

## Portafolio

Compuestos naturales, modelos murinos  
y su aplicación en el estudio del lupus  
eritematoso sistémico

Ramírez-Quintero Rubí<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Alba J.C<sup>2</sup>,  
Abrego-Peredo A.A<sup>2</sup>, Gasca-Pérez Eloy<sup>2</sup>,  
Domínguez-Pantoja M<sup>2,3</sup>



## Compuestos naturales, modelos murinos y su aplicación en el estudio del lupus eritematoso sistémico

Ramírez-Quintero Rubí<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Alba J.C<sup>2</sup>, Abrego-Peredo A.A<sup>2</sup>, Gasca-Pérez Eloy<sup>2</sup>, Domínguez-Pantoja M<sup>2,3</sup>.

A principios del siglo XX, el médico y bacteriólogo alemán Paul Ehrlich, introdujo el término “*horror autotoxicus*” para describir el proceso por el cual el sistema inmunológico de un individuo ataca y daña tejidos propios (Silverstein, 2001). Actualmente, este tipo de trastornos son conocidos como enfermedades autoinmunes como por ejemplo el Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

### El Lupus Eritematoso sistémico

El LES es una enfermedad autoinmune, causada por la interacción de factores ambientales y genéticos, que en conjunto producen alteraciones en la función del sistema inmune. El LES afecta a nueve mujeres por cada hombre, debido a la participación de las hormonas sexuales femeninas en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Nusbaum et al., 2020). En este trastorno, el inadecuado funcionamiento del sistema inmunológico induce una producción constante de citocinas inflamatorias y la activación prolongada de los linfocitos B, las cuales producen diversos tipos de auto-anticuerpos, es decir, anticuerpos que reconocen y atacan tejidos propios. Entre este tipo de anticuerpos se encuentran los anti-ADNcs, anti-ADNdc, los anticuerpos antinucleares (ANAS), que posteriormente forman complejos inmunes que dañan los tejidos como la piel y los riñones. Desafortunadamente, alrededor del 50% de los pacientes desarrollan una variedad de complicaciones y problemas clínicos como la nefritis, la hipertensión pulmonar, la artritis, entre otros; afectando su calidad de vida. Es por ello, que es de suma importancia el desarrollo de investigación enfocada

Fecha de recepción:

01/12/2022

Fecha de aceptación:

11/01/2023

<sup>1</sup>Estudiante de la Maestría en Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana.

<sup>2</sup>Unidad de Citometría de Flujo, Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana.

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad Veracruzana.

Autor de correspondencia

marildominguez@uv.mx

Conflicto de intereses: los autores declaramos no tener ningún tipo de conflicto de intereses en la realización y/o publicación del presente trabajo.

en la comprensión de las alteraciones en procesos biológicos que favorecen el inicio y progresión del LES así como la búsqueda de nuevas terapias (Figura 1)

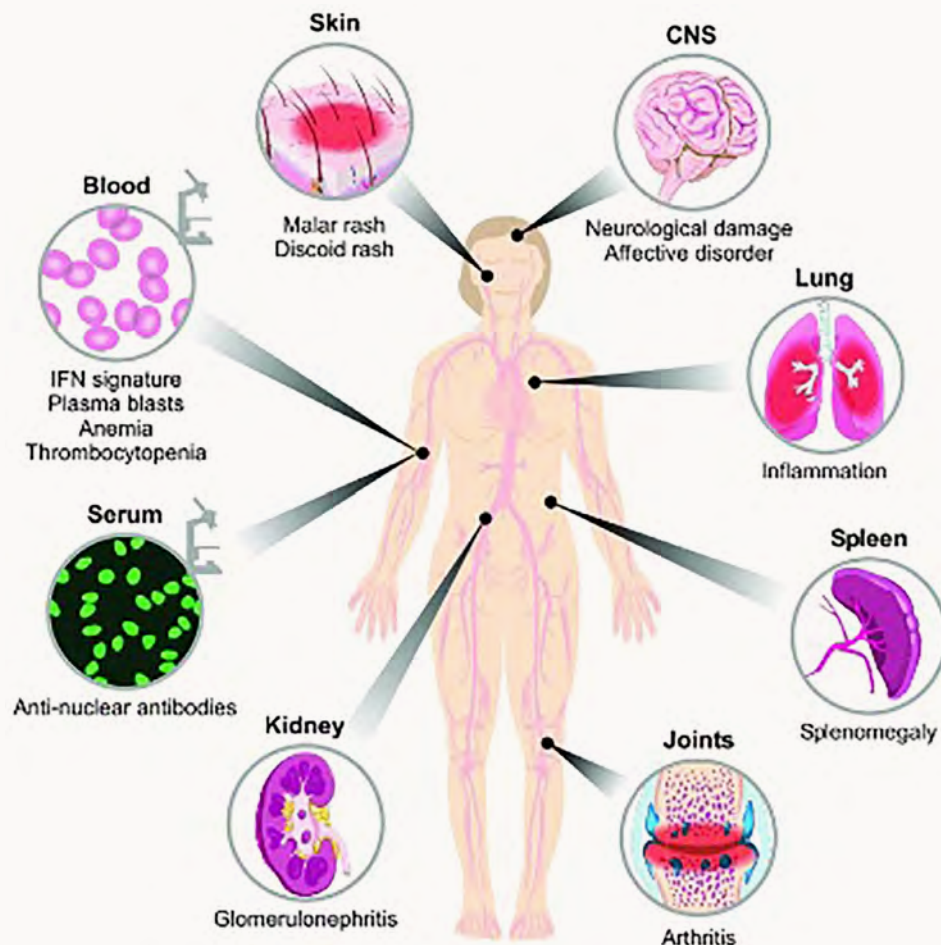


Figura 1

### Los modelos animales ayudan en la investigación del LES

A lo largo de los años, la investigación biomédica ha empleado diversos modelos animales para el estudio de la patogénesis de distintas enfermedades, así como sus enfoques terapéuticos. El estudio del LES no es la excepción, de tal forma que, en los últimos 50 años, se han creado diferentes modelos murinos (ratones) que desarrollan la enfermedad de manera espontánea, modelos que requieren ser inducidos, algunos modelos modificados genéticamente y humanizados, todos ellos

presentando características fenotípicas y clínicas de la enfermedad (Halkom et al., 2020). Entre todos estos, los modelos espontáneos son los más cercanos a mimificar el curso natural de la enfermedad de manera similar a lo que sucede en los pacientes.

En este sentido, el modelo de la cepa B6.MRL/MpJ-Fas<sup>lpr</sup>/J, es un claro ejemplo de ello. Este modelo fue generado mediante la cruce de cuatro diferentes cepas de ratones (LG un 75%, AKR un 12.6%, C3H un 12.1% y B6 un 0.3%). El resultado de esta cruce, fue una mutación espontánea en el gen codificante para la proteína Fas, que es un receptor importante para la apoptosis de los linfocitos T y B, confiriéndole la propiedad de linfoproliferación, también conocida como *lpr*. A diferencia de otros modelos, los ratones B6.MRL/MpJ-Fas<sup>lpr</sup>/J son capaces de desarrollar un panel completo de autoanticuerpos característicos del lupus en humanos, además presentan manifestaciones clínicas adicionales como la artritis, cerebritis, rash cutáneo y vasculitis (Reilly & Gilkeson, 2002). Otra ventaja de este modelo es que su fenotipo autoinmune comienza entre los tres y cinco meses de edad, por lo que la progresión de la enfermedad es mucho más lenta comparada con otros modelos, permitiendo un seguimiento a largo plazo (Figura 2)

Dentro de la Unidad de Citometría de Flujo (UCF) del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana, alumnos de licenciatura, posgrado e investigadores, se han dedicado al estudio de los aspectos moleculares y celulares del LES, así como de otras enfermedades asociadas con anomalías en la

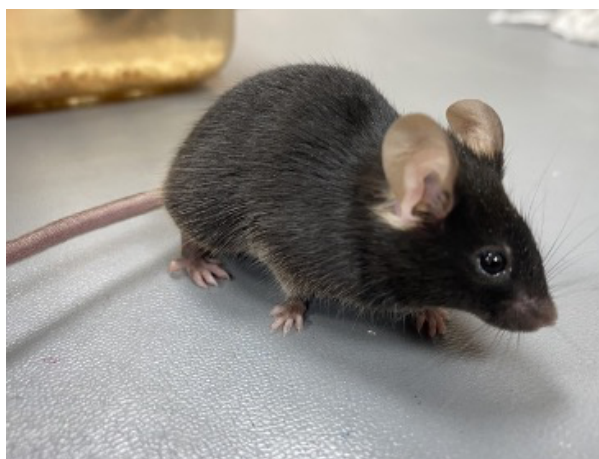


Figura 2



Figura 3

función y desarrollo del sistema inmunológico como las inmunodeficiencias primarias y el cáncer (Figura 3).

Actualmente, parte de la investigación que se desarrolla en la UCF se ha enfocado al estudio de compuestos naturales con un alto potencial terapéutico principalmente en enfermedades como el LES y el cáncer. El primer estudio de este tipo consistió en evaluar el efecto del flavonoide naringenina, encontrado principalmente en frutos cítricos, sobre el desarrollo del LES, empleando el modelo B6.MRL-Fas<sup>lpr</sup>/J (Abrego-Peredo et al., 2020). De manera más reciente, se comenzó el estudio del efecto del compuesto natural curcumina sobre la respuesta inmune antitumoral. Los resultados derivados de estas investigaciones han sido promisorios, por lo que ahora, estamos interesados en estudiar el efecto de la curcumina en la progresión y desarrollo del LES en el modelo B6.MRL-Fas<sup>lpr</sup>/J.

### La curcumina como posible alternativa terapéutica

La curcumina es un compuesto de la familia de los polifenoles que se encuentra en la raíz de la planta *Curcuma longa*. Desde la antigüedad, algunas civilizaciones asiáticas han empleado la curcumina en el tratamiento de algunas enfermedades por sus propiedades antiinflamatorias (Figura 4). Sin embargo, se desconocen los mecanismos de acción y sí produce efectos adversos. Es por ello que, en las últimas décadas, se ha incrementado la investigación profunda y seria, acerca del potencial terapéutico de la curcumina y otros compuestos naturales. En este sentido,



Figura 4

se ha propuesto que la curcumina disminuye algunas manifestaciones de la inflamación crónica en enfermedades autoinmunes, neoplásicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, etc. Dichos estudios han sido realizados en modelos animales, muestras de pacientes o líneas celulares (Castro et al., 2014; Handono et al., 2015; Srivastava et al., 2011). Sin embargo, aún se desconoce el potencial terapéutico que tiene la curcumina en las manifestaciones del LES, así como los mecanismos celulares y las vías moleculares implicadas.

### Evaluación del potencial terapéutico de la curcumina en el LES

Una vez establecidas dosis efectivas, las vías de administración y los periodos de tratamiento es necesario evaluar las propiedades terapéuticas de la curcumina en modelos murinos de LES. Para ello, la investigación puede apoyarse en un amplio espectro de técnicas como la ELISA, la microscopia de fluorescencia, el cultivo celular y la citometría de flujo, por mencionar algunas. Por ejemplo, la técnica de ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) nos permite determinar la presencia de los anticuerpos anti-ADNdc presentes en el suero (tanto en pacientes como en modelos animales), los cuales representan uno de los criterios diagnósticos más importantes para el LES. Para poder identificarlos, se emplean dos componentes acoplados: un anticuerpo (el cual se unirá al antígeno) y una enzima (que indicará la unión al antígeno). Para su realización, distintas diluciones del suero se colocan en una placa recubierta con un antígeno que, en este caso, será ADN, y se incuban a temperatura ambiente. Posterior-

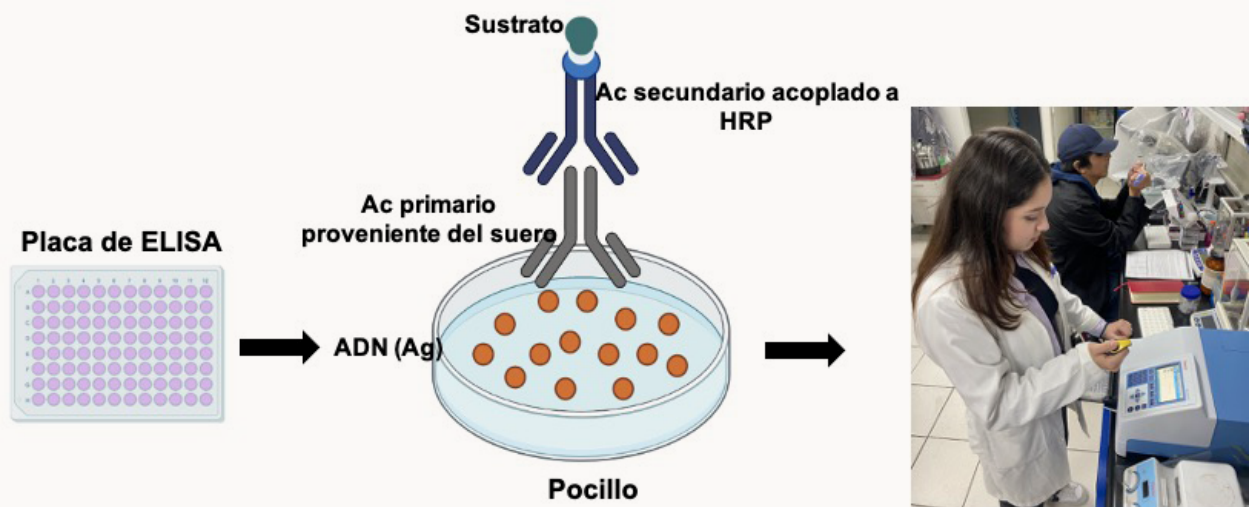


Figura 5

mente, se agrega un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, que en presencia de su sustrato específico, generará una reacción de color que permitirá el reconocimiento de los anticuerpos anti-ADNdc, finalmente estas placas son analizadas en un lector de ELISA a 450nm (Figura 5).

Por otra parte, para la detección de las inmunoglobulinas dirigidas en contra de diferentes componentes nucleares y citoplasmáticos, también denominados ANAS, se emplea un ensayo de inmunofluorescencia. Esta técnica cualitativa consiste en la visualización de moléculas a través de la señal que emite una molécula fluorescente, conocida como fluorocromo. Para ello, el suero del sujeto de estudio se incuba en una laminilla que tiene fijadas células Hep-20 (línea celular derivada

del carcinoma humano laríngeo) caracterizadas por tener núcleo y nucleolos grandes, facilitando la visualización de los complejos nucleares. Posteriormente, se agrega e incuba un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo, lo cual permitirá la visualización de los ANAS a través de un microscopio de fluorescencia (Figura 6).

A diferencia de los métodos descritos previamente, el cultivo celular nos permite aislar, crecer, mantener y reproducir células *in vitro*, es decir, fuera de su entorno natural, en una placa. Lo anterior, permite controlar las condiciones en las que se encuentran las células, a través de factores de crecimiento y nutrientes que tendrán influencia en su crecimiento óptimo manteniendo sus caracte-

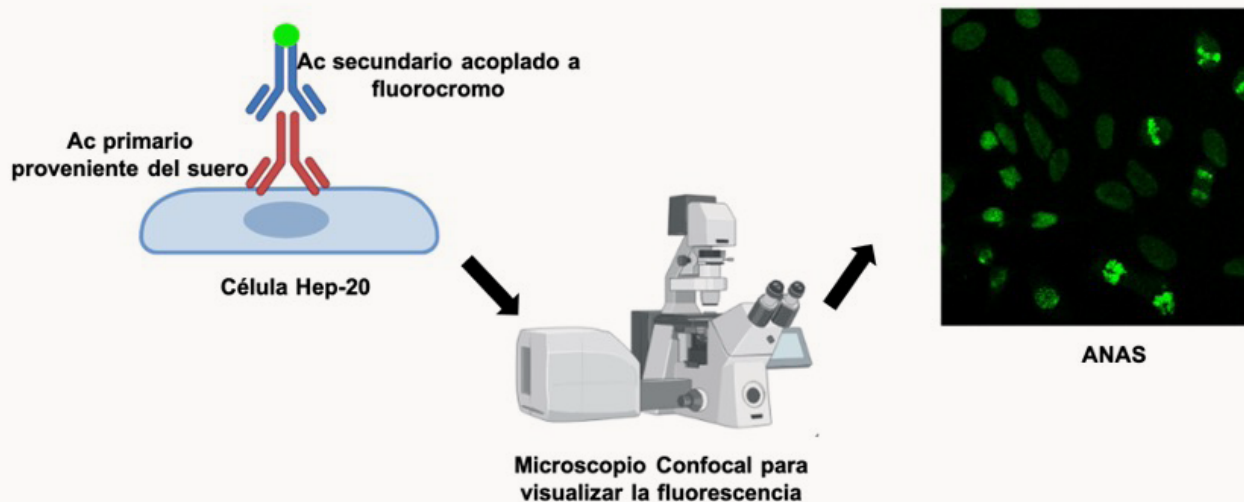


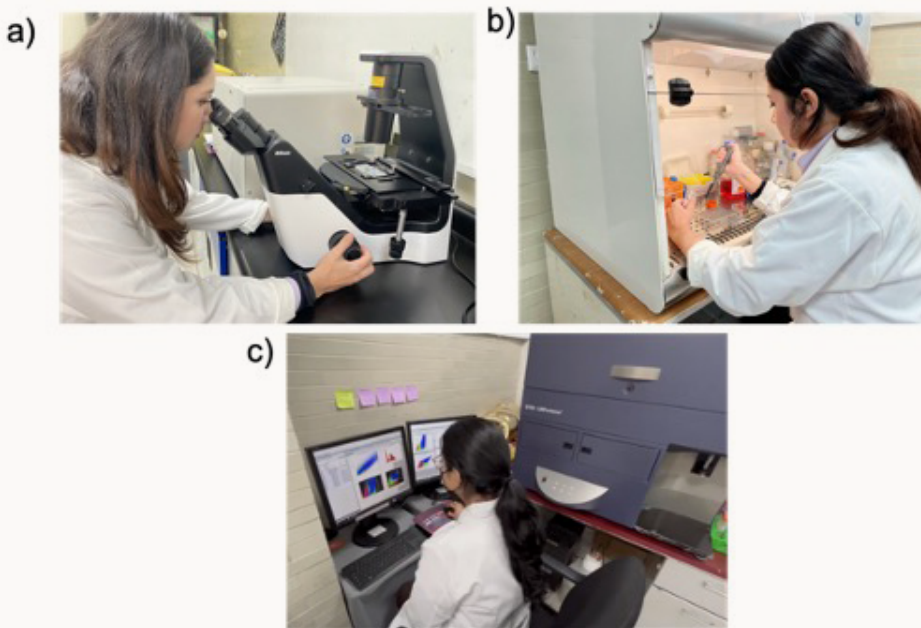
Figura 6

terísticas bioquímicas, genéticas, y fisiológicas. Con esta técnica se puede observar a través del microscopio el comportamiento y algunas características morfológicas de las células del modelo B6.MRL/MpJ-Fas<sup>lpr</sup>/J después de ser tratados con distintas concentraciones de curcumina (Figura 7 a y b).

Por otro lado, la citometría de flujo constituye una herramienta poderosa que permite un análisis multiparamétrico cuantitativo de una gran variedad de características celulares, como el tamaño, la complejidad, así como la expresión de distintas proteínas mediante el uso de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos. Las células que se adquieren en el equipo son transportadas en fila india a través de un sistema de fluidos hacia un punto de interrogación: un haz de luz. A su vez, un sistema óptico y otro electrónico digitalizan el comportamiento de cada célula al dispersar el haz de luz y emitir cierta fluorescencia al excitar los fluorocromos por el láser, facilitando la clasificación de poblaciones celulares específicas (Domínguez-Pantoja et al.,2018). Esta herramienta, permite determinar si el tratamiento con curcumina induce cambios en la expresión de ciertas proteínas o en las proporciones de las poblaciones celulares implicadas en el desarrollo del LES (Figura 7 c).

En conjunto, los datos obtenidos a través de todas estas técnicas nos proporcionarán las evidencias veraces acerca del efecto de la curcumina sobre un modelo murino de LES, así como los posibles mecanismos celulares y moleculares implicados. Estos datos permitirán la obtención de productos de alto impacto como son artículos científicos en revistas y foros nacionales e internacionales.





Figuras 7a, 7b y 7c

## Referencias

Abrego-Peredo, A., Romero-Ramírez, H., Espinosa, E., López-Herrera, G., García-García, F., Flores-Muñoz, M., Sandoval-Montes, C., & Rodríguez-Alba, J. C. (2020). Naringenin mitigates autoimmune features in lupus-prone mice by modulation of T-cell subsets and cytokines profile. *PLoS ONE*, *15*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233138>

Castro, C. N., Barcala Tabarozzi, A. E., Winnewisser, J., Gimeno, M. L., Antunica Noguerol, M., Liberman, A. C., Paz, D. A., Dewey, R. A., & Perone, M. J. (2014). Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, *177*(1), 149–160. <https://doi.org/10.1111/cei.12322>.

Domínguez-Pantoja M, López-Herrera G, Romero-Ramírez H, Santos-Argumedo L, Chávez-Rueda AK, Hernández-Cueto Á, Flores-Muñoz M, Rodríguez-Alba JC. (2018). CD38 protein deficiency induces autoimmune characteristics and its activation enhances IL-10 production by regulatory B cells. *Scand J Immunol*;87(6):e12664. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sji.12664>.

Halkom, A., Wu, H., & Lu, Q. (2020). Contribution of mouse models in our understanding of lupus. In *International Reviews of Immunology* (Vol. 39, Issue 4, pp. 174–187). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1742712>

Handono, K., Pratama, M. Z., Endharti, A. T., & Kalim, H. (2015). Treatment of low doses curcumin could modulate Th17/Treg balance specifically on CD4+ T cell cultures of systemic lupus erythematosus patients. *Central European Journal of Immunology*, 40(4), 461–469. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.56970>

Nusbaum, J. S., Mirza, I., Shum, J., Freilich, R. W., Cohen, R. E., Pillinger, M. H., Izmirly, P. M., & Buyon, J. P. (2020). Sex Differences in Systemic Lupus Erythematosus: Epidemiology, Clinical Considerations, and Disease Pathogenesis. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 95, Issue 2, pp. 384–394). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.09.012>

Reilly, C. M., & Gilkeson, G. S. (2002). *Key Words Lupus Mouse Knock out Autoimmune Use of Genetic Knockouts to Modulate Disease Expression in a Murine Model of Lupus, MRL/lpr Mice.*

Silverstein, A. M. (2001). Autoimmunity versus horror autotoxicus: The struggle for recognition. *Nature*, 2, 279–281.

Srivastava, R. M., Singh, S., Dubey, S. K., Misra, K., & Khar, A. (2011). Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. In *International Immunopharmacology* (Vol. 11, Issue 3, pp. 331–341). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.014>