



Artículo Original | Original Article

Efecto del extracto de alcaloides de *Berberis darwinii* Hook sobre respuestas celulares innatas en fagocitos murinos

[Effect of the extract of *Berberis darwinii* Hook alkaloids on innate cellular responses in murine phagocytes]

Daniela Núñez¹, Natalia Balboa², Fernando Carvajal², Marysol Alvear² y Marco Paredes¹

¹Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

²Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

Contactos / Contacts: Marco PAREDES - E-mail address: marco.paredes@ufrontera.cl

Abstract: *Berberis darwinii* Hook is a species that inhabits southern Chile and Patagonia. This is being used by the Mapuche ethnic group for the treatment of inflammatory processes, febrile states, and stomach pain. The purpose of the following study was to evaluate in vitro the properties of an alkaloid extract of *B. darwinii* root on cellular responses in monocytes from the rat peripheral blood. The results of the quantification of the extract showed a total alkaloid concentration of 1.67 mg/g and the characterization by HPLC-MS determined the presence of berberine and palmatine. In vitro, it was observed that the extracts decreased the adhesion capacity and phagocytic activity of the monocytes and inhibited the translocation of the nuclear factor NF- κ B associated with the modulation of inflammation, but not the production of superoxide anion. These results indicate that the total alkaloids of *B. darwinii* inhibit some specific mechanisms of cellular defense.

Keywords: NF- κ B; Phagocytes activity; Monocyte; Berberidaceae; Adhesion; *Berberis darwinii*.

Resumen: *Berberis darwinii* Hook es una especie que habita el sur de Chile y la Patagonia. Siendo utilizada por la etnia mapuche para el tratamiento de procesos inflamatorios, estados febriles, y dolor estomacal. El propósito del siguiente estudio fue evaluar in vitro las propiedades del extracto de alcaloides de raíz de *B. darwinii* sobre respuestas celulares en monocitos desde sangre periférica de rata. Los resultados de la cuantificación del extracto muestran una concentración de alcaloides totales de 1,67 mg/g y la caracterización por HPLC-MS determinó la presencia de berberina y palmatina. In vitro se observó que los extractos disminuyeron la capacidad de adhesión y la actividad fagocítica de los monocitos e inhibieron la translocación del factor nuclear NF- κ B asociado a la modulación de la inflamación, pero no así la producción de anión superóxido. Estos resultados indicarían que los alcaloides totales de *B. darwinii* inhiben algunos mecanismos específicos de defensa celular.

Palabras clave: NF- κ B; Actividad Fagocítica; Monocito; Berberidaceae; Adhesión; *Berberis darwinii*.

Recibido | Received: 9 de Noviembre de 2017

Aceptado | Accepted: 24 de Enero de 2018

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 25 de Febrero de 2018

Publicado en línea | Published online: 31 de Mayo de 2018

Declaración de intereses | Declaration of interests: se agradece a la Beca Doctoral Nacional y Beca de Apoyo de tesis CONICYT N° 21120557 y 21140816.

Este artículo puede ser citado como | This article must be cited as: D Núñez, N Balboa, F Carvajal, M Alvear, M Paredes. 2018. Efecto del extracto de alcaloides de *Berberis darwinii* Hook sobre respuestas celulares innatas en fagocitos murinos. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 17 (3): 259 – 269.

INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen una gran variedad de metabolitos secundarios, los que presentan una fuente importante de sustancias activas para la producción de nuevos fármacos (Cragg *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2011; Kumari, 2017). En este sentido, Chile posee una gran variedad de plantas medicinales, incluyendo especies nativas que representan una amplia fuente de compuestos de interés. Una de estas plantas es *Berberis darwinii* Hook, una especie perteneciente a la familia Berberidaceae y género *Berberis*, siendo conocida comúnmente como Michay, Michai, Palo amarillo o Quelüng (Hoffmann, 1982; Houghton y Manby, 1985; Silva, 2010). Esta especie nativa habita en el sur de Chile, desde la provincia de Ñuble hasta la Patagonia en ambientes cordilleranos (Hoffmann, 1982; Silva, 2010). Es un arbusto leñoso, espinoso y de hojas perenne, mide entre 1 a 3 metros de altura, sus flores son de color amarillo y su fruto es una baya de color azul oscuro (Hoffmann, 1982; Landrum, 1999). Esta especie ha sido muy utilizada por la etnia Mapuche, sus raíces y tallos se utilizan para teñir lana y piezas de alfarería, mientras que su fruto es fuente de alimento y utilizado en la preparación de bebidas fermentadas semejantes al vino. Cabe destacar que tanto frutos, cortezas y raíces se han empleado en forma de infusión para el tratamiento de resfríos, procesos febriles, inflamación, dolor estomacal y diarrea (Houghton y Manby, 1985; Villagrán y Meza, 1991; Rapoport y Ladio, 1999; Alarcón *et al.*, 2014). Las propiedades medicinales de este género se atribuyen a la presencia de metabolitos secundarios, destacándose principalmente la presencia de alcaloides como la berberina en sus raíces y tallos (Hoffmann, 1982; Fajardo, 1992; Ruiz *et al.*, 2014). A pesar de sus diversos usos en la medicina tradicional del pueblo Mapuche y los amplios beneficios sobre la salud humana ya descritos para este género, sus efectos a nivel celular no han sido descritos totalmente. De este modo el propósito del siguiente trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto del extracto de alcaloides totales obtenido a partir de raíces de *B. darwinii* sobre respuestas funcionales en monocitos de sangre periférica de murinos activadas con lipopolisacáridos (LPS) y levaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron raíces de *Berberis darwinii* Hook (familia Berberidaceae), recolectadas durante los meses de enero y febrero del 2014, en la localidad de

Trakura, a 20 km de Icalma, en la provincia de Cautín, Región de La Araucanía, Chile (Altitud: 1298 (msnm); GPS: -38° 50.869', -71° 29.258'; Exposición: Oeste). El material vegetal fue transportado en condiciones de frío y oscuridad. Las raíces fueron trozadas, lavadas con agua destilada y secadas durante 4 días a 40° C en oscuridad. Finalizados los 4 días, fueron pulverizadas en un molino de acero, previamente desinfectado con etanol al 75%. El material obtenido fue pesado y almacenado a -80° C hasta su utilización. La identificación taxonómica fue realizada por el Mg. Rubén Carrillo, Botánico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. También se archivaron algunos ejemplares de *B. darwinii* en el Herbario Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera bajo el código UFRO 300.

Preparación de extractos metanólicos y alcaloides

Se utilizó 1 g de las muestras secas de raíz en 20 mL de metanol absoluto (3x) (grado analítico, Merck), las que se sometieron a sonicación, en un baño ultrasónico (Elmasonic, E 60H) durante 20 min a 0° C. A continuación, se centrifugaron a 4.000 g por 15 minutos. Las muestras fueron filtradas con papel Whatman N° 1 y concentradas a presión reducida (BÜCHI R-210) a punto de ebullición de 40° C. Las muestras para obtención de alcaloides fueron resuspendidas en 20 mL de agua HPLC (Merck), en fase acuosa fueron basificadas hasta pH 12 con HCl 1 M, y llevadas a un embudo de separación. Se adicionaron 10 mL de CHCl₃, recuperando la fase clorofórmica, este proceso se repitió hasta extraer todos los alcaloides desde la fase acuosa hacia el extracto clorofórmico, para esto se realizaron evaluaciones en la fase clorofórmica mediante cromatografía en capa fina y con el reactivo de Dragendorff. El contenido de alcaloides fue concentrado, eliminando el solvente mediante un rotavapor (HiTech, RE-52), con una temperatura de 40° C y presión controlada. El concentrado fue masado y resuspendido en 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Cuantificación de alcaloides totales

El contenido de alcaloides se evaluó modificando el método colorimétrico descrito por Shamsa *et al.* (2008). Se tomaron 5 mL de extracto clorofórmico y se adicionaron 5 mL de buffer de fosfato pH 4,7 y 5 mL de disolución de verde de bromocresol (34,9 mg

de verde de bromocresol en 25 mL de agua y, se adicionaron 15 mL de NaOH 1 N aforándolo a 50 mL de agua HPLC, llevándolo a baño maría para su disolución), la mezcla se depositó en un embudo de separación, realizando extracciones líquido-líquido con 2 mL de CHCl₃ (3 veces), recuperando la fase con cloroformo (color amarilla). La reacción se leyó a 470 nm. Se ajustó con curva de calibración con berberina (grado de síntesis, Sigma-Aldrich) de 0 a 10 mg/L. El contenido de alcaloides totales se expresa en mg EB/g de M.S (mg equivalentes de berberina por gramo de materia seca).

Caracterización mediante HPLC/DAD

El análisis de identificación de alcaloides se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un equipo Shimadzu (Tokio, Japón) equipado con una bomba (modelo LC-20 AT), un detector UV-visible (SPD-M20A) y un calefactor (Modelo CTO-20AC). La separación de los compuestos se realizó mediante la utilización de la columna RP-18 (12,5 x 0,4 cm, tamaño de partícula 5 µm) (Merck, Germany) a 25°C con una mezcla de 0,5% de ácido fórmico en agua (A) y metanol (B) como fase móvil. La velocidad de flujo fue 1,0 mL min⁻¹ y el programa comenzó con una corrida isocrática 0-10 min con la mezcla 70% A y 30% B, seguido de un gradiente 100% B por 80 min. Los compuestos fueron determinados a 290 nm con 0,001 de sensibilidad, el volumen de inyección fue 20 µL. La muestra se analizó mediante soluciones stock de estándares comerciales berberina, palmatina y bermamida.

Caracterización mediante HPLC-MS

La caracterización del extracto total de *B. darwinii* se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplada con la detección de espectrometría de masas (MS/MS). Para esto se preparó una muestra (en duplicado) de extracto total de alcaloides resuspendido en acetonitrilo, a concentración final de 10 ppm o 0,01 mg/mL, la que fue filtrada en un filtro para jeringa 0,45 µm. El análisis de las muestras se realizó mediante el equipo de Cromatografía Líquida (Shimadzu Prominence) acoplado a Espectrómetro de Masas (Applied Biosystems/MDS Sciex 3200 Qtrap) equipado con fuente de Ionización por Electrospray Turbo VTM, ubicado en las dependencias del BIOREN, Universidad de La Frontera. Para la realización de la separación cromatográfica, se utilizó una columna RP-C18 Inertsil ODS3 (2,1x150 mm, 3

µm), usando un volumen de inyección de 10 µL, un flujo de 0,2 mL/min y una temperatura de columna de 35° C. Las muestras fueron separadas utilizando un gradiente de concentraciones de fase móvil A (Ácido Fórmico 0,1% (Agua) y fase móvil B (Ácido Fórmico 0,1% (Acetonitrilo)). La longitud de onda de trabajo del detector UV/VIS fue de 280 nm. El control del HPLC y espectrómetro se realizó por medio del software "Analyst 1.5.1".

Animales

Para la obtención de monocitos periféricos se utilizaron ratas, machos adultos *Sprague dawley* (250-300 g de peso corporal), obtenidos desde el Bioterio de la Universidad de La Frontera. Estos se mantuvieron en un ambiente controlado, con ciclos diarios de 12 horas de luz/oscuridad, temperatura ambiental de 22° C, comida y agua *ad libitum*. Para la obtención de sangre periférica, los animales fueron eutanasiados mediante una sobredosis de tiopental IM (200 mg/kg PV), una vez aplicado el anestésico, se realizó el reconocimiento de la ausencia de los signos vitales, y se procedió a la disección y obtención de sangre periférica procedente de la vena cava inferior. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de La Frontera (Código de autorización: 033/2014).

Aislamiento y cultivo primario de monocitos murinos desde sangre periférica

La obtención de monocitos se realizó utilizando el protocolo de Wahl *et al.* (2006) con modificaciones. Se obtuvieron entre 8-10 mL de sangre periférica, mediante punción de la vena cava inferior, utilizando EDTA 230 mM. Una vez obtenida la sangre, se realizó una dilución de 1:4 (Sangre: Buffer fosfato salino (PBS) 1x). Para ello se preparó un gradiente con Histopaque®-1077 (Sigma), agregando en primer lugar el Ficoll seguido de 4 mL de sangre/PBS. Las muestras fueron centrifugadas a 2.000 g por 30 minutos en un ángulo de 45°. Se extrajo el anillo de monocitos y se realizaron dos lavados con PBS 1x a 2.000 g por 10 min. Las células fueron resuspendidas en 5 mL de medio RPMI-1640 (Caisson Labs, USA) suplementado (Suero fetal bovino (SFB) 10% y penicilina/estreptomicina/anfotericina 0,1% (Sigma)). Una vez resuspendidas las células, se realizó el conteo de estas en cámara de Neubauer, ajustando la suspensión celular a 2x10⁶ cel/mL, para su posterior uso en los ensayos *in vitro*.

Evaluación de la citotoxicidad celular con azul tripán

Para estimar el efecto de los extractos sobre la viabilidad celular se utilizó el método por exclusión de azul tripán según Alarcón *et al.* (2014) con modificaciones. Para ello se prepararon cultivos de monocitos (2×10^5 cel/mL) en RPMI-1640 suplementado y diferentes concentraciones del extracto (0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$). Los cultivos se incubaron a 37° C y 5% CO₂ por 1 hora. Pasado este tiempo, se adicionaron 20 μL de azul tripán y se incubó durante 20 min. Finalizada la incubación, se realizó el conteo de estas por muestra en cámara de Neubauer, mediante el conteo de células viables (translúcidas) y no viables (azules).

Evaluación de la producción de anión superóxido

Se evaluó el efecto de los extractos sobre la producción de anión superóxido en monocitos según metodología descrita por Paredes *et al.* (2013). Para ello, los cultivos primarios se incubaron en RPMI-1640 suplementado, LPS (100 ng/mL) y diferentes concentraciones del extracto vegetal (0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$). Los cultivos fueron incubados a 37° C y 5% CO₂ por 1 hora en placas de 96 pocillos. A continuación, se descartó el medio y se lavó la monocapa celular dos veces con 200 μL de medio de cultivo RPMI, permitiendo la separación y selección por adhesión selectiva de los monocitos sobre el vidrio del resto de las células sanguíneas del anillo de monocitos (Wahl *et al.* 2006). Posteriormente, se adicionaron 100 μL de medio RPMI-1640 suplementado con nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) a una concentración final de 1 mg/mL. Se incubó a 37° C por 60 min y posteriormente se desechó el medio, agregando 100 μL de metanol, incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se desechó el metanol, secando la placa de cultivo a temperatura ambiente por 5 min. Seguidamente, se agregaron 120 μL de KOH 2M y 140 μL de DMSO, dejando a temperatura ambiente por 20 min con agitación constante. Finalmente, se registró la densidad óptica a 620 nm con un lector de microplacas (Spectra Count Pakard, USA).

Evaluación de la capacidad de adhesión

La capacidad de adhesión sobre monocitos tratados *in vitro* se evaluó mediante conteo directo de las células adheridas en placa de cultivo con microscopio invertido. Para este ensayo, se incubaron los monocitos en medio RPMI-1640 suplementado, LPS

(100 ng/mL) y diferentes concentraciones del extracto vegetal (0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$) durante 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, se realizó un lavado suave con PBS 1x a 37° C, con la finalidad de eliminar las células que no se encuentren adheridas. A continuación, se adicionó medio de cultivo RPMI-1640 a 37° C y se contaron las células totales mediante microscopía, evaluando 5 campos al azar por tratamiento.

Evaluación de la actividad fagocítica

Para evaluar la actividad fagocítica se utilizaron 2×10^5 cel/mL de monocitos suspendidos en medio RPMI-1640 suplementado y diferentes concentraciones del extracto vegetal (0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$), se depositó 200 μL directamente sobre un portaobjeto previamente demarcado, adicionando 20 μL de levaduras teñidas con rojo Congo (1×10^7 cel/mL) (Navarrete *et al.*, 2007; Paredes *et al.*, 2013). El cultivo primario se incubó a 37° C durante 45 min en cámara húmeda. Finalizado el periodo de incubación, se procedió a retirar el sobrenadante y a realizar una tinción de contraste May Grünwald-Giemsa. Para finalizar, las muestras fueron lavadas con abundante agua corriente, limpiadas y secadas a temperatura ambiente, para luego ser montadas con medio Entellan (Merck). La evaluación del porcentaje de la actividad fagocítica, se realizó mediante el conteo directo de los monocitos totales con levaduras fagocitadas, evaluando 5 campos al azar por tratamiento.

Evaluación de la distribución nuclear/citoplasmática de NF- κ B

Para el análisis de la distribución celular de NF- κ B se realizaron cultivos primarios, a partir de 200 μL de monocitos de sangre periférica de rata (2×10^7 cel/mL) suspendidas en medio RPMI-1640 suplementado y diferentes concentraciones del extracto vegetal (0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$). La suspensión celular se depositó sobre un portaobjeto previamente gelatinizado y demarcado. El cultivo primario se incubó a 37° C y 5% CO₂ por 1 hora (Kearns *et al.*, 2006). Finalizado el periodo de incubación, los cultivos fueron lavados 3 veces con PBS 1x durante 1 minuto cada uno. A continuación, las células fueron fijadas con metanol 100% durante 2 minutos y se secaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para la detección inmunocitoquímica se utilizó el kit R.T.U Vectastain Universal ABC Kit (Vector Lab, N° catálogo Cat PK-7200) con inmunoreactividad del segundo anticuerpo

Anti-Mouse y Anti-Rabbit IgG, con modificaciones en el protocolo. Se realizó la inhibición de las peroxidasas endógenas con 0,3% de perhidrol por 10 min. Cada muestra fue incubada con solución de bloqueo durante 10 minutos con el reactivo “Normal Horse Serum”. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario anti-NF- κ B p65 (ThermoScientific) a una dilución 1:250, durante 5 horas a 37° C en cámara húmeda. Luego se eliminó el exceso de anticuerpo con PBS 1x y se incubó con el segundo anticuerpo anti IgG “Universal Secondary Antibody” conjugado a biotina, provisto por el Kit durante 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Después se realizaron tres lavados con PBS 1x y se aplicó el reactivo de detección “Vetactain R.T.U”, el cual posee el complejo peroxidasa-estropoavidina, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado se aplicaron 100 μ L de solución de revelado (DAB al 3% en TRIS-HCl 0,2 M pH 7,6; 5 μ L H₂O₂ 30%) incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para el montaje de las muestras, fueron deshidratadas con una batería ascendente de etanol 50%, 80% y 96%, durante 1 min cada uno. Luego se sumergieron en etanol 100% durante 3 y 5 min cada vez. Posteriormente se realizó el diafanizado con xilol durante 10 min. Las muestras se procesaron fijando un cubreobjetos con medio de montaje Entellan (Merck) para el posterior análisis

microscópico.

Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras en cada uno de los análisis, se realizó un ANOVA de un factor y posteriormente un test de Dunnett's con un nivel de significancia del 95%. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prisma 5.0.

RESULTADOS

Caracterización química del extracto de alcaloides de raíz en *Berberis darwinii*

El extracto de *B. darwinii* utilizado en este estudio presento una concentración de alcaloides totales mediante espectrofotometría de 1,67 mg/g equivalentes a berberina. Mientras que la identificación por HPLC-MS de los compuestos presentes en la muestra realizados en polaridad positiva, mediante el método EMS-EPI (Enhanced Mass Scan), permitieron la identificación de dos tipos de alcaloides, correspondientes a Berberina (en mayor concentración), seguido de Palmatina (Figura N° 1A, Figura N° 1B y Tabla N° 1). Además, se realizó la cuantificación de la muestra mediante HPLC-DAD con estándares de berberina, palmatina y bermamida, obteniendo solo la concentración de Berberina de 52,83 mg L⁻¹ (Figura N°2).

Tabla N° 1
Componentes identificados por HPLC-ESI MS/MS en extracto de
Alcaloides de raíz de *Berberis darwinii*

Identificación	T.R (min)	Ion Precursor (m/z)	Iones Fragmentos (MS2) (m/z)				Referencia
Berberina	32.23	336	320	292	278	263	Librería 1,2
Palmatina	33.12	352	336	308			Librería 1,2

1. Eun-Kyung et al., 2012; 2. Jing Zhang et al., 2012) T.R: Tiempo de retención

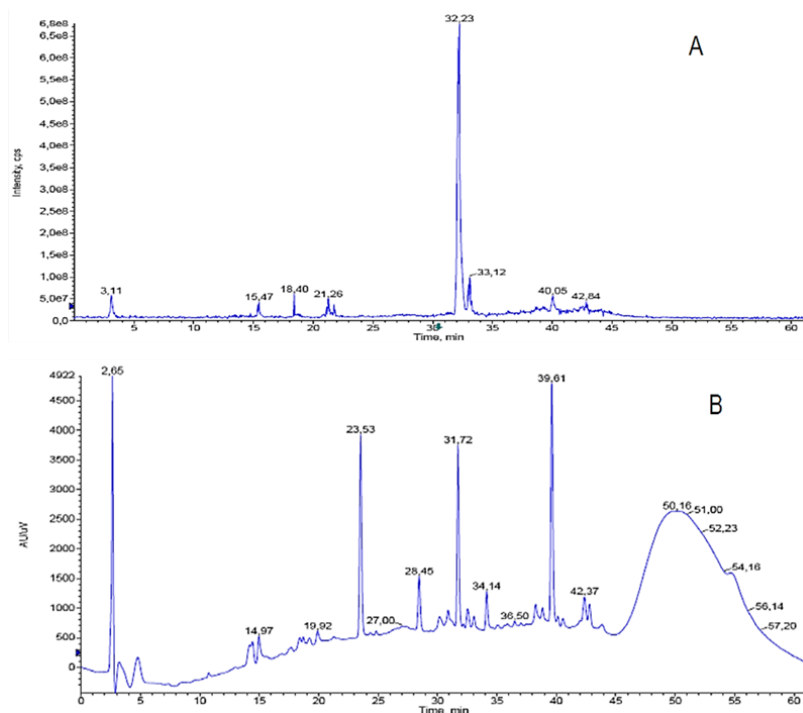


Figura N° 1
Cromatograma de espectro UV a 280 nm de la muestra de raíz.
A) TIC de la muestra de raíz; B) espectro UV de la muestra (280 nm)

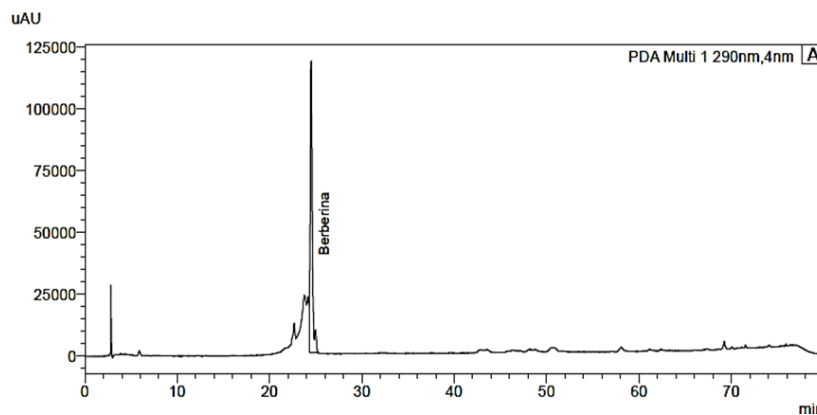


Figura N° 2
Patrón cromatográfico de raíz de *Berberis darwinii*.
Longitud de onda 290 nm, volumen de inyección 20 µL (0.4 mg mL⁻¹). Se identificó a base de compuestos estándares de berberina

Evaluación de citotoxicidad de los extractos sobre monocitos murinos

La evaluación de citotoxicidad sobre monocitos periféricos de rata, indicaron que los extractos poseen efectos de baja citotoxicidad en el rango de las

concentraciones evaluadas de 0,1 µg/mL (85,4%), 1 µg/mL (84,5%) y 10 µg/mL (85,1%), presentando valores similares al vehículo de DMSO 1% (83,8%) y a los controles sin extracto (85,1%) (Figura N° 3).

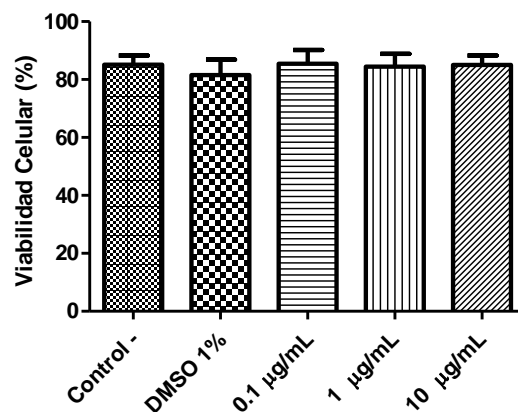


Figura N° 3

Evaluación de viabilidad de monocitos los extractos de alcaloides totales de *B. darwinii* mediante evaluación de viabilidad por exclusión de azul tripán en cultivo primario de monocitos de sangre periférica. Los valores son expresados como la media \pm S.D. (Control - : Células sin activar; DMSO: Vehículo DMSO 1% con células; 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$: diferentes concentraciones de alcaloides).

Efecto del extracto de raíz sobre la producción de anión superóxido

Sobre la producción de anión superóxido, los cultivos primarios de fagocitos murinos activados con LPS y

tratados con diferentes dosis de extractos de *B. darwinii* no demostraron diferencias significativas frente al control positivo (solo activado con LPS) (Figura N° 4).

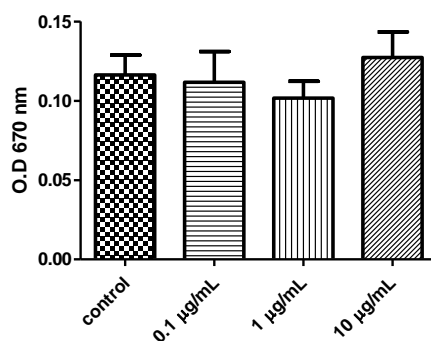


Figura N° 4

Evaluación de la producción de anión superóxido en cultivos primarios de monocitos murinos en presencia de extractos de alcaloides totales de *B. darwinii*. Los valores son expresados como la media \pm S.D. (Control: Células activadas con 100 ng/mL de LPS sin alcaloides; 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$: diferentes concentraciones de alcaloides más 100 ng/mL de LPS).

Evaluación de la capacidad de adhesión

La evaluación de la capacidad de adhesión sobre monocitos, indicó que los extractos de alcaloides de *B. darwinii* poseen efectos negativos sobre la capacidad de adhesión de los fagocitos activados con

LPS (Figura N° 5). Pudiendo observar diferencias significativas en los cultivos tratados con el extracto respecto al control activado solo con LPS, estas diferencias se observaron en presencia de todas las concentraciones.

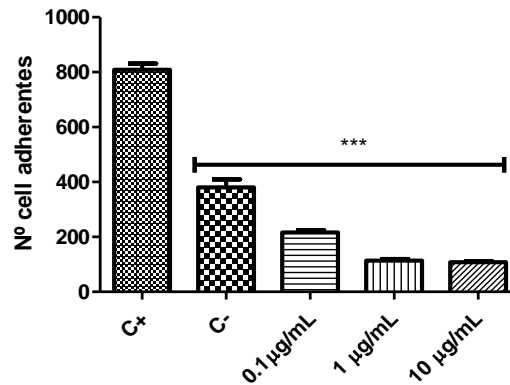


Figura N° 5

Evaluación de la capacidad de adhesión de cultivo primario de monocitos periféricos en presencia de extractos de alcaloides totales de *B. darwinii*. Los valores son expresados como la media \pm S.D. El símbolo *** indica un valor $p < 0,001$ respecto a los controles positivos con LPS (Análisis ANOVA de una vía, seguido de un post test de Dunnett's) (Control +: Células activadas con LPS; Control -: Células sin activar; 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$: diferentes concentraciones de alcaloides más 100 ng/mL de LPS).

Efecto de los extractos sobre la actividad fagocítica de monocitos activados con levaduras

La evaluación de la capacidad fagocítica de monocitos enfrentados con levaduras y tratados con extracto de alcaloides, mostró una disminución

significativa solo en la concentración más elevada (10 $\mu\text{g/mL}$), con respecto al control positivo tratado solo con levaduras (Figura N° 6A, Figura N° 6B y Figura N° 6C).

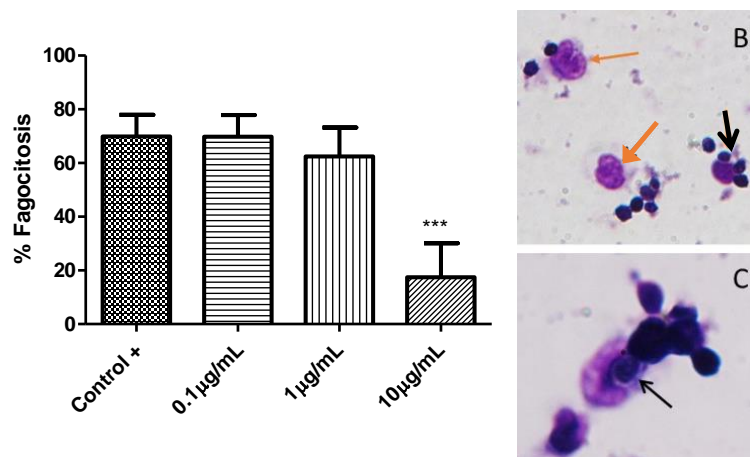


Figura N° 6

Evaluación de la actividad fagocítica en cultivo primario de monocitos activados con levaduras (A). B y C: Imágenes de la actividad fagocítica evaluada (Flecha negra: levaduras; flecha naranja: Monocitos. Aumento B 400X y C 1000x). Los valores son expresados como la media \pm S.D. El símbolo *** indica un valor $p < 0,001$ respecto a los controles positivos (Análisis ANOVA de una vía, seguido de un post test de Dunnett's).

(Control +: Células más levaduras; 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$: diferentes concentraciones de alcaloides más levaduras)

Evaluación de la translocación de NF- κ B

El análisis inmunocitoquímico, indicó la presencia del complejo proteico NF- κ B en todas las células fagocíticas presentes en el cultivo primario. Se pudo observar una marcada señal inmunoreactiva tanto en las células estimuladas por lipopolisacáridos, como en las muestras sin estimular (Figura N° 7A y Figura

N° 7B). En las muestras tratadas con LPS (Figura N° 7C), se pudo observar una inmunomarca positiva a nivel nuclear, a diferencia de las muestras tratadas con extractos y activadas con LPS donde se observa una inhibición en la translocación del factor, observando la inmunomarca a nivel citoplasmático (Figura N° 7D, Figura N° 7E y Figura N° 7F).

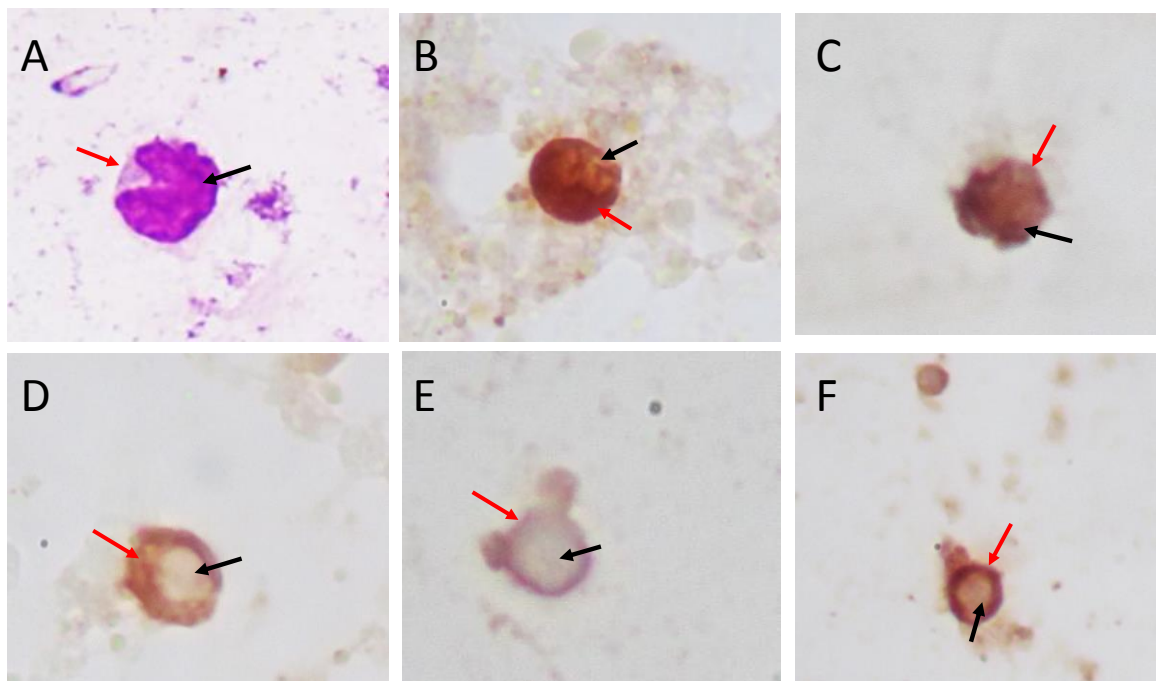


Figura N° 7

Evaluación de la expresión inmunocitoquímica de la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo A) Monocito sin LPS o alcaloides, tratado con hematoxilina; B) Control negativo; C) Control positivo: activado con LPS 100 ng/mL; D, E y F; 0.1, 1 y 10 μ g/mL de alcaloides activados con 100 ng/mL de LPS (Flecha negra: Núcleos; flecha naranja: citoplasma).

DISCUSIÓN

El proceso inflamatorio es la respuesta del organismo ante una injuria causada por un agente biológico, químico o mecánico, defendiendo al huésped del agente agresor, para esto activa y recluta diversas células con la finalidad de reestablecer la homeostasis, sin embargo una respuesta descontrolada de estas células, puede dar a lugar diversas enfermedades degenerativas crónicas (Moreno-Eutimio, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Entre las células más importantes en el proceso de iniciación y modulación de la inflamación, se encuentran los macrófagos los que pueden ser activados por diversos estímulos pro-inflamatorios. Entre estas moléculas podemos encontrar estructuras

microbianas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), como LPS presente en las bacterias Gram negativas y Cimosano en hongos. Estas moléculas son reconocidas por los macrófagos mediante receptores de reconocimiento de patrones (RRP). La interacción entre estas moléculas y sus receptores, permite al sistema inmune innato reconocer estos antígenos, induciendo así la respuesta inmunitaria (Bautista y Mosqueda, 2005).

En el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antiinflamatoria, los productos naturales nos brindan una gran diversidad de fitoquímicos, con una incomparable complejidad estructural y un gran potencial biológico, destacando a los alcaloides como uno de los grupos más diversos de metabolitos

secundarios relacionado con efectos antiinflamatorios presentes en plantas (Gómez *et al.*, 2011). En nuestro estudio los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* indicarían que el extracto de alcaloides de raíz de *B. darwinii* inhibirían a diferentes concentraciones algunas de las respuestas relacionadas con inmunidad innata, como la capacidad de adhesión y la actividad fagocítica de monocitos activados con LPS y levaduras. Estos resultados podrían estar relacionados con la inhibición de la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B) observado en los ensayos de inmunocitoquímica. NF- κ B, es un factor de transcripción constitutivo presente en el citoplasma celular unido a una proteína inhibitoria (I κ B). Al ser estimulada cualquiera de las vías asociadas a NF- κ B en presencia de algún patógeno, las proteínas inhibitorias son fosforiladas, ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma, permitiendo su translocación al núcleo donde regulará la transcripción de diversos genes diana que juegan un rol importante en la regulación de la inmunidad y el proceso inflamatorio (Yamamoto and Gaynor, 2001; Echeverri and Mockus, 2008). Los alcaloides berberínicos presentes en *B. darwinii*, podrían modular de forma selectiva algunas respuestas específicas en monocitos, relacionadas con el proceso de adhesión del fagocito a las superficies y la actividad fagocítica. Cabe destacar que entre los genes que regula NF- κ B se encuentran diversas moléculas de adhesión como I-CAM, Selectina-E y V-CAM activadas por LPS, Cimosano, IL-1 β o TNF α (López, 2004; Oviedo *et al.*, 2005), esto podría indicar que los alcaloides estarían inhibiendo estas vías específicas, disminuyendo la expresión de estas moléculas e impidiendo así la adhesión de los monocitos y macrófagos, o disminuyendo su capacidad fagocítica. Por otra parte, la evaluación de los efectos del extracto en la evaluación de producción de anión superóxido, no se observaron diferencias significativas entre el control activado con LPS y las células tratadas con alcaloides, a diferencia del estudio de Alarcón *et al.* (2014), donde se observaron diferencias significativas, esto podrían estar relacionado a la presencia de otros componentes en el extracto total utilizado en el ensayo de Alarcón *et al.* (2014) como lo son polifenoles y flavonoides, los que podrían estar influyendo en la disminución de la producción de óxido nítrico.

El análisis de los resultados obtenidos sobre la caracterización química de los compuestos presentes en nuestro extracto mediante HPLC-MS, permitieron identificar solo dos compuestos, los que

corresponderían a Berberina y Palmatina. En este caso, se esperaba encontrar un mayor número de alcaloides, como los descritos en otras especies del género *Berberis* (Ruiz *et al.*, 2014). Esto pudo deberse a la presencia de Berberina que se identificó en grandes concentraciones, lo que podría haber dificultado la identificación de otros compuestos presentes en la muestra. Estos datos se correlacionan con los obtenidos en HPLC/DAD, donde solo se pudo identificar Berberina. Estos resultados concuerdan con estudios de diversas especies de *Berberis* de Asia, Europa y América del Sur que describen altos niveles de este compuesto en diferentes estructuras de la planta, principalmente en raíz (Shamsa *et al.*, 2008; Mokhber-Dezfuli *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Los extractos totales de alcaloides de *B. darwinii* tendrían un efecto sobre la capacidad de adhesión de fagocitos totales y en altas concentraciones sobre la actividad fagocítica, pudiendo tener relación sobre la inactivación de la vía de NF- κ B. A su vez, los extractos no demuestran interferencia en la producción de anión superóxido. Esto sugiere que los extractos de alcaloides podrían estar modulando ciertas vías específicas asociadas con la actividad defensiva de estas células de forma selectiva.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal del Departamento de Ciencias Básicas y al Laboratorio de Bioquímica de Suelos del Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales de la Universidad de La Frontera por facilitar sus dependencias para este trabajo. Además, se agradece por la sustentación económica de la Beca Doctoral Nacional y Beca de Apoyo de tesis CONICYT N° 21120557 y 21140816.

REFERENCIAS

- Alarcón D, Paredes M, Ramos D, González K, Díaz R, Núñez D. 2014. Los extractos acuosos y metanólico de *Berberis darwinii* H. (Berberidaceae) inhiben respuestas celulares innatas en monocitos humanos tratados *in vitro*. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 13: 81 - 91.
- Bautista C and Mosqueda J. 2005. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. **Vet**

- Mex 36: 453 - 468.
- Cragg G, Newman D, Snader K. 1997. Natural products in drug discovery and development. **J Nat Prod** 60: 52 - 60.
- Echeverri N, Mockus I. 2008. Factor nuclear κ B (NF- κ B): Signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. **Rev Fac Med** 56: 133 - 146.
- Fajardo V. 1992. **Alcaloides en especies del género *Berberis* en Chile**. Química de la flora de Chile. Editorial Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Gómez H, González K, Medina J. 2011. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 182 - 217.
- Hoffmann A. 1982. **Flora silvestre de Chile zona araucana**. Ediciones Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile.
- Houghton P, Manby J. 1985. Medicinal plants of the Mapuche. **J Ethnopharmacol** 13: 89 - 103.
- Kearns J, Basak S, Wernes S, Huang C, Hoffmann A. 2006. I κ B ϵ provides negative feedback to control NF- κ B oscillations, signaling dynamics and inflammatory gene expression. **J Cell Biol** 173: 659 - 664.
- Kumari P, Kumari C, Singh PS. 2017. Phytochemical screening of selected medicinal plants for secondary metabolites. **Int J Life Sci Scienti Res** 3: 1151 - 1157.
- Landrum M. 1999. Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and adjacent southern Argentina. **Ann Missouri Bot Gard** 86: 793 - 834
- López L. 2004. La regulación del factor de transcripción NF- κ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. **Rev Inv Clín** 56: 83 - 92.
- Mokhber-Dezfuli N, Saeidnia S, Reza-Gohari A, Kurepaz-Mahmoodabadi M. 2014. Phytochemistry and pharmacology of *Berberis* species. **Pharmacogn Rev** 8: 8 - 15.
- Moreno-Eutimio M. 2016. Inflamación y sepsis. **Rev Hosp Jua Mex** 83: 86 - 91.
- Navarrete J, Pinilla G, Muñoz L, Ruiz A, Cifuentes Y. 2007. Determinación de valores de referencia para la microtécnica de fagocitosis y muerte intracelular de *Cándida álbicans* en un grupo de población sana en Bogotá. **Nova** 5: 31 - 37.
- Oviedo J, Ochoza A, Lopez J, Valdez J. 2005. Interferencia molecular en la ruta de transducción de NF- κ B por bacterias patógenas. **Rev Educ Bioquím** 24: 12 - 20.
- Rapoport E and Ladio A. 1999. Los bosques Andino-patagónicos como fuentes de alimentos. **Bosques** 20: 55 - 64.
- Ruiz A, Zapata M, Sabando C, Bustamante L, von Baer D, Vergara C, Mardones C. 2014. Flavonols, Alkaloids, and antioxidant capacity of edible wild *Berberis* species from Patagonia. **J Agric Food Chem** 62: 12407 - 12417.
- Paredes M, González K, Figueroa J, Montiel-Eulefi E. 2013. Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage function. **Fish Physiol Biochem** 39: 1215 - 1221.
- Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. **Thai J Pharm Sci** 32: 17-20.
- Silva F. 2010. **Flora agropecuaria de Aysén**. Ministerio de Agricultura de Chile, Servicio Agrícola y Ganadero Región de Aysén, Aysen, Chile.
- Villagrán C, Meza I. 1991. Etnobotánica de la isla Alao, archipiélago de Chiloé, Chile. **Bol Mus Nac Hist Nat Chile** 42: 39 - 78.
- Wahl L, Wahl S, Smythies L, Smith P. 2006. Isolation of human monocyte populations. **Curr Protocols Immunol** 7-6. doi: 10.1002/0471142735.im0706as70
- Yamamoto Y, Gaynor R. 2001. Role of the NF- κ B pathway in the pathogenesis of human disease states. **Curr Mol Med** 1: 287 - 296.
- Zhang H, Shan Y, Wu Y, Xu C, Yu X, Zhao J, Yan J, Shang W. 2017. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 cells. **Int Immunopharmacol** 52: 93 - 100.