

El tratamiento con resiniferatoxina exhibe propiedades antiinflamatorias en un modelo murino de inflamación inducida por lipopolisacárido

José Luis Muñoz-Carrillo^{1*}, Paola Trinidad Villalobos-Gutiérrez², Ana María Puebla-Pérez³, Argelia López-Luna⁴, Juan Armando Flores-de la Torre⁴, Israel Alvarez-Barreto¹, Oscar Gutiérrez-Coronado²

¹Laboratorio de Ciencias Básicas, Escuela de Odontología de la Universidad Cuauhtémoc, Plantel Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México. ²Laboratorio de Inmunología, Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Vida, Centro Universitario de los Lagos de la Universidad de Guadalajara. Lagos de Moreno, Jalisco, México. ³Laboratorio de Inmunofarmacología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería de la Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. ⁴Laboratorio de Farmacia y Toxicología de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, Zacatecas, México.

ABSTRACT

Resiniferatoxin treatment exhibits anti-inflammatory properties in a murine model of lipopolysaccharide-induced inflammation

Introduction. Inflammation is a protective physiological response of the immune system against various stimuli, such as infection or tissue damage, which, by not being resolved properly, can be harmful to the host. In the search for new therapeutic alternatives that inhibit the inflammatory response, several studies have reported the use of various molecules, such as resiniferatoxin (RTX), a potent agonist of the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1).

Objective. To evaluate whether RTX treatment exhibits anti-inflammatory properties, using a murine model of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation.

Material and methods. BALB/c mice were stimulated with LPS and subsequently treated with dexamethasone (DEX), capsaicin (CAP), Bay 11-7082, capsazepin (CPZ) and RTX. In addition, other groups of mice were stimulated with LPS and then treated with Bay 11-7082 and CPZ plus RTX. After treatment, plasma levels of prostaglandin (PG)-E₂, nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α were quantitatively determined using *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) kits.

Results. Treatment with RTX significantly decreased plasma levels of PGE₂, NO, IL-1 β and TNF- α . Likewise, it was observed that the treatments with Bay 11-7082 and CPZ plus RTX showed a synergistic

Historial del artículo

Recibido: 1 jun 2021

Aceptado: 31 ago 2021

Disponible en línea: 1 sep 2021

Palabras clave

Dexametasona, inflamación, mediadores proinflamatorios, lipopolisacárido, resiniferatoxina.

Keywords

Dexamethasone, inflammation, pro-inflammatory mediators, lipopolysaccharide, resiniferatoxin.

Copyright © 2021 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

José Luis Muñoz-Carrillo, Universidad Cuauhtémoc, Plantel Aguascalientes. Av. Siglo XXI #6104, Solidaridad I. C.P. 20196 Aguascalientes, México. Tel: +521 4499154609. E-mail: mcbjlm@gmail.com <https://revistabiomedica.mx>.

anti-inflammatory effect, observing a more pronounced significant decrease in plasma levels of PGE₂ and TNF- α .

Conclusion. These findings suggest that treatment with RTX shows anti-inflammatory properties, apparently associated with the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway, independent of the TRPV1 receptors, placing RTX as a potential drug in the treatment of inflammatory diseases.

RESUMEN

Introducción. La inflamación es una respuesta fisiológica protectora del sistema inmunológico frente a diversos estímulos, tales como la infección o daño celular, la cual, al no resolverse de manera adecuada, puede ser perjudicial para el hospedero. En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que inhiban la respuesta inflamatoria, diversos estudios han reportado el uso de varias moléculas, tales como la resiniferatoxina (RTX), un potente agonista del receptor de potencial transitorio vanilloide (TRPV)-1.

Objetivo. Evaluar si el tratamiento con RTX exhibe propiedades antiinflamatorias, utilizando un modelo murino de inflamación inducida por lipopolisacárido (LPS).

Material y métodos. Se estimularon ratones BALB/c con LPS y posteriormente fueron tratados con dexametasona (DEX), capsaicina (CAP), Bay 11-7082, capsazepina (CPZ) y RTX. Además, otros grupos de ratones fueron estimulados con LPS y luego tratados con Bay 11-7082 y CPZ más RTX. Después del tratamiento, se determinaron cuantitativamente los niveles plasmáticos de prostaglandina (PG)-E₂, óxido nítrico (NO), interleucina (IL)-1 β y factor de necrosis tumoral (TNF)- α utilizando kits de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ELISA.

Resultados. El tratamiento con RTX disminuyó de manera significativa los niveles plasmáticos de PGE₂, NO, IL-1 β y TNF- α . Así mismo, se observó que los tratamientos con Bay 11-7082 y CPZ más RTX mostraron un efecto antiinflamatorio sinérgico, observándose una disminución significativa más pronunciada en los niveles plasmáticos de TNF- α y PGE₂.

Conclusión. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con RTX muestra propiedades antiinflamatorias, aparentemente asociadas con la vía de señalización factor nuclear (NF)- κ B, independiente de los receptores TRPV1, colocando a la RTX como un fármaco potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta protectora del sistema inmunológico innato en contra de factores exógenos y/o endógenos, tales como el estrés celular, la lesión tisular y la infección (1). Esta respuesta se caracteriza fenotípicamente por sus signos cardinales, como el enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y en algunos casos pérdida de la función (2). La respuesta inflamatoria consta principalmente de cuatro componentes: 1) inductores inflamatorios, los cuales pueden ser endógenos, como los patrones moleculares asociados al daño (DAMP) o bien exógenos, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP); 2) sensores, que son receptores celulares que reconocen a los patrones moleculares (PRR), como los receptores de tipo Toll (TLR); 3) mediadores proinflamatorios, como las citocinas, quimiocinas, metabolitos del ácido araquidónico y el sistema del complemento; y 4) tejidos y células diana, donde los mediadores inflamatorios actúan, promoviendo la inmunidad protectora (3).

Entre los principales inductores exógenos de la respuesta inflamatoria se encuentra el LPS, una endotoxina glucolípida, responsable de una amplia variedad de efectos sobre la salud en humanos, ya que puede inducir efectos cardiovasculares negativos y choque séptico (4). El LPS es el principal factor de virulencia de las bacterias gramnegativas y un potente inductor de la inflamación sistémica, que puede desencadenarse a través de la activación del receptor TLR-4, lo que resulta en la activación de factores de transcripción, como el NF- κ B, para inducir la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios (5). Éstos se sintetizan y liberan durante la fase silenciosa de la inflamación, seguida de una vascular, en la cual hay vasodilatación y

aumento de la permeabilidad vascular, lo que da lugar a la fase celular, que se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias en el sitio de la lesión (6), con el fin de prevenir la progresión de un mayor daño tisular, a través de un mecanismo de resolución y así lograr el retorno a la homeostasis de los tejidos dañados (7). Sin embargo, cuando la resolución de la inflamación no se logra y continúa sin control, puede resultar en varios trastornos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas o cáncer. Para contrarrestar esto, actualmente se encuentra disponible una amplia variedad de agentes antiinflamatorios, así como en desarrollo (8). No obstante, todavía existe la necesidad de desarrollar nuevas terapias que ayuden en el tratamiento de enfermedades inflamatorias; en particular, el uso de productos biológicos, como la resiniferatoxina (RTX), que ha mostrado potencial terapéutico (9).

La RTX es un vanilloide derivado de una planta tipo cactus llamada *Euphoria resinifera* y es un análogo ultrapotente del vanilloide capsaicina (CAP) y agonista del TRPV1, que activa y luego desensibiliza al TRPV1, produciendo analgesia (10). Además de sus múltiples acciones biológicas, a través del TRPV1, estudios han reportado que la RTX tiene un efecto antiinflamatorio importante tanto en modelos *in vitro* (11, 12) como *in vivo* (13-15). Con base en esto, el objetivo del presente estudio fue evaluar si el tratamiento con RTX exhibe propiedades antiinflamatorias, mediante la disminución de los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1 β , NO y PGE₂, utilizando un modelo murino de inflamación inducida por LPS. Además, dado que no está claro el mecanismo por el cual la RTX ejerce su efecto antiinflamatorio, también se evaluó el efecto del tratamiento con CPZ, un antagonista del receptor TRPV1 y Bay 11-7082, un inhibidor selectivo del NF- κ B, en conjunto con el tratamiento con RTX, con el propósito de identificar si las propiedades antiinflamatorias de la RTX podrían estar asociadas con la vía de señalización de NF- κ B, de manera independiente de los TRPV1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal experimental

Se utilizaron ratones BALB/c machos de dos meses y medio de edad, con un peso corporal promedio de 25 gramos. Se formaron nueve grupos de seis ratones cada uno: grupo control sano (H_C); grupo control estimulado con LPS (C_{LPS}); dos grupos control estimulados con LPS y tratados con DEX (DEX_{LPS}) y CAP (CAP_{LPS}); un grupo estimulado con LPS tratado con RTX (RTX_{LPS}); dos grupos estimulados con LPS, tratados con CPZ (CPZ_{LPS}) y Bay 11-7082 (Bay_{LPS}) y dos grupos estimulados con LPS, tratados con CPZ (CPZ_{RTX}) y Bay 11-7082 (Bay_{RTX}), más RTX. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada, con acceso libre a agua y alimento balanceado especial para roedores. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del Área de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas, con el número de aprobación CBCS-021-A-2017 y se manejaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO -1999), para el cuidado y uso de animales de laboratorio, publicado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el Diario Oficial de la Federación (México) el 28 de junio de 2001.

Inducción de la respuesta inflamatoria con LPS

Para inducir la respuesta inflamatoria sistémica con LPS, se administró vía intraperitoneal (i.p.) una dosis de 250 μ g/100g (16) de LPS de *E. coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, L4524), el cual se disolvió previamente en solución salina fisiológica de NaCl al 0.9%. Noventa minutos después, se recolectó el plasma para determinar los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1 β y PGE₂.

Tratamiento farmacológico

Tratamiento antiinflamatorio. Los grupos control DEX_{LPS} se trataron con fosfato sódico de dexametasona comercial a una dosis de 1mg/kg (14, 15), administrado por vía i.p. 30 minutos después se administró el LPS y 90 minutos después, se recolectó el plasma.

Tratamiento con resiniferatoxina y capsaicina. Los grupos RTX_{LPS} y CAP_{LPS} se trataron con 20 µg/kg de RTX (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce St., Saint Louis, MO, USA, 63103) (14, 15) y 1.28 mg/kg de CAP (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce St., Saint Louis, MO, USA, M2028) (17), ambos administrados por vía i.p. 30 minutos después se les administró el LPS y 90 minutos después se recolectó el plasma.

Tratamiento con capsazepina y Bay 11-7082. Los grupos CPZ_{LPS} y Bay_{LPS} se trataron con CPZ (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce St., Saint Louis, MO, USA, C191) y Bay 11-7082 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. TX), disueltos en solución salina fisiológica, NaCl al 0.9% con DMSO (dimetilsulfóxido) al 2%; ambos con una dosis de 5 mg/kg (18, 19), administrados por vía i.p. 30 minutos después se administró el LPS y 90 minutos después se recolectó el plasma. Los grupos CPZ_{RTX} y Bay_{RTX} se trataron con CPZ y Bay 11-7082 y 30 minutos después se les administró una dosis de RTX. Finalmente, 30 minutos después se les administró el LPS y 90 minutos después se recolectó el plasma.

Tratamiento anestésico. Todos los ratones fueron anestesiados con una dosis de 50 mg/kg de pentobarbital sódico (PISABENTAL®, Reg. SAGARPA Q-7833-215), previo a la recolección del plasma.

Recolección del plasma

A todos los ratones se les administró por vía subcutánea 200 UI de heparina y quince minutos después se obtuvo la sangre mediante punción cardíaca. Posteriormente, la muestra sanguínea se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 rpm y se recolectó el plasma. Después se tomaron alícuotas de 60 µl y se depositaron en tubos Eppendorf, para su almacenamiento a -80°C, hasta su uso. El plasma del grupo H_C se recolectó al momento de adquirir los animales.

Determinación cuantitativa de mediadores proinflamatorios

Los niveles plasmáticos de TNF-α, IL-1β y PGE₂ se determinaron mediante ELISA usando inmunoensayos Quantikine® M, R&D Systems USA. La concentración plasmática de NO se

determinó mediante el kit R&D Systems Total Nitric Oxide, Parameter™.

Análisis estadístico

Todos los grupos fueron independientes (muestras no pareadas), por lo que la determinación de la concentración plasmática de TNF-α, IL-1β y PGE₂ se realizó en un solo tiempo por triplicado. Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar (DE). La significancia estadística se determinó mediante análisis de varianza (una vía ANOVA) con la prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey, para la determinación de las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos H_C, C_{LPS}, DEX_{LPS}, CAP_{LPS}, RTX_{LPS}, CPZ_{LPS}, Bay_{LPS}, CPZ_{RTX} y Bay_{RTX}. Se consideró un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó con el software Graphpad PRISM para Windows versión 6 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

En el presente estudio, se estimularon ratones BALB/c con LPS para inducir una respuesta inflamatoria aguda, en la que los niveles plasmáticos de TNF-α, IL-1β, NO y PGE₂ se cuantificaron mediante ELISA. Se observó que 90 minutos después de la administración del LPS, los niveles plasmáticos de TNF-α (1,311 ± 139 pg/ml) IL-1β (246 ± 44 pg/ml), NO (170 ± 8.3 pg/ml) y PGE₂ (1,926 ± 233 pg/ml) aumentaron significativamente ($p < 0.05$) en comparación con los grupos H_C (86.1 ± 7.4 pg/ml; 35.6 ± 5.6 pg/ml; 56.1 ± 11 pg/ml y 1,533 ± 132 pg/ml, respectivamente) (Figura 1a-d).

Cuando se administró DEX, los niveles plasmáticos de TNF-α (235 ± 93.6 pg/ml), IL-1β (151 ± 22 pg/ml) y NO (46.7 ± 5.0 pg/ml) disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) en comparación con los grupos C_{LPS} (Figura 1a-c). Con respecto a la PGE₂, los niveles plasmáticos disminuyeron (1,700 ± 171 pg/ml), sin embargo, esta disminución no fue significativa ($p = 0.06$), con respecto al grupo C_{LPS} (Figura 1d). Así mismo, se observó que el tratamiento con DEX disminuyó los niveles plasmáticos de NO y PGE₂, a niveles basales similares a los de los grupos

H_C , mientras que los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-1 β se encontraron elevados en comparación con los grupos H_C (Figura 1a-d).

Por otro lado, el tratamiento con CAP disminuyó significativamente ($p < 0.05$) los niveles plasmáticos de TNF- α (487 ± 52.8 pg/ml), IL-1 β (160 ± 12 pg/ml), NO (52.2 ± 8.8 pg/ml) y PGE $_2$ (449 ± 57.5 pg/ml), en comparación con los grupos C_{LPS} . Asimismo, se observó que el tratamiento con RTX, también disminuyó significativamente los niveles

plasmáticos de TNF- α ($1,096 \pm 43.7$ pg/ml), IL-1 β (154 ± 12 pg/ml), NO (80.0 ± 13 pg/ml) y PGE $_2$ (738 ± 136 pg/ml), en comparación con los grupos C_{LPS} . Cuando se compararon los grupos tratados con CAP y RTX, con los grupos H_C , se observó que los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-1 β estaban elevados ($p < 0.05$), contrario a los de la PGE $_2$, los cuales se observaron por debajo de los niveles basales, mientras que los niveles de NO fueron similares a los niveles basales del grupo H_C (Figura 1a-d).

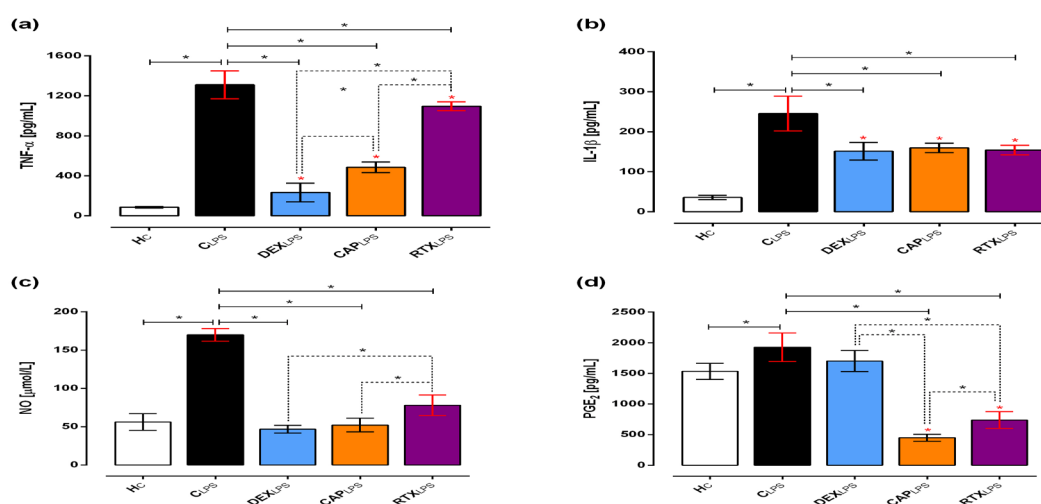


Figura 1. Niveles plasmáticos de (a) TNF- α , (b) IL-1 β , (c) NO y (d) PGE $_2$ en ratones BALB/c estimulados con LPS (C_{LPS}) y tratados con DEX (DEX_{LPS}), CAP (CAP_{LPS}) y RTX (RTX_{LPS}). H_C : grupo de control sano (H_C). Los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1 β , NO y PGE $_2$ se cuantificaron mediante ELISA. Asteriscos rojos: grupos comparados con el grupo H_C . Los valores son representados como la media \pm DE por grupo ($n=6$), indicando el nivel de significancia ($*p < 0.05$). LPS: lipopolisacárido; RTX: resiniferatoxina; DEX: dexametasona; CAP: capsaicina; ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

Debido a que las vías de señalización asociadas con las propiedades antiinflamatorias exhibidas por la RTX no se conocen bien, y si es posible que actúe a través de la vía de señalización del NF- κ B, de manera independiente del TRPV1, se evaluó el efecto de la RTX, en conjunto con CPZ (antagonista de los TRPV1) y Bay 11-7082 (inhibidor selectivo del NF- κ B), sobre los niveles plasmáticos de TNF- α y PGE $_2$ en ratones BALB/c estimulados con LPS. La Figura 2 muestra los niveles plasmáticos de TNF- α y PGE $_2$ en los grupos tratados con CPZ (696 ± 182 y 366 ± 80.5 pg/ml, respectivamente) y Bay 11-7082 ($207 \pm$

19.2 y 325 ± 30.6 pg/ml, respectivamente), los cuales mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) de estos mediadores inflamatorios, en comparación con los grupos C_{LPS} y RTX_{LPS} . Asimismo, la adición de la RTX a los grupos CPZ_{RTX} y Bay_{RTX} mostró un efecto antiinflamatorio sinérgico, donde los niveles plasmáticos de TNF- α (102 ± 29.5 y 144 ± 21.4 pg/ml, respectivamente) y PGE $_2$ (126 ± 45.8 y 143 ± 41.4 pg/ml, respectivamente) disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) en comparación con los grupos que solo fueron tratados con CPZ y Bay 11-7082.

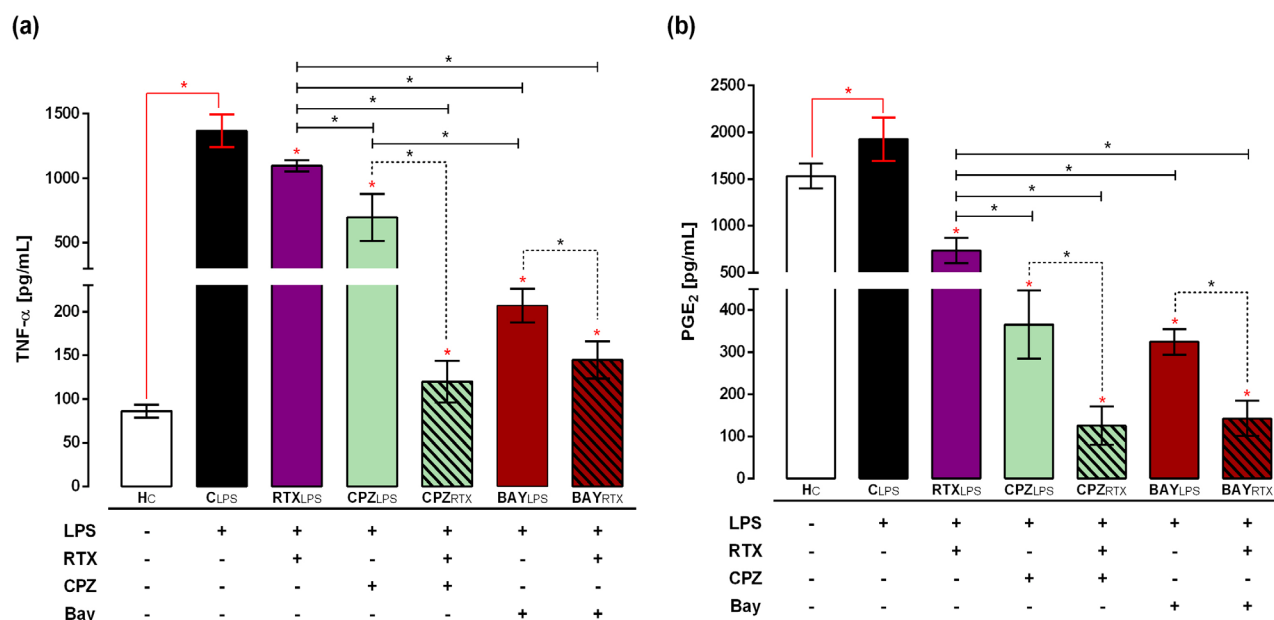


Figura 2. Niveles plasmáticos de (a) TNF- α y (b) PGE₂; en ratones BALB/c estimulados con LPS (C_{LPS}) y tratados con CPZ más RTX (CPZ_{RTX}) y Bay 11-7082 más RTX (BAY_{RTX}). Grupos estimulados con LPS y tratados con RTX (RTX_{LPS}), CPZ (CPZ_{LPS}) y Bay 11-7082 (BAY_{LPS}). Grupo de control (H_c). Asteriscos rojos: grupos comparados con el grupo C_{LPS}. Los niveles plasmáticos de TNF- α y PGE₂ se cuantificaron mediante ELISA. Los valores son representados como la media \pm DE por grupo (n=6), indicando el nivel de significancia (*p<0.05). LPS: lipopolisacárido; RTX: resiniferatoxina; DEX: dexametasona; CAP: capsaicina; CPZ: capsazepina; BAY: Bay 11-7082 Inhibidor del NF- κ B. ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

DISCUSIÓN

El LPS es una potente endotoxina de bacterias gramnegativas, capaz de inducir una respuesta inflamatoria local o sistémica, a través de la producción de mediadores inflamatorios, tales como el TNF- α , IL-1 β , NO y PGE₂ (20), como se muestra en la figura 3a. El TNF- α es una potente citocina proinflamatoria (21), producida por diferentes tipos de células del sistema inmunológico, y juega un papel clave en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias, mediante la activación de una cascada de señalización para producir citocinas proinflamatorias, especialmente IL-1 β , IL-6 e IL-8 (22). La IL-1 β es una citocina proinflamatoria y pirogénica, con un papel importante en la regulación de las respuestas locales y sistémicas, mediante la generación de fiebre y activación de linfocitos, además de que promueve el reclutamiento y activación de células mieloides en el sitio de inflamación (23). Tanto el TNF- α como la IL-1 β

participan de manera fundamental en las respuestas inflamatorias; por un lado, inducen la expresión de la ciclooxigenasa (COX)-2, que participa en la biosíntesis de la PGE₂, a través del metabolismo del ácido araquidónico (24). La síntesis desregulada de PGE₂ se asocia a una respuesta inflamatoria, participando en todos los procesos que conducen a los signos cardinales de la respuesta inflamatoria, tales como el enrojecimiento, la hinchazón y el dolor (25). Por otro lado, el LPS, IL-1 β y TNF- α son capaces de inducir la expresión de la isoforma de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), para la producción de NO, en células endoteliales, del músculo liso, macrófagos y en otros tipos de células (26). El NO es una importante molécula de señalización biológica con funciones reguladoras en los sistemas cardiovascular, inmunológico y nervioso central y periférico (27). Debido a la importancia de estos mediadores inflamatorios en la evolución y patogenia de la respuesta inflamatoria,

en este estudio evaluamos los niveles plasmáticos de diversos mediadores inflamatorios, tales como el TNF- α , IL-1 β , PGE₂ y NO, los cuales incrementaron de manera significativa después de la estimulación con LPS.

El propósito de la respuesta inflamatoria es erradicar los estímulos nocivos, las células necróticas y propagar la reparación tisular. Sin embargo, la inflamación persistente incontrolada puede conducir al desarrollo de enfermedades crónicas (28). En este contexto, los glucocorticoides (GC) son actualmente fármacos antiinflamatorios potentes de tipo esteroideo, los cuales son utilizados amplia y terapéuticamente para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias (29). Diversos estudios han demostrado que los fármacos antiinflamatorios de tipo esteroideo, como la DEX, ejercen su efecto antiinflamatorio suprimiendo la expresión de genes proinflamatorios, mediante la inhibición de factores de transcripción, como el NF- κ B (30), inhibiendo la producción de TNF- α , IL-1 β , NO y PGE₂ (14, 15), como se muestra en la figura 3b. Nuestros resultados concuerdan con estos estudios, ya que se observó que el tratamiento con DEX disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1 β y NO. Respecto a la PGE₂, los niveles disminuyeron, pero no fue significativo. Aunque varios estudios han demostrado que la DEX suprime la expresión de ARNm de COX-2 (32), otros estudios han reportado que la expresión máxima de ARNm de COX-2 y el pico máximo de producción de la PGE₂ se produjeron tres y 24 horas después de la estimulación con LPS, respectivamente. Así mismo, en este mismo estudio, se observó que la máxima supresión de la PGE₂ por la DEX ocurrió hasta las 48 horas (32). Estos hallazgos pueden explicar nuestros resultados, ya que los niveles de la PGE₂ se determinaron 90 minutos y dos horas después de la administración de LPS y DEX, respectivamente; por lo tanto, no se observó una disminución significativa en los niveles plasmáticos de la PGE₂.

Por otro lado, la CAP es un vanilloide natural derivado de la planta del género *Capsicum*, el cual tiene una amplia variedad de usos terapéuticos clínicos, incluyendo su efecto analgésico (33).

No obstante, también es una molécula que tiene efectos antiinflamatorios (34), ya que es capaz de inhibir la actividad enzimática de COX-2 y la expresión de la iNOS (35), así como la producción de mediadores proinflamatorios, como la PGE₂, NO y TNF- α (34, 35). Nuestros resultados concuerdan con estos estudios, ya que el tratamiento con CAP redujo significativamente los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1 β , PGE₂ y NO en ratones BALB/c estimulados con LPS.

Además del efecto analgésico de la RTX, a través del bloqueo y la desensibilización de los TRPV1 (10), diversos estudios han reportado que la RTX exhibe propiedades antiinflamatorias, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, inhibiendo la expresión del NF- κ B de manera dosis-dependiente (11), así como la expresión de enzimas proinflamatorias, como la iNOS y la COX-2, y síntesis de NO y PGE₂ (12). Un estudio basado en un modelo de insuficiencia renal isquémica aguda en ratas, mostró que el tratamiento con RTX previno el daño renal al inhibir la respuesta inflamatoria, disminuyendo la expresión de TNF- α renal, con un aumento en plasma de IL-10 (13). Dos investigaciones demostraron el potencial terapéutico de la RTX para el tratamiento de la respuesta inflamatoria durante la fase intestinal de la infección por *T. spiralis*. En estos estudios se observó que el tratamiento con RTX disminuyó los niveles séricos de PGE₂, NO, IL-12, INF- γ , IL-1 β y TNF- α en el modelo de rata, protegiendo al hospedero frente a la infección, ya que también se observó una disminución significativa del número de eosinófilos en sangre y de la carga parasitaria de *T. spiralis* en el tejido muscular (14, 15). Por lo tanto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la RTX es capaz de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , IL-1 β , NO y PGE₂.

De acuerdo con la cinética de las citocinas proinflamatorias, el TNF- α es la primera citocina que se libera después de la estimulación con LPS (36) y seguida de este estímulo inflamatorio, la PGE₂ se sintetiza a través de la expresión de la COX-2 (37), por lo que ambos mediadores son considerados los orquestadores de la respuesta inflamatoria. Bajo este esquema, en el presente estudio se evaluó el

efecto del tratamiento con RTX, en conjunto con los tratamientos con CPZ y Bay 11-7082 sobre los niveles plasmáticos de TNF- α y PGE₂, para investigar si es posible que la RTX actúe a través de la vía de señalización de NF- κ B, de manera independiente a los TRPV1, debido a que, por un lado, la CPZ es un análogo sintético de la CAP y antagonista competitivo de los TRPV1 (18) y, por otro lado, el Bay 11-7082 es un inhibidor del NF- κ B (38). Diversos estudios han reportado que el BAY 11-7082 es un inhibidor del NF- κ B, demostrando un efecto antiinflamatorio (38); mientras que la CPZ exhibe efectos antiinflamatorios, a través de la supresión de mediadores proinflamatorios (39). Por tanto, nuestros resultados concuerdan con estos estudios, ya que los tratamientos con CPZ y Bay

11-7082 junto con la RTX, presentaron un efecto farmacológico sinérgico, disminuyendo de manera significativa los niveles plasmáticos de TNF- α y PGE₂, mostrando un mayor efecto antiinflamatorio en comparación con CPZ y Bay 11-7082. Aunque estudios han reportado el potencial terapéutico del tratamiento con CPZ y RTX para el dolor (40), esta es la primera vez que se muestra un efecto antiinflamatorio sinérgico de la CPZ y el Bay 11-7082 más RTX, por lo que estos hallazgos indican que, posiblemente, las propiedades antiinflamatorias de la RTX pueden estar asociadas con la vía de señalización del NF- κ B como se aprecia en la figura 3c, ya que un estudio previo demostró que la RTX es capaz de inhibir la expresión de NF- κ B de manera dosis-dependiente (11).

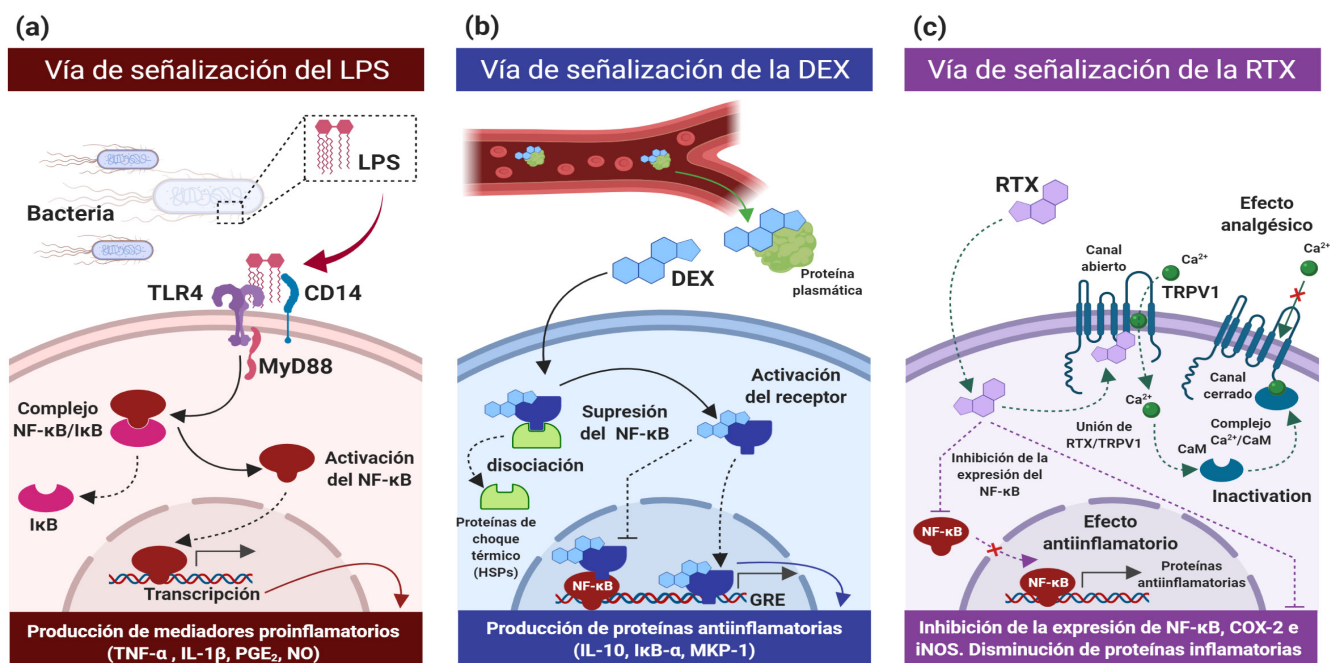


Figura 3. Vías de señalización molecular de la respuesta inflamatoria y fármacos antiinflamatorios. **(a)** Mecanismo de acción del LPS para la inducción de la respuesta inflamatoria. **(b)** Mecanismo de acción de la DEX, actividad antiinflamatoria. **(c)** Hipótesis del efecto antiinflamatorio de la RTX. Creada con BioRender.com por los autores con base en las referencias citadas en el texto. LPS: lipopolisacárido; TLR-4: receptor 4 tipo Toll; CD14: grupo de diferenciación 14; MyD88: proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88; NF- κ B: factor nuclear- κ B; I κ B: inhibidor del NF- κ B; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; IL-1 β : interleucina 1 β ; COX-2: ciclooxigenasa 2; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; DEX: dexametasona; GRE: elementos de respuesta a glucocorticoides; MKP-1: proteína quinasa-1 activada por mitógenos; RTX: resiniferatoxina; TRPV1: receptor de potencial transitorio vanilloide 1; CaM: calmodulina

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que la RTX exhibe propiedades antiinflamatorias, al disminuir la producción de mediadores proinflamatorios. Además, informamos por primera vez que el tratamiento con RTX junto con la CPZ y el Bay 11-7082, muestran un efecto farmacológico sinérgico, potenciando el efecto antiinflamatorio, posiblemente asociado con la vía de señalización NF- κ B, de manera independiente de los TRPV1. Sin embargo, es necesario realizar más estudios y generar más evidencia científica para probar esta hipótesis. Además, nuestros resultados evidencian que el TRPV1 puede estar asociado y contribuir con la patogénesis de la respuesta inflamatoria y algunos agonistas del TRPV1, como la RTX, podrían ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a los autores que realizaron la presente investigación, así como al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECyTJAL) por el apoyo otorgado.

REFERENCIAS

- Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*. 2015 Feb; 160(5): 816-27. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.010.
- Muñoz-Carrillo JL, Castro-García FP, Gutiérrez-Coronado O, Moreno-García MA, Contreras-Cordero JF. Physiology and pathology of innate immune response against pathogens. In: Rezaei N. *Physiology and pathology of immunology*. England: IntechOpen; 2017. P. 99-134. doi: 10.5772/intechopen.70556
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010 Mar; 140(6): 771-6. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006.
- Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environ Health*. 2006 Mar; 5: 7. doi: 10.1186/1476-069X-5-7.
- Gu L, Meng R, Tang Y, Zhao K, Liang F, Zhang R et al. Toll-like receptor 4 signaling licenses the cytosolic transport of lipopolysaccharide from bacterial outer membrane vesicles. *Shock*. 2019 Feb; 51(2): 256-65. doi: 10.1097/SHK.0000000000001129.
- Vergnolle N. The inflammatory response. *Drug Dev Res*. 2003 Sep; 59(4): 375-81. doi: 10.1002/ddr.10306.
- Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*. 2015 May; 27(3): 149-60. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.014.
- Dinarello CA. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*. 2010 Mar; 140(6): 935-50. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.043.
- Muñoz-Carrillo JL, Muñoz-López JL, Muñoz-Escobedo JJ, Maldonado-Tapia C, Gutiérrez-Coronado O, Contreras-Cordero JF et al. Therapeutic effects of resiniferatoxin related with immunological responses for intestinal inflammation in Trichinellosis. *Korean J Parasitol*. 2017 Dec; 55(6): 587-99. doi: 10.3347/kjp.2017.55.6.587.
- Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A target for rational drug design. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016 Aug; 9(3): 52. doi: 10.3390/ph9030052.
- Singh S, Natarajan K, Aggarwal BB. Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor-kappa B activation by diverse agents. *J Immunol*. 1996 Nov; 157(10): 4412-20. PMID: 8906816. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/157/10/4412.long>
- Chen CW, Lee ST, Wu WT, Fu WM, Ho FM, Lin WW. Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol*. 2003 Nov; 140(6): 1077-87. doi: 10.1038/sj.bjp.0705533.
- Ueda K, Tsuji F, Hirata T, Takaoka M, Matsumura Y. Preventive effect of TRPV1 agonists capsaicin and resiniferatoxin on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 May; 51(5): 513-20. doi: 10.1097/FJC.0b013e31816f6884.
- Muñoz-Carrillo JL, Muñoz-Escobedo JJ, Maldonado-Tapia CH, Chávez-Ruvalcaba F, Moreno-García MA. Resiniferatoxin lowers TNF- α , NO and PGE₂ in the intestinal phase and the parasite burden in the muscular phase of *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol*. 2017 Jan; 39(1). doi: 10.1111/pim.12393.
- Muñoz-Carrillo JL, Contreras-Cordero JF, Muñoz-López JL, Maldonado-Tapia CH, Muñoz-Escobedo JJ, Moreno-García MA. Resiniferatoxin modulates the Th1 immune response and protects the host during intestinal nematode infection. *Parasite Immunol*. 2017 Sep; 39(9). doi: 10.1111/pim.12448.
- Rivest S, Laflamme N, Nappi RE. Immune challenge and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. *J Neurosci*. 1995 Apr; 15(4): 2680-95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-04-02680.1995.
- Demirbilek S, Ersoy MO, Demirbilek S, Karaman A, Gürbüz N, Bayraktar N et al. Small-dose capsaicin reduces systemic inflammatory responses in septic rats.

- Anesth Analg. 2004 Nov; 99(5): 1501-7. doi: 10.1213/01.ANE.0000132975.02854.65.
18. Nguyen TL, Nam YS, Lee SY, Kim HC, Jang CG. Effects of capsazepine, a transient receptor potential vanilloid type 1 antagonist, on morphine-induced antinociception, tolerance, and dependence in mice. *Br J Anaesth*. 2010 Nov; 105(5): 668-74. doi: 10.1093/bja/aeq212.
 19. Irrera N, Vaccaro M, Bitto A, Pallio G, Pizzino G, Lentini M et al. BAY 11-7082 inhibits the NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways and protects against IMQ-induced psoriasis. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Mar; 131(6): 487-98. doi: 10.1042/CS20160645.
 20. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002 Nov; 71: 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
 21. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012 Jan; 119(3): 651-65. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225.
 22. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010 Mar; 20(2): 87-103. doi: 10.1615/critrevukargeneexpr.v20.i2.10.
 23. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr; 27: 519-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
 24. Akiba Y, Kaunitz JD. Prostaglandin pathways in duodenal chemosensing. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Dec; 29 (Suppl 4): 93-8. doi: 10.1111/jgh.12731.
 25. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 May; 31(5): 986-1000. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207449.
 26. Marzocco S, Di Paola R, Serraino I, Sorrentinoc R, Melic R, Mattaceraso G et al. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *Eur J Pharmacol*. 2004 Jan; 484(2-3): 341-50. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.11.011.
 27. Durão J, Vale N, Gomes S, Gomes P, Barrias CC, Gales L. Nitric oxide release from antimicrobial peptide hydrogels for wound healing. *Biomolecules*. 2018 Dec; 9(1): 4. doi: 10.3390/biom9010004.
 28. Singh A, Chibber P, Kolimi P, Malik TA, Kapoor N, Kumar A et al. Rohitukine inhibits NF- κ B activation induced by LPS and other inflammatory agents. *Int Immunopharmacol*. 2019 Apr; 69: 34-49. doi: 10.1016/j.intimp.2019.01.015.
 29. Nixon M, Upreti R, Andrew R. 5 α -Reduced glucocorticoids: a story of natural selection. *J Endocrinol*. 2012 Feb; 212(2): 111-27. doi: 10.1530/JOE-11-0318.
 30. Biddie SC, Conway-Campbell BL, Lightman SL. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Mar; 51(3): 403-12. doi: 10.1093/rheumatology/ker215.
 31. Yao X, Chen N, Ma CH, Tao J, Bao JA, Zong-Qi C et al. Ginkgo biloba extracts attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury by inhibiting the COX-2 and NF- κ B pathways. *Chin J Nat Med*. 2015 Jan; 13(1): 52-8. doi: 10.1016/S1875-5364(15)60006-1.
 32. Myers MJ, Scott ML, Deaver CM, Farrell DE, Yancy HF. Biomarkers of inflammation in cattle determining the effectiveness of anti-inflammatory drugs. *J Vet Pharmacol Ther*. 2010 Feb; 33(1): 1-8. doi: 10.1111/j.1365-2885.2009.01096.x.
 33. Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA. Capsaicin: current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules*. 2016 Jun; 21(7): 844. doi: 10.3390/molecules21070844.
 34. Tang J, Luo K, Li Y, Chen Q, Tang D, Wang D et al. Capsaicin attenuates LPS-induced inflammatory cytokine production by upregulation of LXR α . *Int Immunopharmacol*. 2015 Sep; 28(1): 264-9. doi: 10.1016/j.intimp.2015.06.007.
 35. Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T et al. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal*. 2003 Mar; 15(3): 299-306. doi: 10.1016/s0898-6568(02)00086-4.
 36. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A new venue of TNF targeting. *Int J Mol Sci*. 2018 May; 19(5): 1442. doi: 10.3390/ijms19051442.
 37. Agard M, Asakrah S, Morici LA. PGE₂ suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Aug; 3: 45. doi: 10.3389/fcimb.2013.00045.
 38. Kumar A, Negi G, Sharma SS. Suppression of NF- κ B and NF- κ B regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (I κ B phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy. *Biochimie*. 2012 May; 94(5): 1158-65. doi: 10.1016/j.biochi.2012.01.023.
 39. Ninomiya Y, Tanuma SI, Tsukimoto M. Differences in the effects of four TRPV1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and COX-2 expression in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Mar; 484(3): 668-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.173.
 40. Menéndez L, Juárez L, García E, García-Suárez O, Hidalgo A, Baamonde A. Analgesic effects of capsazepine and resiniferatoxin on bone cancer pain in mice. *Neurosci Lett*. 2006 Jan; 393(1): 70-3. doi: 10.1016/j.neulet.2005.09.046.