

Los extractos acuoso y metanólico de *Berberis darwinii* H. (Berberidaceae) inhiben respuestas celulares innatas en monocitos humanos tratados *in vitro*

[Aqueous and methanol extracts of *Berberis darwinii* H. (Berberidaceae) inhibit innate cellular responses in human monocytes *in vitro* treated]

David ALARCÓN¹, Marco PAREDES¹, Daniela RAMOS², Katerina GONZÁLEZ³,
Ramiro DÍAZ³ & Daniela NÚÑEZ¹

¹Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal, Universidad de La Frontera, Temuco Chile

²Escuela de Tecnología Médica, Universidad Santo Tomás, Temuco, Chile.

³Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, Chile.

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

Abstract: *Berberis darwinii* H is a native plant of South America, popularly referred to Michay. This species has historically been used by indigenous cultures of Chile as medicinal herb. To preliminarily assess their anti-inflammatory effects was investigated the aqueous and methanolic root extract this plant in human monocytes. The results indicated that the extracts inhibit the production of superoxide anion, the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1-beta (IL-1 β) in monocytes activated with lipopolysaccharide. This result suggests the existence of compounds with potential anti-inflammatory action in these extracts.

Keywords: *Berberis darwinii* H, macrophage, TNF- α , IL-1 β .

Resumen: *Berberis darwinii* H. es una planta nativa de América del Sur, conocida popularmente como Michay. Esta especie ha sido históricamente utilizada por las culturas indígenas de Chile como hierba medicinal. Con el fin de evaluar preliminarmente sus efectos anti-inflamatorios, se investigaron dos tipos de extractos; metanólico y acuoso, preparados a partir de la raíz de esta planta. Los resultados indican que estos extractos inhiben la producción de anión superóxido, la expresión del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y de interleucina-1beta, (IL-1 β) en monocitos activados con lipopolisacárido. Estos resultados sugieren la existencia de compuestos con potencial acción antiinflamatoria en esta planta.

Palabras Clave: *Berberis darwinii* H, monocito, TNF- α , IL1- β .

Recibido | Received: 7 de Diciembre de 2012

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 18 de Mayo de 2013

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2014

Declaración de intereses | Declaration of interests: Se agradece a INNOVA Chile de CORFO por la sustentación económica de este trabajo mediante el Proyecto D10i-1038.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: D Alarcón, M Paredes, D Ramos, K González, R Díaz, D Núñez. 2014. Los extractos acuoso y metanólico de *Berberis darwinii* H. (Berberidaceae) inhiben respuestas celulares innatas en monocitos humanos tratados *in vitro*. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 13(1): 81 – 91.**

INTRODUCCIÓN

Berberis darwinii Hook, es una especie vegetal perteneciente a la familia *Berberidaceae* que habita el sur de Chile y zonas cordilleranas de la Patagonia Argentina (Landrum, 1999). Esta familia está representada en Chile solo por el género *Berberis* con aproximadamente 50 especies (Fajardo et al., 2005). *B. darwinii*, es un arbusto ramificado, espinoso y de hoja perenne, que sobrepasa los 4 metros de altura, las flores son de color amarillo, de nueve pétalos y su fruto maduro es una baya oval de color azul oscuro (Allen y Wilson, 1992).

Estas plantas han jugado un rol importante dentro de la medicina por sus propiedades medicinales. Un ejemplo conocido, es *Berberis vulgaris*, la cual ha sido utilizada desde tiempos ancestrales en diversas localidades del mundo como medicina natural para el tratamiento de diarrea, inflamaciones, úlceras, hemorragias digestivas y enfermedades del tracto urinario (Arayne et al., 2007). El género *Berberis* se caracteriza por la presencia en sus tallos y raíces de diversos tipos de fitoquímicos a los que se les atribuyen muchas de las propiedades medicinales, destacándose la existencia de ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y principalmente alcaloides (Fatehi et al., 2005; Araya, 2006).

En Chile, “el michay” (nombre común dado a diversas especies del género *Berberis* nativas) ha sido utilizado históricamente por la etnia mapuche como planta medicinal, para el tratamiento contra estados febriles, procesos inflamatorios, dolores estomacales, indigestiones y colitis (Muñoz et al., 2001), sin embargo existen algunos estudios con especies chilenas que demuestran mediante bioensayos *in vitro* o *in vivo* propiedades farmacológicas de estas especies (Morales et al., 1989; Morales et al., 1993; Martínez et al., 1997; Martínez, 2003; Osorio et al., 2008; Bhardwaj and Kaushik, 2013). De este modo el propósito de este trabajo fue evaluar *in vitro*, el efecto de los extractos acuoso y metanólico obtenidos a partir de raíces de *B. darwinii*, sobre la producción de anión superóxido y expresión citoquinas pro-inflamatorias tales como interleuquina 1 beta (IL1- β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En este contexto experimental se evaluó la hipótesis de que los extractos inhiben la expresión de respuestas celulares defensivas en monocitos activados con compuestos reconocidamente estimulantes tales como lipopolisacárido y forbol miristato acetato (Fernández et al., 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

El material vegetal (*B. darwinii*) fue recolectado durante el mes de enero del 2011, desde su hábitat natural en la precordillera, cercana a la localidad de Melipeuco, Región de La Araucanía, Chile. Las plantas se transportaron en recipientes refrigerados y en oscuridad al lugar de procesamiento. Se lavaron con agua corriente y posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1%. A continuación se separaron las raíces y se secaron a 40° C durante 2 días. Luego del secado, estas fueron pulverizadas en una trituradora previamente desinfectada con etanol al 75%. El material pulverizado se pesó y almacenó a -80° C hasta su utilización.

La identificación taxonómica se llevó a cabo por el profesor Enrique Hauenstein de La Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Católica de Temuco. Un ejemplar de muestra fue depositado en el herbario del Laboratorio de Botánica con el número de muestra Bd/UCT101.

Preparación de extractos metanólico y acuoso

Extracto metanólico (fracción acuosa):

Se maceraron 100 g de raíces pulverizadas de *B. darwinii* en un litro de metanol puro (Merck, USA) durante seis días, con agitación constante y en oscuridad. El extracto obtenido fue concentrado en un rotavapor (Hi Tech, RE-52A), bajo presión reducida a 30° C, obteniéndose 9,5 g de un residuo de color marrón oscuro. El residuo fue resuspendido en un litro de agua destilada y posteriormente se desgrasó por extracción líquido-líquido con n-hexano (3 x 200 ml). La fracción de n-hexano se desechó y la fracción acuosa se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio con presión reducida a 30° C. El residuo concentrado se disolvió en 200 ml de agua destilada a 35° C y posteriormente se liofilizó en un equipo alfa 1-4 LD (Chrits, Germany) obteniéndose 6,14 g de material liofilizado.

Extracto acuoso:

Se preparó una infusión con 100 g de raíz pulverizada de *B. darwinii* y 500 ml de agua destilada a 90 °C durante 15 min con agitación constante. Posteriormente esta primera infusión se filtró, recuperando el material vegetal húmedo el cual fue procesado de la misma forma dos veces consecutivas

obteniéndose 1,5 litros. Finalmente este volumen de infusión se filtró a través de una membrana de 45 nm y luego se liofilizó en un equipo alfa 1-4 LD (Chrits, Germany), obteniéndose 1,50 g de material liofilizado.

Aislamiento y cultivo primario de monocitos humanos

La obtención de monocitos se realizó a partir de sangre periférica, la que se obtuvo mediante punción venosa anticubital a 6 personas, previa firma de consentimiento informado y aprobación por el Comité de Ética de La Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera. Según los criterios de exclusión para la toma de muestra, no se consideraron personas que tuvieran historial médico de infecciones recientes, ni tratamientos con inmunomoduladores u otros con efecto sobre el sistema inmune, aceptándose solo individuos sanos, tanto hombres como mujeres. La muestra de sangre fresca fue recolectada en tubos Vacutainer de 4 ml con heparina como anticoagulante. La separación de monocitos, se realizó de acuerdo a metodología descrita por Majsky (1982) con pequeñas modificaciones. Para ello se preparó un gradiente discontinuo de percoll en tubos de 10 ml, agregando en primer lugar 2 ml de Percoll 72%, luego 2 ml de Percoll 63%. Sobre el gradiente se depositaron 2 ml de sangre. Los tubos se centrifugaron a 2.000 g por 25 minutos. Luego, se extrajo el anillo de monocitos formado. Las células se resuspendieron en 3 ml de buffer fosfato salino (PBS), centrifugando luego a 2.000 g por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Este proceso de lavado se repitió tres veces. Finalmente, las células fueron resuspendidas en RPMI-1640 (Caisson Labs, USA) para su posterior uso. La pureza del aislamiento se evaluó mediante análisis microscópico de un frotis celular previamente teñido con May Grunwald Giemsa.

Conteo de células y evaluación de viabilidad

Se realizó el conteo de células y se estimó el porcentaje de viabilidad utilizando una cámara de Neubauer. Para ello, se prepararon diluciones (1:10 v/v) de las suspensiones celulares las cuales se mezclaron con azul tripan al 0,1% de concentración final (Barriga, 2008). Se depositaron 20 μ l de suspensión celular diluida sobre la cámara y se contabilizaron células viables (translucidas) y no

viables (azules). Las suspensiones celulares se ajustaron a 1×10^6 cel/ml para su posterior uso en los ensayos *in vitro*. Se procesaron 6 muestras de sangre de individuos diferentes y tres réplicas técnicas por cada una. Los ensayos funcionales y moleculares descritos en adelante se realizaron con este mismo número de muestras.

Evaluación de la citotoxicidad de los extractos

Para estimar el efecto de los extractos sobre la viabilidad celular se utilizó el método por exclusión de azul tripan según Barriga (2008). Para ello se prepararon cultivos de monocitos (5×10^4 células/ml) en RPMI-1640 suplementado con ampicilina y estreptomycin (100 mg/ml), suero fetal bovino 10% y diferentes concentraciones del extracto (10, 1, y 0,1 mg/ml). Los cultivos se incubaron a 37° C y 5% CO₂ por 18 y 72 horas.

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, se prepararon cultivos primarios en medio RPMI-1640 suplementado con ampicilina y estreptomycin (100 mg/ml), suero fetal bovino 10%, PMA, LPS, y extracto vegetal según como se describe en la Tabla N° 1. Se utilizó una concentración de 0,1 mg/ml del extracto ya que esta concentración no tuvo efectos citotóxicos según los análisis previos (1A y 1B). Los cultivos fueron incubados a 37° C y 5% CO₂ por 20 horas en placas de 96 posillos. A continuación, se descartó el medio y se lavó la monocapa celular dos veces con 250 μ l de medio de cultivo. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de RPMI-1640 suplementado con nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) a una concentración final de 1mg/ml. Se incubó a 37° C por 60 min y posteriormente se desechó el medio y se agregó 100 μ l de metanol, incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se desechó el metanol y la placa de cultivo se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min. Seguidamente, se agregaron 120 μ l de KOH 2M y 140 μ l de dimetil sulfóxido (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).

Tabla 1

Tratamientos experimentales utilizados para evaluar el efecto del extracto acuoso (EA) y fracción acuosa del extracto metanólico (EM) de raíz de *B. darwinii* sobre la expresión de IL-1 β y TNF- α y producción de anión superóxido en monocitos humanos activados con LPS y PMA

Tratamientos	Monocitos (1x10 ⁶ Cel/ml)	PMA (1 μ g/ml)	LPS (50 ng/ml)	Extracto Acuoso (0,1 mg/ml)	Extracto Metanólico (0,1 mg/ml)
Control negativo	+	-	-	-	-
Control PMA	+	+	-	-	-
Control LPS	+	-	+	-	-
PMA + EA	+	+	-	+	-
PMA + EM	+	+	-	-	+
LPS + EA	+	-	+	+	-
EA	+	-	-	+	-
EM	+	-	-	-	+

IL-1 β : Interleuquina 1 beta. TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa. PMA: Acetato de forbol miristato. LPS: lipopolisacarido

Evaluación de la expresión de IL-1 β y TNF- α por medio de PCR en Tiempo Real

Se evaluó el efecto de los extractos sobre la expresión transcripcional de IL-1 β y TNF- α en monocitos estimulados y no estimulados con LPS y PMA. Para ello, se prepararon cultivos de 500 μ l en tubos de 1,5 ml conteniendo RPMI-1640 suplementado con ampicilina y estreptomycinina (100 mg/ml), suero fetal bovino 10%, PMA, LPS, y extracto vegetal según como se describe en la Tabla N° 1. Los cultivos fueron incubados a 37° C y 5% CO₂ por 20 horas. Posteriormente, las células fueron sedimentadas centrifugando los tubos a 10.000 g por 10 min, se desechó el medio de cultivo y a partir del sedimento celular se extrajo ARN total de acuerdo a la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). La concentración del ARN, se estimó según Sambrook *et al.*, (1989), utilizando la ecuación [ARN] = OD260 x FD x 40 μ g/ml, donde FD es el factor de dilución y OD260 la absorbancia medida a 260 nm. Mientras que la pureza se evaluó mediante la razón de absorbancia OD260/OD280, considerado valores de 1,75 a 1,95 como buena estimación de pureza (Sambrook *et al.*, 1989). A partir de 1 μ g de ARN total, se preparó ADN complementario (ADNc) utilizando el kit *High capacity RNA-to-cDNA* (Applied

Biosystems, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La expresión transcripcional de IL-1 β y TNF- α se evaluó mediante RT-PCR en Tiempo Real, aplicando un método de cuantificación relativa tal como se describe en Matamala *et al.*, (2010). Los niveles de expresión son presentados gráficamente como unidades de expresión relativa respecto al control (RQ). Para la amplificación por RT-PCR en Tiempo Real se utilizó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas, USA). Las condiciones térmicas de amplificación se programaron con un ciclo inicial de 10 minutos a 95° C, seguido de 40 ciclos compuestos cada uno por desnaturalización a 95° C por 25 s, hibridación a 60° C por 25 s y elongación a 72° C por 25 s. Adicionalmente se realizó un análisis de fusión de los productos amplificados para evaluar la especificidad de la reacción. Los partidores utilizados, se obtuvieron a partir de las secuencias nucleotídicas de los ADN complementarios de IL-1 β y TNF- α almacenados en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El diseño de partidores se realizó con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Las secuencias de los partidores utilizados se muestran en la Tabla N° 2.

Tabla 2.

Partidores utilizados para evaluar la expresión transcripcional de IL-1 β , TNF- α y β -actina por RT-PCR en tiempo real, en monocitos humanos activados con LPS y PMA

Nombre del partidor	Secuencia	Acceso a Genbank
L-ILH	5'- CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA-3	NM 000576.2
R-ILH	5'- TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA-3	NM 000576.2
L-TNFH	5'- GGAGCCAGCTCCCTCTATTT-3	NM 000594.2
R-TNFH	5'- GGCTACATGGGAACAGCCTA-3	NM 000594.2
L- β -actina	5'- AAGACCTGTACGCCAACACA-3	NM 001101.3
R- β -actina	5'- ATCCACATCTGCTGGAAGGT-3	NM 001101.3

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de 6 muestras de sangre de individuos diferentes y tres réplicas técnicas por cada una, se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó un test de Dunnett's, considerándose significativa las diferencias cuando el valor $p < 0,05$. Para el análisis se utilizó el programa Prisma 5.0.

RESULTADOS

Evaluación de toxicidad celular de los extractos de *B. darwinii*

La evaluación de la citotoxicidad de los extractos etanólicos y acuosos de *B. darwinii* sobre monocitos humanos tratados *in vitro*, indica que los extractos tienen efectos citotóxicos relativamente bajos en el rango de las concentraciones y tiempos de exposición evaluados (Figuras 2A y 2B). Particularmente, ambos tipos de extractos aplicados en concentración de 0,1 mg/ml no afectaron la viabilidad celular, presentando niveles similares a los cultivos controles sin extractos (Figura 2A y 2B). Se observó una mayor efecto citotóxico a las 18 y 72 horas, en los cultivos tratados con la fracción acuosa del extracto metanólico en las concentraciones de 1 y 10 mg/ml.

Efecto de extractos acuoso y metanólico (fracción acuosa) sobre la producción de anión superóxido

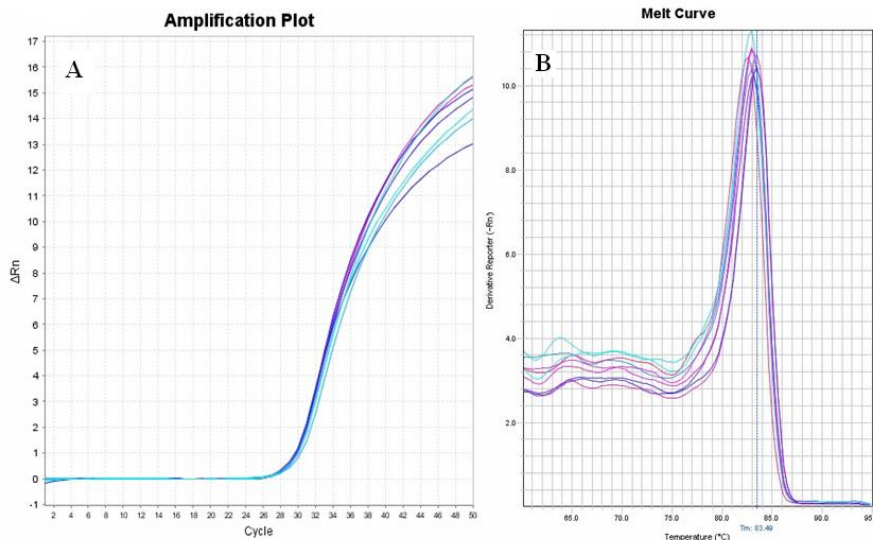
Los cultivos celulares tratados con PMA y LPS incrementaron significativamente el nivel de anión superóxido intracelular respecto al control no tratado

($p < 0,05$), demostrando la utilidad de estos compuestos como controles positivos (Figura 3). Ambos extractos disminuyeron de forma significativa ($p < 0,05$) la producción de anión superóxido en monocitos activados con LPS o PMA respecto a los controles positivos estimulados solo con LPS o PMA, siendo mayor el efecto de los extractos sobre los monocitos activados con LPS (Figura 3).

Análisis de expresión de IL-1 β y TNF- α

La Figura 1 muestra las curvas de amplificación y fusión de los productos de RT-PCR de IL-1 β , TNF- α y β -actina (control endógeno). Se observa solo un producto de amplificación por cada gen demostrando la especificidad de las reacciones de amplificación y por consiguiente la validación de este método para la determinación cuantitativa de la expresión transcripcional de IL-1 β , TNF- α según como se describe en Matamala *et al.*, (2010). Los monocitos estimulados con PMA o LPS incrementan significativamente ($P < 0,05$), el nivel de expresión de los transcritos de IL-1 β y TNF- α respecto al control negativo (Figuras 4 y 5). El nivel de expresión de IL-1 β en monocitos activados con PMA y suplementados con extracto acuoso o metanólico no difirió significativamente respecto a las células activadas solo con PMA (Figura 4). En cambio, los monocitos estimulados con LPS y suplementados con el extracto acuoso o metanólico, disminuyeron significativamente la expresión respecto al control tratado solo con LPS (Figura 4).

Figura 1



Curvas de amplificación (A) y de fusión (B) del gen endógeno β -actina obtenidas a partir de RT-PCR del ARN total extraído de monocitos tratados con extracto acuoso y fracción acuosa del extracto metanólico de raíz de *B. darwinii*. Cada línea representa una reacción de amplificación y fusión de cada muestra en reacciones individuales. La expresión transcripcional de β -actina fue utilizada como datos normalizantes según el sistema de cuantificación relativa descrito en Matamala et al, (2010). La reacción de amplificación y análisis de fusión se realizó con el equipo y software StepOne de Applied Biosystems (USA).

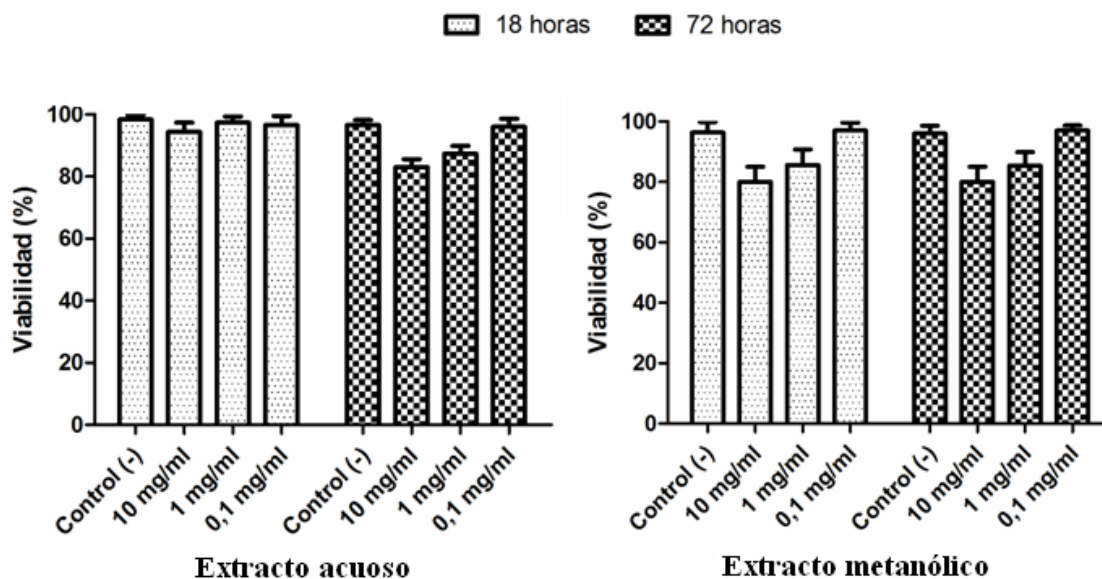
El análisis de la expresión transcripcional de TNF- α , muestra un patrón de expresión similar al obtenido para el transcrito de IL-1 β (Figura 5). En cultivos estimulados con PMA y suplementados individualmente con ambos tipo de extractos se observó una disminución de la expresión de esta interleuquina, sin que esta fuera significativa. En cambio en células estimuladas con LPS mas los extractos aplicados de forma individual se observa una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$; Figura 5),

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo, indican que los extractos acuosos y fracción acuosa del extracto metanólico de la raíz de *B. darwinii* afectan negativamente respuestas celulares en monocitos humanos relacionadas con inmunidad innata tales como generación de anión superóxido intracelular y expresión génica de IL-1 β y TNF- α . Estos efectos eventualmente podrían estar relacionados con la presencia en estos extractos de compuestos fitoquímicos con actividad biológica tal como se ha descrito en otras especies de la familia Berberidaceae (Yesilada, 2002; Fatehi et al., 2005).

Figura 2.

Determinación de la citotoxicidad de los extractos acuosos y metanólicos (fracción acuosa) de raíz de *B. darwinii* mediante evaluación de viabilidad por exclusión de azul tripan en cultivo primario de monocitos humanos. Los datos fueron obtenidos a partir de células obtenidas de 6 muestras de sangre y son expresados como la media \pm S.D. Los ensayos fueron realizados en triplicado para cada muestra y los valores se registraron a las 18 y 72 horas post-tratamiento.



Uno de los compuestos mejor estudiados y con mayor evidencia relacionada con efectos inmunológicos son los alcaloides berberínicos cuyas concentraciones son especialmente elevada en raíces de especies del género *Berberis* (Fajardo, 1992; Gómez *et al.*, 2011). Por ejemplo los alcaloides aislados de *Berberis vulgaris*, estimulan la expresión de IL-12p40, la subunidad mayor de IL-12 en macrófagos murinos, vía activación de la proteína quinasa mitógena activadora de p38 (Kang *et al.*, 2002). También se ha demostrado que alcaloides de esta misma especie incrementan de manera significativa los niveles de ARNm de diversas citoquinas de manera dosis dependiente (Kim *et al.*, 2008). Publicaciones que describen actividades

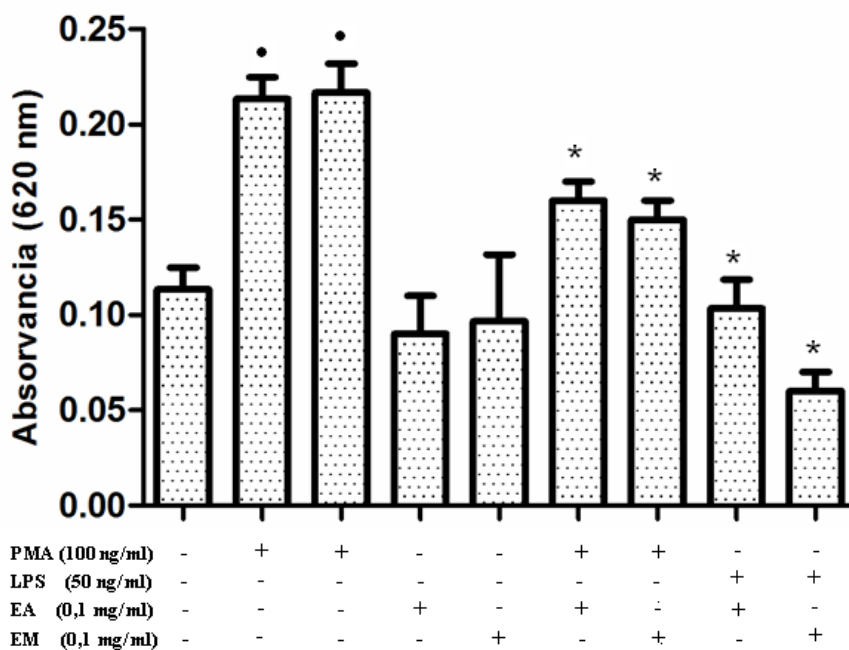
antiinflamatorias de alcaloides derivados de plantas como *Annona muricata* (Victoria *et al.*, 2006), *Zanthoxylum elephantiasis* (González *et al.*, 2008), *Piper auritum*. (Nair *et al.*, 1989; Ortega *et al.*, 1996), permiten sugerir que estos compuestos tienen la capacidad de modular la respuesta inmunológica y que eventualmente estos efectos podrían estar relacionados con la inhibición de vías transductoras de señales que incrementan el nivel transcripcional de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β y TNF- α en macrófagos y otras células que expresan estos genes. Particularmente, nuestros datos indican que los extractos acuosos y metanólicos disminuyen la producción de anión superóxido y el nivel de expresión de IL-1 β y TNF- α en monocitos estimulados PMA o LPS siendo más significativa la

disminución en células estimuladas con LPS lo cual podría indicar que los extractos interfieren la vía de activación asociada a este compuesto. Se debe considerar que PMA y LPS activan monocitos por diferentes vías de señalización intracelular induciendo producción de anión superóxido y expresión genérica de moléculas proinflamatorias (Yagawa *et al.*, 1985; Gomez *et al.*, 2010), por lo tanto se puede sugerir que la vías moleculares asociadas a la activación por LPS podrían estar mas directamente afectadas por los extractos evaluados en este trabajo. Cabe señalar que el LPS es uno de los principales componentes de la

superficie externa de bacterias Gram negativas y constituye un potente activador de células del sistemas inmune incluyendo macrófagos, monocitos, neutrófilos y células endoteliales (Moreno y Sánchez, 2003). Por lo tanto la inhibición de su actividad se constituye como un mecanismo anti-inflamatorio asociado a células que modulan este tipo de respuestas y podría explicar los efectos benéficos de sus infusiones en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, incluyendo lumbago y reumatismo (Yesilada, 2002).

Figura 3

Producción de anión superóxido en cultivo primario de monocitos humanos tratados con extracto acuoso (EA) y fracción acuosa del extracto metanólico (EM) de raíz de *B. darwinii*. Los datos fueron obtenidos a partir de células (10^6 cel/ml) obtenidas de 6 muestras de sangre humana y son expresados como la media \pm S.D. Los ensayos fueron hechos en triplicado. El símbolo • indica un valor $p < 0,05$ respecto al control negativo. El símbolo * indica un valor $p < 0,05$ respecto a los controles positivos PMA y LPS.



Esta primera aproximación ha permitido demostrar que los extractos de *B. darwinii* poseen compuestos activos que inducen respuestas celulares a nivel de monocitos activados relacionadas con la inhibición de respuestas innatas que eventualmente

podría tener aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de patologías inflamatorias. Futuros trabajos permitan fraccionar y caracterizar los extractos de *B. darwinii* para evaluar sus efectos a nivel de compuestos mejor caracterizados.

Figura 4.

Estimación de los niveles de expresión transcripcional de IL-1 β mediante RT-PCR en tiempo real de monocitos humanos tratados con extracto acuoso (EA) y fracción acuosa del extracto metanólico (EM) de raíz de *B. darwinii*. Los datos fueron obtenidos a partir de células (10⁶ cel/ml) obtenidas de 6 muestras de sangre humana y son expresados como la media \pm S.D. Los ensayos fueron hechos en triplicado. El símbolo • indica un valor p < 0,05 respecto al control negativo. El símbolo * indica un valor p < 0,05 respecto a los controles positivos PMA y LPS.

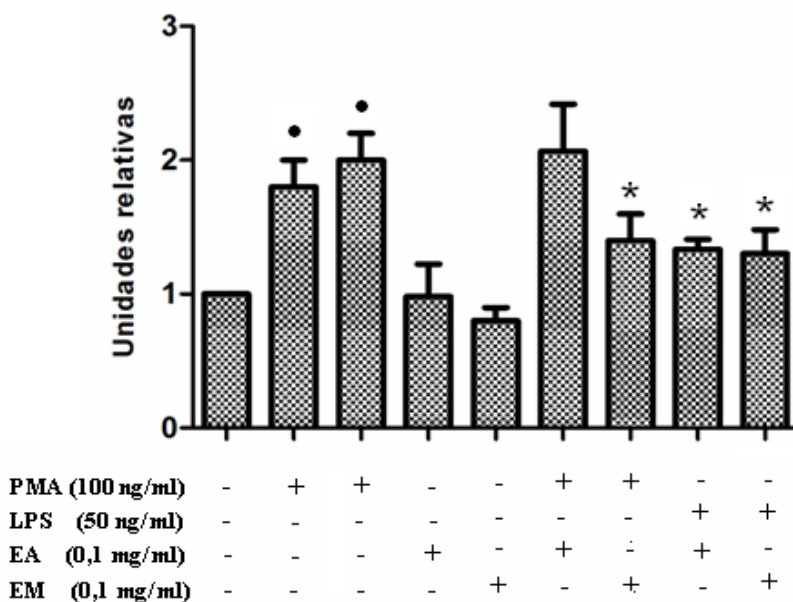
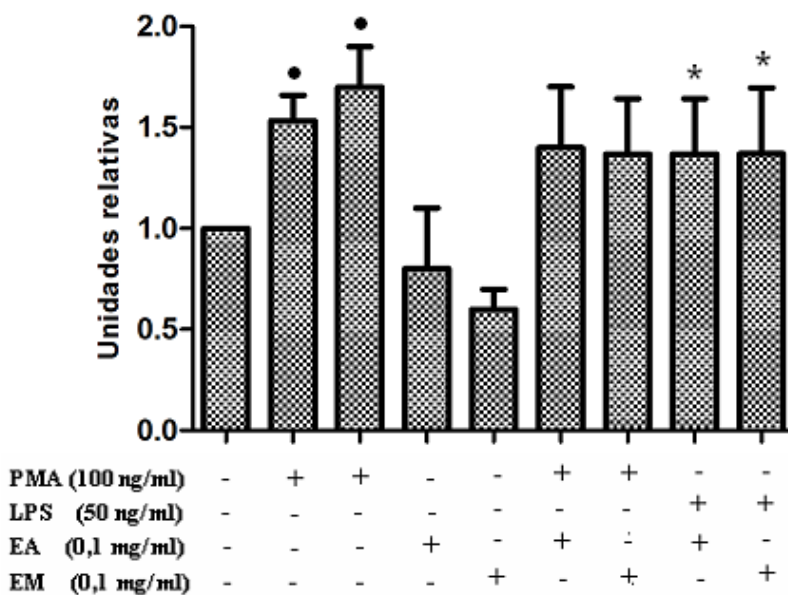


Figura 5.

Estimación de los niveles de expresión transcripcional de TNF- α mediante RT-PCR en tiempo real de monocitos humanos tratados con extracto acuoso (EA) y fracción acuosa del extracto metanólico (EM) de raíz de *B. darwinii*. Los datos fueron obtenidos a partir de células (10⁶ cel/ml) obtenidas de 6 muestras de sangre humana y son expresados como la media \pm S.D. Los ensayos fueron hechos en triplicado. El símbolo • indica un valor p < 0,05 respecto al control negativo. El símbolo * indica un valor p < 0,05 respecto a los controles positivos PMA y LPS.



CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos y metanólicos de *B. darwinii* disminuyen la producción de anión superóxido y citoquinas proinflamatorias en monocitos activados con LPS y PMA. Esto sugiere la presencia en estos extractos de compuestos que modulan negativamente vías metabólicas asociadas con la actividad defensiva de estas células. Próximos estudios permitirán aislar y caracterizar estos compuestos y evaluar posibles aplicaciones farmacológicas como antiinflamatorios.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a INNOVA Chile de CORFO por la sustentación económica de este trabajo mediante el Proyecto D10i-1038.

REFERENCIAS

- Allen RB, Wilson JB. 1992. Fruit and seed production in *Berberis darwinii* Hook, a shrub recently naturalized in New-Zealand. **J Bot** 30: 45 - 55.
- Arayne M, Sultana N, Bahadur S. 2007. Review. The Berberis store: *Berberis vulgaris* in therapeutics. **Pak J Pharm Sci** 20: 83 - 92.
- Araya M. 2006. **Estudio químico de *Berberis coletiodes***. Tesis Facultad de Ingeniería. Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.
- Barriga M. 2008. **Conteo y evaluación de la viabilidad de células mononucleares**. Protocolos y métodos Laboratorio de Biología Molecular Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Bhardwaj D, Kaushik N. 2013. Phytochemical and pharmacological studies in genus *Berberis*. **Phytochem Rev** Doi 1.1007/s11101-013-9272-x.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. RNA isolation from cultured cells. **Anal Biochem** 162: 156 - 159.
- Fajardo V, Salmerón M, Cuadra P, Herrera R, Moreno B, Villarroel L. 2005. **Estudio químico de plantas australes**. En Flora de Chile. Biología, farmacología y química. Editorial Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile.
- Fajardo V. 1992. **Alcaloides en las especies del género *Berberis***. En: Muñoz, O. (ed) Química de la flora de Chile. Santiago, Chile.
- Fatehi M, Saleh T, Fatehi-Hassanabad Z, Farrokhfal K, Jafarzadeh M, Davodi S. 2005. A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. **J Ethnopharmacol** 102: 46 - 52.
- Fernandes ML, Mendes ME, Brunialti MK, Salomão R. 2010. Human monocytes tolerant to LPS retain the ability to phagocytose bacteria and generate reactive oxygen species. **Braz J Med Biol Res** 43: 860 - 868
- Gomes NE, Brunialti MK, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. 2010. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. **Braz J Med Biol Res** 43: 853 - 859.
- Gómez H, González K, Medina J. 2011. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 182 - 217.
- González JA, Vélez H, Nuevas L, Márquez L, Garrido G, González K. 2008. Aislamiento y efecto antiinflamatorio de un alcaloide de *Zanthoxylum elephantiasis* Macf (Rutaceae) introducida en Cuba. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 7: 264 - 267.
- Kang BY, Chung SW, Cho D, Kim TS. 2002. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the induction of interleukin-12 p40 production in mouse macrophages by berberine, a benzodioxoloquinoline alkaloid. **Biochem Pharmacol** 63: 1901 - 1910.
- Kim S, Kim Y, Kim JE, Cho KH, Chung JH. 2008. Berberine inhibits TPA-induced MMP-9 and IL-6 expression in normal human keratinocytes. **Phytomedicine** 15: 340 - 347.
- Landrum L. 1999. Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and Adjacent Southern Argentina. **Ann Missouri Bot Gard** 86: 793 - 834.
- Majsky A. 1982. Monocyte isolation using Percoll. A comparison with the adherence method. **Cas Lek Cesk** 121: 584 - 585.
- Martinez JL, Torres R, Morales MA. 1997. Hypotensive effect of O-methylisothallicberine, bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Berberis chilensis*, on normotensive rats. **Phytother Res** 11: 246 - 248.
- Martinez JL. 2003. Alcaloides bisbencilisoquinolinicos como antagonista de calcio de origen natural: comparación de actividades

- (artículo de revisión). **Rev Asoc Col Cienc Biol (Colombia)** 15: 11 - 32.
- Matalama F, Paredes M, Cornejo R. 2010. Efecto del láser de baja energía sobre la expresión de GAP-43 (growth associated protein 43) en nervio isquiático de rata. **Int J Morphol** 28: 815 - 821.
- Morales MA, Gallardo R, Martínez JL, Puebla RS, Hernández DA. 1989. Effects of 7-O-demethylisothalicerine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid of *Berberis chilensis*, on electrical activity of frog cardiac pacemaker cells. **Gen Pharmacol** 20: 621 - 625.
- Morales MA, González E, Torres R, Martínez JL. 1993. Cardiodepressor effects of 7-O-Demethylisothalicerine, bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Berberis chilensis*. **Arch Med Res** 24: 177 - 181.
- Moreno C, Sánchez A. 2003. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. **Rev Med Univ Navarra** 47: 29 - 33.
- Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. 2001. **Plantas medicinales de uso en Chile**. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, Chile.
- Nair MG, Sommerville J, Burke BA. 1989. Phenyl propenoids from roots of *Piper auritum*. **Phytochemistry** 28: 654 - 655.
- Ortega T, Carretero MT, Pascual E, Villar AM. 1996. Antiinflammatory activity of ethanolic extracts of plants used in traditional medicine in Ecuador. **Phytother Res** 10: 121 - 122.
- Osorio EJ, Robledo SM, Batista J. 2008. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, Chapter 2 Alkaloids with antiprotozoal activity. Volume 66: 113 - 190.
- Paredes M, González K, Figueroa J. 2013. Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage function. **Fish Physiol Biochem** DOI 10.1007/s10695-013-9777-7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory** 2: 1659.
- Victoria M, Rodríguez F, Morejón Z, Martínez M, López M. 2006. Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. **Rev Cubana Plant Med** 11: 1 - 12.
- Yagawa K, Kaku M, Ichinose Y, Aida Y, Tomoda A. 1985. Fc receptor-mediated desensitization of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) generation response of guinea-pig macrophages and polymorphonuclear leucocytes. **Immunology** 55: 629 - 638.
- Yesilada E, Kupeli E. 2002. *Berberis crataegina* DC roots exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. **J Ethnopharmacol** 79: 237 - 248.