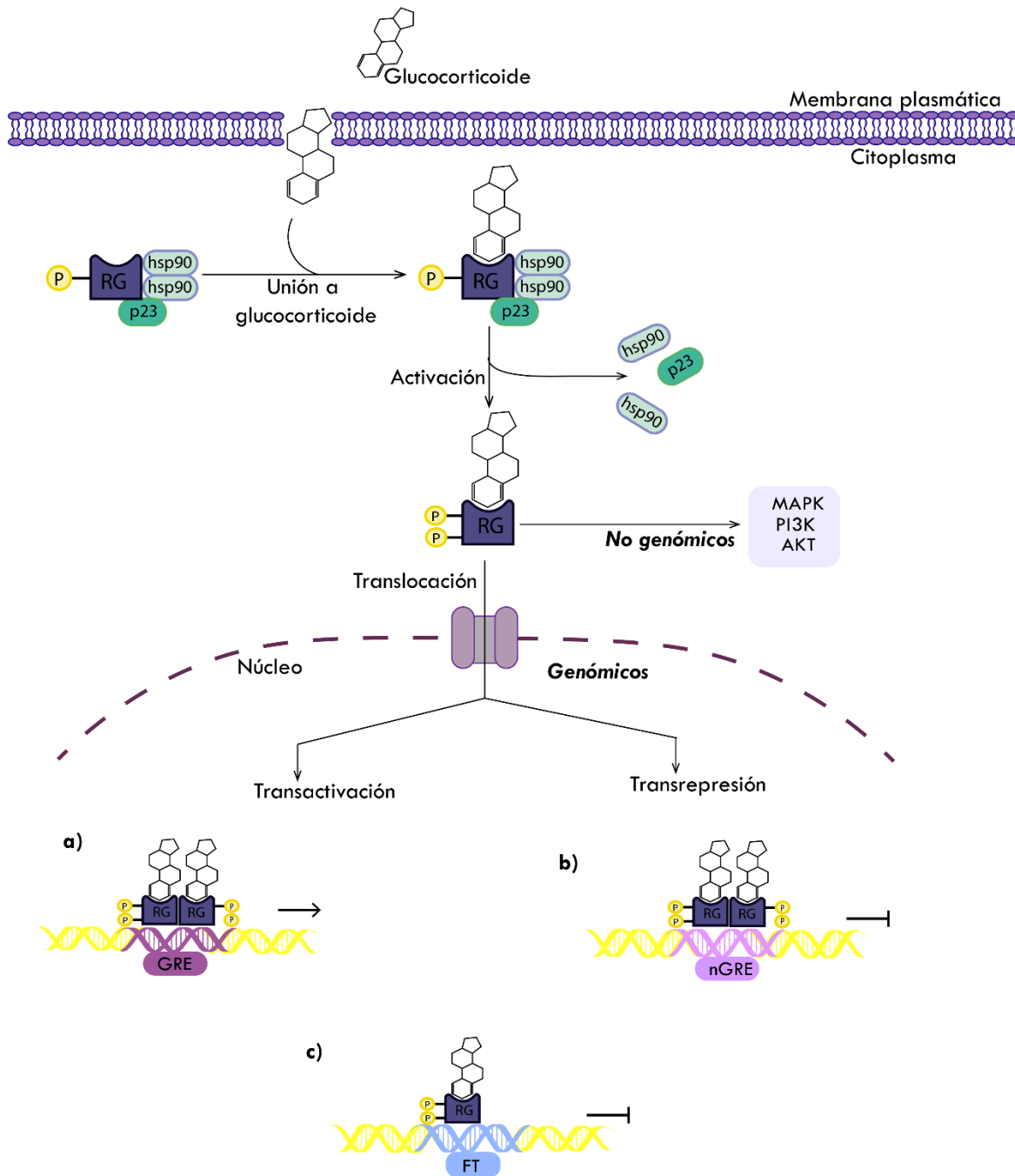


Figura 6. Vía de señalización de los glucocorticoides. GR puede señalizar de una manera no genómica mediante la modulación de la actividad de varias quinasas, incluida la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y AKT. Por otra parte, se encuentran los mecanismos genómicos que incluyen señalizaciones de transactivación y transrepresión. **a)** Directo: el GR activado se une directamente a GRE; **b)** compuesto: GR se une directamente a un GRE e interactúa con factores de transcripción (FT) vecinos unidos al ADN; **c)** tethering: GR se une a otros factores de transcripción unidos a ADN. Tomado y modificado de Ramamoorthy y Cidlowski, 2016.

La Dexametasona

La 9-fluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona mejor conocida como dexametasona (*Figura 7*) es un glucocorticoide sintético con potentes propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras, las cuales son ejercidas al unirse al GR; este complejo interactúa con secuencias específicas de ADN localizadas en las zonas de regulación génica, modulando así la síntesis y/o liberación de mediadores que inician cambios vasculares y, por lo tanto, suprimen los signos cardinales de la inflamación; su efecto sistémico y de acción prolongada es gracias a su estructura fluorada y la afinidad aumentada por el RG (**Earp y cols., 2008**); su potencia es aproximadamente 30 veces mayor que la de los glucocorticoides de acción corta e intermedia como la hidrocortisona, la prednisona y metilprednisolona.

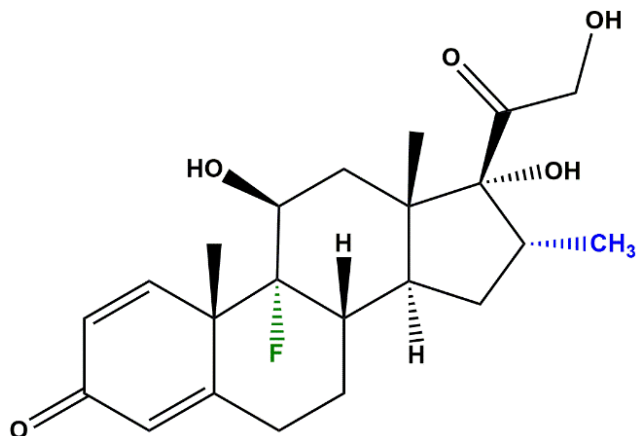


Figura 7. Estructura química de la dexametasona. La introducción del radical fluoruro en C-9 (verde) y la metilación en C-16 (azul) de la estructura, aumenta notoriamente la actividad glucocorticoide y antiinflamatoria del compuesto.

La dexametasona tiene una buena absorción después de la administración oral, teniendo una biodisponibilidad del 86%, se sabe que no tiene afinidad por la transcortina uniéndose solamente a la albumina (**Czock y cols., 2005; Cummings y cols., 1990**).

A continuación, se resumen los parámetros farmacocinéticos de la dexametasona (*Tabla 1*).

Fármaco	Parámetros						
	Bd oral (%)	C _{max} (µg/l)	t _{max} (h)	Vd (l/kg)	Unión proteica (%)	T _{1/2} (h)	Excreción urinaria (%) ⁺⁺
Dexametasona	86	100	2	2	66-70	3-5	30-40

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de la dexametasona. Datos correspondientes a una administración oral de 12 mg. En general la absorción de los glucocorticoides es completa pero el efecto de primer paso hepático determina la variabilidad en la biodisponibilidad. Bd: biodisponibilidad absoluta; C_{max}: concentración máxima; t_{max}: tiempo a C_{max}; t_{1/2}: vida media de eliminación; Vd: Volumen aparente de distribución. Tomado y modificado de Serra y cols., 2012.

Desafortunadamente sus efectos clínicamente deseados están relacionados con efectos adversos que incluyen cambios dermatológicos, efectos oftalmológicos y cardiovasculares, especialmente en tratamientos que incluyen dosis altas y duración prolongada (**Gensler, 2013**), como la artritis reumatoide, por lo que el desarrollo de nuevos medicamentos que permitan tratar y prevenir enfermedades con mayor eficacia y seguridad, y efectos secundarios mínimos, es un campo constante de investigación.

1.7 La diosgenina

Las Sapogeninas esteroidales son productos naturales obtenidos de las saponinas, un grupo de glicósidos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y empleado para la obtención de productos esteroidales biológicamente activos (**Fernández- Herrera y cols., 2009**).

La Diosgenina es una sapogenina esteroideal (*Figura 8*), que se encuentra en una variedad de plantas, incluida la alholva (*Trigonella foenum graecum*) y raíces de ñame salvaje (*Dioscorea villosa*), *Solanum incaunm*, y *Solanum xanthocarpum* (**Kim y cols., 2012**).

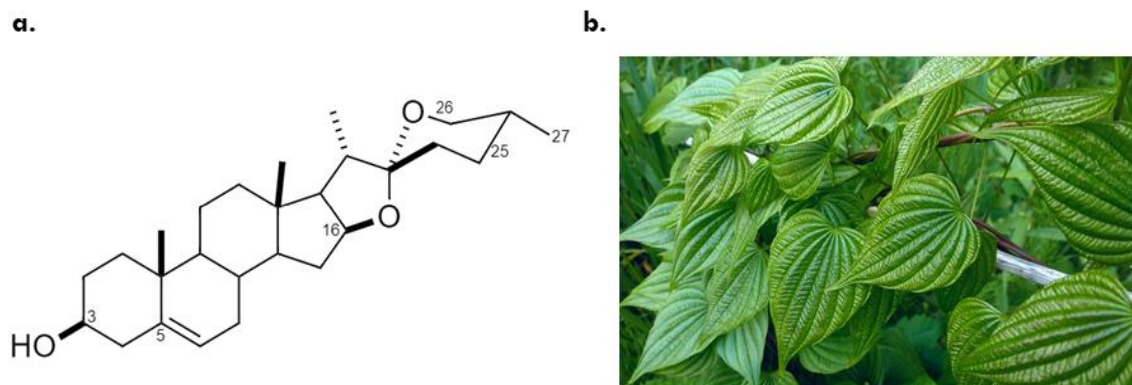


Figura 8. a) Estructura química de la diosgenina. Obtenida por hidrólisis de la saponina dioscina, los anillos A-D forman el esqueleto ciclopenta[α]fenantreno y la cadena lateral espirocetálica está indicada con los anillos E y F. Tomado y modificado de Fernández-Herrera y cols., 2009. **b)** Se encuentra en abundancia en las raíces de ñame salvaje (*Dioscorea villosa*). [Fotografía de Wendell G. Smith] (Smith Mill Road, Georgia, 2012).

Son pocos los estudios que reportan datos sobre la farmacocinética de la diosgenina, sin embargo, se reportan datos de la administración por vía oral de diosgenina a dosis de 100 mg/kg en ratas (Xu y cols., 2009), resumidas a continuación (Tabla 2).

Parámetros	Valores
$t_{1/2}$ (h)	5.72
K_e (1/h)	0.125
CL (L/h/kg)	22.82
t_{max} (h)	5.81
C_{max} (ng/mL)	274.13

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de la diosgenina en rata (n=8).

Es el principal compuesto precursor en la fabricación de esteroides sintéticos y en las últimas décadas se ha demostrado que tiene efectos preventivos/terapéuticos en diversas afecciones médicas, como el cáncer, la diabetes, trastornos gastrointestinales y condiciones inflamatorias (Jesus, M. y cols., 2016; Parama, D. y cols., 2020).

Jung y cols., (2010), demostraron que la diosgenina inhibe la producción de mediadores inflamatorios inducidos por LPS / IFN- γ en macrófagos murinos en un estudio *in vitro*. En sus experimentos observaron que en los macrófagos tratados con diosgenina a ciertas concentraciones durante 2 horas seguido de la estimulación con LPS (1 μ g / ml) / IFN- γ (50 U / ml) durante 3 o 24 horas, se inhibía la producción de IL-1 β e IL-6 en comparación con las células tratadas solamente con LPS/IFN- γ , mientras que la producción de TNF- α , no se observa afectada (*Figura 9*).

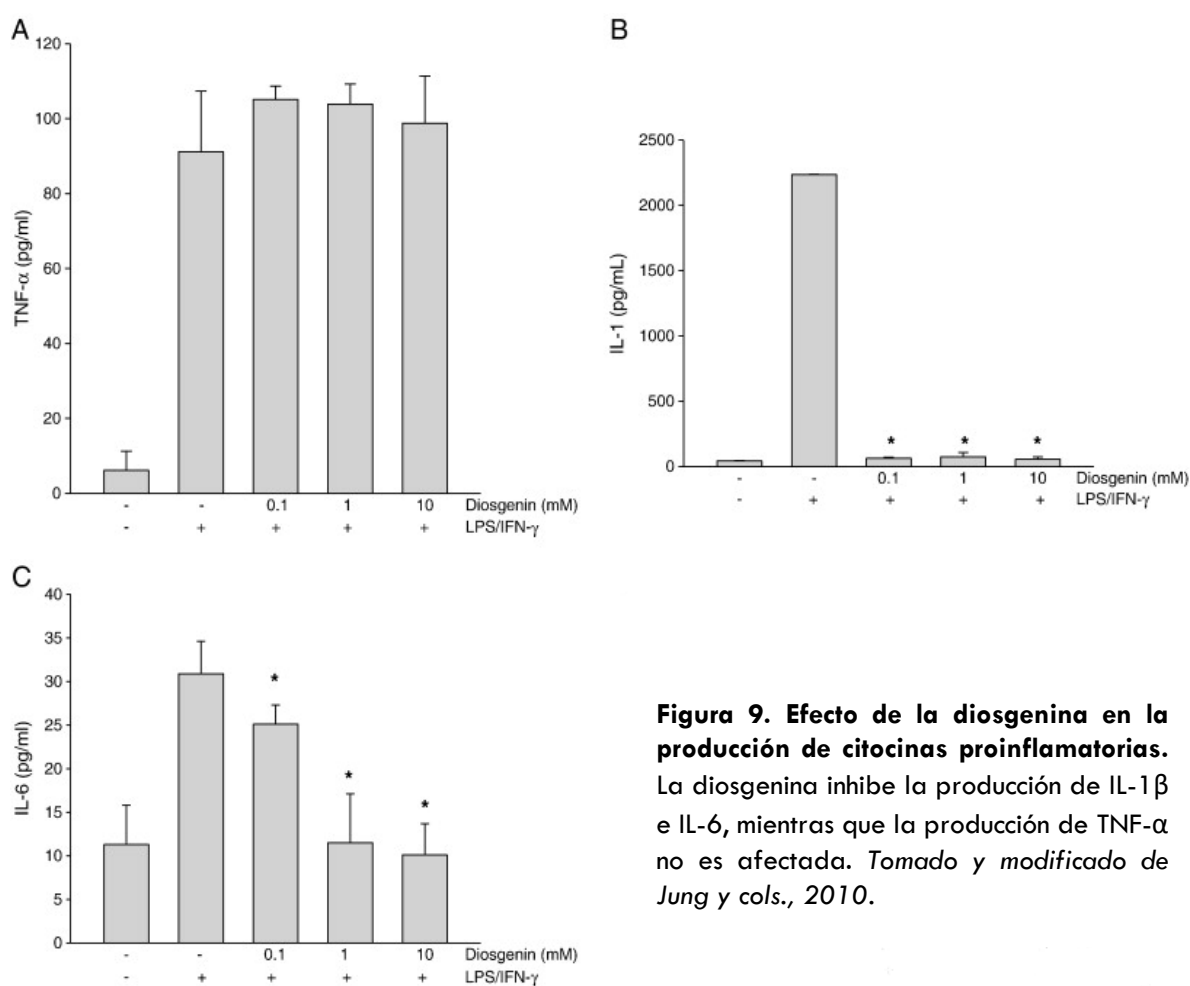


Figura 9. Efecto de la diosgenina en la producción de citocinas proinflamatorias. La diosgenina inhibe la producción de IL-1 β e IL-6, mientras que la producción de TNF- α no es afectada. Tomado y modificado de Jung y cols., 2010.

Cuando los macrófagos se exponen a estímulos inflamatorios, secretan citocinas como el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, y las proteínas quinasas están involucradas en las vías de transducción de señales que regulan esta respuesta; Jung y cols., (2010) en sus

ensayos demostraron que los macrófagos pueden utilizar diferentes vías de señalización de MAPK, y que la diosgenina inhibe la producción de mediadores inflamatorios en macrófagos inducidos por LPS/INF- γ a través de la inhibición selectiva de la fosforilación de JNK (*Figura 10*), pero no la fosforilación de p38 y ERK; la disminución de los niveles de CK2 en el núcleo, la supresión de la actividad de AP-1 y la inhibición de la degradación de I κ B.

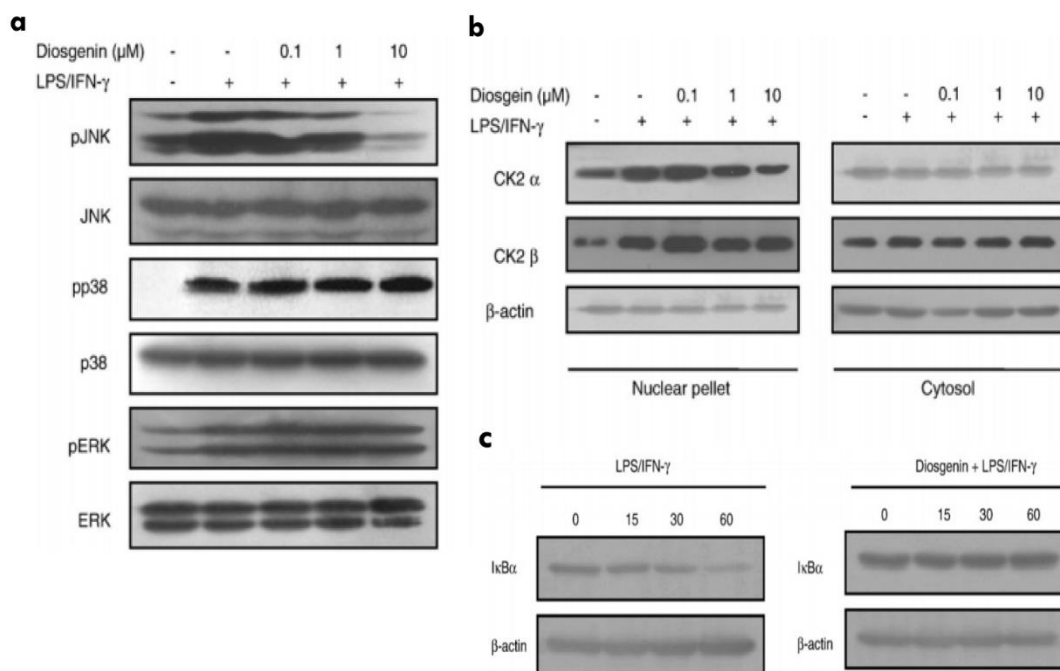


Figura 10. Efecto de la diosgenina en las vías de señalización MAPK. **a.** La activación de pp38, p-JNK y p-ERK y **b.** La expresión de CK2, **c.** La degradación de I κ B α en macrófagos estimulados con LPS / IFN- γ . El nivel de proteína β -actina se consideró como un control interno. Los resultados ilustrados son de un solo experimento, y son representativos de tres experimentos separados. Tomado y modificado de Jung y cols., 2010.

Por otra parte, **Junchao y cols., (2017)** a través de técnicas *in vitro* e *in vivo* demostraron que la diosgenina suprime la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, al comparar ratones sanos contra ratones BALB/c asmáticos tratados con acetato de prednisolona y/o diosgenina. Demostraron que la diosgenina reduce la infiltración de células inflamatorias en ratones BALB/c asmáticos, al administrar 100 mg / kg / día de diosgenina. Al aplicar la tinción de hematoxilina-eosina (*Figura 11*) en tejidos del bronquio pulmonar, evaluaron la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos) bajo los diversos tratamientos utilizados.

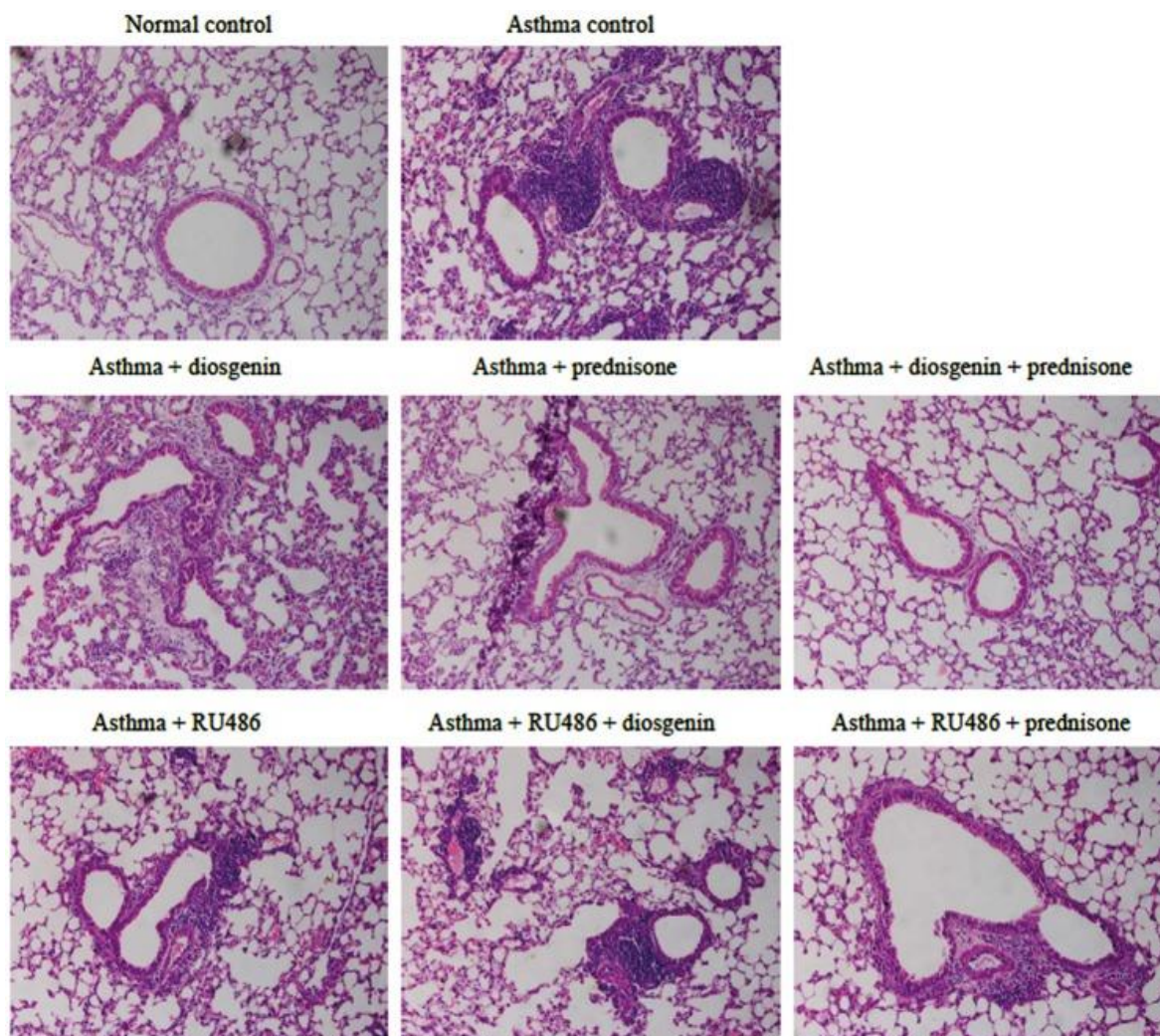


Figura 11. Tinción HE en el bronquio pulmonar izquierdo (200X) e infiltración de células inflamatorias pulmonares en ratones BALB / c. Las células teñidas de azul púrpura alrededor de las vías respiratorias son células inflamatorias infiltradas, se aprecia además el engrosamiento del epitelio traqueal y la capa de músculo liso, en comparación con el grupo control. Tomado y modificado de *Junchao y cols., 2017*.

Posteriormente midieron las concentraciones de las citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 mediante la técnica de ELISA en los ratones BALB/c, observando que la secreción de estas fue significativamente mayor en el grupo con asma en comparación con el grupo normal después de los tratamientos (*Figura 12*). El tratamiento con RU486 (antagonista de GR) bloqueó los efectos de diosgenina y acetato de prednisona provocando que la secreción de citocina retornara a niveles similares a los ratones del grupo asmático no tratado. Confirmando así, que la diosgenina reduce la infiltración de células inflamatorias y la secreción de citocinas proinflamatorias en ratones asmáticos BALB / c, posiblemente a través de interacciones con RGs ya que RU486 suprimió sus efectos antiinflamatorios al unirse directamente al receptor.

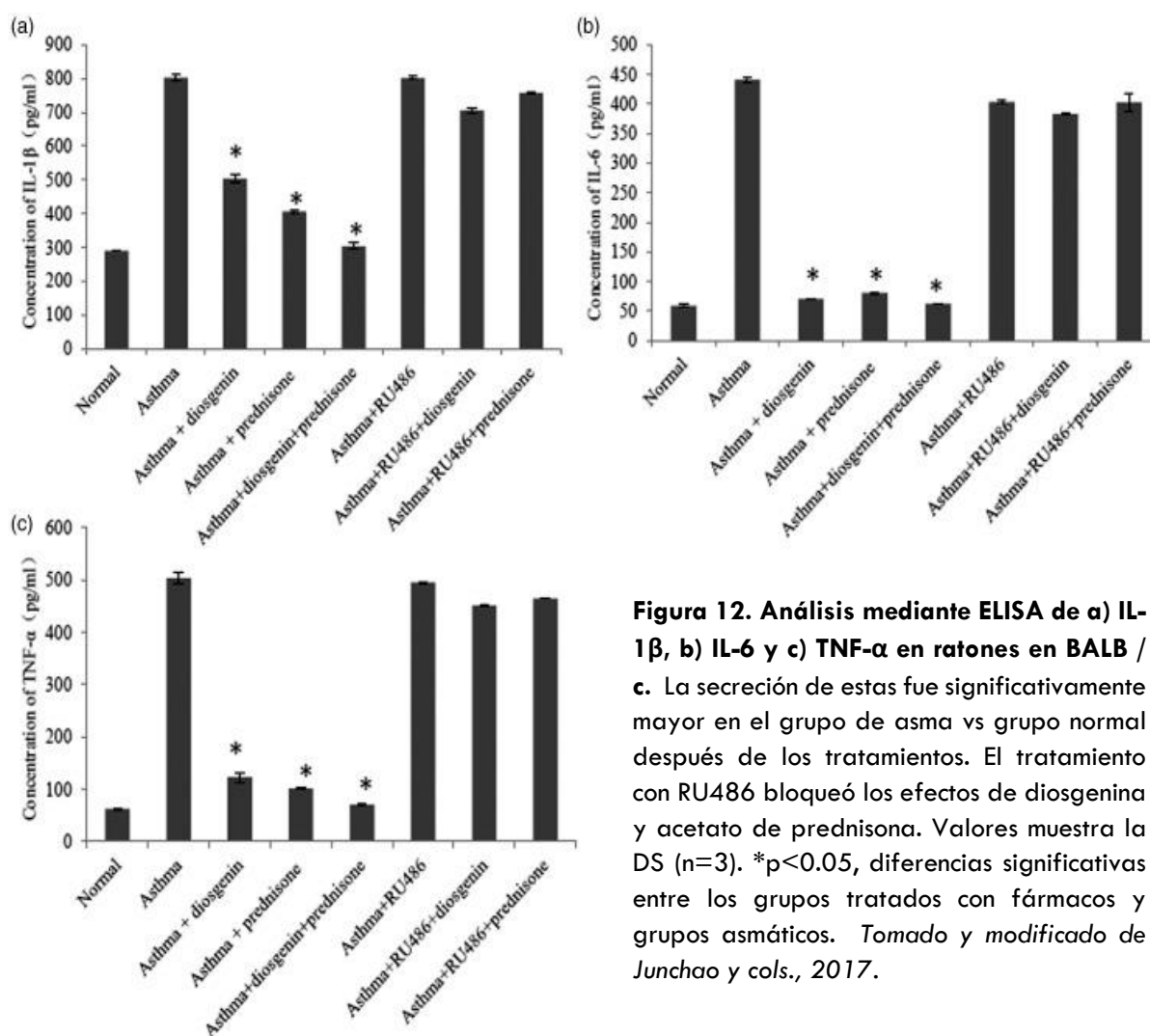


Figura 12. Análisis mediante ELISA de a) IL-1 β , b) IL-6 y c) TNF- α en ratones en BALB / c. La secreción de estas fue significativamente mayor en el grupo de asma vs grupo normal después de los tratamientos. El tratamiento con RU486 bloqueó los efectos de diosgenina y acetato de prednisona. Valores muestra la DS (n=3). *p<0.05, diferencias significativas entre los grupos tratados con fármacos y grupos asmáticos. Tomado y modificado de Junchao y cols., 2017.

En la actualidad se sabe también que existen análogos de la diosgenina con alto potencial farmacológico (**Fernández-Herrera y cols., 2009; Singh, y cols., 2014**), por lo tanto, estos compuestos naturales desempeñan un papel importante en el desarrollo de nuevos fármacos en la industria farmacéutica y además permiten explorar modificaciones adicionales durante el proceso.

1.8 El derivado colestánico BSS-4

En el Laboratorio de Síntesis y modificación de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez, se llevó a cabo la síntesis del triacetato de 22-oxocolest-5-en-3 β , 16 β , 26-triilo (BSS-4) (*Figura 13*), un compuesto colestánico obtenido al tratar la diosgenina con anhídrido acético (Ac_2O) y eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$), a una temperatura de 0 a -5°C , obteniendo un rendimiento del 80-85% (**Fernández-Herrera y cols., 2009**).

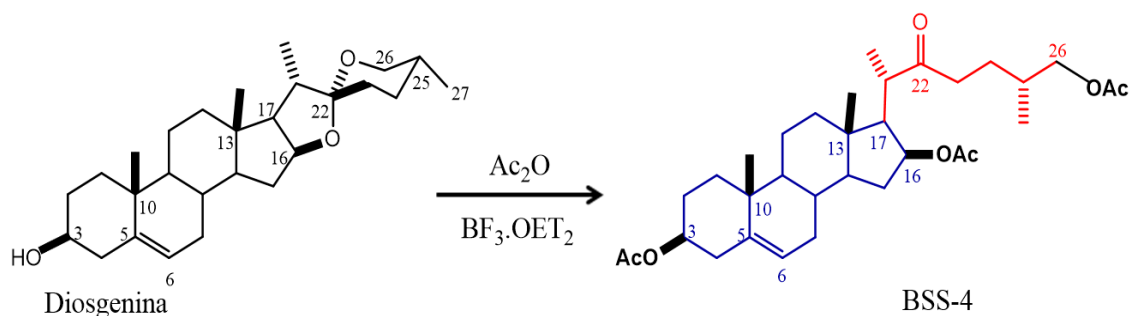


Figura 13. Obtención del derivado colestánico BSS-4 a partir de diosgenina. En la estructura se aprecia el núcleo esteroidal (azul) y la apertura de la cadena lateral espirocetálica (rojo), característico de un compuesto colestánico. Tomado y modificado de Fernández-Herrera y cols., 2009.

Estudios realizados en el Laboratorio de Neuroquímica de la BUAP, han demostrado que la administración intraperitoneal de 1.5mg/kg de BSS-4 en ratas sanas produce un probable efecto trófico (*Figura 14*), reflejado en el aumento de la longitud dendrítica y el número de dendritas en neuronas piramidales. Además, se observó que la administración intraperitoneal de 0.5, 0.25 y 0.125 mg/kg de BSS-4 presenta un posible efecto neuroprotector ante un daño excitotóxico y un posible efecto antiinflamatorio al disminuir la longitud del cuerpo neuronal (**Trejo, 2013**).

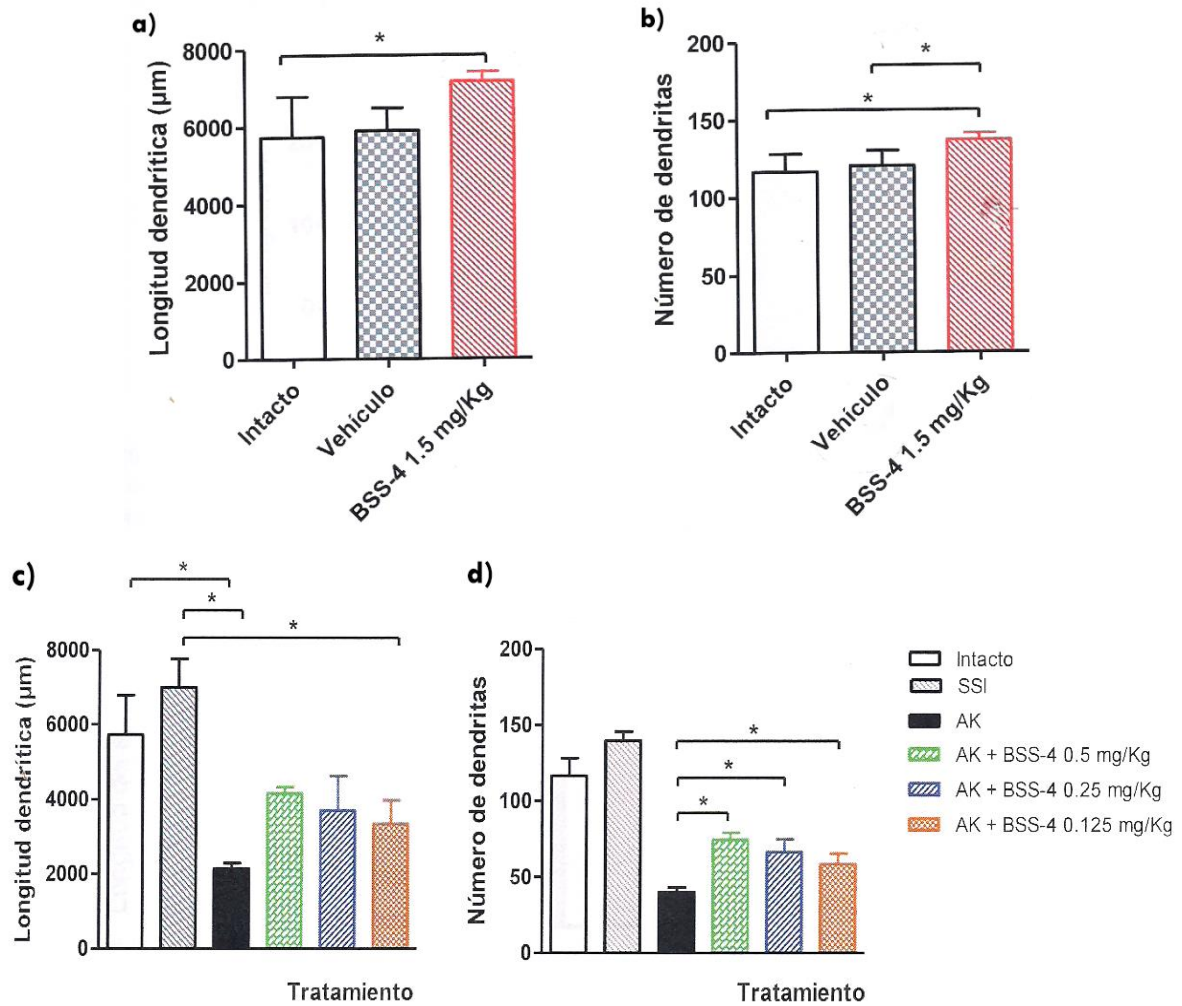


Figura 14. **a)** Aumento en la longitud dendrítica y **b)** número de dendritas en ratas íntegras administradas con 1.5 mg/kg de BSS-4. Efectos en neuronas piramidales del hipocampo, se aprecia la disminución del daño al administrar BSS-4 **c)** longitud dendrítica y **d)** número de dendritas. Tomado y modificado de Trejo, R., 2013.

Por otra parte, **Gil en 2014** evidenció que la administración crónica de BSS-4 por vía intraperitoneal en dosis de 0.5 y 1 mg/kg mejora la memoria de reconocimiento y la memoria espacial (*Figura 15*) evaluadas en la prueba de reconocimiento de objetos y el laberinto de Barnes respectivamente. También fue observado el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en el hipocampo.

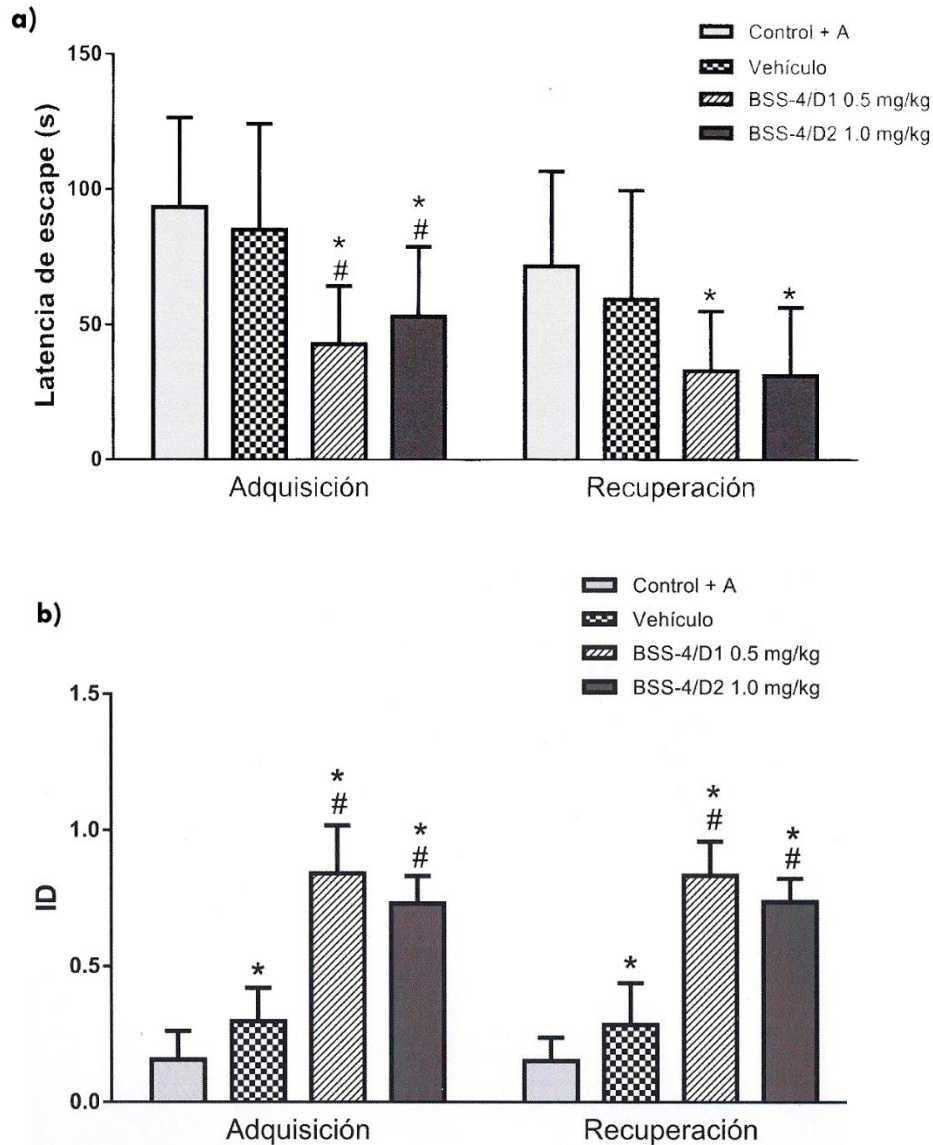


Figura 15. La administración crónica de BSS-4 mejora la adquisición y facilita la recuperación de la memoria espacial a largo plazo. a) El BSS-4 reduce el tiempo de latencia para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes. **b)** El BSS-4 aumenta el índice de discriminación de objetos en comparación con el grupo control. Las barras muestran el valor de las medias \pm DE (n=6). Tomado y modificado de Gil, E., 2014.

Experimentos posteriores llevados a cabo por **Rodríguez (2016)** demuestran que en ratones tratados con BSS-4 (1.5 mg/kg) aumenta la expresión del factor de crecimiento neuronal (NGF) en el hipocampo, promoviendo así el aumento de la expresión del receptor

TrkA (Figura 16), por lo que concluye que, el aumento de la señalización del NGF podría ser la vía mediante la cual el BSS-4 promueve la mejora del aprendizaje y la memoria.

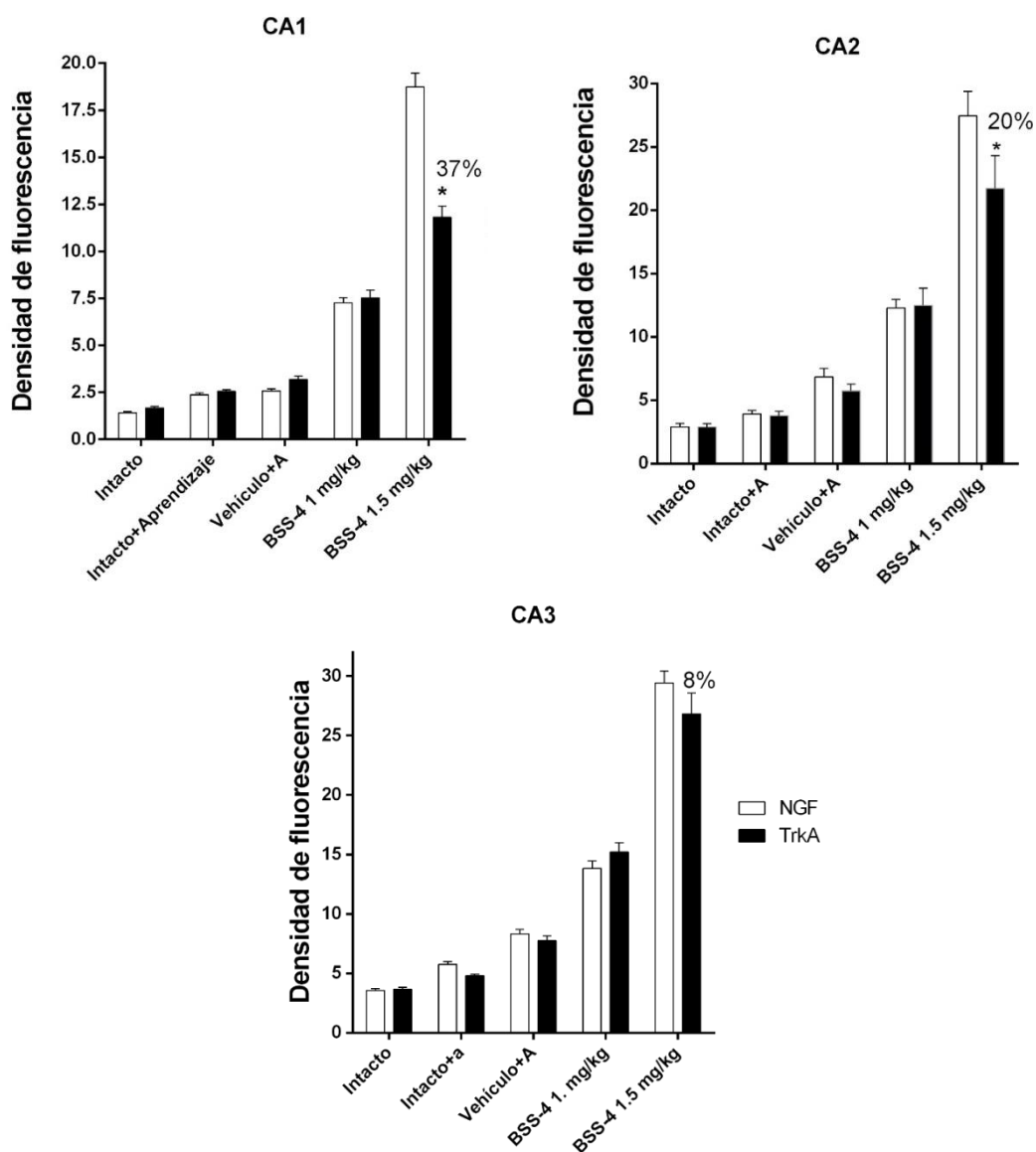


Figura 16. La administración de BSS-4 (1.5 mg/kg) aumenta la expresión de NGF y su receptor TrkA en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo de ratón. Existen diferencias significativas en las expresiones del NGF y el TrkA en el grupo tratado con BSS-4 ($p \leq 0.05$). las barras muestran el valor de las medias \pm EEM. Prueba de U de Mann-Whitney. Tomado y modificado de Rodríguez, 2016.

1.9 Modelos de inflamación

El uso de modelos animales es necesario para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano, y la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la inflamación requiere de modelos que permitan evaluar las propiedades antiinflamatorias de ciertos agentes, así como la producción de mediadores inflamatorios en los sitios de daño. Los modelos *in vivo* son los más utilizados, pues permiten valorar dichas características; entre los más utilizados debido a su alta reproducibilidad se encuentran los modelos pleurales de inflamación (inmune y no inmune), modelos de inflamación aguda en la oreja, modelos de artritis y lesión tisular, como este último, existe el modelo de inflamación de la almohadilla plantar, utilizado ampliamente para la evaluación de nuevos agentes antiinflamatorios (**Winyard y Willoughby, 2003**).

1.10 Modelo de inflamación de la almohadilla plantar inducido por carragenina en rata.

La inflamación de la almohadilla plantar inducido con carragenina, es un método descrito por Winter y cols., (1962). Este modelo es utilizado para evaluar la producción de mediadores inflamatorios, propiedades antiinflamatorias de ciertos fármacos, así como la eficacia de compuestos analgésicos; mediante la administración de carragenina en la almohadilla plantar de rata o ratón. La carragenina (*Figura 17*) es un irritante que desencadena una respuesta inflamatoria de naturaleza aguda, no inmune y altamente reproducible. Esta respuesta inflamatoria suele cuantificarse por el aumento en el tamaño de la pata que es máximo alrededor de 3 y 5 h después de la inyección del inflamogeno (**Winter y cols., 1962, Fehrenbacher y cols., 2012**)

La cuantificación de la inflamación plantar se puede realizar mediante tres métodos:

- a) Medir la circunferencia de la pata (PC) por una longitud de hilo de algodón enrollado alrededor de la pata en el nivel del metatarso y apretarlo suavemente.
- b) El aumento de tamaño también se puede evaluar midiendo el grosor de la pata en el eje dorsal-plantar en el nivel del metatarso con un calibrador.

c) Mediante el uso de un pletismómetro, cuya evaluación es la más conveniente, rápida y precisa.

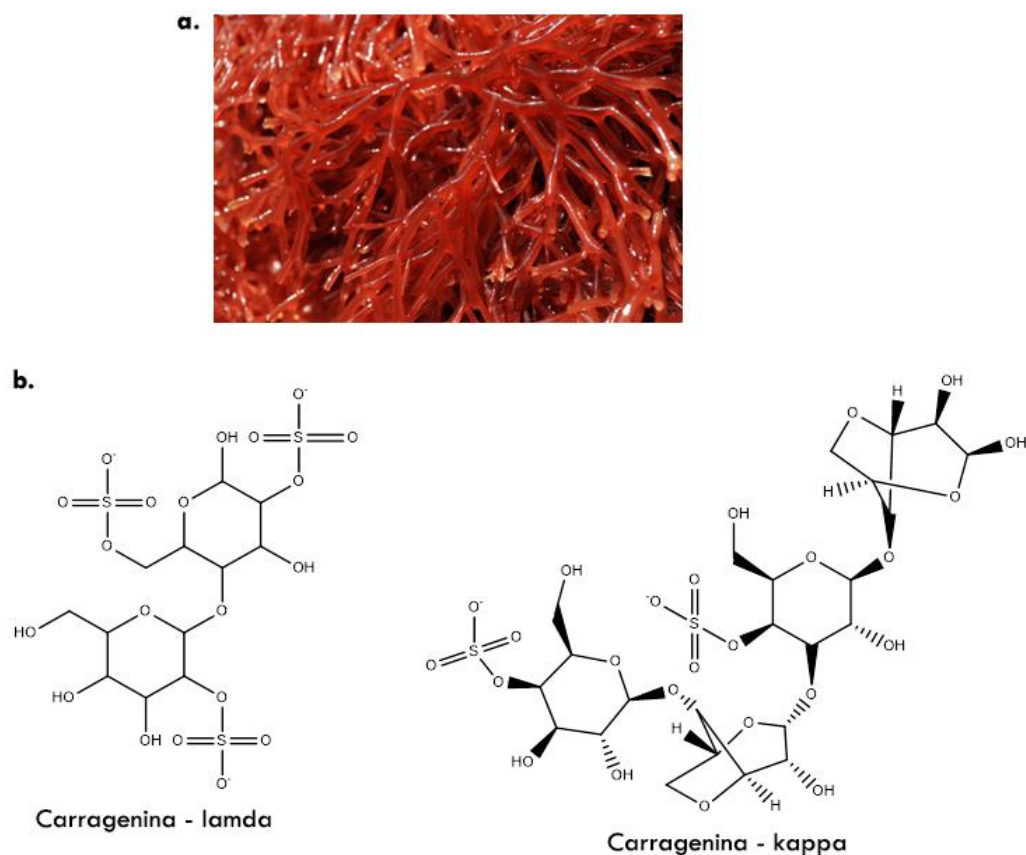


Figura 17. Estructuras de la carragenina. **a)** *Chondrus crispus*, el alga tradicional productora de carragenina, conocida como "musgo irlandés" (Necas, J. y Bartosikova, L., 2013). **b)** Estructura química de la carragenina λ y κ , mezcla utilizada como inductor de inflamación en el modelo de inflamación de la almohadilla plantar.

2. JUSTIFICACIÓN

La inflamación es una respuesta adaptativa que garantiza la supervivencia de los organismos ante estímulos y condiciones nocivas; muestra una gran variedad de mediadores moleculares implicados, regidos por diferentes mecanismos de inducción, regulación y resolución (Okin y Medzhitov, 2012).

Cuando estos procesos regulados sufren alteraciones, el sistema pone en marcha una respuesta de estrés para restaurar la homeostasis pero, si existe una falla en estos mecanismos de autorregulación y resolución del proceso inflamatorio, se desencadena una serie de procesos patológicos, los cuales, en su mayoría son tratados con fármacos antiinflamatorios altamente efectivos, como los glucocorticoides y los AINES, pero el uso de estos resultan, a largo plazo, en una serie de efectos adversos múltiples y variados (Czock y cols., 2005; Gensler, 2013).

La búsqueda de nuevas moléculas con alto potencial farmacológico ha demostrado que una gran variedad de plantas posee propiedades medicinales. La diosgenina, una sapogenina esteroideal, abundante en plantas del género *Dioscorea* y principal compuesto precursor en la fabricación de esteroides sintéticos, ha revelado tener efectos terapéuticos sobre procesos inflamatorios al actuar sobre la expresión de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-1 β (Jung y cols., 2010; Junchao y cols., 2017); potentes mediadores de los procesos inflamatorios cuyo equilibrio homeostático en el sistema, es indispensable y su papel patológico en los estados inflamatorios sistémicos son cada vez más reconocidos.

Los efectos de la diosgenina sobre el proceso inflamatorio y la síntesis de análogos estructurales que pudieran ser más efectivos (Fernández- Herrera y cols., 2009; Singh, M. y cols., 2014), así como su evaluación experimental, se han convertido en un campo relevante de estudio. Tal es el caso del triacetato de 22-oxocolest-5en-3, 16, 26-triilo (BSS-4), el cual ha demostrado tener un efecto neuroprotector y antiinflamatorio ante lesiones excitotóxicas en el hipocampo de rata (Trejo, 2013) con dosis menores a las que usualmente se han usado con Diosgenina. Por lo que la relación estructura química-actividad biológica, hace posible suponer que esta molécula posee propiedades antiinflamatorias que pueden ser evaluadas en un modelo experimental.

3. HIPÓTESIS

El efecto antiinflamatorio de la administración del derivado colestánico BSS-4 disminuye la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y de la interleucina 1 beta (IL-1 β) en un modelo de inflamación aguda.

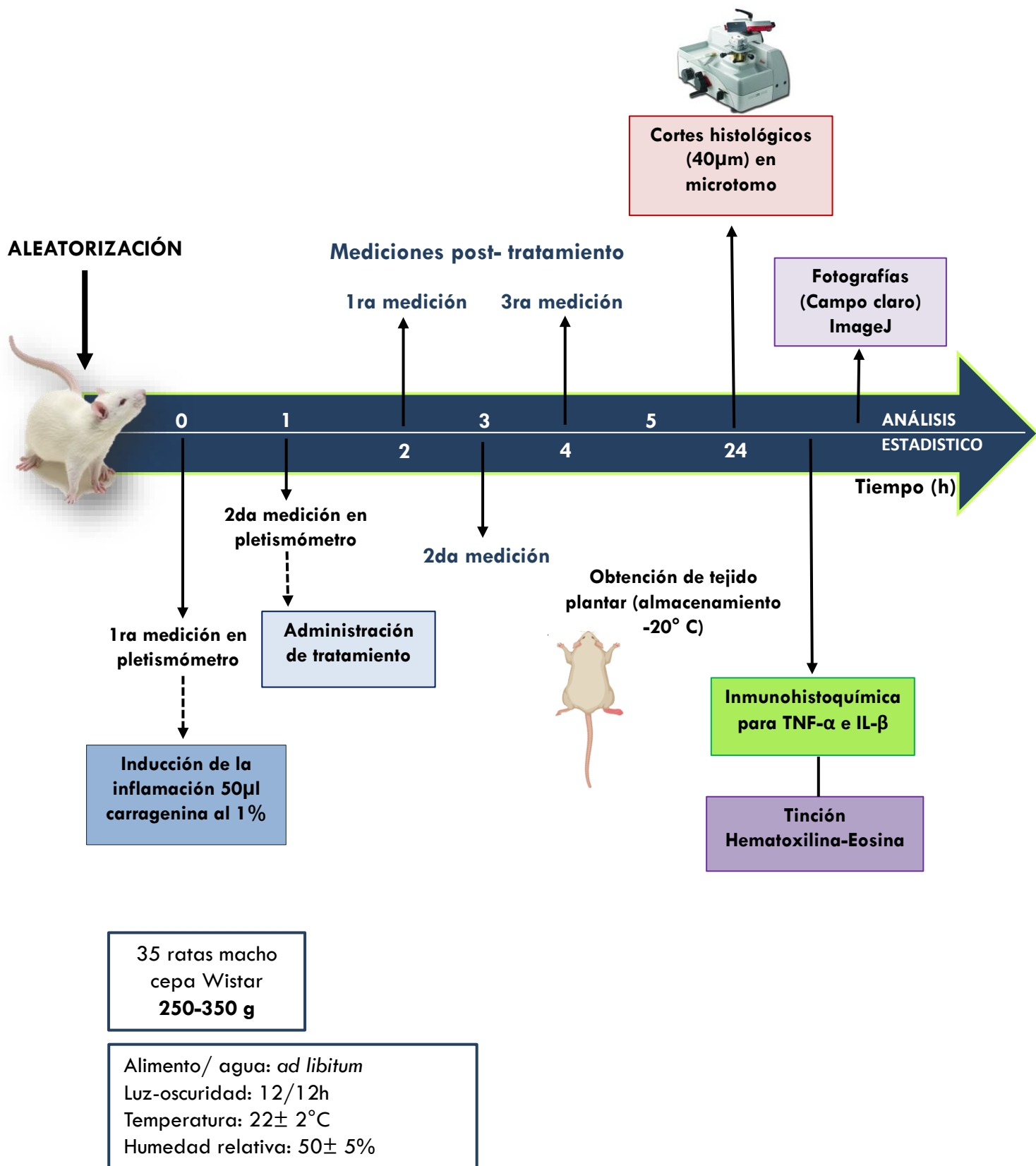
4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antiinflamatorio del derivado colestánico BSS-4 en un modelo de inflamación aguda.

4.1 Objetivos particulares

- ❖ Determinar la actividad antiinflamatoria del derivado colestánico BSS-4 en dosis de 0.5 y 1 mg/kg, en un cuadro de inflamación aguda producido por la administración de carragenina.
- ❖ Determinar la expresión de la citocina proinflamatoria TNF-alfa en tejido plantar mediante la técnica de inmunohistoquímica con peroxidasa.
- ❖ Determinar la expresión de la citocina proinflamatoria IL-1 β en tejido plantar mediante la técnica de inmunohistoquímica con peroxidasa.
- ❖ Comparación histopatológica de los tejidos obtenidos, mediante la tinción de hematoxilina y eosina.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Se emplearon 35 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250-350 g, provenientes del Bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, los sujetos fueron alojados en el vivario del laboratorio de Neuroquímica, en cajas individuales de plástico, agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz-oscuridad 12/12 h, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, y con humedad relativa de $50\pm 5\%$.

Durante su estancia en el vivario los sujetos recibieron *handling* durante 5 minutos todos los días para habituarlos al experimentador, además de 30 minutos de socialización desde su llegada hasta el día de la prueba para disminuir el estrés. El manejo de los animales se llevó a cabo bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que trata de las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de Laboratorio” (**Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001**). La experimentadora está certificada por el bioterio Claude Bernard de la BUAP en el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

Los sujetos fueron aleatorizados para formar los siguientes grupos experimentales:

Grupo	N
Carragenina (Carr.)	6
Carragenina + Solución Salina Isotónica	5
Carragenina + Dexametasona (0.5 mg/kg)	6
Carragenina + Vehículo	6
Carragenina + BSS-4 Dosis 1 (0.5 mg/kg)	6
Carragenina + BSS-4 Dosis 2 (1 mg/kg)	6

Tabla 3. Grupos experimentales.

6.2 Preparación de las soluciones

- **BSS-4:** Se preparó una solución madre con una concentración de 1mg/2ml, empleando como vehículo una solución 1:1 de solución buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4 y agua desionizada. La osmolaridad de la solución es de 301 mOsm/L. Esta solución se almacenó a 4°C .

- **Vehículo:** Solución 1:1, de Solución Buffer de Fosfatos (PBS) pH 7.4 y agua desionizada.
- **Carragenina:** Solución de carragenina al 1% (Sigma-Aldrich).
- **Dexametasona:** Solución inyectable (8 mg/2 ml) (AMSA Laboratorios). Cada ampolleta contiene fosfato sódico de dexametasona equivalente a 8mg de dexametasona en vehículo cbp 2ml.

6.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

6.3.1 Pletismómetro

Se utilizó un pletismómetro digital LE7500 (Panlab/ Harvard Apparatus) para la evaluación de la inflamación plantar, el cual consta de una unidad sensora y una unidad de control (*Figura 18*).



Figura 18. Pletismómetro Digital LE 7500 (Panlab/HARVARD) APPARATUS)

Este instrumento es utilizado para determinar la variación de volumen de las extremidades de los roedores, midiendo la variación del nivel del líquido al introducir la extremidad en un depósito; al introducir la extremidad en el recipiente cambia el nivel del líquido y la conductividad entre dos electrodos de platino previamente introducidos en la unidad sensora. Este cambio se expresa en mililitros.

6.3.2 Inducción de la inflamación plantar

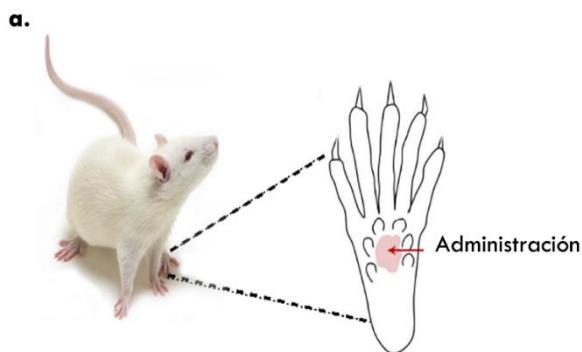
Los sujetos fueron trasladados desde el vivario al área de experimentación 30 minutos antes del inicio de la prueba para su habituación y reducción del estrés.

Previo a la inducción de la inflamación, las extremidades de los sujetos fueron marcadas con plumón de tinta indeleble a la altura tibio-dorsal de ambas extremidades anteriores. Posterior al marcaje, se realizó la primera medición (basal) de ambas patas traseras en el pletismómetro (Pletismómetro Digital LE7500 Panlab/Harvard Apparatus), cada medición se grabó en el equipo e inmediatamente fue registrada en la bitácora, así como también la hora en que se realizó.

Inmediatamente después, se indujo la inflamación aguda en la pata derecha, mediante el método de inflamación de la almohadilla plantar inducido por carragenina, el cual consiste en la administración vía subcutánea de 50 μ l de carragenina (Sigma-Aldrich) al 1% (**Nasiara y cols., 2019**) en el área de la aponeurosis plantar (*Figura 19a*).

Transcurrida una hora después de la administración de carragenina, se realizó una segunda medición (ambas patas) (*Figura 19b*) e inmediatamente la administración de los tratamientos vía intraperitoneal (i.p.).

Finalmente, las mediciones se realizaron cada hora después del tratamiento, durante un periodo de tres horas. Inmediatamente al término de la última medición se administró una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.), posteriormente fueron perfundidos vía intracardiaca con paraformaldehído al 4% en PBS durante aproximadamente 20 minutos.



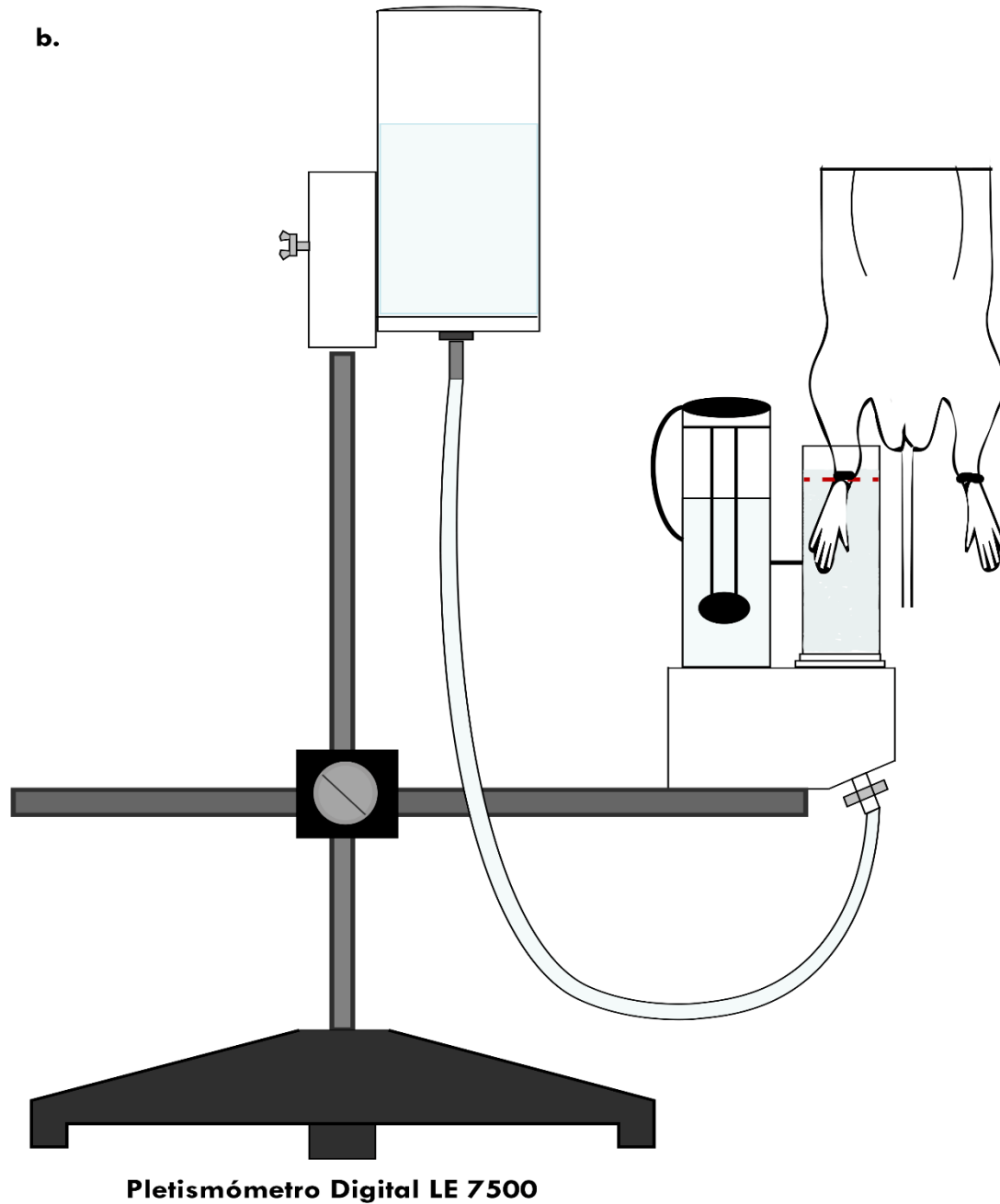


Figura 19. Inducción y evaluación de edema plantar inducido con carragenina. a) Administración de la carragenina en el área de la aponeurosis plantar. **b)** Evaluación de la inflamación en el pletismómetro, la unidad sensora detectará el volumen de agua desplazado al introducir la extremidad del sujeto.

6.3.3 Obtención de tejido plantar

Al término de la perfusión, se obtuvo el tejido plantar de ambas patas (*Figura 20a*), con ayuda de un bisturí y una placa de acrílico de 7x7 mm (*Figura 20b*), que permitió obtener tejidos de un mismo tamaño para todos los sujetos, cada tejido fue colocado en un microtubo bien identificado e inmediatamente almacenado a una temperatura de -20°C. Posteriormente en un micrótopo de deslizamiento (Leica SM 2010R) y mediante el enfriamiento del tejido con CO₂ se obtuvieron cortes longitudinales de 40 µm de espesor, los cortes obtenidos fueron colocados en PBS 1X frío para su posterior análisis mediante la técnica de inmunohistoquímica.

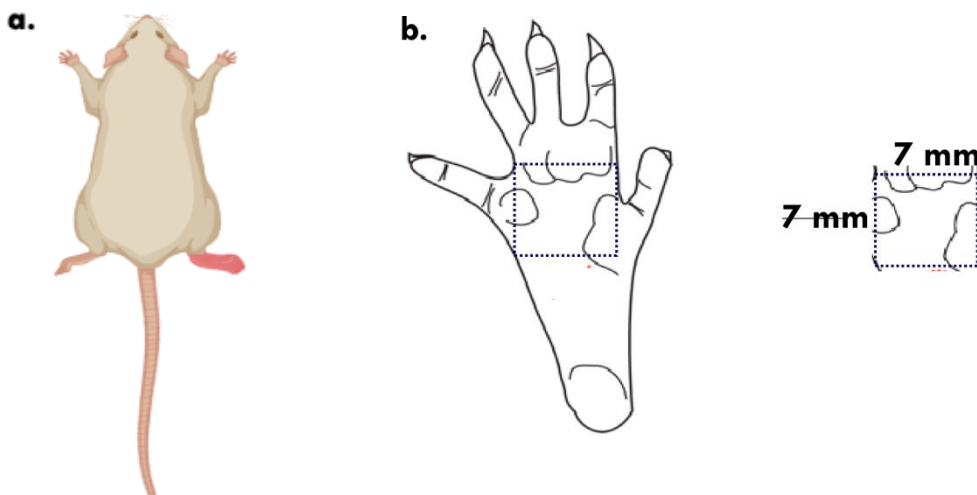


Figura 20. a) Obtención del tejido plantar. a. Se obtuvo el tejido plantar de ambas extremidades inflamada (derecha) y no inflamada (izquierda). b. El área contorneada corresponde es el área que se obtuvo, es decir, el aponeurisma plantar de la pata.

6.4. Inmunohistoquímica HRP/DAB

Esta técnica permite la determinación de moléculas específicas en los tejidos, mediante la combinación de un anticuerpo y una reacción química (**Kim y cols., 2016**). Este método indirecto se utilizó para la detección de TNF- α e IL-1 β , mediante el uso de dos anticuerpos (primario y secundario). El anticuerpo secundario está acoplado a biotina. La estreptavidina en complejo con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) se une a la biotina. En presencia de peróxido de hidrogeno (H₂O₂), la HRP oxida al cromógeno 3,3-

diaminobencidina (DAB), formando un producto insoluble que se visualiza con la presencia de un color marrón oscuro (*Figura 21*).

Para este ensayo, se seleccionaron 5 tejidos al azar de cada uno de los grupos, de cada tejido se eligieron 20 cortes al azar, de los cuales 10 fueron para la identificación de TNF- α y 10 para IL-1 β . La distribución anterior, fue para ambas extremidades, derecha e izquierda.

Tras la selección de los tejidos, se realizó el procesamiento de los cortes en placas de cultivo celular, el primer paso consistió en realizar 3 lavados para permeabilizar el tejido con PBS-Triton-100x al 0.2% (10 minutos/lavado), se continuó con el bloqueo para inhibir la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en PBS-Tx (TRITON X -100) por 10 minutos, posteriormente 3 lavados con PBS-Tx al 0.2% (10 minutos/lavado). Para el bloqueo del marcaje inespecífico se utilizó NGS (Normal Goat Serum) al 10% por 10 minutos, después 3 lavados con PBS-Tx al 0.2 % (10 minutos/lavado). Se realizó la incubación con el anticuerpo primario contra TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, INC, TNF- α (N-19): sc-1350, dilución 1:250) y contra IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology, INC, IL-1 β (H-153): sc-7884, dilución 1:100) por 1 noche en el oscilador a temperatura ambiente.

Se procedió con la segunda parte de la inmunohistoquímica, iniciando con 3 lavados con PBS-Tx al 0.2% (10 minutos/lavado) y posteriormente la incubación con el anticuerpo secundario biotilado para TNF- α (Vector, Anti-rabbit IgG: BA-1000, dilución 1:500) y para IL-1 β (Vector, Anti-goat IgG: BA-9500, dilución 1:500) por 1 hora en el oscilador a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS-Tx al 0.2% (10 minutos/lavado), para después realizar la incubación en estreptavidina (dilución 1:5000) durante una hora, seguido de 3 lavados con PBS 1X (10 minutos/lavado); al finalizar los lavados, se realizó el revelado en oscuridad con 3,3-diaminobencidina (DAB) en PBS 1X y H₂O₂ (3%), la reacción finaliza hasta observar un color marrón en el tejido, que fue de aproximadamente 8 minutos para TNF- α y 15 minutos para IL-1 β , finalmente se hicieron los 3 lavados con PBS IX.

Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados al 3%, con resina sintética. Se observaron en el microscopio de campo claro Leica DM 100 LED y se capturaron fotografías de todo el tejido a una magnificación de 40X. Las fotografías se analizaron con el programa ImageJ.

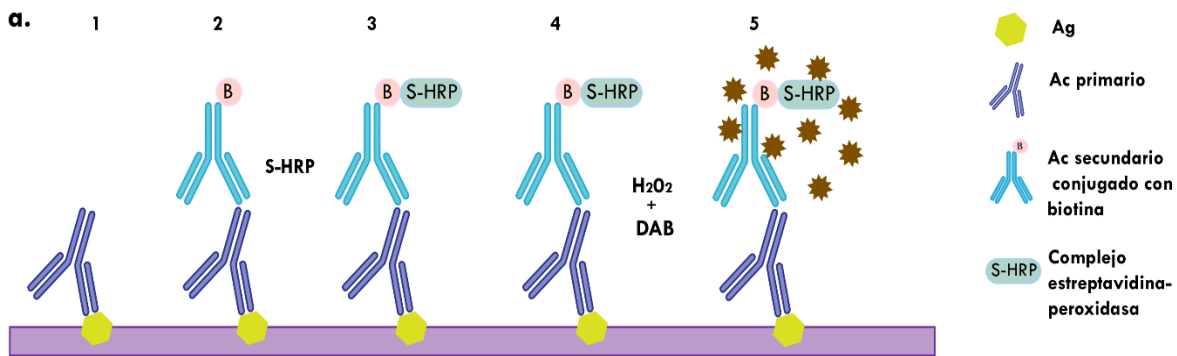


Figura 21. Inmunohistoquímica HRP/DAB. a. 1. El Ac primario reconoce al antígeno al unirse a una secuencia aminoacídica específica. 2. El anticuerpo secundario acoplado a biotina reconoce al anticuerpo primario. 3. Posteriormente se a la biotina se une el complejo estreptavidina-peroxidasa (S-HRP). 4. Finalmente, en presencia de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y 3,3 diaminobencidina (DAB) reacciona con la HRP, 5. manifestándose a través de una coloración marrón oscuro en el tejido.

6.5. Tinción de hematoxilina-eosina

La tinción de hematoxilina-eosina (H-E) ha sido ampliamente utilizada y es esencial para reconocer varios tipos de tejidos y los cambios morfológicos que forman la base de un diagnóstico (De Haan, K. y cols., 2021). El procedimiento tiñe al núcleo y el citoplasma con colores contrastantes para diferenciar fácilmente los componentes celulares, siendo la hematoxilina un colorante básico (catiónico) que tiene afinidad por las estructuras ácidas como el núcleo, mientras que la eosina es un colorante ácido (aniónico) con afinidad a componentes básicos como el citoplasma.

Se realizó la tinción de hematoxilina-eosina previo y posterior al marcaje inmunohistoquímico (contratinción), para el análisis del tejido, su estructura y celularidad (Figura 22).

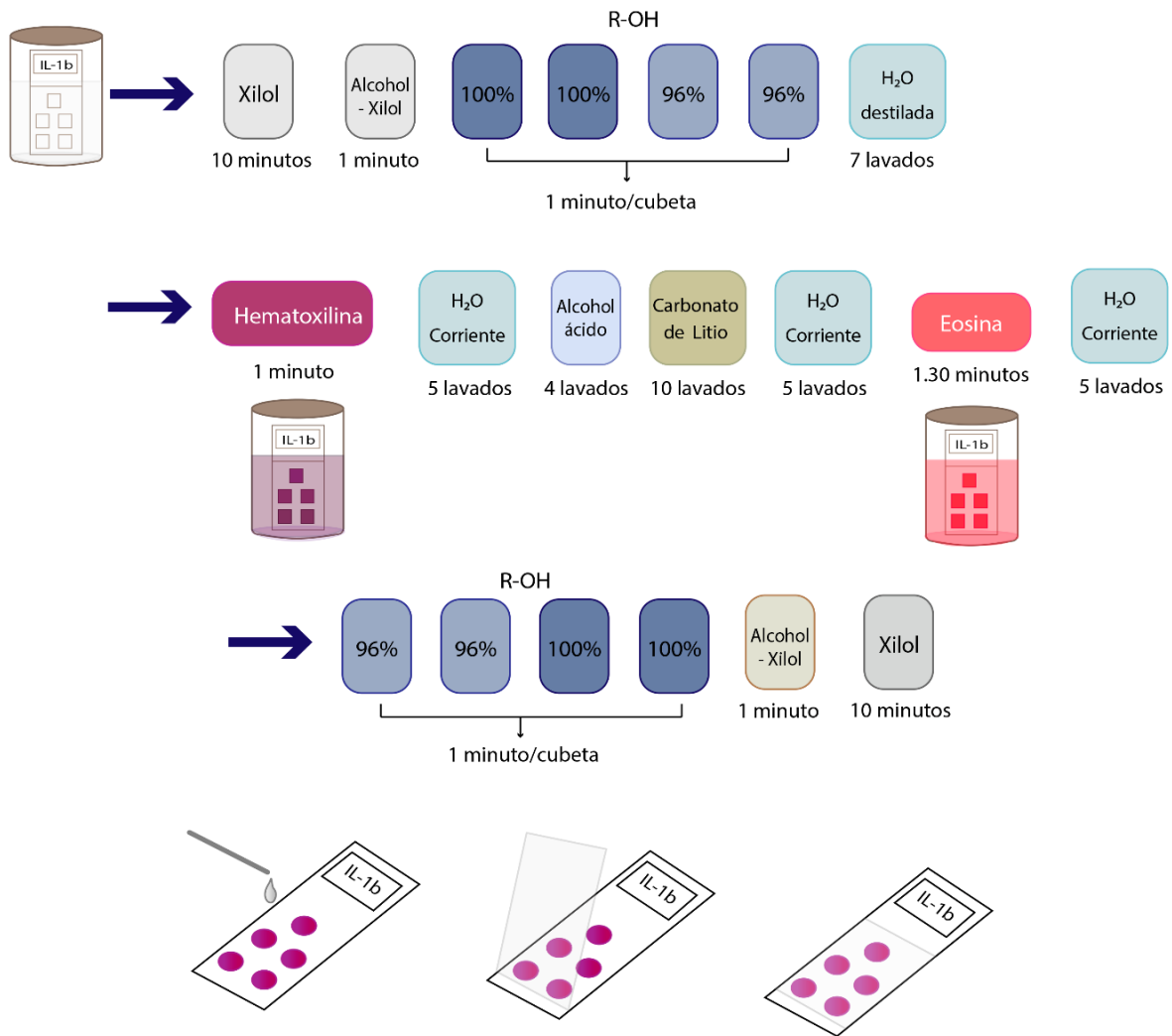


Figura 22. Protocolo de la tinción de hematoxilina-eosina. La hidratación de los tejidos se realizó en una batería de alcoholes en concentraciones decrecientes, seguida de la etapa de tinción con hematoxilina y eosina, posteriormente la deshidratación se realizó con cambios en alcohol a concentraciones crecientes. Finalmente, la protección de los tejidos mediante el montaje con resina sintética. Tomado y modificado de Feldman y Wolfe, 2014.

6.6. Análisis estadístico de los datos

Los resultados correspondientes a la variación del volumen de la pata inflamada reflejaron una distribución normal, por lo que se empleó un ANOVA de medidas repetidas para un factor, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar que pares de tratamientos difieren significativamente. Se aceptaron diferencias significativas cuando el valor de $p \leq 0.05$.

Los datos obtenidos del análisis de las fotografías para determinar la variación de la expresión del TNF- α y de la IL-1 β fueron sometidos a la prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para conocer que pares de tratamientos difieren significativamente. Se aceptaron diferencias significativas cuando el valor de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos se abordan a continuación:

7.1. Efecto antiinflamatorio del derivado colestánico BSS-4 en el modelo de inflamación de la pata con carragenina

El efecto antiinflamatorio fue evaluado en el modelo de inflamación de la pata inducido por carragenina en rata, el cual es ampliamente utilizado para la evaluación de compuestos con posible actividad antiinflamatoria.

Se administró por vía subcutánea una solución de λ - κ carragenina en la aponeurosis plantar de la pata derecha de cada sujeto, provocando así una reacción inflamatoria aguda y localizada, la cual se manifestó con el aumento del tamaño de la pata, este aumento fue medido en unidades de volumen (ml) con un pletismómetro manual, instrumento que determina la variación de volumen, al medir la variación de nivel de líquido después de introducir la extremidad en un depósito; permitiendo así el seguimiento de la evolución del proceso inflamatorio y así detectar las posibles propiedades antiinflamatorias de sustancias farmacológicas.

Los resultados en este experimento muestran el efecto antiinflamatorio de la dexametasona (0.5 mg/kg), un importante fármaco con potente acción antiinflamatoria, y el BSS-4, fármaco derivado de la diosgenina, en dos dosis diferentes 0.5 y 1 mg/kg (*Figura 23*).

Se observó que en aquellos sujetos que no fueron administrados con ningún tratamiento y aquellos que fueron administrados con solución salina o vehículo, tuvieron un aumento de volumen continuo hasta el momento de la última medida; entre estos grupos no se encontró ninguna diferencia significativa; sin embargo, en los animales tratados con BSS-4 en dosis de 0.5 mg/kg, el volumen (inflamación) disminuyó, siendo estadísticamente significativo en la hora 3 ($*p \leq 0.05$) y en la hora 4 ($****p \leq 0.0001$) respecto al grupo carragenina, por otra parte, los sujetos que fueron administrados con dosis de 1 mg/kg del BSS-4 también mostraron una disminución de la inflamación estadísticamente significativa solo en la hora 4 ($*p \leq 0.05$) respecto al grupo carragenina. Finalmente se aprecia que la inflamación disminuyó en el grupo dexametasona (0.5 mg/kg) donde hubo diferencias significativas en

la hora 3 y 4 (**** $p \leq 0.0001$) respecto al grupo carragenina y en la hora 4 ($\#\#p \leq 0.01$) respecto al grupo BSS-4 (1 mg/kg).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos BSS-4 (0.5 mg/kg) y BSS-4 (1 mg/kg).

GRUPOS	INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN (ml) \pm EEM		
	1 hora	2 horas	3 horas
Carragenina (Control negativo)	1.54 \pm 0.05	1.62 \pm 0.05	1.71 \pm 0.04
Solución Salina Isotónica	1.48 \pm 0.05	1.60 \pm 0.03	1.71 \pm 0.02
Vehículo	1.47 \pm 0.05	1.54 \pm 0.05	1.63 \pm 0.05
Dexametasona (Control positivo)	1.35 \pm 0.04	1.22 \pm 0.02	1.15 \pm 0.02
BSS-4 (0.5 mg/kg)	1.40 \pm 0.04	1.34 \pm 0.03	1.26 \pm 0.03
BSS-4 (1 mg/kg)	1.39 \pm 0.05	1.41 \pm 0.01	1.45 \pm 0.05

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria. En la tabla se resumen de los valores obtenidos al medir las extremidades de los sujetos experimentales en el pletismómetro después de administrar los tratamientos. Se muestra el valor de las medias \pm EEM.

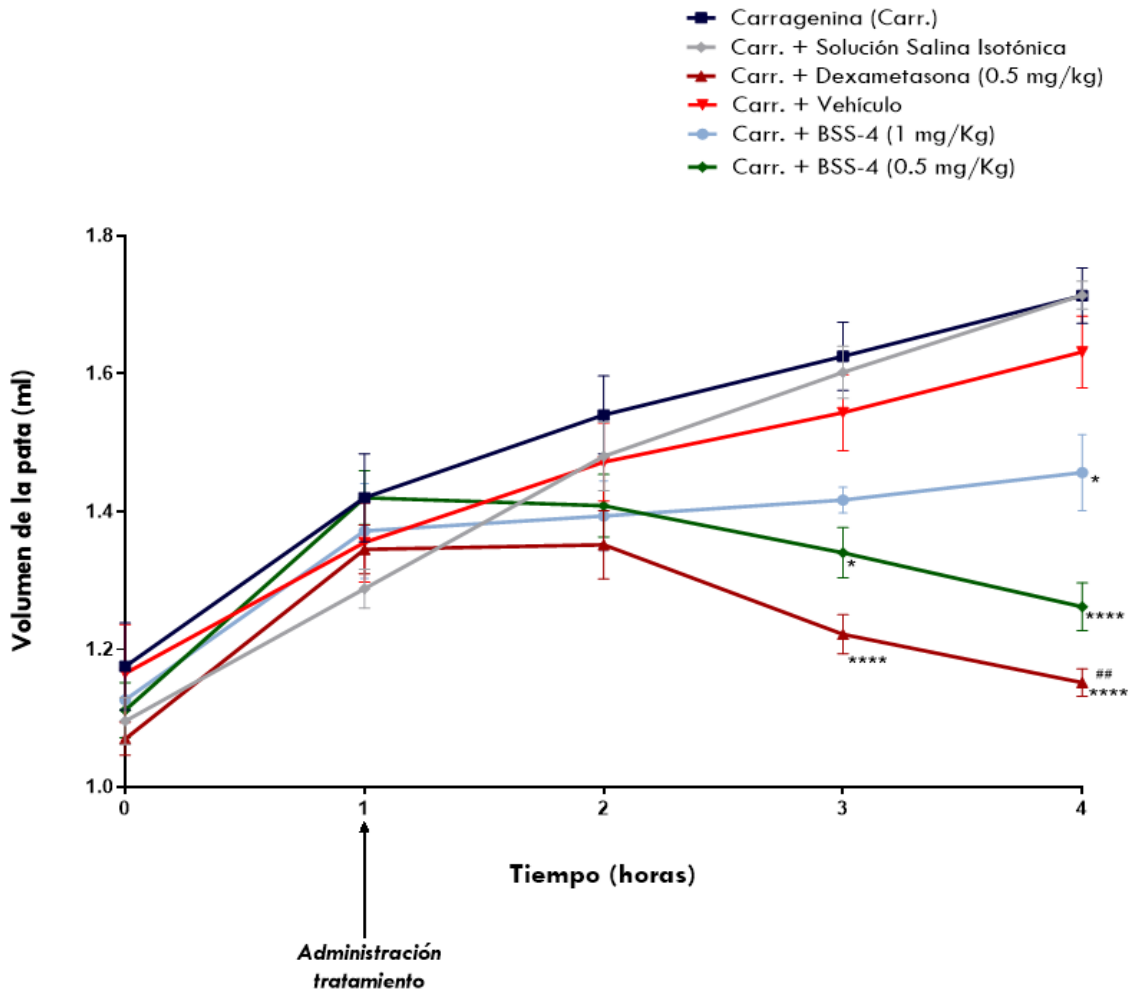


Figura 23. La administración aguda de BSS-4 disminuye la inflamación inducida con carragenina. En la gráfica se muestra el aumento del volumen de la extremidad inflamada respecto al tiempo, previo y posterior a la inyección subplantar de carragenina (1%, 50 μ l). Se aprecia que en los grupos administrados con BSS-4 (0.5 y 1 mg/kg) y dexametasona (0.5 mg/kg) el volumen disminuyó con respecto al grupo carragenina, encontrando diferencias significativas 2 horas después de la administración del tratamiento. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=6), (n=5). ANOVA de medidas repetidas para un factor y prueba de comparaciones múltiples de Tukey (* $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$).

Por otra parte, se calculó el porcentaje de inhibición en los diferentes lapsos de tiempo (1, 2, 3 horas post-tratamiento), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{control negativo} - \text{tratado}}{\text{control negativo}} \times 100$$

Obteniendo los siguientes resultados *tabla 5*:

Grupos	% de Inhibición de la inflamación			% Promedio de Inhibición
	1 hora	2 horas	3 horas	
Dexametasona	12.21%	24.80%	32.75%	23%
BSS-4 (0.5 mg/kg)	8.57%	17.54%	26.33%	17.48%
BSS-4 (1 mg/kg)	9.55%	12.80%	14.94%	12.43%

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la inflamación. En la tabla se muestra el porcentaje de inhibición de cada uno de los tratamientos en cada uno de los lapsos de tiempo evaluados.

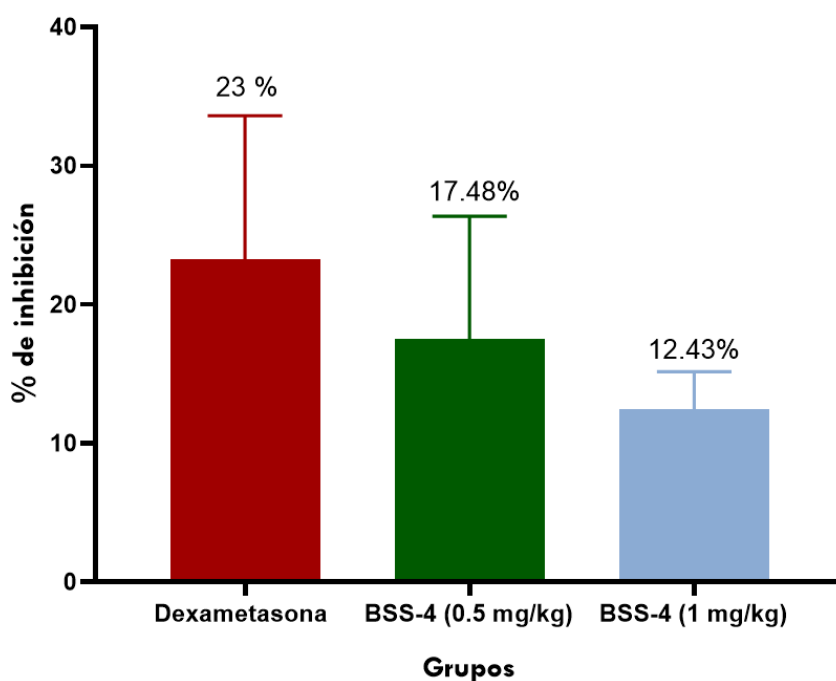


Figura 24: Porcentaje de inhibición de la inflamación. En la gráfica se observa el porcentaje de inhibición de cada uno de los tratamientos, observando un mejor efecto en la dexametasona y el BSS-4 (0.5 mg/kg)

Así mismo se midieron los volúmenes de la pata contralateral (izquierda) a la cual no se le indujo inflamación, esto con el objetivo de tener un control de las medidas, al no haber una condición que provocara el aumento de volumen durante el tiempo evaluado, se espera que este sea constante como se muestra en la gráfica de la *Figura 24*.

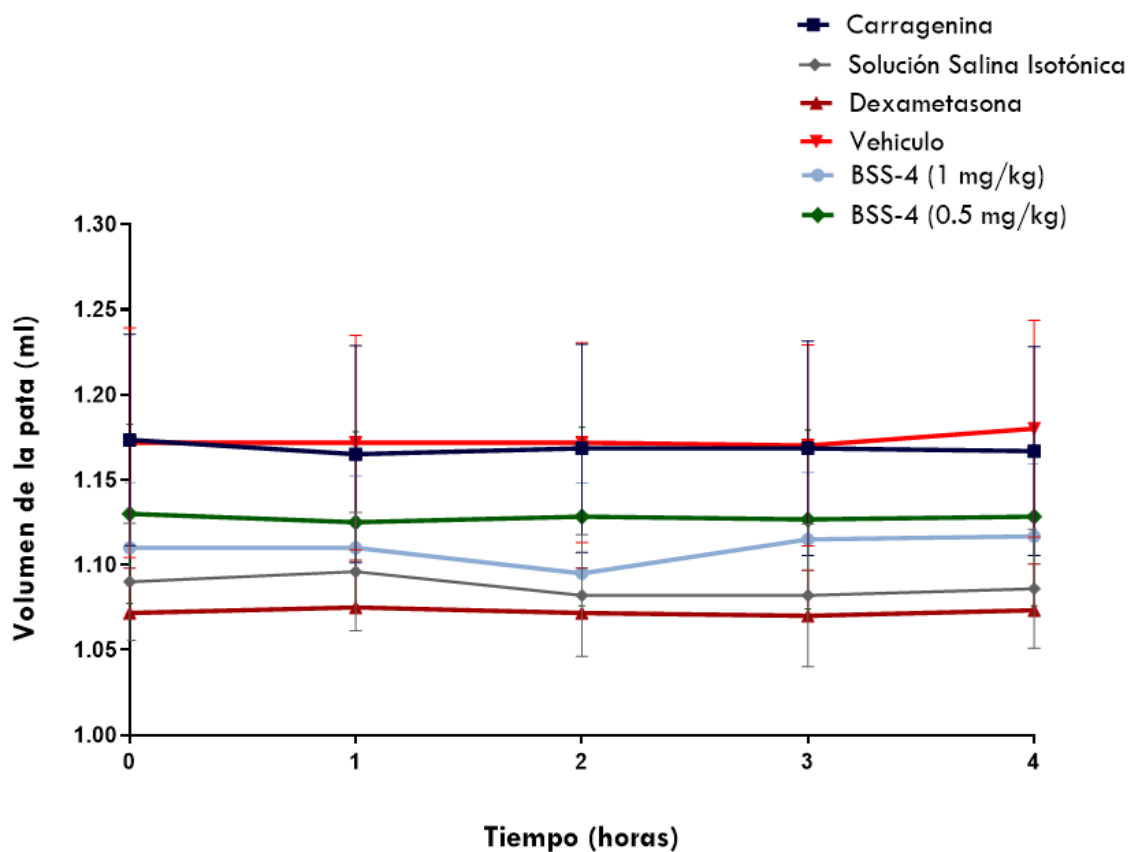


Figura 25. Volumen de la extremidad izquierda (control). En la gráfica se muestra el volumen correspondiente a la extremidad izquierda, por grupo. El volumen se mantuvo constante durante el transcurso del tiempo evaluado para todos los grupos. Las barras representan las Medias \pm EEM.

7.2 Efecto del derivado colestánico BSS-4 sobre la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-1-beta (IL-1 β) en el tejido plantar

Se obtuvo el tejido plantar (izquierdo y derecho) de cada uno de los sujetos, para después ser almacenados a una temperatura de -20° C. Posteriormente, de cada tejido se obtuvieron 20 cortes longitudinales histológicos viables de 40 μ m de grosor, de los cuales se seleccionaron 16 cortes al azar que se emplearon para las pruebas inmunohistoquímicas.

	No. de tejidos	Cortes/tejido		Fotografías/grupo	
		TNF-A	IL-1 β	TNF-A	IL-1 β
Derecha	5	9	8	50	45
Izquierda	5	9	8	50	45

Tabla 6. Resumen del número de fotografías obtenidas por grupo. Se muestra el número de cortes y las fotografías obtenidas para cada uno de los marcadores evaluados.

Partiendo de la premisa de que el BSS-4 tiene una estructura similar a la de los corticoesteroides antiinflamatorios y por ende un posible efecto antiinflamatorio el cual se ejerce principalmente al bloquear la expresión de citocinas proinflamatorias; se realizó el análisis de marcadores específicos: el TNF- α y la IL-1 β , pues son importantes mediadores positivos de la inflamación y de los principales blancos terapéuticos para el tratamiento de diversos procesos patológicos.

El análisis de estas citocinas se realizó no solo en el tejido inflamado sino también en el tejido sano (*Figura 26A y 27A*), esto, con la finalidad de contar con un control negativo, pues al no haber inflamación se espera la ausencia de la marca obtenida por la inmunohistoquímica, propia de la presencia de la citocina en el tejido.

En las fotomicrografías obtenidas se aprecia el marcaje positivo para TNF- α e IL-1 β en el tejido inflamado y en contraste, se observa la ausencia de la marca en los tejidos sanos (control negativo).

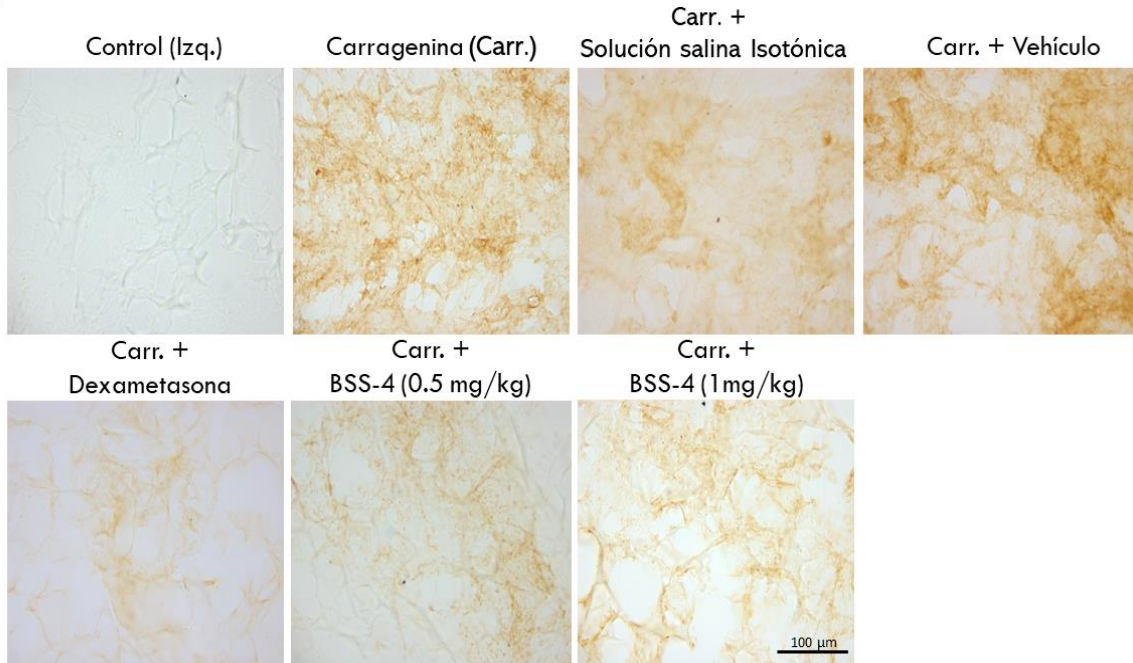
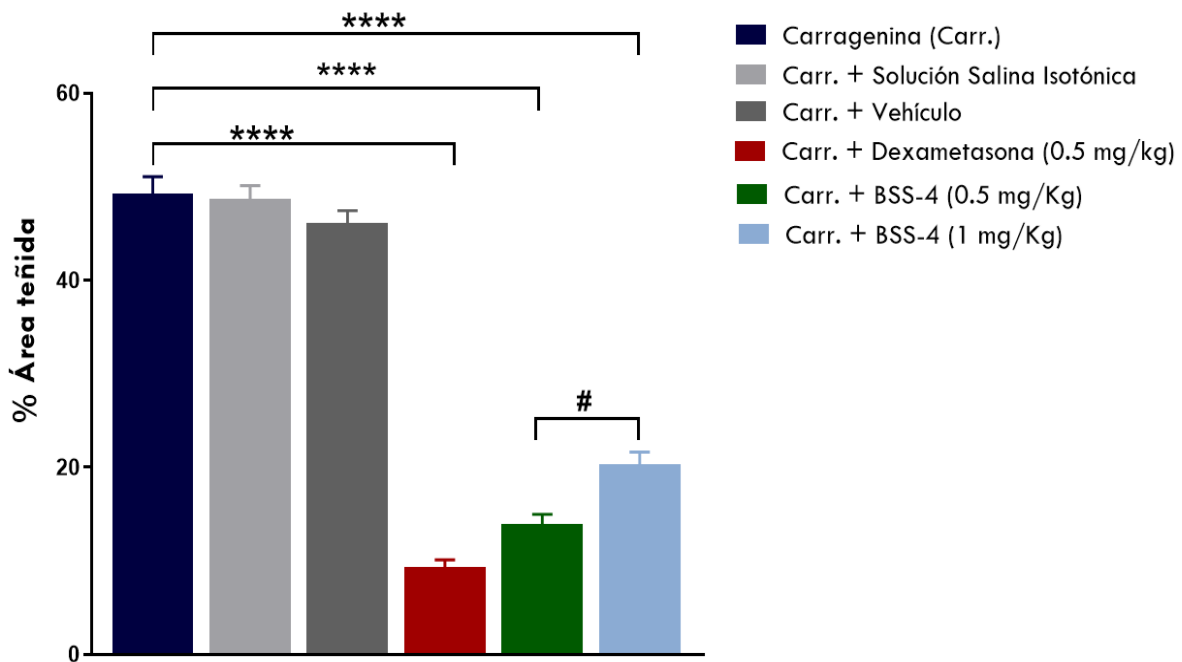
A**B**

Figura 26. La administración aguda del BSS-4 disminuye la expresión de TNF- α en tejido inflamado. A) Se muestran fotomicrografías representativas de las inmunohistoquímicas para TNF- α (barra de escala correspondiente a 100 μ), tejido derecho e izquierdo. **B)** El marcaje positivo fue cuantificado como porcentaje de área teñida con el programa ImageJ. Se observa la disminución de la expresión del TNF- α en los grupos tratados con Dexametasona y BSS-4 en ambas dosis. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=5). Prueba de ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey (****p \leq 0.0001).

Como se aprecia en la gráfica (*Figura 26B*), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos Carr. + vehículo y Carr. + solución salina isotónica al comparar con el grupo Carragenina. En el grupo administrado con dexametasona (0.5 mg/kg) se observa que la expresión de TNF- α disminuyó significativamente respecto al grupo carragenina (**** $p \leq 0.0001$); por otra parte, en los grupos administrados con BSS-4 (0.5 mg/kg) y (1 mg/kg) la expresión del TNF- α es 2 veces menor que el grupo administrado con carragenina (**** $p \leq 0.0001$).

Al comparar los tratamientos se aprecia que existe diferencia estadísticamente significativa ($\#p \leq 0.05$) del grupo administrado con BSS-4 (1 mg/kg) respecto al grupo BSS-4 (0.5 mg/kg).

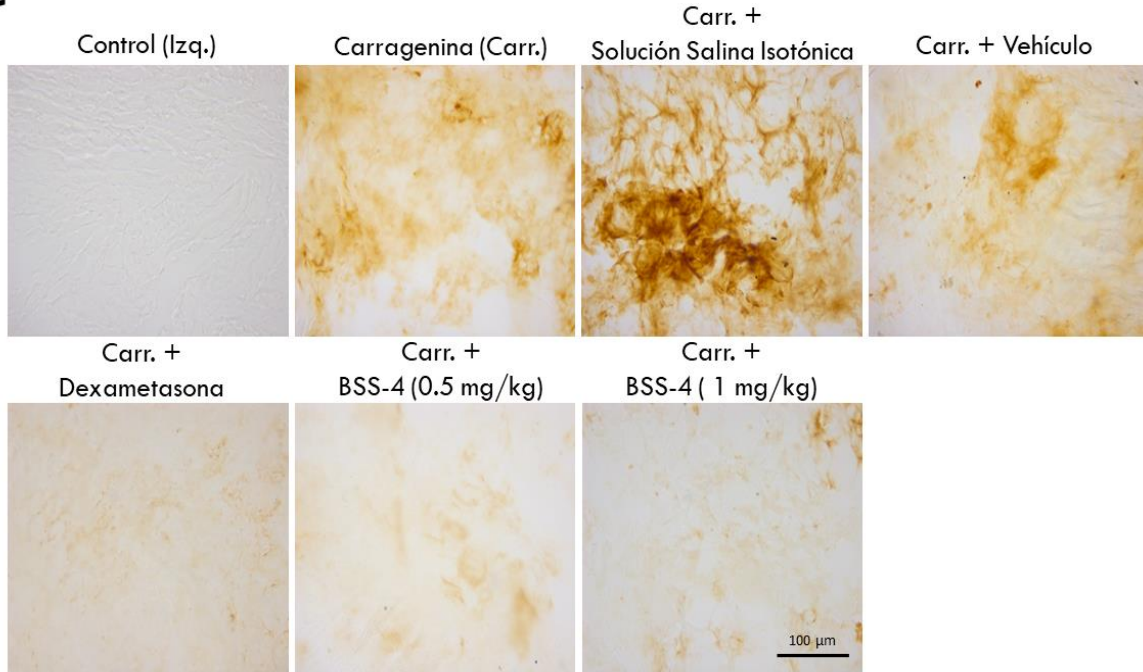
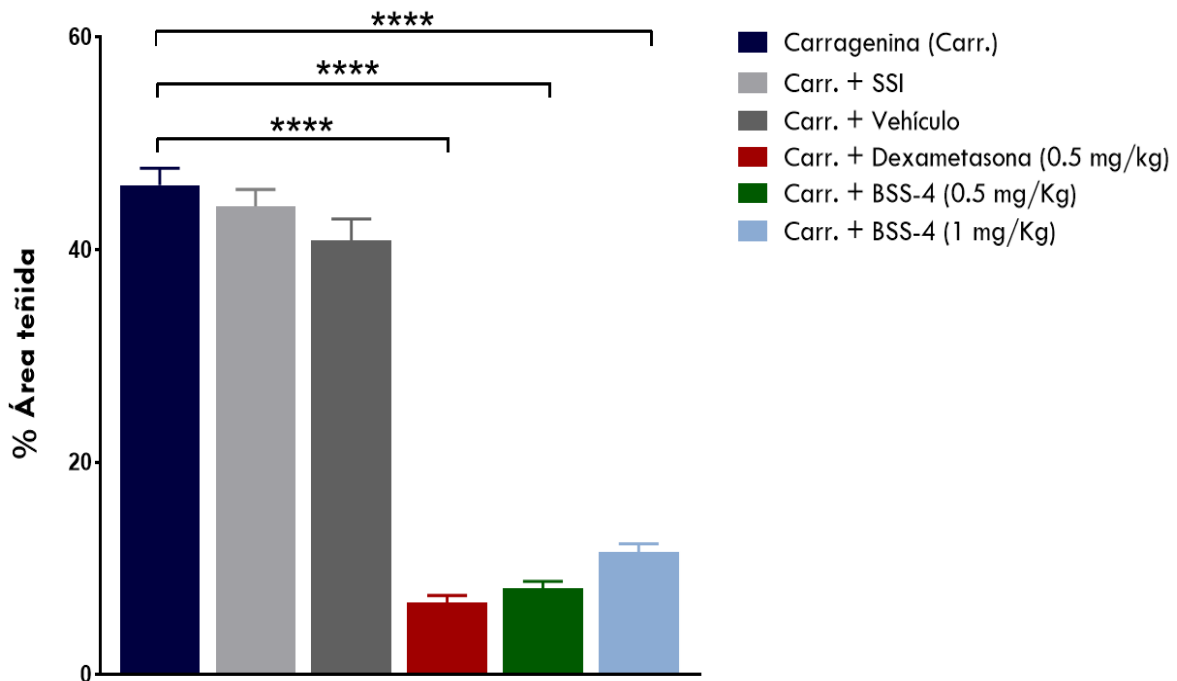
C**D**

Figura 27. La administración aguda del BSS-4 disminuye la expresión de la IL-1 β en tejido inflamado. **C)** Se muestran fotomicrografías representativas de las inmunohistoquímicas que muestran inmunoreactividad a IL-1 β (40X, barra de escala correspondiente a 100 μ m), tejido derecho e izquierdo. **D)** El marcaje positivo fue cuantificado como porcentaje de área teñida con el programa ImageJ. Se observa la disminución de la expresión de la IL-1 β en los grupos tratados con Dexametasona y BSS-4 en ambas dosis en comparación con el grupo carragenina. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=5). Prueba de ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey (****p \leq 0.0001).

La expresión de la interleucina 1-beta (*Figura 27B*) es menor en aquellos grupos que recibieron tratamiento. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo carr. + dexametasona (**** $p \leq 0.0001$) respecto al grupo carragenina; además en los grupos administrados con BSS-4, carr. + BSS-4 en dosis 0.5 mg/kg (**** $p \leq 0.0001$) y carr. + BSS-4 en dosis 1 mg/kg (**** $p \leq 0.0001$) se aprecia una diferencia estadísticamente significativa al compararlo con el grupo administrado solamente con carragenina.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de IL-1 β entre los grupos administrados con dexametasona y BSS-4.

7.3. Estudio histopatológico de tejido inflamado

Se realizó el estudio histopatológico de los cortes obtenidos del tejido plantar mediante la tinción de hematoxilina-eosina (HE), aplicada al tejido inflamado y no inflamado; por otra parte, se utilizó como contratinción (HE-IHQ) en los tejidos analizados con la técnica de inmunohistoquímica.

Al término de la obtención de los cortes, se montaron laminillas con cortes de tejido sano y tejido inflamado, las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo el protocolo de la tinción de hematoxilina-eosina, lo que permitió así observar los posibles cambios en la citoarquitectura del tejido.

En la *figura 28a* se muestra la estructura del tejido analizado, como se aprecia se trata de la piel, que además de tener una estructura capaz de establecer interacciones entre componentes celulares de la epidermis y la dermis, posee varios tipos de células con potencial para producir o responder a diversos estímulos endógenos o exógenos.

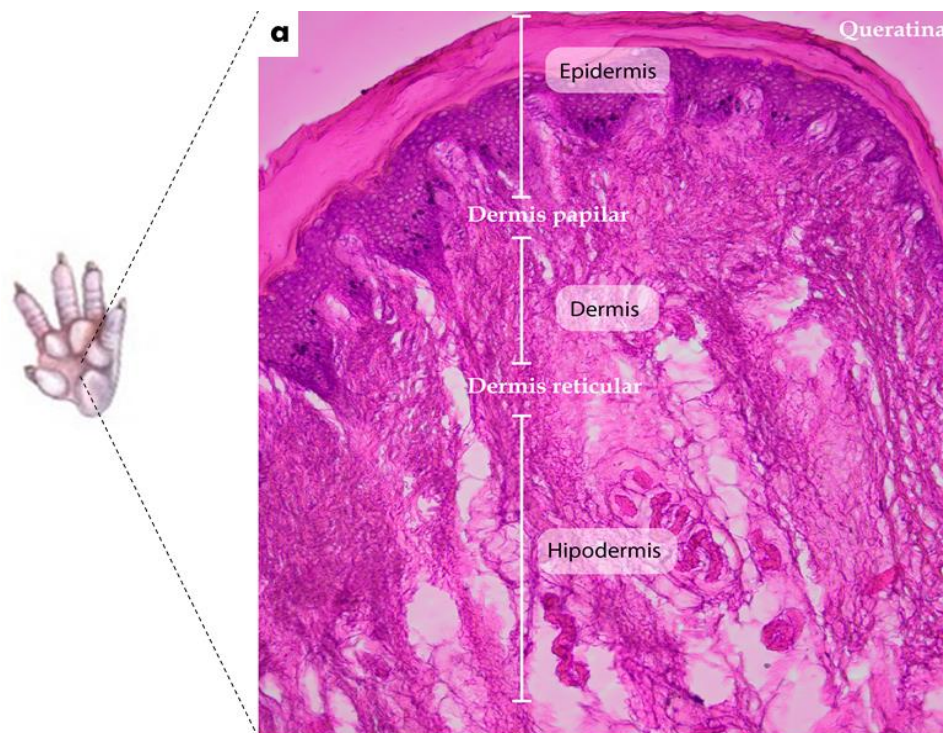


Figura 28a. Corte longitudinal de tejido plantar de rata (20X). Se muestra la estructura de la piel constituida por tres capas sucesivas; la epidermis, formada por epitelio queratinizado; la dermis, constituida en su mayor parte por tejido conjuntivo y la hipodermis integrada principalmente por adipocitos. Tinción de hematoxilina-eosina.

La epidermis consiste en múltiples capas de epitelio escamoso estratificado (*Figura 28b*), compuestas casi por completo de células epiteliales especializadas llamadas queratinocitos.

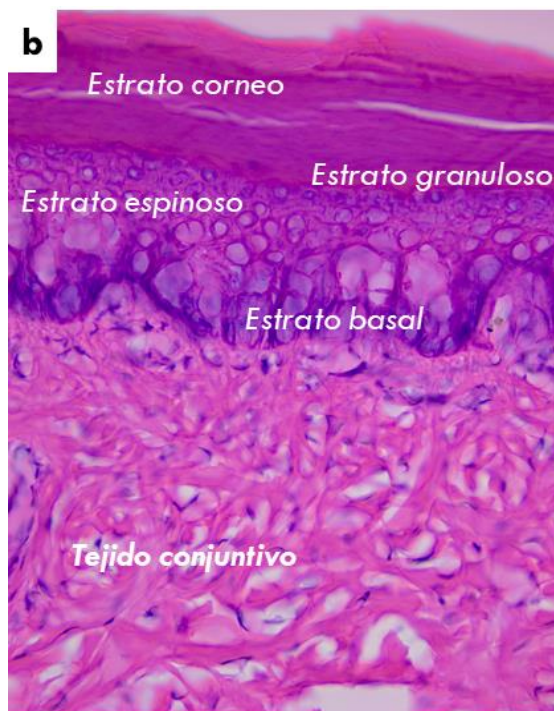


Figura 28b. Corte longitudinal de tejido plantar de rata (40x). b. La capa basal de queratinocitos, anclada en la membrana basal, está proliferando continuamente y su progenie de células en maduración se desplaza hacia arriba y se diferencia hasta formar varias capas diferentes. En la capa superior, llamada estrato córneo, las células sufren una muerte programada, con lo que se forma una barrera impermeable rica en queratina y lípidos que es importante para la protección contra los microorganismos, así como contra factores físicos y químicos perjudiciales. Tinción de hematoxilina-eosina.

La dermis por su parte es rica en células como macrófagos, mastocitos, fibroblastos, por mencionar algunos e histológicamente más compleja, pues está constituida por colágeno, elastina y fibras reticulares; estos tejidos conectivos sostienen a los vasos sanguíneos y linfáticos, así como las terminaciones nerviosas. Finalmente, la hipodermis es la capa más profunda de la piel y está integrada principalmente por una red de colágeno y adipocitos.

Como se mencionó anteriormente la carragenina es un agente irritante que se emplea ampliamente en modelos de inflamación, principalmente en estudios que involucran el análisis de medicamentos con posibles propiedades antiinflamatorias. La inyección de este agente produjo un edema intenso caracterizado por la afluencia de células inflamatorias en los tejidos epiteliales y conjuntivos, por lo que se puede esperar que la estructura del tejido sufra cambios, es por ello por lo que, se analizó la histología en cada uno de los tratamientos.

En el panel de fotomicrografías que se muestra en la *figura 29* se observa que, en el tejido correspondiente a la extremidad izquierda (control), la estructura histológica es

normal, sin ningún cambio en las capas epidérmica y dérmica, y sin infiltración celular aparente.

En los sujetos administrados con carragenina, carr. + solución salina isotónica y carr. + vehículo, hubo cambios en la capa dérmica observando una infiltración celular masiva de neutrófilos, células polimorfonucleares que juegan un papel central en la inflamación.

Por otro lado, los grupos administrados con carr. + dexametasona, carr. + BSS-4 (0.5 mg/kg) y carr. + BSS-4 (1 mg/kg) muestran menos infiltración celular en la capa dérmica en comparación con los tejidos administrados solo con carragenina.

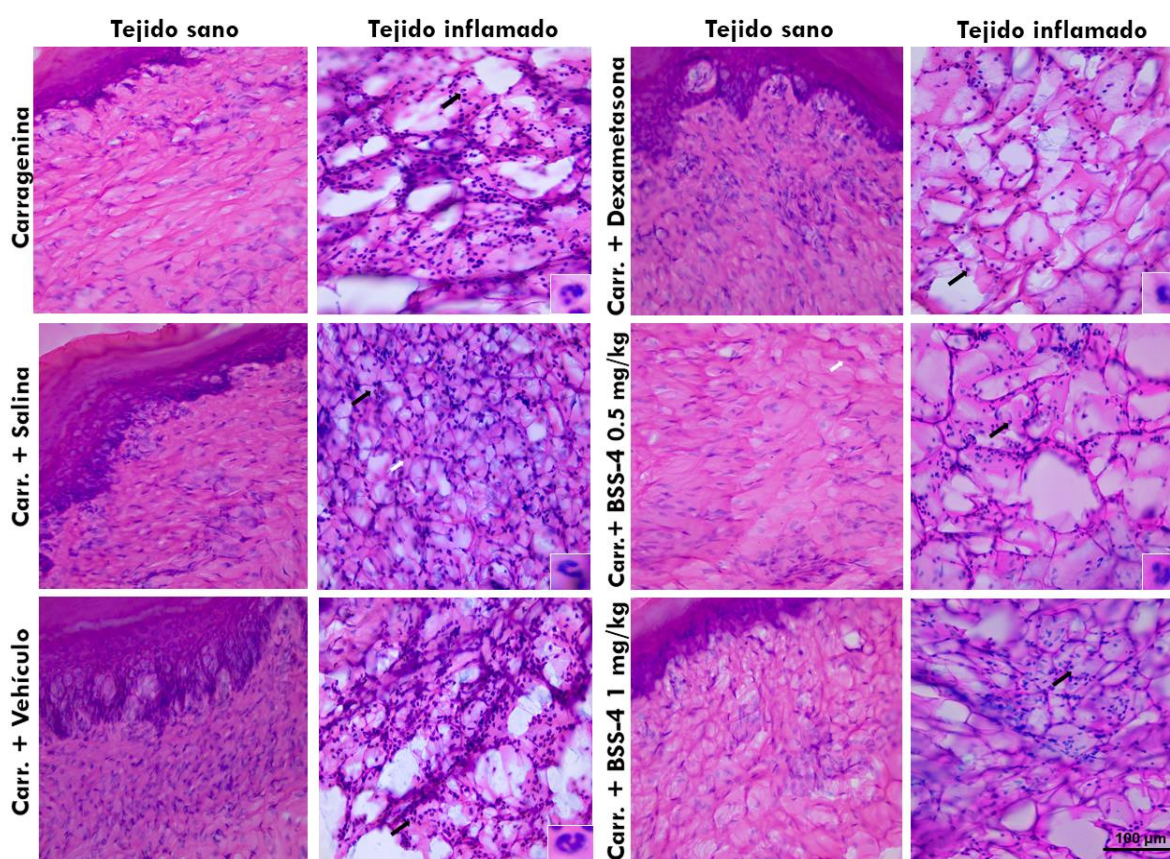


Figura 29. Tinción con hematoxilina-eosina en tejido plantar de rata. Fotomicrografías representativas del análisis histopatológico (40×, barra = 100 µm) de tejidos pertenecientes a las extremidades izquierda y derecha de ratas sometidas al modelo de inflamación inducido por carragenina y teñidas con hematoxilina-eosina. Las imágenes correspondientes al tejido inflamado muestran infiltrado celular en la capa dérmica. Las flechas negras indican células polimorfonucleares (neutrófilos), en los controles no se observan cambios estructurales, ni infiltrado celular.

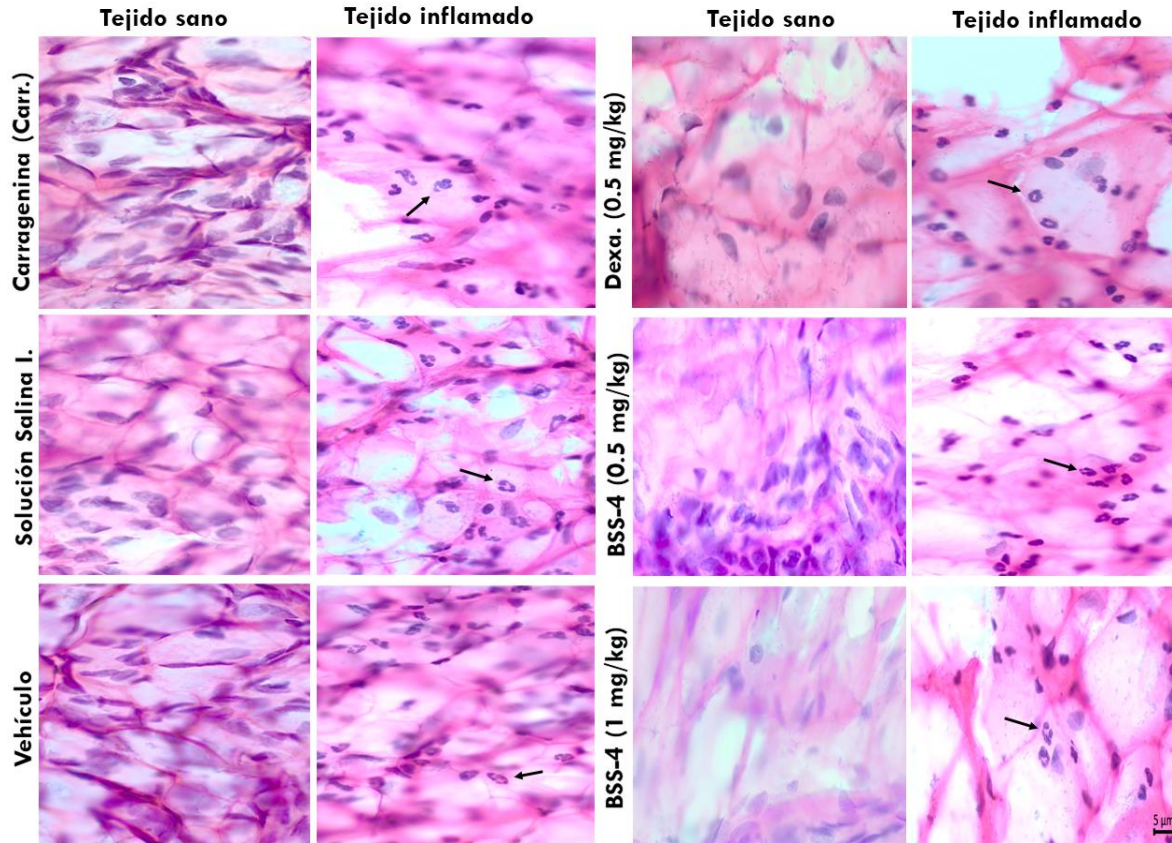


Figura 30. Tinción de hematoxilina-eosina en tejido plantar de rata (100X). El tejido correspondiente a la extremidad intacta (izquierda) se observa íntegro, observando principalmente fibroblastos, células características del tejido conjuntivo sano. En contraste con el tejido inflamado (derecha) donde se aprecia infiltrado celular principalmente neutrófilos, flechas negras.

La tinción de H-E fue utilizada como contratinción a la marca obtenida mediante el tratamiento inmunohistoquímico, gracias a ello fue posible observar la localización exacta de la coloración marrón propia de la presencia de las citocinas, apreciándola en el citoplasma de algunas células, como lo pueden ser los neutrófilos, caracterizados por ser células redondas de 10-14 μm de diámetro, con un núcleo con dos a cinco lóbulos conectados por un fino hilo de cromatina; y macrófagos, caracterizados por ser células de gran dimensión y tener un núcleo único y central.

El análisis inmunohistoquímico reveló una abundante expresión de TNF- α e IL-1 β en aquellos tejidos pertenecientes a los grupos que fueron administrados con carragenina, carr. + solución salina isotónica y carr. + vehículo, y con ayuda de la tinción (*Figura 31 y 32*) se comprobó que la presencia de neutrófilos es también mayor en estos grupos, en comparación con los grupos administrados con carragenina, pero que si tuvieron un tratamiento (dexametasona y BSS-4 en sus dos dosis).

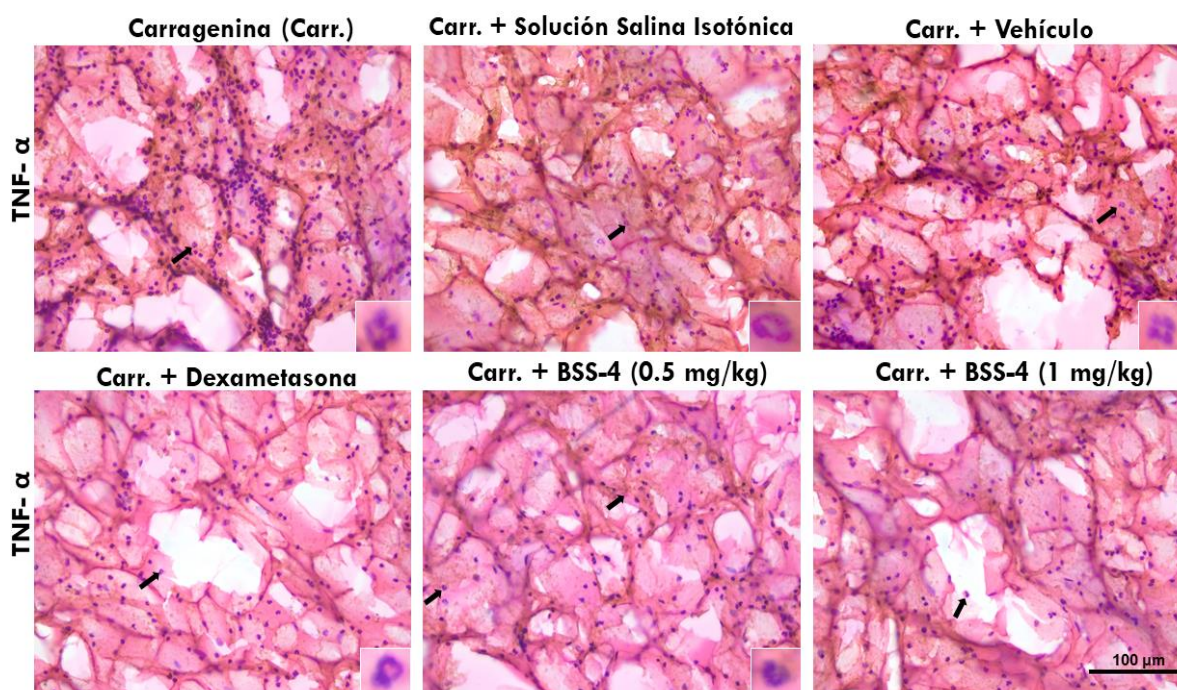


Figura 31. Fotomicrografías representativas de la inmunohistoquímica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En cada una de las imágenes (40X, barra=100 μm) se aprecian células características de la inflamación, principalmente neutrófilos. Es posible además observar una coloración marrón en su citoplasma, propia de un marcaje positivo a TNF- α

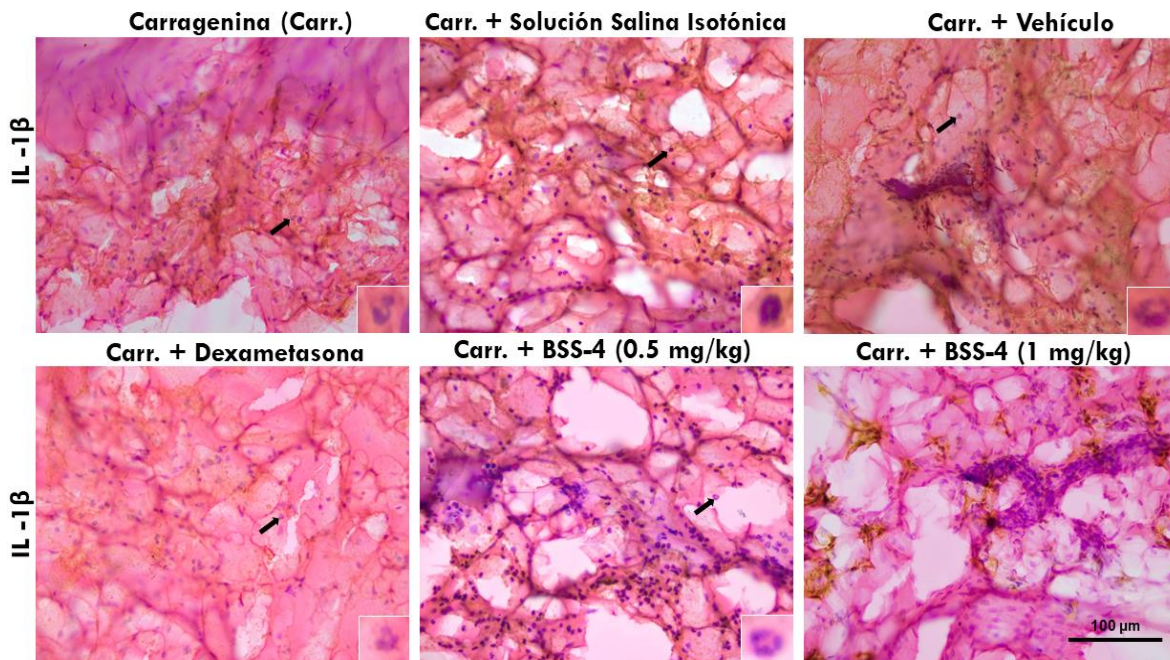


Figura 32. Fotomicrografías representativas de la inmunohistoquímica para la Interleucina 1-beta. En cada una de las imágenes (40X, barra=100μm) se aprecian células características de la inflamación, principalmente neutrófilos. Es posible además observar una coloración marrón en su citoplasma, propia de un marcaje positivo a IL-1β.

A continuación, se muestra otro panel de fotografías (*figura 33 y 34*) con mayor aumento (100X), que permitió observar el marcaje de la inmunohistoquímica, además de una mejor apreciación del tipo de células en el tejido.

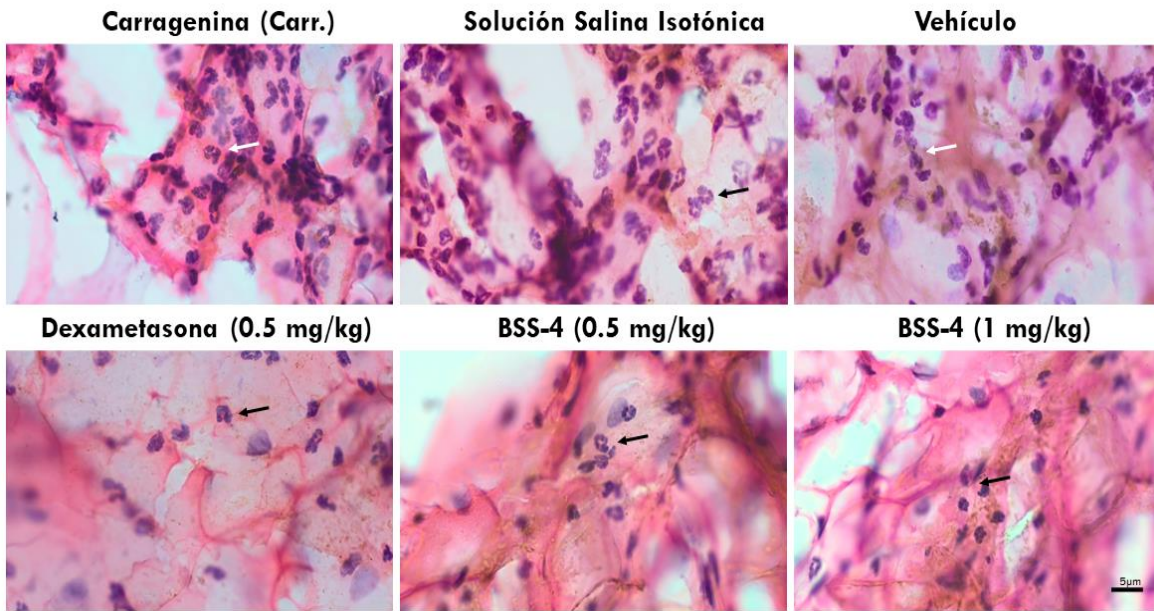


Figura 33. Marcaje positivo a TNF- α con tinción de contraste (H&E). En cada una de las imágenes se observan neutrófilos, células características del proceso inflamatorio, además del marcaje positivo para el Factor de Necrosis tumoral alfa, la cual se aprecia en gran parte de la matriz extracelular. Las flechas negras/blancas indican células polimorfonucleares. (100X, barra=5 μ m).

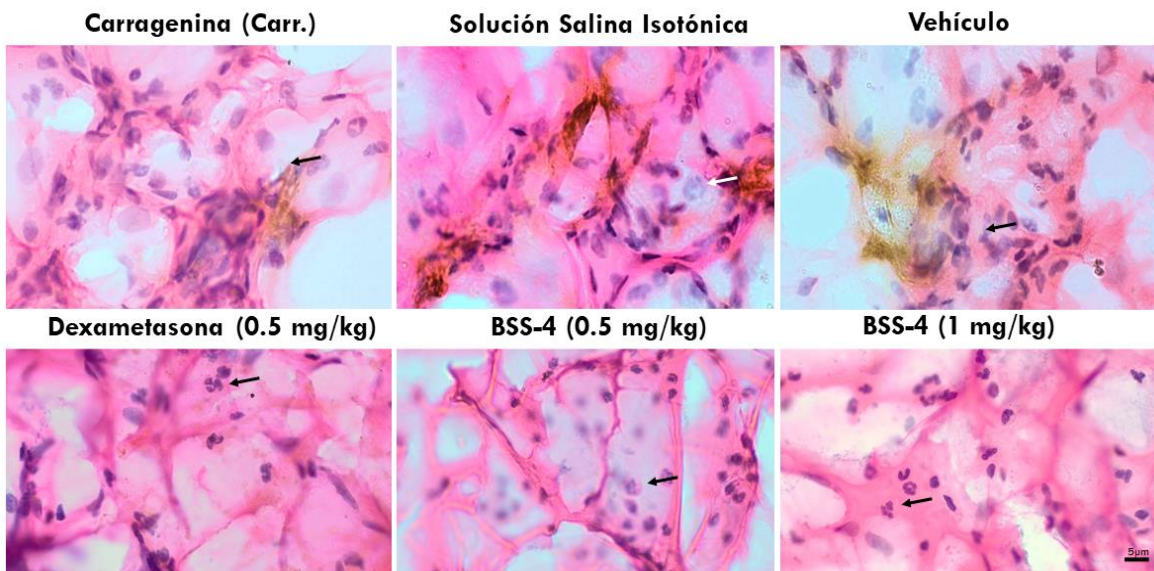


Figura 34. Marcaje positivo a IL-1 β con tinción de contraste (H&E). En cada una de las imágenes se observan neutrófilos, células características del proceso inflamatorio, además del marcaje positivo para la Interleucina 1-beta, la cual se aprecia en gran parte de la matriz extracelular en los grupos que no recibieron tratamientos. Las flechas negras/blancas indican células polimorfonucleares. (100X, barra=5 μ m).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La respuesta desencadenada en el proceso inflamatorio agudo tiene como principal objetivo la eliminación del estímulo nocivo y, el inicio del proceso de restablecimiento homeostático, los eventos e interacciones celulares y moleculares minimizan eficientemente el daño y contribuyen a la resolución de este. Cuando la inflamación aguda no es controlada suele evolucionar a un proceso crónico, que más tarde dará lugar a procesos patológicos graves (**Medzhitov, 2008; Sugimoto y cols., 2016**). No obstante, existen fármacos valiosos para el tratamiento de la inflamación, los AINES y los glucocorticoides.

Los glucocorticoides se emplean ampliamente en el tratamiento del dolor agudo y crónico, resultante de procesos inflamatorios. Aunque estos fármacos presentan un potente efecto antiinflamatorio es bien sabido que tienen efectos secundarios importantes, aunque esto dependerá de la dosis del fármaco y la duración del tratamiento (**He y cols., 2014**).

En un esfuerzo por desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la inflamación, en este trabajo se evaluó el BSS-4, un derivado de la diosgenina, una saponina que ha recibido gran atención como un nuevo fármaco terapéutico, candidato para el tratamiento de diversas enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, metabólicas (diabetes tipo 2, síndrome metabólico) e inflamatorias (artritis reumatoide, asma y fibrosis hepática) (**Jesus y cols., 2016; Parama, D. y cols., 2020**). Partiendo de la premisa de que la modificación química en ciertas estructuras les confiere actividades biológicas específicas y de importancia médica, ha demostrado que la relación estructura química-actividad biológica es fundamental en la búsqueda de moléculas que puedan tener un alto potencial terapéutico.

Los primeros resultados obtenidos en este trabajo muestran que la administración del BSS-4 en dosis de 0.5 y 1 mg/kg en animales intactos, disminuye la inflamación inducida con carragenina (*Figura 23*), estadísticamente significativo en comparación con los grupos control carragenina, carragenina + SSI y carragenina + vehículo, después de 2 horas administrado el fármaco, sin embargo, este efecto no se observó en comparación con el control positivo (Dexametasona a dosis de 0.5 mg/kg), por lo tanto, es posible entonces deducir que el BSS-4 tienen un efecto antiinflamatorio evidente, apreciando un mejor efecto con la dosis de 0.5 mg/kg pero, no un mejor efecto que la dexametasona.

Para complementar los datos anteriores, se calculó el porcentaje de inhibición de la inflamación producida por la administración de la carragenina, confirmando así, que la dexametasona disminuyó la inflamación al tener un porcentaje de inhibición del 23%, es decir, un 5.5 % más que el BSS-4 en dosis 0.5 mg/kg; mientras que el BSS-4 (0.5 mg/kg) tuvo un porcentaje de inhibición del 17.48%, 5.0% más que el BSS-4 (1mg/kg) que tuvo un 12.43 %, afirmando así un mejor efecto de la dosis más baja.

El modelo de inflamación de la almohadilla plantar inducido por carragenina es un modelo de inflamación aguda que implica una variedad de mediadores inflamatorios en su desarrollo y que permite evaluar las propiedades antiinflamatorias de nuevas moléculas (**Winter y cols., 1962**). La inyección de carragenina en la superficie subplantar de la pata de rata induce un edema bifásico. La fase temprana se observa alrededor de una 1 hora y está caracterizada por la liberación de histamina, serotonina y bradicinina, mientras que la fase retardada (posterior a una hora) se atribuye a la infiltración de neutrófilos, prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina 1 beta (IL-1 β) (**Posadas y cols., 2004; Halici y cols., 2007**).

La evaluación de la respuesta inflamatoria se realizó durante un periodo de 5 horas, suficientes para establecer un proceso agudo y poder evaluar la actividad antiinflamatoria, este mecanismo representa una secuencia de respuestas dinámicas y organizadas que incluyen eventos celulares y vasculares; la respuesta que ocurre en la microvasculatura normalmente aparece en pocos minutos después de la lesión tisular, iniciando con eventos vasculares rápidos, como la vasodilatación que da lugar a la entrada de mediadores inflamatorios, produciendo el edema intersticial, por otra parte, mediadores como la histamina, algunas interleucinas y los leucotrienos, estimulan la infiltración intensa de leucocitos en pocos minutos (**Mansouri, M. T. y cols., 2015**). Entre los leucocitos, los neutrófilos son las primeras células inflamatorias que se reclutan en el sitio de inflamación.

El efecto del BSS-4 se observó después de una hora administrada; esto sugiere que el compuesto juega un papel importante en la fase aguda de la inflamación y su acción podría estar relacionado con un efecto inhibitor sobre la síntesis de ciertos mediadores inflamatorios, siendo este un efecto inmediato que podría estar llevándose a cabo mediante los mecanismos no genómicos caracterizados por un rápido inicio del efecto (<15 minutos)

pues no se llevan a cabo mecanismos de transcripción y traducción de genes, ya que los receptores a glucocorticoides (RG) unidos a membrana o citosólicos señalizan mediante la modulación de la actividad de varias quinasas, como proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), proteína cinasa B (AKT) y las quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) (Ayroldi y cols., 2012). Este efecto antiinflamatorio se observó durante las horas posteriores pues en los grupos administrados con los tratamientos la inflamación de la extremidad disminuyó, lo que permitió evaluar a elementos de la fase “tardía” como lo son las citocinas.

Siguiendo esta hipótesis, se analizó la expresión de ciertas citocinas en tejido inflamado, demostrando que la administración del BSS-4 (0.5 y 1 mg/kg) disminuyó significativamente la expresión de citocinas proinflamatorias: el factor de necrosis tumoral alfa (*Figura 26*) y la interleucina 1 beta respecto al grupo carragenina (*Figura 27*) estos resultados confirman un efecto antiinflamatorio, y coinciden con los resultados reportados por Jung y cols. (2010) en un estudio sobre la diosgenina, donde ésta inhibió la producción de IL-1 β e IL-6, en macrófagos activados, estimulados con LPS/INF- γ ; sugiriendo que su efecto es a través de la inhibición selectiva de la activación de la quinasa c-Jun-N terminal (JNK), la cual está relacionada con la síntesis de citocinas pro inflamatorias, NF- κ B y la activación de la proteína activadora-1 (AP-1).

Otro dato que debemos resaltar es que una dosis de 0.5 mg/kg (dosis menor) muestra un mejor efecto en comparación a la dosis de 1 mg/kg (dosis mayor), lo que en este ensayo nos indica que la actividad antiinflamatoria no es dependiente de la dosis, es decir, no hubo un mejor efecto con una dosis mayor. Una explicación desde el punto de vista de la farmacodinamia es que a dosis de 0.5 mg/kg el BSS-4 tiene una mayor potencia y eficacia, sin embargo, esto es solo una hipótesis que abre las posibilidades para continuar con el estudio de este fármaco.

Basado en la información anterior y con base en la bibliografía, sabemos que la secreción de estas citocinas esta mediada por NF- κ B y GR y debido a que el BSS-4 tiene una estructura esteroidal similar a la de los glucocorticoides; podemos proponer que el BSS-4 podría estar actuando al unirse a los receptores de glucocorticoides (GR), los GR activados al unirse a otros factores de transcripción, como lo es el NF- κ B y AP-1 (Cruz-Topete, D. y.

Cidlowski J. A., 2015; Scheschowitsch, K. y cols., 2017), estarían reprimiendo así la capacidad para inducir la transcripción de genes proinflamatorios, lo que conduciría a una secreción disminuida de citocinas proinflamatorias y por lo tanto corroborando los resultados obtenidos en el análisis con la inmunohistoquímica.

La diosgenina, tiene efectos antiinflamatorios al igual que muchos de sus análogos sintetizados ((**Fernández- Herrera y cols., 2009; Singh, M. y cols., 2014**), sin embargo, los mecanismos por los cuales ejerce estos efectos aún no están bien dilucidados; no obstante, otra propuesta dada por **Junchao y cols. (2016)**, sugiere que la diosgenina mejoro la expresión de los GR desencadenando vías de señalización antiinflamatorias mediadas por GR y en consecuencia la expresión de la proteína de unión a ARNm triestrapolina (TTP), la cremallera de leucina inducida por glucocorticoides (GILZ), proteína quinasa activada por mitógeno- 1 (MKP-1) y NF- κ B, genes que juegan un papel importante en los mecanismos antiinflamatorios. Con lo anterior, se pueden suponer las vías por las cuales el BSS-4 estaría ejerciendo sus efectos.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la tinción de hematoxilina- eosina (*Figura 29 y 30*) permiten observar los cambios en el tejido inflamado respecto al tejido sano, caracterizando así un modelo de inflamación aguda, al observar la infiltración de células y cambios en la morfología del tejido. Otro dato que corrobora las propiedades antiinflamatorias del BSS-4, es que en los grupos que fueron administrados con el tratamiento se disminuyó considerablemente el infiltrado celular, lo cual es resultado de la inhibición de ciertos genes proinflamatorios o bien la expresión de ciertos genes antiinflamatorios, esto dependerá de la vía de señalización activada.

9. CONCLUSIONES

- La administración intraperitoneal del derivado colestánico BSS-4 a una dosis de 0.5 mg/kg tiene un mejor efecto antiinflamatorio respecto a la dosis de 1.0 mg/kg en el modelo de inflamación inducida con carragenina en la almohadilla plantar.
- La administración intraperitoneal del derivado colestánico BSS-4 a una dosis de 0.5 mg/kg disminuye la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β .
- La administración intraperitoneal del derivado colestánico BSS-4 a una dosis de 1.0 mg/kg disminuye la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β .
- La administración intraperitoneal del derivado colestánico BSS-4 a una dosis de 0.5 mg/kg y a una dosis de 1.0 mg/kg disminuye el infiltrado celular en un modelo de inflamación aguda.

10. REFERENCIAS

1. Alunno, A., Carubbi, F., Giacomelli, R. y Gerli, R. (2017). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets. *BMC Rheumatology*, 1(1), 1-13
2. Ashley, T. N., Weil, Z. M., y Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Cost, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 43, 385-406
3. Ayroldi, E., Cannarile, L., Migliorati, G., Nocentini, G., Delfino, D. V. y Riccardi, C. (2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB Journal*. 26(12), 4805-4820
4. Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The journal clinical investigation*. 118(2), 413-420
5. Boraschi, D., Lucchesi, D., Hainzl, S., Leitner, M., Maier, E., Mangelberger, D., Oostingh, G., Pfaller, T., Pixner, C., Posselt, G., Italiani, P., Nold, M., Nold-Petry, C., Bufler, P., Dinarello, C. (2011). IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *European Cytokine Network*. 22(3), 127-147
6. Burns, C. M., (2016). The History of Cortisone Discovery and Development. *Rheumatic Disease Clinics of North America* (42)1, 1-14
7. Carswell, A. E., Old, L. J., Kassel, L. R., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72(9), 3666-3670
8. Cruz-Topete, D., y Cidlowski, J. A. (2015). One Hormone Two Actions: Anti- and Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(0), 20-32
9. Cummings, D. M., Larijani, G. E., Conner, D. P., Ferguson, R. K., y Rocci, M. L. (1990). Characterization of dexamethasone binding in normal and uremic human serum. *DICP, The Annals of pharmacotherapy*, 24(3), 229-231
10. Czock, D., Keller, F., Maximilian, F. y Häussler, U. (2005). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids. *Clinical pharmacokinetics*. 44 (1), 62-87

11. De Haan, K., Zhang, Y., Zuckerman, J. E., Liu, T., Sisk, A. E., Diaz, M. F., Jen, K. Y., Nobori, A., Liou, S., Zhang, S., Rianhi, R., Wallace, W. D., y Ozcan, A. (2021). Deep learning-based transformation of H&E stained tissues into special stains. *Nature Communications*. 12, 411-418
12. Dinarello, C. A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*. 27, 519–50
13. Earp, J. C., Pyszczynski, N. A., Molano, D. y Jusko, W. (2008). Pharmacokinetics of Dexamethasone in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 29(6), 366-372
14. Fehrenbacher, J. C., Vasko, M. R. y Duarte, D. B. (2012). Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)- Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Current Protocols in Pharmacology*, 56(1), 5.4.1-5.4.4
15. Feldman, A. T. y Wolfe, D. (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. *Methods in Molecular Biology*, 31-43.
16. Fernández-Herrera, M. A., Sandoval-Ramirez, J., Meza-Reyes S. y Montiel-Smith, S. (2009). Side - chain opening of steroidal sapogenins to form 22-oxocholestanic skeletons. An approach to analogues of the aglycone of the potent anticancer agent OSW-1. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 53(3), 126-130
17. Gensler L. S. (2013). Glucocorticoids: complications to anticipate and prevent. *The Neurohospitalist*, 3(2), 92–97
18. Ghosh, S., May, M. J., y Kopp, E. B. (1998). NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual Review of Immunology*. 16, 225-260
19. Gil, L. E. (2014). Efecto de la administración crónica del BSS-4 y de cafeína sobre la recuperación de la memoria espacial al largo plazo y la actividad de enzimas antioxidantes en el hipocampo de rata. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
20. Guan, Q. y Zhang, J. (2017). Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators of Inflammation*. 2017, 1-8
21. Gulati, K., Guhathakurta, S., Joshi, J., Rai, N. y Ray, A. (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunology*. 4(2), 1-9

22. Halici, Z., Dengiz, G. O., Odabasoglu, F., Suleyman, H., Cadirci, E. y Halici, M. (2007). Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. *European Journal of Pharmacology*, 566(1-3), 215-221
23. Harirforoosh, S., Asghar, W. y Jamali, F. (2013). Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutocal Sciences*, 16(5), 821
24. He, Y., Yi, W., Suino-Powell, K., Zhou, X. E., Tolbert, W. D., Tang, X., Yang, J., Yang, H., Shi, J., Hou, L., Jiang, H., Melcher, K., & Xu, H. E. (2014). Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids. *Cell research*, 24(6), 713–726
25. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function, and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49(7), 1215–1228
26. Jesus, M., Martins, A. J. P., Gallardo, E., & Silvestre, S. (2016). Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2016, 4156293.
27. Johannes W.G., J. and Johannes W.J., B. (2013). Kelley's Textbook of Rheumatology. In: G. Firestein, R. Budd, S. Gabriel, L. McInnes and J. O' Dell, ed., *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 894-916.
28. Junchao, Y., Zhen, W., Yuan, W., Liying, X., Libin, J., Yuanhong, Z., Wei, Z., Ruilin, C. y Lu, Z. (2017). Anti- trachea inflammatory effects of diosgenin from *Dioscorea nipponica* through interactions with glucocorticoid receptor α . *Journal of International Medical Research*, 45(1), 101-113
29. Jung, D-H., Park, H-J., Byun, H-E., Park, Y-M., Kim, T-W., Kim, B-O., Um, S-H., Pio, S. (2010). Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF- κ B and AP-1 activation. *International Immunopharmacology*. 10(9), 1047-1054
30. Kim, S. D., Jeon, K. B., Lee, E. Y., Woo, H. W. y Mun, Y. J. (2012). Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species

and Mitochondrial Pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 1-8.

31. Kim, S. W., Roh, J., y Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls and Tips. *Journal of pathology and translational medicine*, 50(6), 411-418
32. Kumar, V., Cotran, R. S., y Robbins, S. L. (2013). *Robbins Basic Pathology*. Pennsylvania: Saunders.
33. Mansouri, T. M., Hemmati, A. A., Naghizadeh, B., Mard, A. S., Rezaie, A., y Ghorbanzadeh, B. (2015). A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 47(3), 292-298
34. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*; 454, 428-434
35. Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. 140, 771-776
36. Moss, M., Jin, C., Milla, M., Burkhart, W., Carter, L., Chen, W., Clay, W., Didsbury, J., Hassler, D., Hoffman, C., Kost, T., Lambert, M., Leesnitzer, M., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J., Warner, J., Willar, D. y Becherer, J. D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*. 385, 733–736
37. Nasiara, K., Inamullah, K., Waheed, K., Imran, K., Ajmal, K., Ahsan, S. H., Hizbullah, K., Javid, H., y Ahmed, A. H. (2019). Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activities of Asparacosin a Involve Selective Cyclooxygenase 2 and Inflammatory Cytokines Inhibition: An in-vitro, in-vivo, and in-silico Approach. *Frontiers in Immunology*. 10, 1-11
38. Nauseef, W. M. y Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602-611
39. Necas, J., y Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinary Medicine*. 58(4), 187-205

40. Okin, D., y Medzhitov, D. (2012). Evolution of inflammatory Disease. *Current Biology*. 22, 733-740
41. Parama, D., Boruah, M., Yachna, K., Rana, V., Banik, K., Harsha, C., Thakur, K. K., Dutta, U., Arya, A., Mao, X., Ahn, K. S., y Kunnumakkara, A. B. (2020). Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogs: Effective therapies against different chronic diseases. *Life Sciences*. 260
42. Pennica D, Hayflick J. S., Bringman T. S., Palladino M. A., Goeddel D. V. (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(18), 6060–6064
43. Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L. y Cirino, G. (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 331-338
44. Ramamoorthy S. y Cidlowski J. A., (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 42(1), 15–18
45. Rhen, T. y Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids – New Mechanisms for Old Drugs. *The New England Journal of Medicine*. 353(16), 1711-1723
46. Rodríguez, V. L. (2016). Efecto de la administración crónica del derivado colestánico BSS-4 sobre la memoria de reconocimiento, la expresión del Factor de Crecimiento Neuronal y del receptor TrkA. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
47. Ronchetti, S., Migliorati, G., Bruscoli, S. y Riccardi, C. (2018). *Definiting the Role of Glucocorticoids in inflammation*. *Clinical Science*, 132 (14), 1529-1543
48. Scheschowitsch, K., Leite, J. A. y Assreuy, J. (2017). New Insights in Glucocorticoid Receptor Signaling-More Than Just a Ligand-Binding Receptor. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 16.
49. Schett, G., Dayer, J.-M. y Manger, B. (2015). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*. 12(1), 14-24

50. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación de México. Estados Unidos Mexicanos.
51. Serra, H. A., Roganovich, J. M. y Rizzo, L. F. L. (2012). Glucocorticoides: Paradigma de Medicina Traslacional de lo Molecular al Uso Clínico. *Medicina (Buenos Aires)*, 72(2), 158-170
52. Singh, M., Hamid, A. A., Maurya, A. K., Prakash, O., Khan, F., Kumar, A., Aiyelaagbe, O. O., Negi, A. S., Bawankule, D. U. (2014). Synthesis of diosgenin analogues as potential anti-inflammatory agents. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 323-333
53. Stenken, J. A., Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical Chemistry of Cytokines-A Review. *Analytica Chimica Acta*. 853, 95-115
54. Sugimoto, A. M., Sousa, P. L., Pinho, V., Perretti, M., y Teixeira, M. M. (2016). Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in immunology*. 7 (160), 1-18
55. Tang, D., Kang, R., Coyne, B. C., Zeh, H., y Lotze, T. M. (2012). PAMPs and DAMPs: Signal Os that Spur Autophagy and Immunity. *Immunological Reviews*. 249(1), 158-175
56. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E., Salfeld, J., Tak, P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 117, 244-279
57. Trejo, C. R. (2013). Efecto del BSS-4 sobre la morfología dendrítica en un modelo de lesión excitotóxica en el hipocampo dorsal de rata. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
58. Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *BBA Molecular Cell Research*. 1843(11), 2563-2582.
59. Winter, C. A., Risley, E. A., Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the 'Rat as an Assay for Antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111, 444-447

60. Winyard, P. G. y Willoughby, D. A. (2003). Inflammation protocols. Methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Editorial: Humana press.
61. Wojdasiewicz, P., Poniatowski, A. A., y Szukiewicz D. (2014). The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation, 2014*
62. Xu, L., Liu, Y., Wang, T., Qi, Y., Han, X., Xu, Y., Peng, J. y Tang, X. (2009). Development and validation of a sensitive and rapid non-aqueous LC-ESI-MS/MS method for measurement of diosgenin in the plasma of normal and hyperlipidemic rats: A comparative study. *Journal of Chromatography B, 877(14-15):1530-1540*
63. Zhang, J. M., y An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International Anesthesiology Clinics. 45(2), 27–37*

11. OTROS

- CONGRESO

Los resultados preliminares se presentaron en el siguiente congreso, en modalidad de cartel.



27 ITALO-LATINAMERICAN ASIAN & AFRICAN
CONGRESS OF ETHNOMEDICINE
Milazzo, September 9-13



XXVII SILAE CONGRESS, MILAZZO 2018

PS023- Determination of the effect of BSS-4 cholestanic derivative on carrageenan-induced inflammatory process

Casimiro-Rosas M.^{1*}, Fernández-Herrera M.A., Sandoval-Ramírez J.², Mendieta L., Luna F.,
Martínez I.¹

*mary_cr25_05@hotmail.com

¹Departamento de Farmacia, ²Laboratorio de Síntesis y Modificación de productos naturales Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla, 14 sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla C. P. 72592, México.

Introduction

Inflammatory diseases are a major cause of morbidity worldwide. At present, non-steroidal anti-inflammatory drugs and steroids are the most common drugs used to treat inflammation, however, the side effects of these limit their application. That is why the search for effective natural substances in the treatment of inflammatory diseases is increasing. Sapogenins are natural compounds of great importance due to their use in the preparation of some biologically active steroidal products¹. They are substances that are widely distributed in an extensive variety of plants, many of them with medicinal properties. The triacetate of 22-oxocolest-5-en-3 β , 16 β , 26-triyl (BSS-4) is a cholestanic compound synthesized from diosgenin², which has been shown to have anti-inflammatory properties by having a similar structure to that of anti-inflammatory steroid drugs³.