

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIARTRÍTICA SOBRE UN MODELO MÚRIDO DE UNA MOLÉCULA ANÁLOGA A CURCUMINA

Carrillo López, María Isabel (1), Escobedo Martínez, Carolina (2), Guzmán Gutiérrez, Silvia Laura (3), Deveze Álvarez, Martha Alicia (4), Trujillo Valdivia, Alfonso (5), Enríquez Habib, Raúl Guillermo (6)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas] | [mi.carrillolopez@ugto.mx]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [c.escobedo@ugto.mx]

3 [Catedrática CONACyT. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Campus México, DF, Universidad Nacional Autónoma de México] | [saguzmangu@conacyt.mx]

4 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [devezem@hotmail.com]

5 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [trujillo@ugto.mx]

6 [Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México] | [habib@unam.mx]

Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto antiartrítico de la molécula Diacetilcurcumina (DAC), el cuál es un compuesto análogo a la molécula de Curcumina derivado de la reacción de acetilación de ésta última, la cual es aislada del rizoma de *Cúrcuma longa* L. La evaluación de la actividad antiartrítica de DAC fue evaluada sobre un modelo múrido inducido por adyuvante completo de Freund. El compuesto se administró por vía oral a las dosis de 20, 40 y 60 mg/kg, además del fármaco referencia Fenilbutazona a la dosis de 80 mg/kg.

Se registró una actividad antiartrítica significativa de la DAC en la fase aguda y crónica a las dosis administradas de 20 y 60 mg/kg, respectivamente, además de no observarse desarrollo de lesiones secundarias asociadas a este modelo farmacológico.

Abstract

In the present study, we evaluated the antiarthritic effect of the molecule Diacetylcurcumin (DAC), which is a compound analogous to the Curcumin molecule derived from the acetylation reaction of the latter, which is isolated from the rhizome of *Curcuma longa* L. Evaluation of the antiarthritic activity of DAC was evaluated on a murine model induced by Freund's complete adjuvant. The compound was administered orally at the doses of 20, 40 and 60 mg/kg, in addition to Phenylbutazone the reference drug to the dose of 80 mg/kg.

Significant antiarthritic activity of DAC was recorded in the acute and chronic at the administered doses of 20 and 60 mg/kg, respectively, and no development of secondary lesions associated with this pharmacological model.

Palabras clave

Cúrcuma Longa L.; Diacetilcurcumina; Antiartrítico; Adyuvante completo de Freund.

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune idiopática, caracterizada por sinovitis simétrica en articulaciones grandes y pequeñas que pueden conducir a daño articular progresivo e incapacidad [1]. Se utilizan analgésicos y antiinflamatorios, incluyendo los esteroides, para suprimir los síntomas. Se han propuesto nuevas terapias, como las dirigidas al factor de necrosis tumoral alfa (infliximab) o a la terapia anti-CD20 (rituximab), que inhiben el proceso inmunológico subyacente. Sin embargo, todos estos fármacos tienen varios efectos no deseados. Investigaciones recientes buscan descubrir fármacos antiinflamatorios de acción prolongada con mínimos efectos secundarios [2]. Se utilizan varios modelos animales para evaluar compuestos potencialmente útiles contra la AR y la elección de un modelo particular depende de las propiedades inmunológicas que se observan en el modelo y su relación con la enfermedad humana. Entre los modelos disponibles está la artritis inducida por colágeno o adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund) en roedores, artritis espontánea inducida por TNF- α o modelos genéticos, como el modelo animal transgénico. Mientras que ningún modelo de AR puede considerarse ideal, la artritis de rata inducida por adyuvante de Freund comparte varios rasgos con la artritis humana y su sensibilidad para evaluar agentes antiartríticos fue la base para su elección como modelo para evaluar la actividad de Diacetilcurcumina, molécula análoga de la Curcumina (**Figura 1**).

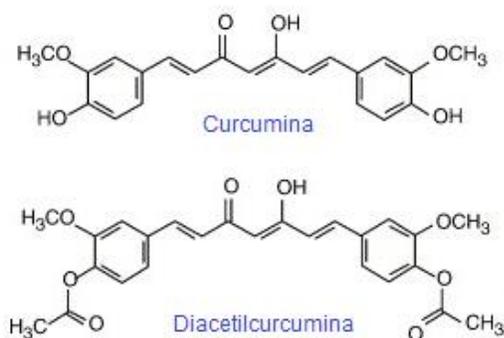


Figura 1: Estructura química de Curcumina y Diacetilcurcumina

Curcuma longa L. es un tipo de especia originaria de la India derivada de los rizomas de la planta, tiene una larga historia de uso en la medicina ayurveda como un tratamiento para las condiciones inflamatorias. *C. longa* es un miembro perenne de la familia Zingiberaceae y se cultiva en la India y otras partes del sureste de Asia [3]. El principal componente activo de la cúrcuma y el responsable de su color amarillo vibrante es la curcumina, fue identificada por primera vez en 1910 por Lampe y Milobedzka [4].

La molécula de Curcumina presenta en su estructura dos grupos OH reactivos, que permiten la introducción de grupos farmacóforos en su estructura y de esta forma variar o potenciar su actividad farmacológica [5]; los grupos acetilo cuando se unen a ciertas moléculas orgánicas, les imparten un efecto farmacológico aumentado para cruzar la barrera hematoencefálica, haciendo que este sea más intenso y se incremente su actividad a una dosis dada, ejemplificando lo anterior en la industria farmacéutica el antiinflamatorio natural ácido salicílico se somete a una reacción de acetilación para convertirlo en ácido acetilsalicílico, el cual es más efectivo que el primero mencionado [6], por lo cual constituyen una materia prima asequible de producción nacional con gran interés para la industria farmacéutica.

Mientras que la curcumina ha sido atribuida a numerosas actividades farmacológicas, incluyendo las propiedades antioxidantes [7] y antimicrobianas [8], este trabajo se focalizó en los efectos antiinflamatorios y antiartríticos de su molécula análoga: Diacetilcurcumina (DAC), producto obtenido de la reacción de acetilación de la curcumina.

En el presente trabajo se evaluó el efecto antiartrítico del compuesto DAC en un modelo murino de artritis inducida por adyuvante de Freund. El compuesto se administró oralmente a las dosis de 20, 40 y 60 mg/kg; además de utilizar fenilbutazona (80 mg/kg) como fármaco referencia.

Hasta ahora no se encuentra reportado en la literatura alguna investigación sobre las propiedades antiartríticas de DAC realizadas sobre un modelo murino de artritis, sólo entre los

estudios recientes sobre DAC está la evaluación de la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* [10]; evaluación de actividad anti-cancerígena [11] y su actividad preventiva en daño citotóxico y neuronal en complejos con Manganeso [12].

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuesto

El compuesto Diacetilcurcumina (DAC) fue obtenido mediante reacción de acetilación de la molécula de Curcumina, utilizando anhídrido acético en presencia de piridina como catalizador.

Vehículo

Para administrar los compuestos tanto DAC como Fenilbutazona se utilizó como vehículo aceite de maíz (0.1 ml/100 g), y DMSO al 5 % respecto al volumen total de aceite para cada una de las dosis.

Animales

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los estándares éticos para la investigación experimental del dolor en animales de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999). Se utilizaron ratas macho Wistar consanguíneas (250-300 g) estas fueron obtenidas del Bioterio de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato. Los animales se alojaron en 5 grupos: Vehículo, DAC 20, DAC 40, DAC 60 y Fenilbutazona 80 mg/kg, de tres ratas cada grupo. Al término del experimento (25 días), todos los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico y diseccionados para almacenar sus órganos (estómago, hígado, riñones, pulmones) en solución de formaldehído al 10%, para su análisis posterior.

Actividad anti-inflamatoria

El estado artrítico se indujo mediante inyección intradérmica plantar (a través de una aguja de calibre 20) en la pata trasera derecha de 0,05 ml de adyuvante de Freund completo (Sigma Aldrich). Este método, descrito por Newbould (1963) [15], ha sido ampliamente utilizado para detectar posibles fármacos anti-inflamatorios con actividad antiartrítica. Entre los diversos tipos de adyuvantes

disponibles, el más comúnmente utilizado en animales de experimentación es el adyuvante de Freund completo (CFA), que contiene micobacterias muertas, usualmente *Mycobacterium bovis* BCG a una concentración de 1 mg/ml o menos [16].

El grado de edema se evaluó por el método de desplazamiento volumétrico, utilizando un pletismómetro digital PAN LAB. El desplazamiento de volumen se registró 24 h antes además 8 y 24 h después de la inyección de CFA. Para completar la evaluación de la actividad en la inducción de artritis, las variaciones de volumen en la pata trasera se registraron diariamente hasta por 25 días después de la inyección. La fenilbutazona (fármaco de referencia, Sigma Aldrich, 80 mg/kg) y la muestra de Diacetilcurcumina (en una dosis de 20, 40 y 60 mg/kg) se administraron vía oral antes de la inyección de CFA y diariamente durante 14 días después. También se estuvo pendiente de la aparición o progresión de lesiones secundarias en animales de ensayo.

Las diferencias entre los grupos control y tratamiento se analizaron mediante la prueba de Tukey. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad anti-inflamatoria

La inyección de CFA en la pata trasera causó inflamación, que alcanzó su máximo en las primeras 8 h. posteriormente, la inflamación disminuyó lentamente hasta el día 3 para los grupos del vehículo, DAC 20 y 40 mg/kg, y para el día 4 en el caso de los grupos DAC 60 mg/kg y Fenilbutazona, se presentó un aumento después del día 5, posteriormente se observó otra disminución en el día 10-11, posteriormente se observó un ligero aumento después de este día y se mostraron los registros de inflamación sostenidas hasta el final del experimento. No se observaron lesiones secundarias (**Figura 2**)



Figura 2: Estado de la pata trasera derecha de tres ratas en cuestión al día 1 después del tratamiento profiláctico. (1) Vehículo, (2) Fenilbutazona 80 mg/kg, (3) DAC 60 mg/kg

Dosificación.

Cada dosis evaluada del compuesto de DAC y de Fenilbutazona fue administrada diariamente durante 14 días. La primera dosis se administró media hora después de la inyección de CFA en la almohadilla de la pata posterior derecha [15]. Las mediciones registradas con el pleτισmometro digital a las 8 y 24 horas no mostraron diferencia significativa. (Figura 3).

Los resultados del análisis gráfico y estadístico de los datos de cada grupo durante los 25 días del experimento, registraron para el grupo control (administración sólo de vehículo y DMSO al 5%), un máximo de inflamación en el día 7, continuando con un aumento sostenido en el resto del experimento; para el grupo de DAC 20 mg/kg se observaron lecturas superiores al grupo control durante la mayoría de los días, teniendo un máximo de inflamación en el día 13, se observaron

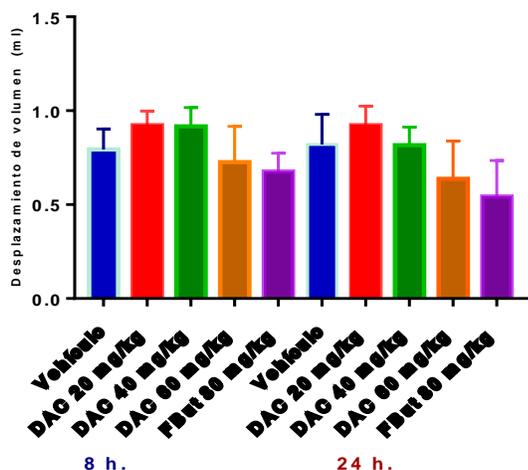


Figura 3: Mediciones de desplazamiento de volumen después de la administración vía oral de fenilbutazona (80 mg / kg) y de Diacetilcurcumina DAC (20, 40 y 60 mg / kg) Cada barra muestra la media de 3 lecturas ± EEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey. P< 0.05.

diferencias significativas de este grupo con DAC 60 mg/kg y Fenilbutazona en el día 4, y en los días 12 y 13 únicamente con el grupo de Fenilbutazona; para el grupo de DAC 40 mg/kg se encontró diferencia significativa comparado con el grupo de Fenilbutazona para los días 11 y 13 y la inflamación a partir del día 7 se mantuvo hasta el final del experimento; para el grupo de DAC 60 mg/kg se observó un efecto favorable de desinflamación, obteniendo lecturas muy similares a las del grupo de Fenilbutazona (fármaco referencia), se observó diferencia significativa en el día 4 con el grupo de DAC 20 mg/kg; para el grupo Fenilbutazona se observaron valores inferiores en las mediciones en comparación con el resto de los grupos, sin embargo para los días 23, 24 y 25 se observó un ligero aumento en la inflamación, probablemente debido al desarrollo de tolerancia, teniendo un impacto en el efecto para este grupo. En general y con el análisis estadístico realizado puede observarse un efecto agudo en la inflamación con el tratamiento de DAC a la dosis de 20 mg/kg y un efecto crónico a la dosis de DAC 60 mg/kg. (Figura 4).

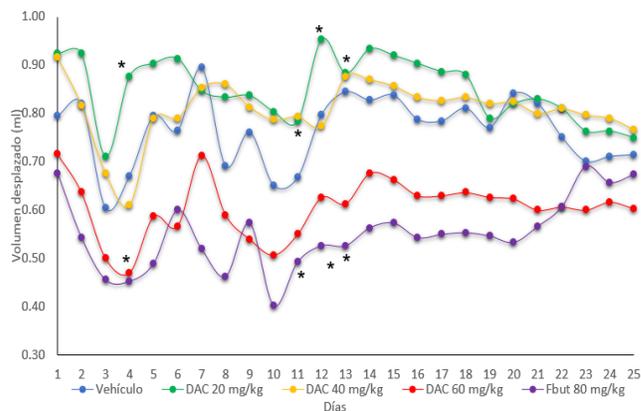


Figura 4: Mediciones con pleτισmometro de los 25 días del experimento, grupos: Fenilbutazona (80 mg/kg) DAC (20, 40 y 60 mg/kg) en la fase de inflamación inducida por CFA a largo plazo en la pata trasera del modelo mürido (Rata Wistar). Cada punto en el curso del tiempo muestra la media de 3 mediciones. Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey P<0.05

CONCLUSIONES

El compuesto Diacetilcurcumina molécula análoga de Curcumina tiene un efecto potencial como agente antiartrítico. Este estudio contribuye a proporcionar datos farmacológicos sobre una

molécula semisintética con posible actividad antiartrítica y que de manera indirecta respalda el uso tradicional de *Curcuma longa* L. utilizada para condiciones inflamatorias. Se identificaron las dosis a las cuales el compuesto tiene mayores efectos, por lo cual se podría partir de estos datos para evaluar su actividad a otras diferentes dosis en estudios posteriores e identificar de manera más precisa el efecto anti-artrítico.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos los fondos otorgados al proyecto 1088/2016, a través de la Convocatoria Institucional de Apoyo a la Investigación Científica 2016-2017. Gracias a la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato, por la grata oportunidad de participar en el Verano de Investigación Científica UG. Agradecemos la asistencia técnica del C. Juan Pedro Galván Chía.

REFERENCIAS

- [1]. G. Mendoza-Vázquez, A.D.R.-M., A.J. Guerra-Soto, M. Ramírez-Villafaña, A.G. González-Sánchez, J.I. Gámez-Nava, A. Nava, Artritis reumatoide y dislipidemias, in *El Residente*. 2013. p. 12-22.
- [2]. Ekambaram, S., S.S. Perumal, and V. Subramanian, Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2010. 10(1): p. 56.
- [3]. Ammon HP, W.M., *Pharmacology of Curcuma longa*. *Planta Med* 1991. 57: p. 1-7.
- [4]. Lampe V, M.J., No title available, B.D.C. Ges, Editor. 1913. p. 2235.
- [5]. Torres Rodríguez, E., et al., Empleo de ultrasonido en la extracción de curcumina a partir de su fuente natural. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2014. 19: p. 14-20.
- [6]. Koide, K., et al., Acetylated Resveratrol: A New Small Molecule Radioprotector. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 72(1): p. S697.
- [7]. OP, S., Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol*, 1976. 25: p. 1811-1812.

[8]. Negi PS, J.G., Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem* 1999. 47: p. 4297-4300.

[9]. Araújo, C. and L. Leon, Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001. 96: p. 723-728.

[10]. Sardi, J.D.O., et al., Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. *Journal of Medical Microbiology*, 2017. 66(6): p. 816-824.

[11]. Basile, V., et al., Curcumin derivatives: Molecular basis of their anti-cancer activity. *Biochemical Pharmacology*, 2009. 78(10): p. 1305-1315.

[12]. Sumanont, Y., et al., Effects of manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin on kainic acid-induced neurotoxic responses in the rat hippocampus. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007. 30(9): p. 1732-1739.

[14]. Lorke, D., A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 1983. 54(4): p. 275-287.

[15]. Newbould, B.B., Chemotherapy of arthritis induced in rats by micobacterial adyuvant. *Br. J. Pharmacol*, 1963. 21: p. 127-136.