



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA**  
**CAPACIDAD ANTI-INFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE LA**  
**ALFA-MANGOSTINA EN UN MODELO DE ARTRITIS MURINA**  
**INDUCIDO POR COLÁGENA**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**P R E S E N T A:**  
**DIANA ROCIO HERRERA ACO**

**TUTOR PRINCIPAL: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM**  
**COMITÉ TUTORAL: DRA. CLARA ESPITIA PINZÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM**  
**DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**  
**FACULTAD DE QUÍMICA UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM bajo la Dirección de la Dra. Gladis Frago González.

El trabajo se realizó con apoyo del PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA OPTIMIZACIÓN DE VACUNAS, INMUNOMODULADORES Y MÉTODOS DIAGNÓSTICOS del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y de CONACyT (CB-2012-169011).

## DEDICATORIA

A MI MADRE, quien siempre me apoya en todo lo que emprendo y siempre me ha impulsado desde niña a dar lo mejor de mí. Gracias mamá, sin tus enseñanzas y la formación que me diste, esto nunca hubiera sido posible. Gracias por tu amor incondicional y por estar siempre conmigo.

A MI PADRE, por todo el apoyo recibido y por siempre impulsarme a estudiar para tener un mejor futuro y ser mejor día con día. Gracias papá este logro también es tuyo.

A MI HERMANA, quién siempre me ha apoyado de manera incondicional y me echa porras para ser cada día mejor. Muchas gracias hermana, este logro fue gracias a ti también y a tu invaluable ayuda en este proyecto.

A ERICK SILVA, mi compañero de vida durante 11 años y que ahora forma parte de mi familia. Gracias por siempre estar conmigo tanto en mis triunfos como en mis fracasos y siempre escucharme y alentarme a continuar hacia adelante para alcanzar mis metas. Gracias por tu amor incondicional y la confianza que siempre has depositado en mí para lograr lo que quiero. Este logro también es tuyo y agradezco que estés conmigo para celebrarlo.

A mis amigos, cuya amistad valoró. Gracias por sus enseñanzas en el campo de la investigación y por esas discusiones y pláticas que me dejaron grandes aprendizajes no sólo en temas de investigación sino también en temas de la vida. Agradezco haber podido vivir esta aventura junto a ustedes.

A mis mascotas vivas y a las que ya han fallecido, quienes siguen siendo y serán una parte muy importante en mi vida. Gracias por su cariño incondicional y por siempre externarme que están ahí presentes cuando los necesite. Cada uno es y ha sido único para mí y agradezco el que hayan compartido su vida conmigo.

A todos los animales, gracias por existir. Por ustedes, día con día intento adquirir más conocimientos y más habilidades para poderles brindar la mejor atención y mi mejor esfuerzo para sacarlos adelante. Siempre será para mi una gran satisfacción verlos partir a su casa sanos con sus seres queridos y ver en su mirada o en alguna muestra de cariño el agradecimiento por haberlos ayudado.

*Hay que estudiar mucho, para saber poco.*  
Montesquieu

## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por brindarme la oportunidad de seguir adquiriendo conocimientos y experiencia en el campo de la investigación.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM que ha sido mi sede desde que inicie mi formación en la investigación y que me ha permitido ir cultivando experiencias día con día.

Al programa de becas para estudios de Doctorado del CONACyT, Número de becario 254086 por el apoyo financiero brindado.

A mi tutora principal, la Dra. Gladis Fragoso González del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D. F. quien siempre confió en mí para la realización de este proyecto y me ha brindado su apoyo incondicional no sólo en el ámbito laboral sino también en el personal.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. José Pedraza Chaverri, Facultad de Química, UNAM, México y la Dra. Clara Espitia Pinzón, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México por sus críticas y conocimientos aportados en cada tutorial y su disposición a apoyarme en cualquier momento.

A la M. en C. Evelyn Pulido y al Dr. Armando Pérez por su apoyo, tiempo, paciencia e invaluable conocimientos en el área de la histopatología y la inmunohistoquímica.

A la Histotecnóloga Raquel Guerrero- Alquicira de la Facultad de Medicina, UNAM por su colaboración en la realización de los cortes histológicos y las tinciones presentadas en este proyecto.

A la MVZ Gina Díaz, al MVZ Jorge García, a la MVZ Isabel Herrera y al Ing. Erick Silva por todo su apoyo en el manejo, medicación, toma de muestras y obtención de tejidos de los animales de laboratorio y la crianza de la cepa murina DBA/ 1J.

A Omar Medina por todo su apoyo y paciencia en la realización de las técnicas utilizadas para la determinación del estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes.

A los miembros del jurado, por sus correcciones y observaciones para la mejora del presente trabajo.

A los animales de experimentación, ya que sin su sacrificio este trabajo no podría ser posible.

A mi familia y a mis mascotas, por su amor incondicional y porque día con día me impulsan a ser mejor a nivel profesional y a nivel personal.

A mis amigos, gracias por sus pláticas, risas, discusiones, apoyo en la realización de técnicas que desconocía y demás. Sin ustedes y el aprendizaje que me brindaron, esta aventura y la culminación de este trabajo no hubieran sido los mismos.

## RESUMEN

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que se asocia a una respuesta Th1 y Th17 exacerbada y a una alta producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Los fármacos utilizados actualmente para su control tienen la desventaja de presentar efectos adversos importantes a largo plazo o de tener un alto costo. La  $\alpha$ -mangostina, es una xantona que posee capacidad antioxidante y anti-inflamatoria en varios modelos de inflamación incluyendo modelos no autoinmunes de artritis, aunque aún no se conocen por completo los procesos bioquímico-inmunológicos en los que subyacen estos efectos.

**Objetivo:** Identificar *in vitro* e *in vivo* los efectos anti-inflamatorios y antioxidantes de la  $\alpha$ -mangostina que subyacen al control del proceso inflamatorio y del daño articular inducido por la artritis autoinmune experimental murina.

**Materiales y métodos:** Se indujo un modelo de artritis experimental autoinmune (artritis inducida por colágena) en ratones DBA/1J a través de dos inmunizaciones con colágena y adyuvante completo e incompleto de Freund, respectivamente. Para evaluar el efecto terapéutico de la  $\alpha$ -mangostina, se administraron dos dosis (10 y 40 mg/kg) por vía oral durante 33 días a ratones DBA/1J con CIA establecida obteniéndose la escala clínica, la escala histopatológica y la producción de autoanticuerpos; así como el nivel de citocinas y quimiocinas y la generación de estrés oxidante tanto a nivel local como sistémico. *In vitro*, se evaluó el efecto de distintas dosis de  $\alpha$ -mangostina sobre linfocitos polarizados hacia células Th1 o Th17 y sobre células dendríticas activadas con LPS.

**Resultados:** Ambas dosis de  $\alpha$ -mangostina disminuyeron la signología clínica de la CIA a corto plazo y la dosis más alta también disminuyó los cambios histopatológicos. Esta mejoría también se acompañó de una disminución en la producción de anticuerpos IgG2a anticolágena y en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-33) y quimiocinas (LIX/ CXCL5, IP-10/ CXCL10, MIG/ CXCL9 y RANTES/ CCL5) y en la generación de estrés oxidante (disminución en la actividad de la NADPH oxidasa y la lipoperoxidación e incremento en el nivel de glutatión) a nivel articular. *In vitro*, esta xantona exhibió un efecto proapoptótico sobre linfocitos polarizados hacia Th1 y Th17 y un efecto inmunomodulador (disminución en la expresión de CD86 y CD40, disminución en la producción de citocinas tipo Th1 e incremento en la producción de IL-10) sobre células dendríticas activadas con LPS.

**Conclusiones:** La  $\alpha$ -mangostina ejerció un efecto anti-inflamatorio, antioxidante y antiartrítico *in vivo*, ya que mejoró la signología clínica y los cambios histopatológicos presentados en estadios tempranos de la CIA establecida en ratones DBA/ 1J gracias a su capacidad para modular varios de los mecanismos involucrados en la respuesta inflamatoria y en la generación de estrés oxidante.

**Palabras Clave:** Artritis inducida por colágena; Artritis Reumatoide;  $\alpha$ -mangostina; inflamación; estrés oxidante.

## ABSTRACT

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease which is associated with an exaggerated Th1 and Th17 responses and a high production of reactive oxygen and nitrogen species. Drugs currently used for their control have the disadvantages either presenting significant adverse effects in the long term or having a high cost.  $\alpha$ -mangostin is a xanthone that possesses antioxidant and anti-inflammatory capacities in several models of inflammation including non-autoimmune models of arthritis, although the biochemical-immunological processes underlying these effects are not yet completely clarified.

**Objective:** To identify *in vitro* and *in vivo* the anti-inflammatory and antioxidant effects of  $\alpha$ -mangostin that underlie the control of the inflammatory process and joint damage induced by experimental murine autoimmune arthritis.

**Materials and Methods:** A model of experimental autoimmune arthritis (collagen-induced arthritis) was induced in DBA/1J mice through two immunizations with collagen and complete and incomplete Freund's adjuvant, respectively. To evaluate the therapeutic effect of  $\alpha$ -mangostin, two doses (10 and 40 mg/kg) were administered orally for 33 days to DBA / 1J mice with established CIA, obtaining the clinical score, the histopathological score and the production of autoantibodies as well as the level of cytokines and chemokines and the generation of oxidative stress both locally and systemically. *In vitro*, the effect of different doses of  $\alpha$ -mangostin was evaluated on lymphocytes polarized towards Th1 or Th17 cells and on dendritic cells activated with LPS.

**Results:** Both doses of  $\alpha$ -mangostin decreased the clinical signs of CIA in the short term and the higher dose also reduced histopathological changes. This improvement was also accompanied by a reduction in the production of anti-collagen IgG2a antibodies and proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-33) and chemokines (LIX/CXCL5, IP-10/ CXCL10, MIG/CXCL9 and RANTES/CCL5). Moreover, it also reduced oxidative stress (decreasing the activity of NADPH oxidase and lipoperoxidation and increasing the level of glutathione) at the joint level. *In vitro*, this xanthone exhibited a proapoptotic effect on lymphocytes polarized towards Th1 and Th17 and an immunomodulatory effect (a decrease in the expression of CD86 and CD40, a reduction in the production of Th1 cytokines and an increase in the production of IL-10) on LPS-activated dendritic cells.

**Conclusions:**  $\alpha$ -mangostin exhibited anti-inflammatory, antioxidant and anti-arthritic effects *in vivo* since it improved the clinical signs and the histopathological changes presented in early stages of established CIA in DBA/1J mice due to its capability to modulate several mechanisms involved in the inflammatory response and in the generation of oxidative stress.

**Keywords:** Collagen-induced arthritis; Rheumatoid arthritis;  $\alpha$ -mangostin; inflammation; oxidative stress.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Artritis Reumatoide</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiología, genética y etiología de la Artritis Reumatoide	1
1.1.2 Fisiopatología de la Artritis Reumatoide	2
1.1.2.1 Fases de progresión de la Artritis Reumatoide	2
1.1.2.2 Células efectoras en la fisiopatología de la AR	3
1.1.2.2.1 Células dendríticas en la Artritis Reumatoide	5
1.1.2.2.2 Linfocitos Th1 y Th17 en la Artritis Reumatoide	7
1.1.2.3 Mediadores inflamatorios participantes en la fisiopatología de la Artritis Reumatoide	9
1.1.3 Papel de las especies reactivas en el proceso inflamatorio y el daño articular presentes en la Artritis Reumatoide	13
1.1.4 Control del proceso inflamatorio en la Artritis Reumatoide y relevancia de la participación de los linfocitos T reguladores y de las Células Dendríticas tolerogénicas	16
1.1.5 Artritis Reumatoide en animales	22
1.1.6 Tratamiento	25
1.1.6.1 Tratamientos Convencionales	25
1.1.6.2 Polifenoles y flavonoides en el control de la inflamación en la Artritis y sus mecanismos de acción asociados	28
1.1.7 Modelos animales de Artritis	35
<b>1.2 Antecedentes</b>	<b>36</b>
1.2.1 $\alpha$ -Mangostina	36
1.2.1.1 Efectos anti-inflamatorios y antioxidantes de la $\alpha$ -mangostina	37
1.2.1.2 Toxicidad aguda y crónica de la $\alpha$ -mangostina	40
<b>2. Planteamiento del Problema y Justificación</b>	<b>40</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>42</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>42</b>
4.1 General	42

<b>4.2 Específicos</b>	<b>43</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Reactivos</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Obtención de la <math>\alpha</math>-mangostina</b>	<b>44</b>
<b>5.3 Animales de experimentación</b>	<b>44</b>
<b>5.4 Medición de endotoxina en la <math>\alpha</math>-mangostina</b>	<b>45</b>
<b>5.5 Evaluación de la capacidad de la <math>\alpha</math>-mangostina de controlar el daño en animales con Artritis Reumatoide</b>	<b>46</b>
5.5.1 Grupos experimentales	46
5.5.2 Modelo experimental de artritis	46
5.5.3 Evaluación de la escala clínica	47
5.5.4 Evaluación de la escala histopatológica	48
5.5.5 Determinación de los niveles de Anticuerpos anticólgena IgG1 e IgG2a	48
5.5.6 Preparación de los homogeneizados de tejido	49
5.5.7 Determinación del estado inflamatorio y anti-inflamatorio	50
5.5.7.1 Evaluación de los niveles de Prostaglandina E <sub>2</sub> en suero y articulaciones	50
5.5.7.2 Evaluación de los niveles de citocinas y quimiocinas a nivel articular	50
5.5.7.3 Inmunohistoquímica	51
5.5.8 Determinación de marcadores de estrés oxidante	51
5.5.8.1 Evaluación de la lipoperoxidación	51
5.5.8.2 Determinación de proteínas oxidadas	52
5.5.8.3 Actividad de la NADPH oxidasa	52
5.5.9 Determinación de la actividad de los sistemas antioxidantes	53
5.5.9.1 Determinación del glutatión reducido	53
5.5.9.2 Actividad de la catalasa	53
5.5.9.3 Actividad de la glutatión reductasa	53
5.5.9.4 Actividad de la glutatión peroxidasa	54
5.5.9.5 Actividad de la glutatión-S-transferasa	54
5.5.9.6 Actividad de la superóxido dismutasa	54
<b>5.6 Efecto de la <math>\alpha</math>-mangostina sobre la activación de las células dendríticas derivadas</b>	<b>55</b>

de la médula ósea del ratón (CDMO)	
5.7 Evaluación de la capacidad de la $\alpha$ -mangostina de inhibir la polarización de células Th1 y Th17 y de inducir células T reguladoras <i>in vitro</i>	56
5.8 Determinación de la viabilidad celular	58
5.9 Determinación de los parámetros inflamatorios y anti-inflamatorios en cultivos <i>in vitro</i> inducidos por la administración de la $\alpha$ -mangostina	59
5.10 Análisis estadístico	60
<b>6. Resultados</b>	<b>60</b>
6.1 Niveles de endotoxina de la $\alpha$ -mangostina	60
6.2 Efecto terapéutico de la $\alpha$ -mangostina sobre la CIA establecida	61
6.3 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre los cambios histopatológicos en ratones con CIA	64
6.4 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre la producción de Anticuerpos IgG1 e IgG2a anticelulágena en la CIA establecida	67
6.5 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre los mediadores inflamatorios producidos a nivel articular y sistémico durante la CIA	69
6.6 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre el estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes en ratones con CIA establecida	73
6.7 Citotoxicidad de la $\alpha$ -mangostina en CDMO y linfocitos polarizados hacia Th1 y Th17	77
6.8 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre las CDMO activadas con LPS	80
6.9 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre los linfocitos polarizados hacia Th1 y hacia Th17	87
<b>7. Discusión</b>	<b>88</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>96</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>97</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>98</b>
<b>11. Anexo</b>	<b>122</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Polarización y activación de linfocitos T y quimiotaxis mediada por células dendríticas (DCs) sinoviales CD1c <sup>+</sup> de pacientes con Artritis reumatoide	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Subtipos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> que participan de manera importante en la Artritis reumatoide y clasificación de linfocitos Th17 de acuerdo a su requerimiento de citocinas para su diferenciación y su perfil de expresión de citocinas y quimiocinas	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Relación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en la activación del factor de transcripción nuclear κB (NF-κB) y la transcripción de citocinas proinflamatorias	<b>16</b>
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg) sobre las células T efectoras convencionales (Tcon) y las células dendríticas (DC)	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b> Blancos terapéuticos de los DMARDs biológicos en la fisiopatología de la Artritis reumatoide	<b>28</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema del efecto <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los polifenoles en la Artritis reumatoide	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Molécula representativa de la α-mangostina	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b> Escala clínica de los distintos grupos experimentales durante los 33 días de duración del tratamiento	<b>62</b>
<b>Figura 9.</b> Comportamiento global de cada uno de los tratamientos desde el día 1 hasta el día 33 de tratamiento representados como el Área bajo la curva	<b>63</b>
<b>Figura 10.</b> Área bajo la curva del Metotrexato durante los días 1-14 (etapa temprana de la CIA) y durante los días 14-33 (etapa tardía de la CIA) de tratamiento en comparación al grupo de Aceite de Maíz	<b>64</b>
<b>Figura 11.</b> Microfotografías a diferentes aumentos de la articulación de la rodilla de un ratón con CIA tratado con Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la α-mangostina) teñido con Hematoxilina-Eosina	<b>65</b>

<b>Figura 12.</b> Microfotografías a 10X de la articulación de la rodilla de los distintos grupos experimentales teñidas con Hematoxilina-Eosina	<b>66</b>
<b>Figura 13.</b> Escala histopatológica de los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento	<b>67</b>
<b>Figura 14.</b> Niveles de autoanticuerpos (A) IgG2a e (B) IgG1 anticóligena II en los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento	<b>68</b>
<b>Figura 15.</b> Producción de Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) en (A) suero y a (B) nivel articular en los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento	<b>69</b>
<b>Figura 16.</b> (A) Producción de citocinas y quimiocinas determinada por la tecnología Luminex xMAP y producción de (B) IL-1 $\beta$ e (C) IL-18 determinada por ELISA en los distintos grupos experimentales después de 68 días de la inducción de la CIA	<b>71</b>
<b>Figura 17.</b> (A) Microfotografías a 40x de la inmunohistoquímica para IL-33 en los tejidos articulares de los ratones de los diferentes grupos experimentales en donde se puede apreciar la inmunoreactividad para esta citocina en color café en el infiltrado inflamatorio y el área correspondiente al pannus dentro de la articulación. (B) Área de expresión de la IL-33 expresada en $\mu\text{m}^2$ en los diferentes grupos experimentales después de 33 días de tratamiento	<b>72</b>
<b>Figura 18.</b> (A) Actividad de la NADPH oxidasa (NOX) y (B) producción de Malondialdehído (MDA) (producto final de la lipoperoxidación) en los homogeneizados de las articulaciones de los ratones de los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento	<b>74</b>
<b>Figura 19.</b> (A) Niveles de glutatión (GSH), (B) Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), (C) Actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), (D) Actividad de la catalasa (CAT) y (E) Actividad de la glutatión reductasa (GR) en los homogeneizados de las articulaciones de los ratones de los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento	<b>75</b>
<b>Figura 20.</b> Niveles de proteínas oxidadas en los homogeneizados de hígado de los ratones en los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento	<b>77</b>
<b>Figura 21.</b> Ausencia de citotoxicidad de la $\alpha$ -mangostina en las distintas concentraciones empleadas sobre las CDMO activadas con LPS durante 4 o 24 horas mediante citometría de flujo	<b>79</b>

<b>Figura 22.</b> Citotoxicidad de la $\alpha$ -mangostina en las distintas concentraciones empleadas sobre los linfocitos polarizados hacia Th17 durante 6 días mediante citometría de flujo	<b>80</b>
<b>Figura 23.</b> Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre la expresión de CD86 en CDMOs activadas con LPS durante 4 horas mediante citometría de flujo. (A) Dot plots representativos del porcentaje de la expresión de CD86 en células CD11c <sup>+</sup> en los distintos grupos tratados con $\alpha$ -mangostina. (B) Índice del porcentaje de células CD11c <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales. (C) Índice de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CD86 en células CD11c <sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales	<b>81</b>
<b>Figura 24.</b> Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre la expresión de CD40 en CDMOs activadas con LPS durante 4 horas mediante citometría de flujo. (A) Dot plots representativos del porcentaje de la expresión de CD40 en células CD11c <sup>+</sup> en los distintos grupos tratados con $\alpha$ -mangostina. (B) Índice del porcentaje de células CD11c <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales. (C) Índice de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CD40 en células CD11c <sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales	<b>83</b>
<b>Figura 25.</b> Producción de las citocinas proinflamatorias (A) TNF $\alpha$ e (B) IL-6 en sobrenadantes de CDMOs estimuladas con LPS y $\alpha$ -mangostina en distintas concentraciones durante 4 horas	<b>85</b>
<b>Figura 26.</b> Producción de las citocinas asociadas a una respuesta tipo Th1 (A) IL-12 (p70) e (B) INF- $\gamma$ en sobrenadantes de CDMOs estimuladas con LPS y $\alpha$ -mangostina en distintas concentraciones durante 4 horas para IL-12 (p70) y durante 24 horas para INF- $\gamma$	<b>86</b>
<b>Figura 27.</b> Producción de las citocinas anti-inflamatorias (A) IL-10 y (B) TGF- $\beta$ en sobrenadantes de CDMOs estimuladas con LPS y $\alpha$ -mangostina en distintas concentraciones durante 4 horas	<b>87</b>
<b>Diagrama 1.</b> Representación esquemática de los efectos <i>in vitro</i> de la $\alpha$ -mangostina sobre las células dendríticas activadas con LPS y los linfocitos polarizados hacia Th1 y Th17 así como de sus efectos anti-inflamatorios y antioxidantes en la terapéutica de la CIA establecida en ratones DBA/1J.	<b>97</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ABS:** Albúmina sérica bovina.
- ACPAs:** Autoanticuerpos contra péptidos citrulinados
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- AIA:** Artritis inducida por antígeno
- AINEs:** Analgésicos no esteroideos.
- Akt/ PKB:** Proteína cinasa B.
- AMP<sub>c</sub>:** Adenosín monofosfato cíclico.
- ANOVA:** Análisis de varianza.
- AP-1:** Proteína activadora 1.
- APC:** Célula presentadora de antígeno.
- AR:** Artritis reumatoide.
- Avidina-HRP:** Complejo avidina - peroxidasa de rábano picante.
- BFA:** Brefeldina A.
- CAT:** Catalasa.
- CCL:** Ligando del motivo C-C
- CD:** Grupo de diferenciación.
- CFA:** Adyuvante completo de Freund
- CIA:** Artritis inducida por colágena.
- CICUAL:** Comité para el uso y el cuidado de animales de laboratorio.
- COX-2:** Ciclooxygenasa 2.
- CTLA-4:** Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos.
- CXCL:** Ligando del motivo C-X-C
- DAB:** 3'3 diaminobenzidina.
- DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- DCs:** Células dendríticas
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.
- ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas.
- eNOS:** Sintasa de óxido nítrico endotelial.
- ER:** Especies reactivas.
- ERNs:** Especies reactivas de nitrógeno.
- EROs:** Especies reactivas de oxígeno.
- FACS:** Clasificación celular activada por fluorescencia (citometría de flujo)
- Fc:** Fracción cristalizable.
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.
- Foxp3:** del inglés Forkhead box protein 3
- GITR:** Proteína relacionada al TNF inducida por glucocorticoides.
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos – macrófagos.
- GPx:** Glutación peroxidasa.
- GSH:** Glutación.

**GSSG:** Glutación disulfuro.  
**GST:** Glutación-S-transferasa.  
**HE:** Hematoxilina-eosina.  
**HLA:** Antígeno leucocitario humano  
**<sup>1</sup>H NMR:** Resonancia magnética nuclear con respecto al núcleo del hidrógeno.  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.  
**IFA:** Adyuvante incompleto de Freund  
**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma.  
**Ig:** Inmunoglobulina.  
**I $\kappa$ B:** Inhibidor  $\kappa$ B.  
**IL:** Interleucina.  
**iNOS:** Sintasa de óxido nítrico inducible.  
**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.  
**LOX:** Lipooxigenasa.  
**LPS:** Lipopolisacárido.  
**LS:** Líquido sinovial.  
**M2:** Macrófagos activados alternativamente.  
**MAPK:** Proteincinasa activada por mitógeno.  
**MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos 1.  
**MeOH:** Metanol.  
**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad.  
**MMPs:** Metaloproteinasas de matriz.  
**moDCs:** Células dendríticas derivadas de monocitos  
**MTX:** Metotrexato.  
**NADPH:** Nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato.  
**NAG-1:** gen 1 activado por AINE's.  
**NF- $\kappa$ B:** Factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B.  
**NK:** Células asesinas naturales.  
**NO:** Óxido nítrico.  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido.  
**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Singulete de oxígeno.  
**OH<sup>•</sup>:** Radical hidroxilo.  
**ONOO<sup>-</sup>:** Anión peroxinitrito.  
**PADI-4:** Peptidil arginina deiminasa tipo IV  
**PBS:** Amortiguador de fosfatos.  
**pDCs:** Células dendríticas plasmacitoides  
**PD-L1:** Ligando 1 de muerte programada  
**PE:** Ficoeritrina.  
**PerCP:** Complejo proteico clorofila-peridina.  
**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>.  
**PPAR $\gamma$ :** Receptor  $\gamma$  activado por los proliferadores de peroxisomas.  
**PTPN22:** Proteína fosfatasa de tirosina no receptora tipo 22  
**RANK:** Receptor del factor nuclear  $\kappa$ B.

**RANKL:** Ligando del receptor del factor nuclear  $\kappa$ B.  
**Redox:** Óxido-reducción.  
**RF:** Factor reumatoide  
**SEM:** Error estándar de la media  
**SFB:** Suero fetal bovino.  
**-SH:** Grupos sulfidrilo.  
**SICUAE:** Subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales.  
**SOD:** Superóxido dismutasa.  
**STAT-3:** Transductor de señal y activador de la transcripción 3.  
**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformador  $\beta$ .  
**Th:** Linfocitos T cooperadores.  
**TM:** Tricrómica de Masson.  
**TMB:** Sustrato cromógeno  $H_2O_2$ -tetrametilbencidina.  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .  
**TNFAIP3:** Proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**Tregs:** Linfocitos T  $CD4^+$  reguladores.  
**UV:** Absorción de radiación ultravioleta.  
**VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial.

# 1. Introducción

## ***1.1 Artritis reumatoide***

### **1.1.1 Epidemiología, genética y etiología de la artritis reumatoide**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica autoinmune que se presenta aproximadamente en el 1% de la población mundial. Es una enfermedad que afecta de manera primaria las articulaciones, pero que con el tiempo también puede generar alteraciones en otros órganos como nódulos reumatoides, vasculitis, pericarditis, miocarditis, escleritis, queratoconjuntivitis seca, uveítis, nefropatía y alteraciones pulmonares (fibrosis intersticial difusa). Debido a que el principal tejido afectado por la AR son las articulaciones, esta enfermedad es considerada discapacitante. Esta discapacidad física ocasionada por la AR genera a su vez una capacidad de trabajo reducida que aunada al alto costo de los fármacos utilizados para su control trae como consecuencia un alto impacto socioeconómico (Firestein, 2003)(Iwamoto et al., 2008)(Choy, 2012)(Smolen et al., 2016). La AR presenta una incidencia anual a nivel mundial de 40/100,000 casos y una relación mujeres: hombres de 2-3:1. La edad de inicio es entre los 40 y 50 años pero puede presentarse en todas las edades (Alamanos and Drosos, 2005)(Alam et al., 2017).

Se sabe actualmente que en la etiología de la AR participan componentes genéticos y medioambientales que pueden permitir modificaciones epigenéticas. Dentro de los factores genéticos se sabe que la heredabilidad de la enfermedad se encuentra entre el 40-65% para la presentación seropositiva de la AR y sólo del 20% para la enfermedad seronegativa (Smolen et al., 2016). Aunado a lo anterior, se han identificado varios genes como factor de riesgo para la enfermedad dentro de los cuales uno de los más importantes es el alelo DR4 del antígeno leucocitario humano (HLA-DR4), así como el locus HLA-DRB1 en pacientes con AR positivos a factor reumatoide (RF) y autoanticuerpos contra péptidos

citrulinados (ACPA) (Alam et al., 2017). Algunos otros genes que se han implicado en la enfermedad participan en la activación y regulación del sistema inmune como lo son la proteína fosfatasa de tirosina no receptora tipo 22 (PTPN22), el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4), la proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNFAIP3) y la peptidil arginina deiminasa tipo IV (PADI-4), entre otros (Alam et al., 2017).

Con respecto a los factores ambientales, uno de los más destacados es el tabaquismo, el cual se ha relacionado con el incremento en la generación de antígenos citrulinados que llevan a la producción de ACPAs y con el incremento en la generación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ya que es una fuente del radical semiquinona. Además del tabaquismo, algunos agentes infecciosos se han relacionado también con la AR como lo son *Escherichia coli*, el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, algunas especies de *Proteus* sp. y *Porphyromonas gingivalis*. La hipótesis por la cual se cree que estos agentes pueden incrementar el riesgo para presentar AR es que algunos de ellos pueden presentar mimetismo molecular con algunos péptidos propios, mientras que otros pueden expresar la enzima PADI-4, la cual está vinculada a la citrulinación de proteínas (Kobayashi et al., 2008) (Duskin and Eisenberg, 2010)(Mateen et al., 2016)(Alam et al., 2017).

### **1.1.2 Fisiopatología de la artritis reumatoide**

#### **1.1.2.1 Fases de progresión de la AR**

La articulación sinovial normal está constituida por un tejido vascularizado que entre sus funciones tiene mantener una presión negativa dentro de la articulación y producir el líquido sinovial que se encarga de la lubricación de la articulación para facilitar el movimiento. Esta articulación se encuentra conformada por la cápsula articular, que a su vez está constituida en su parte exterior por fibras de colágeno, mientras que al interior dentro del espacio articular se encuentran células grasas y la membrana sinovial. Esta

membrana está constituida por dos tipos de células: sinoviocitos tipo macrófago o tipo A y sinoviocitos tipo fibroblasto o tipo B, los cuales se encargan de 1) fagocitar, 2) interactuar con células presentadoras de antígeno (APCs) y de 3) sintetizar el ácido hialurónico (componente principal del líquido sinovial) (Edwards, 1994).

El proceso fisiopatológico de la AR se puede dividir en tres fases: una fase preartrítica, una fase de transición y una fase clínica. En la fase preartrítica se cree que se conjuntan los factores genéticos y los factores ambientales que predisponen a la enfermedad. Estos últimos pueden llevar a cabo a su vez cambios epigenéticos que permitirán el desarrollo de la autoinmunidad y la AR. Durante esta fase se pueden efectuar modificaciones postraduccionales de las proteínas (vimentina, colágena tipo II, queratina,  $\alpha$ -enolasa, histonas, fibrinógeno y fibronectina) tales como la citrulinación, que generarán la aparición de nuevos epítopes que estimularán la formación de autoanticuerpos como los ACPAs. De hecho, estos ACPAs pueden aparecer en la sangre de los individuos 10 años antes del diagnóstico de la AR (Smolen et al., 2016)(Alam et al., 2017).

En la fase de transición los factores genéticos y ambientales se encuentran potenciados mutuamente, lo que conlleva a la pérdida de tolerancia a lo propio y a la entrada a esta fase con cualquier mínimo factor estresante como un trauma menor, infecciones, alteraciones hormonales o factores psicológicos. La fase clínica de la AR comprende la activación del sistema inmune tanto innato como adaptativo y como consecuencia la presentación de la signología clínica de la AR como poliartralgia de las articulaciones de pies y manos, rigidez articular matutina e inflamación de las articulaciones (Alam et al., 2017).

#### **1.1.2.2 Células efectoras en la fisiopatología de la AR**

La AR es una patología altamente heterogénea en la que participan diversos tipos celulares tanto del sistema inmune innato y adaptivo como a nivel local. Dentro de las células que participan en la fisiopatología de la AR se encuentran los linfocitos T cooperadores (Th)1 y

Th17, los linfocitos B, las células dendríticas (DCs), los monocitos, los neutrófilos, los sinoviocitos tipo A y tipo B, los osteoclastos, los osteoblastos y los condrocitos, entre otras (Smolen et al., 2016).

Los linfocitos B participan de manera importante durante el desarrollo de la AR en la producción de autoanticuerpos como el RF, los ACPAs y los anticuerpos anticólagena II. El primero es un autoanticuerpo generalmente de la clase de la inmunoglobulina (Ig)M dirigido contra la fracción cristalizante (Fc) de la IgG que conlleva a la formación de complejos inmunes que pueden ser depositados en la articulación o en algún otro órgano, pudiendo así ocasionar la activación del complemento y la consecuente exacerbación del proceso inflamatorio y del daño articular (Duskin and Eisenberg, 2010).

Los sinoviocitos tipo A son células capaces de producir citocinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y algunas quimiocinas como la IL-8 que ocasionan la destrucción del cartílago articular y el reclutamiento de neutrófilos, los cuales una vez activados pueden producir especies reactivas de oxígeno (EROs) que participan en la oxidación de proteínas, lípidos y DNA y por lo tanto en la destrucción tisular (Smith and Haynes, 2002). Además, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  producidos por los sinoviocitos tipo A pueden afectar también la actividad de los condrocitos al inducir un aumento en su producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs). Aunado a esto, la IL-1 $\beta$  también es responsable de que los condrocitos disminuyan su síntesis de agregan y colágena tipo II, (los cuales proporcionan fuerza y flexibilidad a las articulaciones) e incrementen su producción de óxido nítrico (NO) y EROs como el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>) dando como resultado un incremento en la degradación del cartílago articular (Ahmed et al., 2003)(Liacini et al., 2003) (Andriamanalijaona et al., 2005).

Los sinoviocitos tipo B, son otras células clave que participan de manera importante en la destrucción del tejido articular, ya que también son capaces de producir MMPs bajo la inducción de citocinas proinflamatorias y algunos otros factores como el ligando del receptor del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL), el cual además también se encarga de diferenciar macrófagos

en osteoclastos, los cuales llevan a cabo la resorción ósea del hueso subcondral. Además, estos sinoviocitos tipo fibroblasto pueden también funcionar como APCs y presentar péptidos artritogénicos a las células T autoreactivas induciendo una respuesta proliferativa en éstas. Por otro lado, estas células también son capaces de producir varias citocinas proinflamatorias y factores pro-angiogénicos que amplifican la inflamación y la angiogénesis en el sinovio reumático (Lambert et al., 1998)(Tran et al., 2008)(Hou et al., 2009).

#### **1.1.2.2.1 Células dendríticas en la Artritis reumatoide**

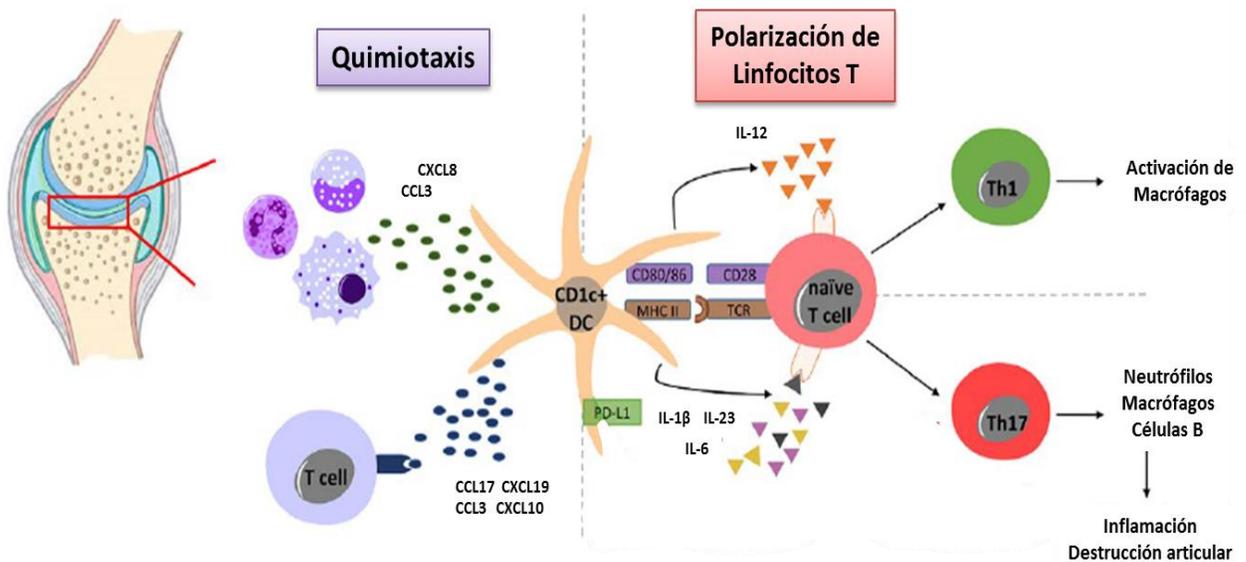
Se ha propuesto que las DCs juegan un papel importante en la fisiopatología de la AR debido a su alta capacidad de presentación antigénica y a su habilidad para dirigir la diferenciación de las células T naive hacia fenotipos proinflamatorios (Ueno et al., 2007)(Li et al., 2011). Aunado a lo anterior, se ha observado que estas DCs se encuentran incrementadas en la sangre periférica y en el líquido sinovial de pacientes con AR en comparación a pacientes con osteoartritis (Estrada-Capetillo et al., 2013)(Wehr et al., 2018). Las DCs asociadas a la AR encontradas con mayor frecuencia en el líquido sinovial de estos pacientes son las DCs CD1c<sup>+</sup>, las DCs plasmacitoides (pDCs) y las DCs derivadas de monocitos (moDCs)(Wehr et al., 2018).

Se ha encontrado que las DCs CD1c<sup>+</sup> de pacientes con AR presentan en su mayoría un fenotipo maduro, el cual es determinado por el aumento en su expresión de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II) y de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 y que esto es suficiente para activar linfocitos T *in vitro* (Moret et al., 2013). Además, estas DCs CD1c<sup>+</sup> secretan cantidades elevadas de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e IL-12, las cuales promueven la diferenciación de linfocitos T naive hacia los subtipos Th1 y Th17, siendo estos últimos los principales subtipos de linfocitos vinculados a la AR. Por otro lado, también secretan quimiocinas como el ligando del motivo C-C (CCL)3, CCL17, el ligando del motivo C-X-C (CXCL)10 y CXCL19 que reclutan linfocitos T al espacio articular; además de CXCL8, la cual también recluta neutrófilos (Wehr et

al., 2018)(Figura 1).

Con respecto a las pDCs, éstas se han encontrado también en una cantidad más elevada en el sinovio de pacientes con AR que en el sinovio de pacientes con osteoartritis, principalmente en aquéllos que son positivos a RF y ACPA. Además, se ha observado que estas pDCs sinoviales presentan un fenotipo inmaduro y producen IL-15 e IL-18, lo cual contribuye al incremento del proceso inflamatorio y al reclutamiento de más DCs (Hitchon and El-Gabalawy, 2011).

Por otro lado, en un estudio se encontró que las moDCs de pacientes con AR presentaban un incremento en su capacidad para producir citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-23, las cuales se encuentran asociadas a la diferenciación de linfocitos Th17 (Estrada-Capetillo et al., 2013). Además, estas moDCs también presentaron un incremento en la producción de quimiocinas como CXCL8 y CCL3, las cuales son capaces de reclutar neutrófilos, macrófagos y monocitos hacia el espacio articular amplificando de esta manera la inflamación (Yu and Langridge, 2017).



**Figura 1. Polarización y activación de linfocitos T y quimiotaxis mediada por células dendríticas (DCs) sinoviales CD1c<sup>+</sup> de pacientes con Artritis reumatoide.** CCL= Ligando del motivo C-C. CXCL= Ligando del motivo C-X-C. IL= Interleucina. TCR= Receptor de células T. MHC II= Complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Th= Linfocito T cooperador. PD-L1= Ligando 1 de muerte programada. Modificado de (Wehr et al., 2018).

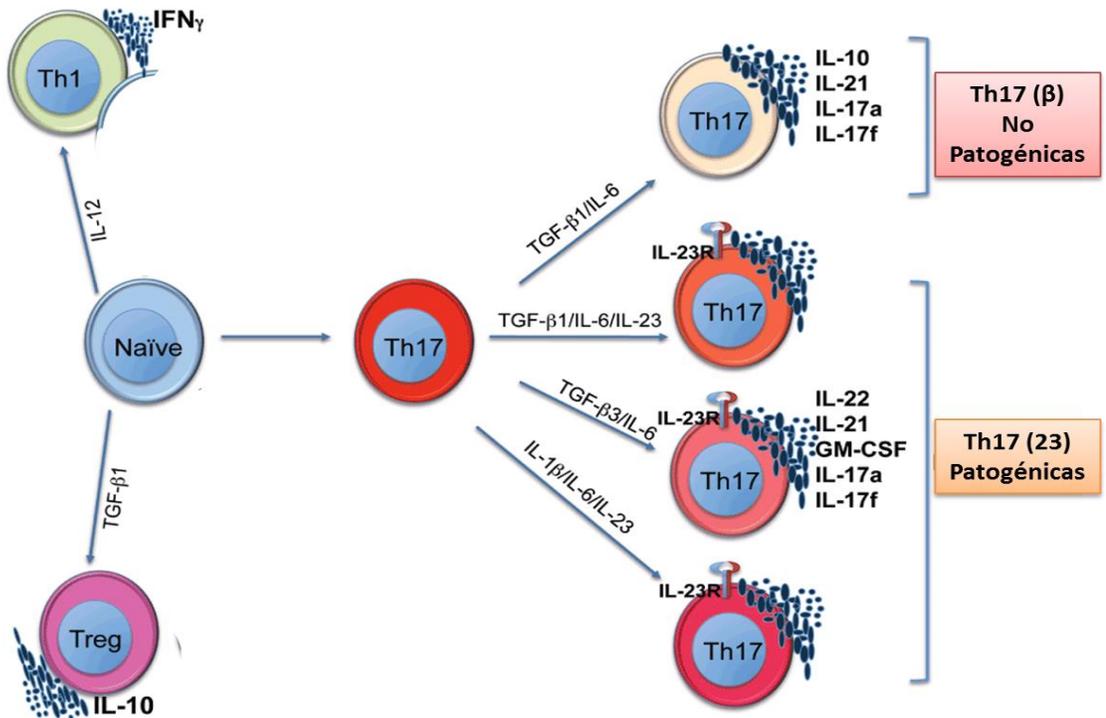
### **1.1.2.2.2 Linfocitos Th1 y Th17 en la Artritis reumatoide**

Los principales linfocitos que participan en el proceso inflamatorio que se presenta en la AR son los Th1 y Th17. Los primeros se caracterizan por producir TNF- $\alpha$ , IL-2, factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas (GM-CSF) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual participa en la activación de macrófagos y la disminución en la reparación del cartílago articular. Por otro lado, los linfocitos Th17 se caracterizan por producir citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-21 e IL-22 y son capaces de incrementar la actividad de células del sistema inmune innato como neutrófilos y macrófagos y de células del sistema inmune adaptativo como los linfocitos B. Además, también incrementan la destrucción ósea por parte de los osteoclastos y disminuyen la reparación del cartílago articular (Mosmann and Coffman, 1989)(Yu and Langridge, 2017)(Wehr et al., 2018).

En el pasado se creía que los linfocitos Th1 eran el principal subtipo de linfocito que participaba en la fisiopatología de la AR. Sin embargo, actualmente se considera que los linfocitos Th17 también participan de manera importante en la AR e incluso algunos autores los han considerado aún más importantes que los linfocitos Th1, ya que han observado que ratones con artritis inducida por colágena (CIA) deficientes en el receptor para INF- $\gamma$  presentan un rápido desarrollo de la artritis en comparación a ratones con CIA deficientes en IL-17A, los cuales presentan una marcada disminución en el desarrollo de la enfermedad (Komatsu and Takayanagi, 2012). Sin embargo, en otros modelos de artritis autoinmune como el de artritis inducida por proteoglicano (PGIA) se ha observado que los linfocitos Th1

también pueden ser artritogénicos, ya que en este modelo la artritis es mediada principalmente por INF- $\gamma$  y no por IL-17 donde la deficiencia de esta última citocina no afecta el infiltrado inflamatorio, la hiperplasia sinovial, la producción de anticuerpos anti-proteoglicano ni tampoco el comienzo ni la severidad de la PGIA. A pesar de lo anterior, tanto como en la PGIA como en la CIA se expresan simultáneamente citocinas como el INF- $\gamma$ , la IL-17, el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6 (Sarkar et al., 2010).

Los linfocitos Th1 requieren de IL-12 y de INF- $\gamma$  para su diferenciación, mientras que inicialmente se creyó que los linfocitos Th17 requerían el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la IL-6 para su diferenciación. Actualmente, los linfocitos Th17 se dividen en dos subtipos: los linfocitos Th17( $\beta$ ) que son los linfocitos Th17 convencionales que son diferenciados con IL-6 y TGF- $\beta$  y que se caracterizan por expresar una mayor cantidad de la citocina inmunomoduladora IL-10, así como de la quimiocina CCL20 y el receptor tipo 6 de la quimiocina C-X-C (CXCR6), adicionalmente a su producción de IL-17A e IL-17F; y los linfocitos Th17(23) que pueden diferenciarse a partir de la presencia de IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  sin necesidad de TGF- $\beta$  exógeno o a partir de IL-6, TGF- $\beta$ 1 e IL-23. Estos linfocitos se caracterizan por producir una alta cantidad de IL-22, la quimiocina CCL9 y el receptor tipo 3 de la quimiocina C-X-C (CXCR3). Además, ambos subtipos de linfocitos Th17 también requieren de IL-21 para su desarrollo y expansión (Lee et al., 2012)(Kurebayashi et al., 2013). Por otro lado, también se ha demostrado que los linfocitos Th17( $\beta$ ) suelen ser poco patogénicos a menos que sean expuestos a la IL-23 por un periodo prolongado, mientras que los linfocitos Th17(23) son altamente patogénicos y se encuentran asociados a una presentación más severa de diversas enfermedades autoinmunes (Lubberts, 2010)(Lee et al., 2012) (*Figura 2*).



**Figura 2.** Subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que participan de manera importante en la Artritis reumatoide y clasificación de linfocitos Th17 de acuerdo a su requerimiento de citocinas para su diferenciación y su perfil de expresión de citocinas y quimiocinas. IL= Interleucina. IFN- $\gamma$ = Interferón gamma. Treg= Linfocito T regulador. Th= Linfocito T cooperador. TGF- $\beta$ 1= Factor de crecimiento transformador  $\beta$ 1. IL-23R= Receptor de IL-23. GM-CSF= Factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas. Modificado de (Lee and Kuchroo, 2015).

### 1.1.2.3 Mediadores inflamatorios participantes en la fisiopatología de la AR

Las citocinas y las quimiocinas son mediadores inflamatorios clave en la fisiopatología de la AR que participan de manera importante desde el inicio de la enfermedad y durante toda su progresión. Algunas de las citocinas que participan de manera importante en el proceso inflamatorio y en la destrucción articular durante la AR son el TNF- $\alpha$ , IL- 1 $\beta$ , IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22 e IL-33, entre otras.

El TNF- $\alpha$  es producido por macrófagos, DCs y células T activadas, entre otras células. Su efecto proinflamatorio en la AR se debe a la inducción de otras citocinas

proinflamatorias, MMPs, la producción de radicales libres y la modulación de linfocitos T reguladores (Tregs) (Boissier et al., 2012). Además, se ha observado que el TNF- $\alpha$  junto con la IL-17 son capaces de inducir la expresión de IL-23 p19 en fibroblastos sinoviales promoviendo de esta manera la diferenciación de linfocitos Th17(23) (Leech and Morand, 2013). Por otro lado, la IL-1 $\beta$  es una citocina proinflamatoria que promueve la activación de leucocitos, células entoteliales, osteoclastos y condrocitos y que junto con el TNF- $\alpha$  se ha asociado fuertemente a la destrucción tisular que se presenta durante la AR (Boissier et al., 2012). Esto es debido en parte a que tanto la IL-1 $\beta$  como el TNF- $\alpha$  son capaces de generar la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual a su vez genera una retroalimentación positiva para la producción de estas citocinas. El TNF- $\alpha$  se encarga de fosforilar al inhibidor  $\kappa$ , el cual se encuentra unido a las subunidades de NF- $\kappa$ B en el citosol; esto provoca la liberación de dímeros de NF- $\kappa$ B (porciones p50 y p65) que se translocan al núcleo en donde se unen a promotores de genes proinflamatorios (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL6, entre otros) y estimulan la activación de la enzima nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa o NOX). Esta última, cataliza la reacción que lleva a la generación de la ERO anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que a su vez puede participar en la formación de otras EROs y ERNs como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el singulete de oxígeno ( $^1O_2$ ) y el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Moynagh, 2005) (*Figura 3*). Además de lo anterior, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  también incrementan la expresión de moléculas de adhesión; lo cual incrementa la migración leucocitaria dentro del sinovio reumático y evitan la producción de inhibidores de MMPs por los fibroblastos sinoviales, mientras promueven la producción de MMPs (particularmente, colagenasa y estromelisina), con lo cual incrementan la destrucción tisular dentro de la articulación. Además, el TNF- $\alpha$  también es capaz de dañar directamente el tejido articular a través de sus efectos citotóxicos y la estimulación del desarrollo de osteoclastos y la producción de IL-11 (Smith and Haynes, 2002)(Iwamoto et al., 2008). En correspondencia con lo anterior, el bloqueo de esta citocina por anticuerpos mejora la signología clínica de los pacientes con AR, en parte debido a la generación de una subpoblación de Tregs  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ CD62L^-$  (Boissier et al., 2012).

La IL-6 es una citocina proinflamatoria producida por células polimorfonucleares, DCs y células sinoviales (principalmente macrófagos activados y sinoviocitos tipo fibroblasto) después de su inducción con TNF- $\alpha$  que participa en la activación de leucocitos sinoviales a nivel local y en la producción de anticuerpos. Se han encontrado niveles altos de esta citocina en la sangre y el líquido sinovial de pacientes con AR y se ha demostrado que esto presenta una correlación positiva con la destrucción articular radiológica observada en estos pacientes. Lo anterior se debe a que esta citocina aumenta la resorción ósea al ejercer su acción sobre neutrófilos y precursores de osteoclastos, en los cuales promueve la diferenciación por mecanismos dependientes o independientes de RANKL. Además, esta citocina también puede participar en la presentación de algunas de las manifestaciones sistémicas de la AR como la astenia, la anemia, la respuesta de fase aguda y el metabolismo de los lípidos (Hirano, 2010)(Boissier et al., 2012)(Picerno et al., 2017). Aunado a esto, la IL-6 producida por fibroblastos sinoviales de pacientes con AR puede promover la diferenciación, la activación y la proliferación de los linfocitos Th17 (Leech and Morand, 2013). Esta citocina también participa en el reclutamiento de células mononucleares, células T y neutrófilos y en la formación de pannus debido a que promueve la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)(Choy, 2012).

La IL-15 es producida por DCs, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos sinoviales de pacientes con AR. Se ha observado que su expresión se encuentra incrementada tanto en el líquido sinovial como en los tejidos sinoviales de pacientes con AR, lo cual se ha asociado al reclutamiento de células T y su posterior activación dentro del sinovio reumático. Además esta IL-15 es capaz de estimular la producción de TNF- $\alpha$  en linfocitos T que se encuentran dentro del sinovio reumático, los cuales a su vez al interactuar con macrófagos mediante contacto directo incrementan también su producción de TNF- $\alpha$ . Aunado a lo anterior, esta citocina también se ha asociado a la activación de osteoclastos (Gravallese and Goldring, 2000)(Arend, 2001).

La IL-17 es producida por linfocitos Th17, linfocitos T  $\gamma\delta$ , células NKT neutrófilos y

células T CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17 y posee diversas funciones biológicas. Por ejemplo, es capaz de estimular a los fibroblastos sinoviales para aumentar su expresión de RANKL y producir IL-6, la proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2), el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y varias quimiocinas CXC (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CXCL10, entre otras), con lo cual promueve la granulopoesis y la quimiotaxis a neutrófilos (Ryu et al., 2006)(Flores-García and Talamás-Rohana, 2012)(M. Katayama et al., 2013). La IL-17 también puede incrementar la expresión de las quimiocinas CC como la CCL2 y la CCL20 que atraen monocitos y linfocitos Th17, respectivamente. Además, la IL-17 puede activar directamente macrófagos y células dendríticas y estimular su producción de citocinas, dentro de las cuales se encuentra la IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12, ésta última capaz de dirigir la diferenciación de linfocitos Th1. Esta citocina también es capaz de promover la formación de centros germinales y la sobrevivencia y proliferación de las células B, por lo cual se ha asociado a la formación de estructuras linfoides ectópicas. La IL-17 también participa en la activación de osteoblastos en los cuales aumenta la expresión de RANKL promoviendo la diferenciación de osteoclastos (Haynes, 2007)(Choi et al., 2009)(Flores-García and Talamás-Rohana, 2012)(Kurebayashi et al., 2013).

La IL-18 se expresa en macrófagos, células dendríticas, osteoblastos y fibroblastos sinoviales de pacientes con AR, mientras que su receptor (IL-18R) es expresado en células T naive, células Th1 y macrófagos y fibroblastos sinoviales (Boissier et al., 2012). Se ha observado que la combinación de esta citocina con IL-12 e IL-15 induce de manera efectiva la producción de INF- $\gamma$  por parte de los tejidos sinoviales. Los efectos proinflamatorios de esta citocina incluyen la estimulación de la producción de NO, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 en macrófagos, la inhibición en la proliferación de condrocitos, el incremento en la producción de quimiocinas, la estimulación de la angiogénesis, el aumento en la producción de la sintasa de óxido nítrico (NOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la activación de linfocitos Th1. Además, la administración de la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), un inhibidor endógeno de la IL-18 mejora la CIA en ratones (Arend, 2001)(Boissier et al., 2012).

La IL-21 es una citocina producida por los linfocitos Th17, la cual es inducida de manera importante por la IL-6. Esta citocina se ha considerado clave en la generación de linfocitos Th17, ya que en la ausencia de IL-6, esta citocina junto con el TGF- $\beta$  pueden inducir la diferenciación de los linfocitos Th17(Lubberts, 2010). La IL-22 es una citocina que pertenece a la superfamilia de la IL-10 y es producida inicialmente por linfocitos T activados (Th17 y Th22) y células asesinas naturales (NK)-22. Posteriormente, se ha encontrado que esta citocina también es altamente expresada en macrófagos y fibroblastos sinoviales de pacientes con AR. Dentro de sus funciones biológicas se encuentran el incremento en la proliferación de fibroblastos sinoviales de pacientes con AR y la producción de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) *in vitro* (Lubberts, 2010)(Akdis et al., 2011)(Pan et al., 2013). También se ha observado que esta citocina es capaz de promover la osteoclastogénesis *in vitro* e incrementar la producción de anticuerpos IgG totales y específicos contra la colágena II; además de que su deficiencia disminuye la susceptibilidad a la CIA en ratones (Geboes et al., 2009)(Lubberts, 2010)(Akdis et al., 2011).

La IL-33 es una citocina que recientemente se ha estudiado por su papel proinflamatorio en la AR. Se ha descrito que tanto la IL-33 como su receptor ST2 se encuentran incrementados en el suero y en el sinovio de pacientes con AR y que las principales células que expresan esta citocina son las células endoteliales y los fibroblastos sinoviales tras la inducción por citocinas proinflamatorias. Además, el bloqueo de la función biológica de la IL-33 mediante anticuerpos contra su receptor, la delección del gen ST2 o la administración de una presentación soluble de ST2 disminuye la severidad de la CIA en ratones (Liew et al., 2010)(Boissier et al., 2012)(Chen et al., 2017).

### **1.1.3 Papel de las especies reactivas en el proceso inflamatorio y el daño articular presentes en la artritis reumatoide**

Las EROs son metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos y altamente reactivos que

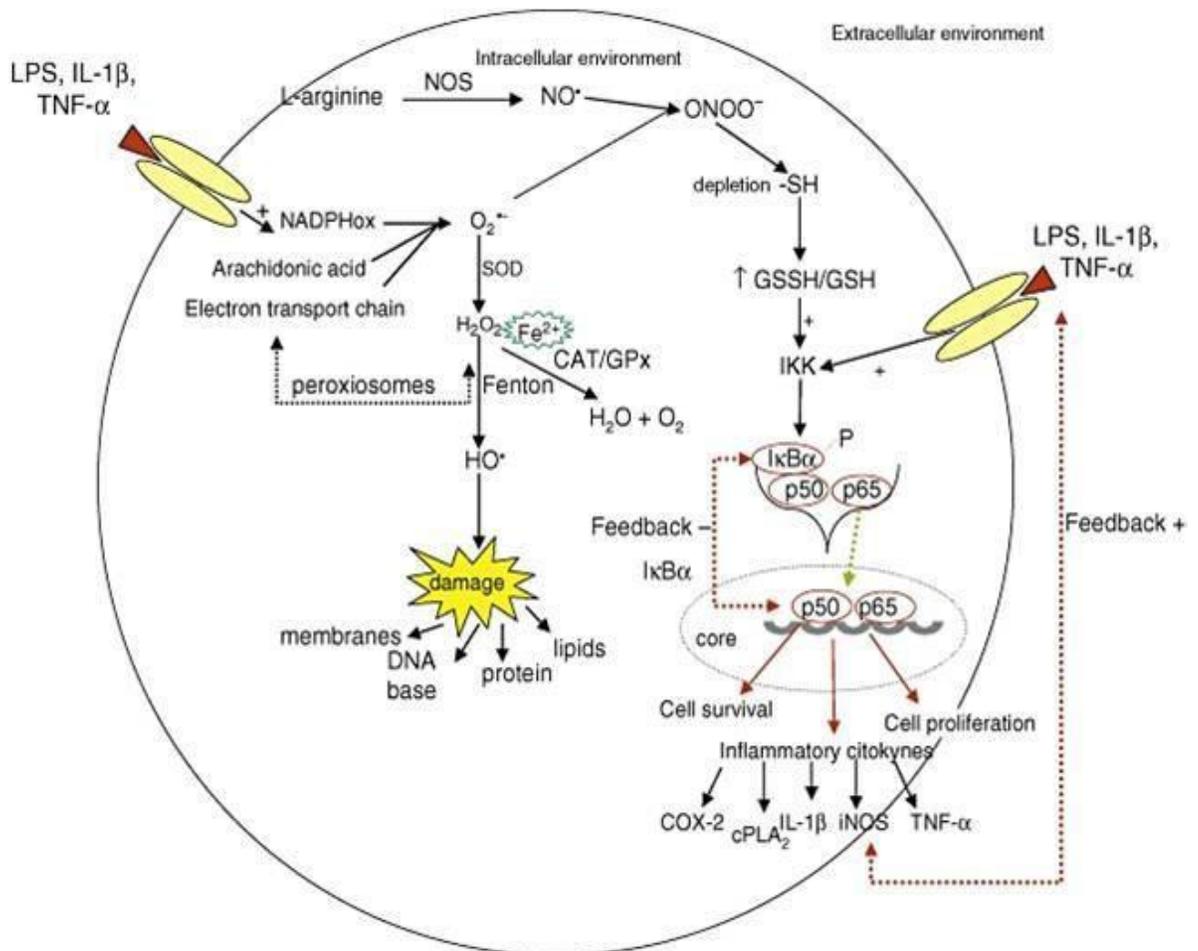
son generados como productos intermedios durante la fosforilación oxidativa y por células fagocíticas activadas durante el estallido respiratorio. Entre las EROs generadas durante estos procesos, destacan por su alta reactividad el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidróxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ). Las EROs participan en múltiples procesos fisiológicos dentro de los cuales se encuentra la defensa contra microorganismos. Sin embargo, la excesiva producción de estas especies reactivas (ER) también es capaz de dañar moléculas y estructuras celulares como el DNA, las proteínas, los lípidos y los componentes de la matriz extracelular como los proteoglicanos y la colágena. Por esta razón, el organismo posee un sistema de defensa antioxidante para mantener un equilibrio entre éste y la producción de EROs. Este sistema de defensa antioxidante se divide en enzimático, al que pertenecen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) y no enzimático, al que pertenecen moléculas como el glutatión reducido (GSH) y las vitaminas A, C y E. La pérdida del equilibrio entre la producción de EROs y el sistema de defensa antioxidante permite el daño oxidante, el cual se conoce como estrés oxidante (Hitchon and El-Gabalawy, 2004)(Filippin et al., 2008)(García-gonzález et al., 2015).

En diversos estudios se ha demostrado que el estrés oxidante participa de manera importante en la fisiopatología de la AR, ya que los pacientes con AR presentan un incremento en la actividad de enzimas oxidantes y una disminución en los niveles de antioxidantes en el suero y líquidos sinoviales (LS), lo cual indica que existe una cantidad elevada de ER en estos pacientes (Henrotin et al., 2003). Además de lo anterior, en algunos estudios se ha demostrado que el estrés oxidante generado durante la AR no se modifica por la actividad de la enfermedad, mientras que en otros se ha demostrado que los pacientes con AR activa presentan un sistema de defensa antioxidante más comprometido (García-gonzález et al., 2015)(Zafar et al., 2016). Aunado a esto, se ha encontrado que la AR ocurre en sujetos previamente sanos que tienen bajos niveles de antioxidantes circulantes, con lo cual se postula que el estrés oxidante podría participar en el desarrollo de la AR (Cerhan et al., 2003).

Varios factores podrían estar involucrados en la generación de estrés oxidante en las articulaciones de los pacientes con AR. Por ejemplo, la presión intraarticular es mucho más alta en las articulaciones de pacientes con AR debido a la fibrosis de la cápsula articular y la inflamación de la membrana sinovial. Esto puede ocasionar colapso de los vasos sanguíneos que aunado a una tasa metabólica tisular elevada en los tejidos inflamados podría inducir un daño por isquemia-reperfusión repetitivo en la articulación. El daño al tejido también podría contribuir a liberar iones de hierro y cobre, los cuales catalizan reacciones para la formación de radicales libres (Hitchon and El-Gabalawy, 2004)(Mateen et al., 2016).

Dentro de los múltiples daños que pueden ocasionar estas especies reactivas generadas durante la AR se encuentran: 1) daño oxidante al ácido hialurónico (despolimerización y por lo tanto disminución de la viscosidad de los LS), al colágeno y al cartílago (fragmentación por el  $O_2^-$ ), 2) daño al ADN, 3) generación de productos de lipoperoxidación, 4) oxidación de lipoproteínas de baja densidad, 5) incremento de grupos carbonilo por la oxidación de proteínas, 6) incremento en la oxidación de IgG y por lo tanto, la generación de factor reumatoide y 7) inducción de apoptosis en condrocitos y alteración de la relación Th1/ Th2 (producida por el NO) (Smith and Haynes, 2002)(Henrotin et al., 2003)(Mateen et al., 2016). Adicionalmente, estas especies reactivas pueden inactivar proteínas inhibidoras de metaloproteinasas e inducir la resorción ósea mediada por osteoclastos, los cuales inducen la producción adicional de  $O_2^-$  (sustrato para la formación de otras ER más agresivas). Los efectos anteriores son amplificados en la presencia de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Lo anterior, puede deberse en parte a que las EROs y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) pueden funcionar como un segundo mensajero para activar al NF- $\kappa$ B e incrementar la activación de los sistemas proteolíticos (Dröge, 2002)(Griffiths, 2005)(Bar-Shai and Reznick, 2006)(Filippin et al., 2008)(García-gonzález et al., 2015)(Figura 3).



**Figura 3.** Relación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en la activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) y la transcripción de citocinas proinflamatorias.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  = anión superóxido.  $\text{H}_2\text{O}_2$  = peróxido de hidrógeno.  $\text{HO}^{\cdot}$  = radical hidroxilo. SOD = superóxido dismutasa. CAT = catalasa. GPx = glutatión peroxidasa. NO = óxido nítrico. NOS = Sintasa de óxido nítrico.  $\text{ONOO}^-$  = anión peroxinitrito. -SH = grupos sulfhidrilo. GSSH/ GSH = relación glutatión disulfuro/ glutatión. IKK = cinasa del inhibidor  $\kappa$ . I $\kappa\text{B}\alpha$  = inhibidor  $\kappa\text{B}$ . P = fosforilación. cPLA<sub>2</sub> = fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica. COX<sub>2</sub> = ciclooxigenasa 2. iNOS = sintasa de óxido nítrico inducible. LPS = lipopolisacárido. TNF- $\alpha$  = factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . IL-1 $\beta$  = interleucina 1 $\beta$ . Tomado de (Filippin et al., 2008).

#### 1.1.4 Control del proceso inflamatorio en la artritis reumatoide y relevancia de la participación de los linfocitos T reguladores y de células dendríticas tolerogénicas

La inflamación es un proceso que requiere ser regulado para evitar el daño al hospedero. Cuando los mecanismos de regulación de este proceso se encuentran alterados o el proceso inflamatorio generado sobrepasa la capacidad de estos mecanismos regulatorios para controlarlo se produce un estado crónico de inflamación como el que sucede en varias autoinmunidades (Santangelo et al., 2007).

Se han descrito diversos mecanismos que participan en la regulación de la inflamación, entre los cuales se encuentran la acción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10, el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la IL-35 producidos por células T, B y NK reguladoras, la producción de adenosina capaz de promover la activación de macrófagos activados alternativamente (M2) y regular la activación de macrófagos activados clásicamente (M1), las células dendríticas tolerogénicas con propiedades reguladoras y el control establecido por el sistema nervioso central a través de la vía anti-inflamatoria colinérgica, entre otros (Fillatreau et al., 2002)(Mauri and Ehrenstein, 2008)(Rosas-Ballina and Tracey, 2009)(Vivier and Ugolini, 2009)(Haskó and Cronstein, 2013).

Entre los mecanismos regulatorios mencionados con anterioridad, las células dendríticas tolerogénicas han cobrado gran importancia debido a su capacidad de modular la respuesta inflamatoria en algunas enfermedades autoinmunes. Estas DCs pueden ser generadas a partir de precursores de médula ósea en roedores o a partir de monocitos humanos al ser sometidos a altas cantidades de IL-10, TG $\beta$ 1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y bajas cantidades de GM-CSF; y se caracterizan por expresar bajas cantidades de moléculas coestimuladoras (CD80/CD86), alta expresión del receptor de quimiocinas CCR7 que aumenta la migración de las CD tolerogénicas a órganos linfoides secundarios, alta expresión de moléculas inhibitorias como PDL1, indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y hemoxigenasa 1, disminuyen la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y expresan en gran cantidad moléculas inductoras de muerte de linfocitos T efectores como CD95L. A nivel funcional, estas células se caracterizan por tener una alta secreción de IL-10

y TGFβ1 y una baja secreción de IL-12p70, con lo cual poseen la capacidad de expandir o generar células T reguladoras. Es por todo lo anterior, que estas células pueden modular la respuesta de células T efectoras, ya sea a través de una sola función predominante o, más frecuentemente, a través de una combinación de mecanismos complementarios (Morelli and Thomson, 2007).

Dentro de los linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y B hay poblaciones reguladoras encargadas de prevenir la autoinmunidad y mantener la tolerancia a lo propio; así como de controlar los procesos inflamatorios que se presentan en diversas patologías incluyendo la AR. Dentro de estas poblaciones reguladoras, los linfocitos Tregs CD4<sup>+</sup> son los que han cobrado mayor importancia debido a su papel en la fisiopatología de la AR, donde estas células tratan de controlar el proceso inflamatorio a nivel articular; sin embargo, con el tiempo este control llega a ser insuficiente debido a varios mecanismos que se presentan durante la progresión de la enfermedad, llevando al daño articular (Oh et al., 2010).

Las células Tregs (con fenotipo CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>high+</sup>) son capaces de suprimir una variedad de células inmune incluyendo linfocitos B, células NK, células NKT, linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, monocitos y DCs. Estas células se caracterizan por expresar el factor de transcripción Foxp3 y moléculas de superficie de carácter supresor como el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3) y la proteína relacionada al TNF inducida por glucocorticoides (GITR), entre otras (Sakaguchi, 2000)(Schmidt et al., 2012).

Los linfocitos Tregs poseen varios mecanismos para controlar la respuesta inmune entre los cuales se encuentran: a) La producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, TFG-β e IL-35 (Shevach et al., 2006)(Collison et al., 2007)(Schmidt et al., 2012) b) La inhibición de la transcripción de citocinas pro-inflamatorias por la supresión de la señalización del calcio, el factor nuclear de células T activadas (NFAT) y NF-κB inducido por la activación del TCR (Bettelli et al., 2005)(Wu et

al., 2006), c) La inducción de apoptosis de células T efectoras por restricción de IL-2, d) La represión del gen de IL-2 en linfocitos T efectoras mediado por la transferencia de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Sojka et al., 2008), e) La hidrólisis extracelular del adenosín trifosfato (ATP) a adenosín difosfato (ADP) o adenosín monofosfato (AMP) por la ectoenzima CD39 y la posterior generación de adenosina por la degradación de AMP por CD73, f) La modulación de la función de las APCs a través de la interacción con moléculas supresoras como CTLA-4 y LAG-3, g) La inducción de muerte celular en linfocitos T efectoras a través de granzimas y perforinas, entre otros (Schmidt et al., 2012)(Figura 4).

La IL-10 es producida por casi cualquier tipo celular del sistema inmune como macrófagos M2, células B, células Tregs, DCs y granulocitos. Esta citocina posee efectos anti-inflamatorios dentro de los cuales destacan: a) La inhibición de la liberación y la función de citocinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, y la proliferación de linfocitos T *in vitro* (Choy and Panayi, 2001), b) La disminución en la activación de células T al suprimir la expresión de CD28 y CD2 (Akdis et al., 2011), c) Activación de una vía pro-tolerogénica en DCs a través del aumento en la expresión del receptor de IL-1 (IL-1RA), TGF- $\beta$ , los receptores inhibidores de la transcripción tipo inmunoglobulina y las moléculas del MHC clase III como HLA-G, d) Inhibición de la función de las células Th1 y Th17 y e) Contribución a la función y proliferación de los linfocitos Treg (Banchereau et al., 2012). En pacientes con AR, se ha observado que la IL-10 es capaz de disminuir la degradación del cartílago articular al inhibir la producción de MMPs y estimular la producción del inhibidor de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) en monocitos; así como de afectar las funciones de las APCs al disminuir la expresión de moléculas del MHC clase II y moléculas coestimuladoras sobre la superficie de los macrófagos y los monocitos. Además, esta citocina también es capaz de disminuir la producción de PGE<sub>2</sub> inducida por TNF- $\alpha$  en fibroblastos sinoviales (Akdis et al., 2011)(Khan et al., 2016). Sin embargo, la concentración local de esta citocina no logra ser suficiente para contrarrestar de manera eficiente el ambiente proinflamatorio que se presenta en la AR (McInnes and Schett, 2007).

La subfamilia del TGF- $\beta$  incluye seis isoformas, tres de las cuales se encuentran en

mamíferos. De estos, el TGF- $\beta$ 1 es el que presenta un mayor papel en el sistema inmune, ya que controla varios aspectos del proceso inflamatorio, la diferenciación de linfocitos T, el cambio de isotipo por parte de los linfocitos B y la tolerancia a lo propio (Banchereau et al., 2012). Se ha demostrado que este factor puede presentar un efecto dual en pacientes con AR donde se ha encontrado en cantidades elevadas en el líquido sinovial. Por ejemplo, el TGF- $\beta$  puede suprimir la función de las células T efectoras, inhibir la proliferación de fibroblastos, disminuir la producción de MMPs, incrementar la producción de inhibidores específicos de metaloproteinasas, inducir e incrementar la función de los linfocitos Treg e inhibir la generación de células Th1 y Th2. Mientras, que por otro lado, el TGF- $\beta$  puede también inducir la diferenciación de células T naive en linfocitos Th17 y puede estar implicado en la fibrosis de la membrana sinovial de pacientes con AR que, eventualmente, termina en la anquilosis de la articulación. El TGF- $\beta$  también puede ser proangiogénico, pero en altas concentraciones inhibe la función de otros factores angiogénicos, demostrando de esta manera nuevamente su papel dual en la fisiopatología de la AR (Smith and Haynes, 2002)(Schmidt et al., 2012)(Banchereau et al., 2012).

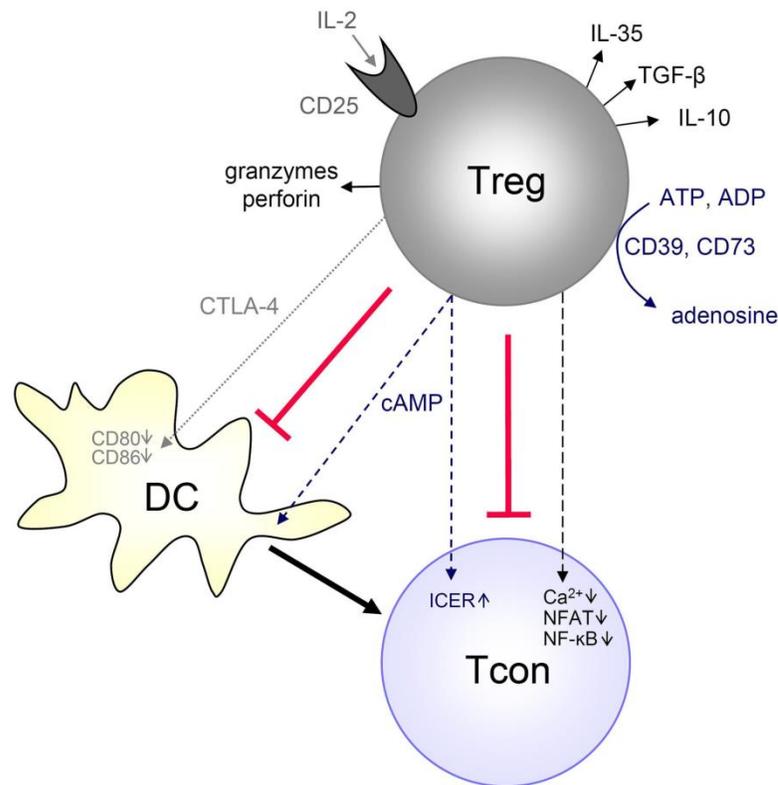
La IL-35 es una citocina anti-inflamatoria que es producida principalmente por las células Tregs Foxp3<sup>+</sup>. Esta citocina no es expresada constitutivamente en los tejidos; aunque células endoteliales, células de músculo liso y monocitos son capaces de producirla después de la estimulación con citocinas proinflamatorias y LPS (Banchereau et al., 2012). La estimulación con esta citocina induce la diferenciación de células T efectoras CD4<sup>+</sup> a células Tregs que expresan IL-35 pero que no requieren de la expresión de Foxp3, TGF- $\beta$  e IL-10 para ejercer sus funciones reguladoras, por lo cual se han denominado células Tregs inducidas por IL-35 (iTreg35)(Banchereau et al., 2012)(Schmidt et al., 2012). Dentro de sus funciones, esta citocina inhibe la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> hacia un subtipo Th17 y es capaz de inhibir la proliferación de células T efectoras. Además, en ratones con CIA, la IL-35 reduce la incidencia de artritis, el número de extremidades artríticas y las características patológicas de la enfermedad debido a su capacidad para incrementar el número de células Tregs y los niveles séricos de IL-10 y para reducir la producción de INF- $\gamma$ , IL-17 y anticuerpos anticólagena II (Akdis et al., 2011)(Banchereau et

al., 2012)(Schmidt et al., 2012).

A pesar de la importancia de las células Tregs en la regulación de la respuesta inflamatoria y de su participación activa en patologías autoinmunes como la AR, estas células no son capaces de controlar de manera efectiva el fenómeno inflamatorio que sucede en la artritis, lo cual podría asociarse a la presentación de los periodos de remisión y de relapso que son observados durante la enfermedad (Gol-Ara et al., 2012). En algunos estudios se ha demostrado que las células Tregs son funcionales y efectivas durante el establecimiento de la AR; sin embargo una vez que el proceso inflamatorio se ha establecido, estas células pueden presentar defectos en su funcionalidad o una disminución en su número, lo cual permite la exacerbación del proceso inflamatorio (de Kleer et al., 2004)(Ehrenstein et al., 2004)(Van Amelsfort et al., 2004)(Möttönen et al., 2005)(Oh et al., 2010)(Gol-Ara et al., 2012). Por otro lado, también se ha observado que las células T CD4<sup>+</sup> efectoras que se encuentran en el sinovio reumático pueden ser afectadas por el ambiente proinflamatorio generado por citocinas, quimiocinas y varios mediadores de la inflamación, lo cual provoca una activación exacerbada de la vía de la protein cinasa B (PKB/c-Akt) en estas células y las hace refractarias a la supresión mediada por las células Tregs (de Kleer et al., 2004)(Van Amelsfort et al., 2007)(Anderson and Isaacs, 2008)(Komatsu and Takayanagi, 2012). Aunado a lo anterior, algunos autores han informado que la regulación de la señalización del receptor de linfocitos T (TCR) por CTLA-4 está dañada en las células Tregs de pacientes con AR, lo cual afecta la capacidad supresora de estas células (Oh et al., 2010)(Gol-Ara et al., 2012). Además, se ha descrito que las células Tregs de pacientes con AR son más propensas a sufrir apoptosis y que la IL-7 y el TNF- $\alpha$  producidos por monocitos del líquido sinovial de estos pacientes afectan su capacidad supresora (Anderson and Isaacs, 2008)(Komatsu and Takayanagi, 2012).

Debido a la observación de que la funcionalidad de las células Tregs en pacientes con AR puede estar comprometida o su número estar reducido y que las células T efectoras presentes en el sinovio reumático son más resistentes a la supresión debido a la presencia de citocinas proinflamatorias, se han dirigido esfuerzos para restaurar los defectos de la ausencia y la funcionalidad de las células Tregs así como a restaurar la

sensibilidad de las células T efectoras a la supresión mediada por estas células, los cuales incluyen bloqueos de citocinas proinflamatorias mediante terapias biológicas con anticuerpos como los anti-TNF- $\alpha$ , terapia con antígenos específicos, expansión *in vivo* de células Tregs mediante anticuerpos monoclonales como el anti-CD3, infusiones de células Tregs, utilización de DCs tolerogénicas o alguna combinación de las anteriores (Flores-Borja et al., 2008)(Anderson and Isaacs, 2008).



**Figura 4. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg) sobre las células T efectoras convencionales (Tcon) y las células dendríticas (DC).** IL= Interleucina. TGF- $\beta$ = Factor de crecimiento transformador  $\beta$ . CTLA-4= Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos. ICER= Represor temprano inducible por AMPc. AMPc= Adenosín monofosfato cíclico. NFAT= Factor nuclear de células T activadas. NF- $\kappa$ B= Factor nuclear  $\kappa$ B. TGF- $\beta$ = Factor de crecimiento transformador  $\beta$ . ATP= Adenosín trifosfato. ADP= Adenosín difosfato. Tomado de (Schmidt et al., 2012).

### 1.1.5 Artritis reumatoide en animales

Se ha descrito que la AR ocurre también en algunas especies animales como los felinos y los caninos en los que se ha observado que presenta características similares a la AR humana, aunque su incidencia no es tan alta como en la población humana. La AR felina pertenece al grupo de las poliartritis erosivas que incluyen también a la poliartritis proliferativa periosteal (PPP) que es la más común. Se ha observado que la AR en gatos es de escasa presentación, aunque un estudio reveló que la incidencia pudiese ser más alta, debido a que la AR en gatos puede ser difícil de reconocer sobre todo en las etapas tempranas de la enfermedad (Carter et al., 1999)(Hanna, 2005).

La AR felina tiene un comienzo insidioso y la claudicación y la deformación articular es desarrollada en un periodo de semanas a meses. Los gatos de mediana edad y los geriátricos son afectados con más frecuencia y los gatos siameses pueden estar sobrerrepresentados (Lemetayer and Taylor, 2014). Los signos clínicos más comunes que se presentan en gatos con AR son rigidez, reticencia al movimiento, inflamación y dolor en las articulaciones y en algunas ocasiones fiebre e inapetencia. El RF es utilizado para el diagnóstico de la AR en felinos, aunque no todos los gatos con AR son positivos a RF. Los estudios radiográficos de felinos con AR generalmente revelan cambios destructivos dentro de las articulaciones en etapas tardías de la enfermedad, mientras que el líquido sinovial presenta un incremento en la cantidad de leucocitos donde alrededor del 86% son neutrófilos. Las biopsias de membranas sinoviales de gatos con AR generalmente demuestran una sinovitis crónica activa con hiperplasia sinovial y un infiltrado inflamatorio compuesto en su mayoría de linfocitos y células plasmáticas (Hanna, 2005)(Lemetayer and Taylor, 2014).

Con respecto a la fisiopatología de la AR en felinos, se ha demostrado la participación de células dendríticas, sinoviocitos tipo fibroblasto y linfocitos B en la destrucción articular progresiva que se presenta en la enfermedad. Sin embargo, aún se cree que los linfocitos T son clave en el inicio y la progresión de la enfermedad (Hanna, 2005). El tratamiento de esta enfermedad con analgésicos no esteroideos (AINEs) y glucocorticoides es ineficaz, mientras que la combinación de metotrexato con leflunomida

mostró una mejoría del 58% en felinos con AR sin efectos colaterales importantes (Hanna, 2005)(Lemetayer and Taylor, 2014).

Con respecto a la AR en caninos, se ha encontrado que esta poliartritis se presenta en perros de 3 a 8 años de edad en articulaciones distales de los miembros torácicos y pélvicos de manera simétrica y ocasiona rigidez matutina, dolor, claudicación, inflamación de tejido blando, fiebre y cambios erosivos eventuales en las articulaciones. Se ha observado que el pastor de Shetland es una de las razas predispuestas a padecer esta enfermedad. El análisis de líquido sinovial demuestra una gran cantidad de células polimorfonucleares, mientras que las biopsias articulares generalmente muestran formación de pannus, infiltración exacerbada de linfocitos principalmente T CD4<sup>+</sup>, macrófagos y células plasmáticas e incremento en la expresión de MHC clase II en la membrana sinovial y en células con morfología similar a las células dendríticas y formación de centros germinales en los que se encuentran linfocitos B que expresan en su mayoría IgG (Bell et al., 1991)(May et al., 1992)(Carter et al., 1999)(Hewicker-Trautwein et al., 1999)(Ollier et al., 2001)(Grande and Croatt, 2003).

La etiología de la AR canina aún continúa bajo investigación. Como en la AR humana se cree que la presentación se debe a una combinación de factores genéticos y ambientales. Dentro de los factores genéticos se han identificado varios alelos del MHC de clase II del perro (DLA-DRB1), los cuales incrementan el riesgo en la presentación de la AR canina como son: el DLA-DRB1\*002, DRB1\*009 y DRB1\*018. Además el alelo DLA-DRB1\*002 se ha asociado a la presencia de un epítipo compartido (SE), el cual es una secuencia de aminoácidos conservada que está vinculada a la presentación de la AR canina (Ollier et al., 2001). Al igual que en la AR humana, algunos agentes infecciosos se han vinculado a la presentación de la AR canina como lo es *B. burgdorferi*, agente causal de la enfermedad de Lyme, que puede afectar las articulaciones de los perros (May et al., 1992)(Carter et al., 1999). Otro agente infeccioso que se ha vinculado más fuertemente a la AR canina es el virus del distemper canino (CDV), el cual se ha encontrado dentro de los complejos inmunes precipitados en el líquido sinovial de las articulaciones de perros con AR aunado a un

incremento en el nivel de anticuerpos contra este virus. Además, el CDV se ha encontrado dentro de los macrófagos sinoviales de los perros con AR, los cuales presentan características de una APC (Bell et al., 1991)(Carter et al., 1999).

Se ha demostrado en la fisiopatología de la AR canina, la participación de anticuerpos antinucleares, anticuerpos anticólera II y de factor reumatoide del tipo IgM, los cuales contribuyen a la generación de complejos inmunes que son depositados en las articulaciones y activan el complemento en la membrana sinovial. Además del RF tipo IgM también se ha encontrado RF tipo IgA, el cual se ha asociado a una enfermedad erosiva más severa. Aunado a lo anterior también se han detectado anticuerpos contra CTLA-4 en el 31% de los perros con AR, lo cual puede contribuir a la exacerbación del proceso inflamatorio. Dentro de las citocinas participantes en el proceso de la AR canina se ha encontrado que la IL-6 es una de las citocinas más predominantes incluso por encima de la IL-1 y el TNF- $\alpha$  (Carter et al., 1989)(May et al., 1992)(Carter et al., 1999)(Khatlani et al., 2003). Por otro lado se ha encontrado que la MMP-3 o estromelina-1 podría participar de manera importante en la destrucción articular, ya que supera 30 veces más la cantidad del inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1) en el líquido sinovial de perros con AR (Hegemann et al., 2003). El tratamiento con aspirina y corticosteroides es paliativo y se ha usado con éxito en algunos casos de RA canina (Grande and Croatt, 2003).

## **1.1.6 Tratamiento**

### **1.1.6.1 Tratamientos convencionales**

Actualmente, uno de los mayores blancos terapéuticos en el tratamiento de la AR es el control de la inflamación, ya que ésta es responsable de la signología clínica, el daño articular y la discapacidad que se presenta en la enfermedad. Las drogas antirreumáticas modificadoras de la enfermedad (DMARDs) se han utilizado desde hace ya varios años para el tratamiento de la AR y tienen como objetivo controlar la inflamación y reducir el daño estructural progresivo a los tejidos. Estos DMARDs pueden ser divididos en sintéticos y

biológicos, y a su vez los sintéticos pueden ser subdivididos en convencionales y con un blanco específico (Smolen et al., 2016)(Alam et al., 2017).

Hasta el momento, el metotrexato (MTX), un DMARD sintético convencional ha permanecido como una de las piedras angulares en el tratamiento de la AR y por lo tanto es uno de los fármacos más utilizados ya sea como monoterapia o en combinación con otros DMARDs para el tratamiento de esta enfermedad (Alam et al., 2017). El MTX es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR) que se desarrolló inicialmente para el tratamiento de distintos tipos de cáncer; sin embargo, posteriormente se encontró que dosis más bajas a las utilizadas en los tratamientos oncológicos eran de utilidad en el tratamiento de la AR(Choi and Brahn, 2010)(Alam et al., 2017).

Los efectos antirreumáticos del MTX no sólo se atribuyen al hecho de que es un antagonista del folato, sino a diferentes mecanismos involucrados en el control de la inflamación, dentro de los cuales destacan: 1) La inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo de las purinas, con lo cual permite la acumulación de adenosina (Ernst et al., 2010)(Alam et al., 2017), 2) La inhibición de la activación de los linfocitos T, su expresión de moléculas de adhesión y el incremento en la sensibilidad de estos linfocitos T activados a CD95 (Receptor de Fas), 3) Disminución selectiva de células B, 4) Inhibición de la unión de la IL-1 $\beta$  a su receptor de superficie celular (Alam et al., 2017), 5) Inducción de células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Xinqiang et al., 2010) y 6) Su actividad antioxidante al suprimir directa o indirectamente la generación de ERO inducidas por IL-6 (Laurindo et al., 1995)(Sung et al., 2000).

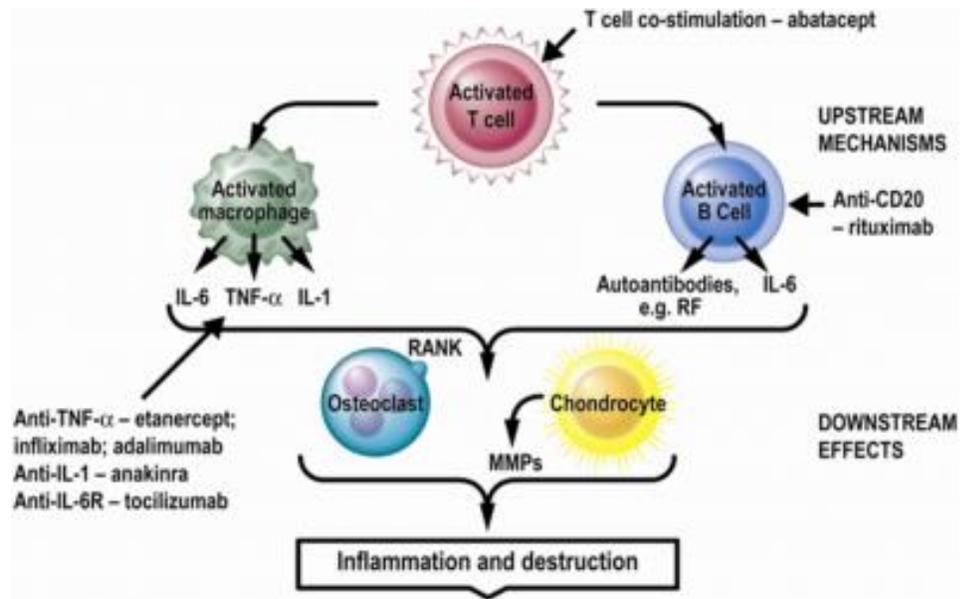
A pesar de que el MTX es el mejor DMARD sintético convencional, algunos pacientes con AR no responden a la monoterapia con este fármaco, por lo cual ha sido necesaria su combinación con otros DMARDs sintéticos o biológicos para mejorar su eficacia. Aunado a lo anterior, aunque este fármaco es en general bien tolerado a largo plazo en pacientes con AR, algunos individuos han requerido el retiro del mismo debido a la generación de efectos adversos como úlceras orales, pérdida de cabello, alteraciones

gastrointestinales, alteraciones en el estado mental, etc., entre otros, sobre todo con su uso a largo plazo (Schett et al., 2008)(Choi and Brahn, 2010).

Los DMARDs biológicos fueron comercializados a partir de 1996 con una alta tasa de remisión de hasta el 50%. Estos agentes presentan en general cuatro mecanismos de acción: inhibición de la actividad del TNF, inhibición del receptor de la IL-6, bloqueo de la coestimulación del linfocito T y depleción de células B. En el 2001, también se aprobó una proteína antagonista del receptor de IL-1 (Anakinra) para su uso en la AR; sin embargo sólo una pequeña proporción de pacientes responden a la inhibición de las vías de la IL-1 (Choi and Brahn, 2010)(Smolen et al., 2016)(Alam et al., 2017) (*Figura 5*). Dentro de los DMARDs biológicos más utilizados se encuentran el etanercept y el infliximab, los cuales antagonizan la actividad del TNF- $\alpha$  y han probado ser eficaces en el control de la signología y la progresión radiológica de la AR. Se ha demostrado que estos agentes también evitan la activación y quimiotaxis de los neutrófilos al tejido sinovial, con la consecuente reducción en la generación de las ERO y el daño oxidante (Choi and Brahn, 2010). Además de lo anterior, se ha descrito que algunos de estos agentes restauran el balance Th17-Tregs o incrementan la población de células Tregs, lo cual es beneficioso en el control de la enfermedad. Sin embargo, estos agentes presentan efectos adversos importantes a largo plazo, como la inmunosupresión, que compromete el óptimo funcionamiento del sistema inmune ante retos infecciosos y no infecciosos (Choi and Brahn, 2010)(Mijnheer et al., 2013). Además, los inhibidores del TNF también se han asociado a la presencia de periodos de exacerbación de la esclerosis múltiple y en general estos agentes biológicos (excepto el rituximab) deben ser evitados dentro de los 5 años siguientes al periodo de remisión en cualquier tipo de cáncer (Smolen et al., 2016).

A pesar de los avances en el tratamiento de la AR durante las últimas décadas, la remisión de la enfermedad o al menos una baja actividad de la misma siguen siendo una meta terapéutica que no es alcanzada por muchos pacientes o es perdida por otros debido a la falta de respuesta a los fármacos utilizados que se da con el tiempo, por lo cual sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas terapias que ayuden en el control de esta

enfermedad.



**Figura 5.** Blancos terapéuticos de los DMARDs biológicos en la fisiopatología de la Artritis reumatoide. RF= Factor reumatoide. IL= Interleucina. TNF- $\alpha$ = Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . MMPs= Metaloproteinasas de matriz. RANK= Receptor activador de NF- $\kappa$ B. IL-6R= Receptor para la IL-6. Tomado de (Birbara, 2012).

### 1.1.6.2 Polifenoles y flavonoides en el control de la inflamación en la artritis y sus mecanismos de acción asociados

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que participan en la pigmentación y la reproducción y como mecanismos de defensa contra la radiación ultravioleta, el daño físico y los patógenos. Estas moléculas se caracterizan por poseer una estructura química en común (un grupo hidroxilo sobre un anillo aromático) con diferentes constituyentes. Las estructuras de los polifenoles pueden variar desde un simple núcleo fenólico hasta moléculas complejas con un alto grado de polimerización. Este grupo se divide en fenoles simples, flavonoides y no flavonoides como los estilbenos (resveratrol), saponinas, curcuminoides y taninos (Serafini et al., 2010)(Andriantsitohaina et al., 2012).

Estudios epidemiológicos han sugerido que un alto consumo en frutas y vegetales que contienen polifenoles puede estar asociado a una disminución en el riesgo de padecer varias enfermedades crónicas degenerativas como algunas enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, metabólicas y neurodegenerativas; así como algunos tipos de cáncer (Yoon and Baek, 2005)(Milenkovic et al., 2013). Además, se ha demostrado que estos fitoquímicos poseen efectos benéficos en muchos estudios *in vitro*, en varios modelos animales y en estudios clínicos. Dentro de sus efectos benéficos en la salud se ha encontrado que pueden alterar el metabolismo de los lípidos, reducir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), alentar el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, mejorar la función endotelial, disminuir la presión sanguínea, inhibir la agregación plaquetaria, mejorar la resistencia a la insulina, regular la inflamación, revertir la neurodegeneración que se da con la edad, inhibir la proliferación de células cancerígenas, regular la apoptosis y prevenir la angiogénesis, entre otros (Nichols and Katiyar, 2010)(Milenkovic et al., 2013). Algunas fuentes de polifenoles en la dieta son las cebollas (flavonoles), el cacao, las uvas (proantocianidinas y estilbenos), el té (flavonoles), las manzanas (flavonoles), el vino tinto (flavonoles y catequinas), las frutas cítricas (flavanonas), las cerezas (antocianidinas), las semillas de sésamo (lignanos) y la soya (isoflavonas) (Pandey and Rizvi, 2009).

Los flavonoides comprenden el grupo más común de los polifenoles de las plantas. Estos compuestos son ingeridos de manera natural como parte de la dieta humana y hay un creciente interés en su potencial farmacológico como posibles moduladores de la inflamación en varias enfermedades incluyendo la AR. Los flavonoides poseen una estructura básica en común que consiste de 2 anillos aromáticos, los cuales son unidos por 3 átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado denominado 2-fenilbenzopirona (Rahman et al., 2006)(Pandey and Rizvi, 2009)(Hughes et al., 2017). Se han identificado y aislado alrededor de 9,000 flavonoides, muchos de los cuales son responsables del color de las flores, las frutas y las hojas (Middleton et al., 2000). Algunas fuentes de flavonoides son bebidas como el té, el vino y la cerveza, granos, legumbres,

bayas, frutas y vegetales (Hughes et al., 2017). Los flavonoides pueden ser subdivididos de acuerdo a sus moléculas de sustitución en flavanoles (catequina y epicatequina), flavonoles (quercetina, miricetina y kaempferol), antocianidinas (cianidina y delphinidina), flavonas (apigenina y diosmina), flavanonas (naringenina y hesperetina) y chalconas (floreтина) (Andriantsitohaina et al., 2012).

Dentro de las acciones de los polifenoles incluyendo a los flavonoides destacan su actividad como atrapadores de radicales libres, su modulación de la actividad enzimática y su inhibición de la proliferación celular *in vitro* y sus efectos como antibióticos, antivirales, antialérgicos, antidiarreicos, antiulcerosos, anti-inflamatorios, antioxidantes, hepatoprotectores, antitrombóticos, antiestrogénicos y antiproliferativos en diversas enfermedades incluyendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, gastrointestinales, diabetes, cáncer, asma y artritis reumatoide, entre otras (Knekt et al., 2002)(Pandey and Rizvi, 2009)(González-Gallego et al., 2010). Sin embargo, estas moléculas también pueden llegar a funcionar como prooxidantes bajo ciertas condiciones y contribuir a la apoptosis celular (Knekt et al., 2002)(Rahman et al., 2006)(Zhang and Tsao, 2016).

Los mecanismos moleculares involucrados en las actividades antiinflamatorias de los polifenoles y los flavonoides incluyen:

- a) Inhibición de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) en leucocitos humanos y de conejo, lo cual puede inhibir la actividad de la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX) (Yoon and Baek, 2005).
- b) Inhibición de la expresión y la actividad de enzimas proinflamatorias como la COX-2 en humanos con AR y ratones con CIA, la LOX-5 y 12 en humanos y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) en humanos y ratones con CIA (Yoon and Baek, 2005)(Shen et al., 2012).
- c) Inhibición de la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) gracias a la disminución en la expresión y la actividad de la COX-2 y la sintasa de PGE microsomal 1 (SPGEm-1) en

- células blanco de ratones con CIA y humanos con AR (Singh et al., 2010).
- d) Activación del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) e inducción del gen 1 activado por analgésicos no esteroidales (NAG-1) en células epiteliales humanas (Yoon and Baek, 2005)(Epstein et al., 2010).
  - e) Inhibición de la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y algunos de sus productos como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en macrófagos, condrocitos y fibroblastos sinoviales humanos (Yoon and Baek, 2005)(Singh et al., 2010).
  - f) Inhibición de la fosforilación de las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPKs) en condrocitos y tejido sinovial de pacientes con AR, las cuales comprenden tres clases: la c-Jun-N terminal cinasa (JNK), la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y las MAPKs p38 que son activadas por algunas citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , entre otros (Kim et al., 2004)(Yoon and Baek, 2005)(Singh et al., 2010)(Shen et al., 2012).
  - g) Disminución en la capacidad de unión de la proteína activadora 1 (AP-1) al DNA y por lo tanto supresión en la producción de MMPs inducidas por TNF- $\alpha$  en condrocitos humanos (Stangl et al., 2007)(Singh et al., 2010)(Shen et al., 2012).
  - h) Inhibición de la activación de la serina/treonina proteína cinasa (Akt) (Yoon and Baek, 2005)(Stangl et al., 2007)(Shen et al., 2012).
  - i) Disminución de la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT-1) generado por el INF- $\gamma$ , así como la activación de la fosforilación de STAT-3 en pacientes con AR y ratones con CIA (Epstein et al., 2010)(Singh et al., 2010).
  - j) Modulación de varios genes del ciclo celular y la sobrevivencia celular (Santangelo et al., 2007).
  - k) Regulación en la expresión de ciertos microRNAs (miRNA) que afectan la expresión de determinados genes en varias líneas tumorales humanas y algunos modelos de ratón (Milenkovic et al., 2013).
  - l) Inhibición de enzimas que degradan la matriz extracelular como las MMPs 1, 2, 3 y 13, algunas desintegrinas y las metaloproteinasas (ADAM) secretadas con motivos de tromboespondina (ADAMTS) 1, 4 y 5 que son agreecanasas en pacientes con AR y ratones con CIA (Singh et al., 2010)(Shen et al., 2012).

- m) Incremento en la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) en tejido sinovial de pacientes con AR (Singh et al., 2010)(Shen et al., 2012).
- n) Disminución en la expresión de diferentes citocinas y quimiocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1/CCL2), el péptido 78 activado por neutrófilos epiteliales (ENA-78/CXCL5), RANTES (CCL5), el oncogene  $\alpha$  regulado por el crecimiento (GRO- $\alpha$ /CXCL1), la proteína inflamatoria de macrófagos 3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ ) y la fractalcina en tejido sinovial de pacientes con AR y ratones con CIA (Singh et al., 2010)(Shen et al., 2012).
- o) Incremento en la liberación de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y la expresión de TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2 y los receptores I y II del TGF $\beta$  (TGF- $\beta$ RI y TGF $\beta$ -RII, respectivamente) en tejido sinovial de pacientes con AR y ratones con CIA (Singh et al., 2010)(Shen et al., 2012).
- p) Inducción del factor relacionado con el factor 2 eritroide , el cual suprime la expresión de MCP-1 y la molécula de adhesión celular vascular 1, la adhesión de monocitos a las células endoteliales y su trans migración, así como la activación de la MAPK p38 (Shen et al., 2012).
- q) Disminución en la expresión del receptor de la calcitonina, la catepsina H $\alpha$ v y las integrinas  $\beta$ 3, así como del RANKL inducido por el factor nuclear de células T activadas c1 (NF-ATc1), lo cual suprime la diferenciación de los osteoclastos en humanos (Singh et al., 2010).

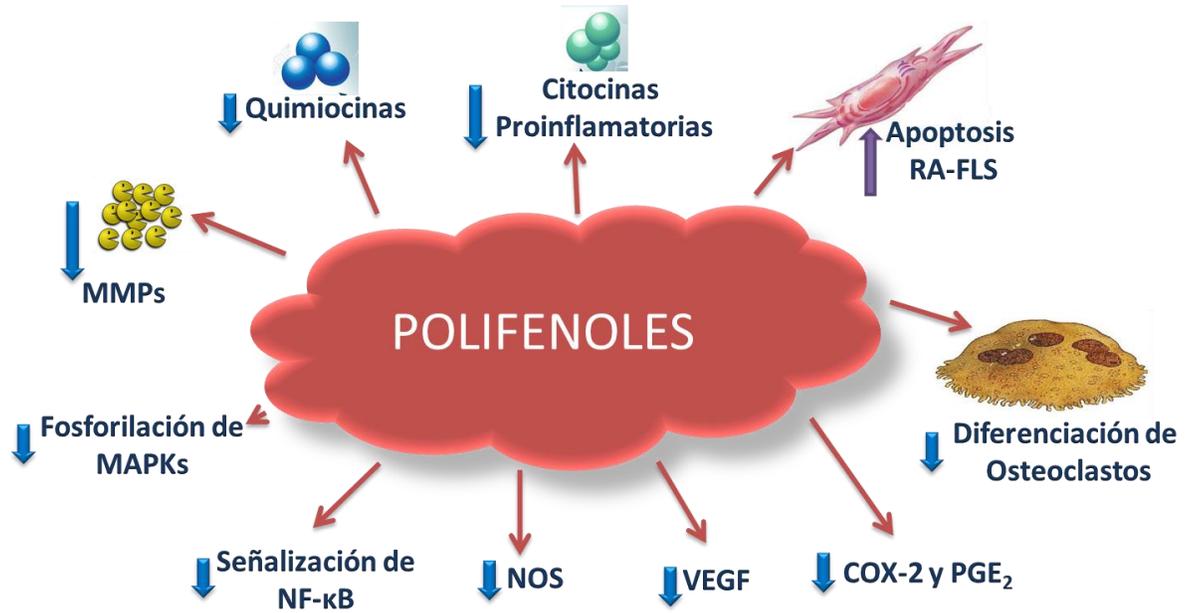
Dentro de sus actividades como antioxidantes se incluyen:

- a) Quelantes de metales como el hierro y el cobre y agentes reductores (Rahman et al., 2006)(Pandey and Rizvi, 2009)(Zhang and Tsao, 2016).
- b) Atrapadores de ERO (dentro de ellos el OH $\cdot$ , O $_2^{\cdot-}$ , H $_2$ O $_2$ , NO y ONOO $^-$ )(Rahman et al., 2006)(Pandey and Rizvi, 2009)(Andriantsitohaina et al., 2012)(Zhang and Tsao, 2016).
- c) Antioxidantes que ocasionan la ruptura de cadenas de formación de ERO (Pandey and Rizvi, 2009)(Zhang and Tsao, 2016).
- d) Inhibidores de la producción de oxígeno singulete y del O $_2^{\cdot-}$  debido a la supresión de la

- xantina oxidasa (Knekt et al., 2002)(Andriantsitohaina et al., 2012).
- e) Promotores de la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT, la GR y la GPx (Andriantsitohaina et al., 2012)(Zhang and Tsao, 2016).
  - f) Protectores del equilibrio glutatión reducido-glutatión oxidado (Rahman et al., 2006)(Andriantsitohaina et al., 2012).
  - g) Potenciadores de la translocación y de la actividad transcripcional del factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 (Nrf2) y de la expresión de sus genes blanco como la quinona oxidoreductasa 1, la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa y la hemooxigenasa 1 (Andriantsitohaina et al., 2012)(Zhang and Tsao, 2016).
  - h) Inhibidores de la expresión de NOX (Andriantsitohaina et al., 2012).
  - i) Inhibidores de la liberación de NO y la expresión de la iNOS en células mononucleares (Magrone and Jirillo, 2010).
  - j) Protectores del ácido ascórbico (Knekt et al., 2002)
  - k) Inhibidores de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)(Rahman et al., 2006).

Algunos autores se han dedicado a investigar las propiedades anti-inflamatorias de los polifenoles incluyendo a los flavonoides en varios modelos de inflamación así como en diversas enfermedades humanas, incluyendo la AR, ya que estos compuestos a diferencia de los compuestos farmacológicos no actúan sobre un receptor o una vía específica sino que poseen múltiples blancos y mecanismos de acción; además de presentar una baja toxicidad con su uso a largo plazo (Cho et al., 2009)(Park et al., 2011)(Yao et al., 2011)(Xuzhu et al., 2012)(Milenkovic et al., 2013). Dentro de los mecanismos de acción de los polifenoles que se han descrito en la AR se encuentran: **1)** Restauración del balance Th17/ Tregs (extracto de proantocianidinas de la semilla de la uva (GSPE), dafnetina, resveratrol)(Park et al., 2011)(Yao et al., 2011)(Xuzhu et al., 2012), **2)** Disminución en la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-26 (GSPE, curcumina, kaempferol, naringenina, quercetina, mangiferina)(Cho et al., 2009)(Park et al., 2011)(Mateen et al., 2016)(Islam et al., 2016)(Hughes et al., 2017), **3)** Aumento en la

producción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 (GSPE)(Park et al., 2011), **4**) Disminución en la expresión de MHC de clase II, CD80 y CD86 sobre las células dendríticas (extracto de polifenoles de la manzana, apigenina, EGCG, silibinina)(González et al., 2011)(Katayama et al., 2013), **5**) Reducción en la angiogénesis por la disminución en la producción de VEGF (curcumina, genisteína, emodina)(Mateen et al., 2016), **6**) Inducción de apoptosis en fibroblastos sinoviales por incremento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax y disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2 o por la activación de la vía de las caspasas (curcumina, resveratrol, ácido gálico, naringenina, apigenina, mangiferina)(Mateen et al., 2016)(Islam et al., 2016), **7**) Bloqueo de la activación de vías de señalización proinflamatorias como NF- $\kappa$ B, MAPKs, p38, JNK y ERK-1/2 (curcumina, EGCG, emodina, kaempferol, quercetina, mangiferina)(Mateen et al., 2016)(Islam et al., 2016), **8**) Inhibición del funcionamiento de los linfocitos B (resveratrol)(Mateen et al., 2016), **9**) Regulación del balance Th1/Th2 (genisteína)(Mateen et al., 2016), **10**) Reducción en la expresión de MMPs (genisteína, EGCG, emodina, quercetina, kaempferol)(Mateen et al., 2016)(Islam et al., 2016)(Hughes et al., 2017), **11**) Reducción en la expresión de quimiocinas como CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL5, IL-8 (EGCG, genisteína, emodina, quercetina)(Mateen et al., 2016)(Hughes et al., 2017), **12**) Disminución en la expresión de la COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub> (emodina, kaempferol, quercetina)(Mateen et al., 2016)(Islam et al., 2016)(Hughes et al., 2017), entre otros (*Figura 6*).



**Figura 6.** Esquema del efecto *in vitro* e *in vivo* de los polifenoles en la Artritis reumatoide. RA-FLS= Sinoviocitos tipo fibroblasto de pacientes con AR. MAPKs= Cinasas de proteína activadas por mitógeno. NF-κB= Factor nuclear κB. MMPs= Metaloproteinasas de matriz. NOS= Sintasa de óxido nítrico. COX-2= Ciclooxygenasa-2. PGE<sub>2</sub>= Prostaglandina E<sub>2</sub>. VEGF= Factor de crecimiento endotelial vascular.

### 1.1.7 Modelos animales de artritis

Los modelos animales han contribuido al entendimiento de los mecanismos básicos de la enfermedad articular; sin embargo, debido a que son inducidos a través de varios estímulos presentan una marcada diversidad entre ellos. Desde una perspectiva histórica los modelos más ampliamente utilizados en las décadas pasadas han sido la artritis por adyuvante, la artritis inducida por colágena (CIA), la artritis inducida por antígeno (AIA) y la artritis inducida por la pared celular de *Streptococcus pyogenes* (van den Berg, 2009). De estos modelos, la artritis por adyuvante fue el primer modelo animal de AR descrito y generado en ratas mediante una sola inyección de Adyuvante Completo de Freund. Posteriormente, numerosos adyuvantes que carecen de propiedades inmunogénicas también se utilizaron para generar artritis en cepas susceptibles de ratas, incluyendo la avidina, el Adyuvante Incompleto de Freund y el pristano. Aunque los mecanismos en la inducción de artritis en

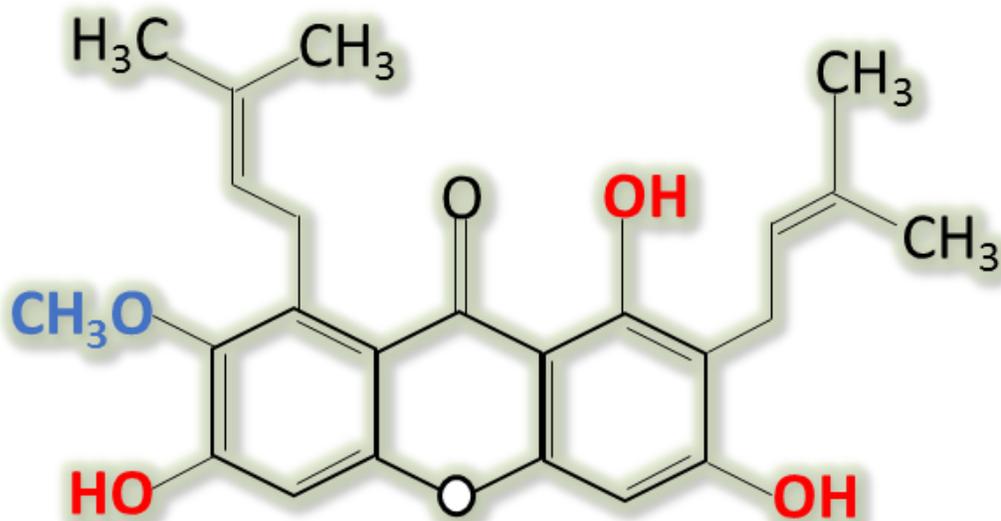
estos modelos no son con frecuencia claros, están dirigidos por respuestas de células T. Sin embargo, posiblemente con la excepción del pristano, su utilidad es limitada debido al hecho de que los ratones (a diferencia de las ratas) son resistentes a la enfermedad inducida por adyuvante. Los modelos de AIA y la artritis inducida por la pared celular de *Streptococcus* sp, sí pueden ser generados en ratones a diferencia del anterior, pero los antígenos inoculados deben ser inyectados de manera intraarticular, lo cual dificulta un poco la inducción del modelo (Vincent et al., 2012). Por su parte, el modelo de artritis inducida por colágena (CIA) es el modelo más ampliamente utilizado por diversos grupos de investigación para generar la artritis debido a las similitudes en su fisiopatología que presenta con la AR humana, incluyendo la fuerte asociación de la enfermedad con moléculas de MHC de clase II (Terato et al., 1985) (Durie et al., 1993)(Haqqi et al., 1999)(Fitzpatrick et al., 2011)(He et al., 2010). En la actualidad existen también nuevos modelos de artritis llevados a cabo en ratones transgénicos, los cuales por ejemplo pueden sobreexpresar un receptor de células T autoreactivo como sucede en el ratón K/B x N o un transgén de TNF- $\alpha$  humano como es el caso del ratón transgénico hTNF- $\alpha$  y que han ayudado a dilucidar ciertos aspectos de la AR (van den Berg, 2009)(Vincent et al., 2012).

## **1.2 Antecedentes**

### **1.2.1 $\alpha$ -Mangostina**

La  $\alpha$ -mangostina, es una de las más de 68 xantonas que se han aislado de la *Garcinia mangostana*, un árbol tropical que crece en el sureste de Asia y al cual se le han atribuido varias propiedades terapéuticas dentro de las cuales destacan su actividad antioxidante, proapoptótica, antiproliferativa, antinociceptiva, anti-inflamatoria, neuroprotectora, hipoglucémica y antiobesidad. La  $\alpha$ -mangostina además de pertenecer al grupo de las xantonas forma parte del grupo de los polifenoles gracias a que posee varios grupos fenólicos dentro de su estructura y está biosintéticamente relacionada a los flavonoides (Pedraza-Chaverri et al., 2008)(Ovalle-Magallanes et al., 2017). Esta xantona se clasifica dentro de las xantonas preniladas y es uno de los principales componentes de la *G.*

*mangostana* junto a la  $\beta$  y  $\gamma$ -mangostina, la gartanina, la 8-deoxigartanina y las garcinonas C y D. La  $\alpha$ -mangostina (Figura 7) presenta 3 grupos hidroxilo localizados en los carbonos C-1, C-3 y C-6, los cuales al ser donadores de electrones, le confieren su capacidad antioxidante y presenta una metoxilación en C-7, la cual le confiere su capacidad citotóxica y por lo tanto su utilidad en varios modelos de cáncer (Pedraza-Chaverri et al., 2008)(Ovalle-Magallanes et al., 2017).



**Figura 7. Molécula representativa de la  $\alpha$ -mangostina.** La cual presenta tres grupos hidroxilo en C-1, C-3 y C-6 (en rojo) y una metoxilación en C-7 (en azul), lo que le confiere sus capacidades antioxidantes y citotóxicas, respectivamente.

#### 1.2.1.1 Efectos anti-inflamatorios y antioxidantes de la $\alpha$ -mangostina

La  $\alpha$ -mangostina posee una gran cantidad de actividades biológicas dentro de las que destacan su capacidad anti-inflamatoria, antitumoral, cardioprotectora, antidiabética, antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antioxidante y antiobesidad (Ibrahim et al., 2016). Su capacidad anti-inflamatoria ha sido demostrada desde hace ya algunos años en varios modelos animales de inflamación. Por ejemplo, en un estudio se observó que la administración oral e intraperitoneal (50 mg/kg) de la  $\alpha$ -mangostina exhibía actividad

antiinflamatoria en ratas con edema de la pata trasera inducida por la administración de carragenina, granuloma por pellet de algodón y granuloma con técnicas de bolsa (Shankaranarayan et al., 1979). En otro estudio se demostró que la  $\alpha$ -mangostina era capaz de inhibir la anafilaxia sistémica en cuyos y ratas, así como la inmunocitoadherencia asociada y de inhibir las respuestas primaria y secundaria de la artritis inducida por la administración de adyuvante completo de Freund en ratas (Gopalakrishnan et al., 1980).

Además de lo anterior, esta xantona es capaz de inhibir significativamente la producción de NO y de PGE<sub>2</sub> en células RAW 264.7 activadas con LPS y de suprimir la transcripción de la iNOS y de la COX-2 y disminuir de manera moderada la producción de TNF- $\alpha$  e IL-4 (Chen et al., 2008)(Tewtrakul et al., 2009). También es capaz de inhibir a la lipooxigenasa 12-humana (Deschamps et al., 2007). Además de su efecto sobre las citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la  $\alpha$ -mangostina también es capaz de disminuir la producción de quimiocinas como la IL-8 en varias líneas celulares humanas y la expresión de receptores de quimiocinas como el CCR2 en el hígado y el tejido adiposo en modelos de obesidad murina (Gutierrez-orozco et al., 2013)(Kim et al., 2017). En macrófagos humanos (células U937 diferenciadas) activados con LPS atenúa la actividad de las vías de las MAPK y la AP-1 y disminuir la supresión en la expresión de PPAR $\gamma$  de una manera dosis dependiente; además de reducir la resistencia a la insulina en adipocitos (Bumrungpert et al., 2009).

En un modelo de colitis murina inducido por dextrán sulfato sódico (DSS), la  $\alpha$ -mangostina administrada a 30 mg/kg y a 100 mg/kg por vía oral durante 10 días mejoró la signología clínica de la enfermedad (pérdida de peso, diarrea, hematoquecia), disminuyó el infiltrado inflamatorio y la actividad de la mieloperoxidasa lo cual se asoció a la inhibición de las vías de NF- $\kappa$ B y las MAPK en el colón (You et al., 2017). Además, la  $\alpha$ -mangostina administrada a 40 mg/kg por vía oral durante 14 días también presentó actividad antiinflamatoria en un modelo de neuroinflamación periférica inducido por LPS, en donde logró disminuir los niveles de IL-6, de COX-2 y de la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO) a nivel cerebral (Nava Catorce et al., 2016).

Con respecto a sus propiedades antialérgicas, la  $\alpha$ -mangostina es un bloqueador de receptores histaminérgicos  $H_1$  y serotoninérgicos y un inhibidor de la liberación de histamina (Chairungrilerd et al., 1996)(Itoh et al., 2008). Además, esta xantona disminuye la degranulación de mastocitos derivados de la médula ósea, su expresión de COX-2 y su producción de IL-6, prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ) y leucotrieno  $C_4$  (Chae et al., 2012). Aunado a lo anterior, la administración de  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg por vía oral durante 3 días en un modelo de asma inducido con ovoalbúmina redujo el reclutamiento de células inflamatorias, la hiperresponsividad de la vía aérea y los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13. Además, disminuyó la fosforilación de Akt y la actividad de la vía de la PI3K, la cual está asociada al reclutamiento de eosinófilos; así como los niveles de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B a nivel nuclear (Jang et al., 2012).

Con respecto a sus propiedades antioxidantes, la  $\alpha$ -mangostina es considerada un antioxidante directo gracias a los tres grupos hidroxilo que posee que funcionan como donadores de electrones para estabilizar las ERO. Dentro de sus efectos se han documentado la disminución en la oxidación de las LDL inducida por cobre o por radicales peroxilo y la disminución en la producción de sustancias reactivas tiobarbitúricas y en el consumo de  $\alpha$ -tocoferol inducido por esta oxidación (Williams et al., 1995). Adicionalmente, esta xantona atrapa directamente las ERO como el singulete de oxígeno y el  $O_2^{\cdot -}$  y previene la neurotoxicidad y la producción de ERO inducidas por el ácido 3-nitropropionico en cultivos de neuronas (Pedraza-Chaverrí et al., 2009)(Ibrahim et al., 2016). En otros estudios se ha observado que tiene una alta capacidad para atrapar el  $ONOO^-$  (Jung et al., 2006) y proteger los sistemas antioxidantes como el GSH y las enzimas antioxidantes GST, GPx, SOD y CAT (Sampath and Vijayaraghavan, 2007).

Además de lo anterior, se ha observado que el pretratamiento con  $\alpha$ -mangostina evita la disminución en la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y en el nivel de NO durante la necrosis miocárdica inducida con isoproterenol en ratas; lo cual apunta hacia un efecto cardioprotector de la  $\alpha$ -mangostina (Sampath and Kannan, 2009). En un modelo cardiaco de daño por reperfusión fue encontrado que la  $\alpha$ -mangostina era

capaz de preservar el trabajo cardiaco, reducir el área de infarto y mantener los niveles de ATP y fosfocreatina cardiacos, lo cual fue asociado a la disminución en la oxidación de proteínas y la lipoperoxidación y a la preservación de los niveles de GSH (Ibrahim et al., 2016).

### **1.2.1.2 Toxicidad aguda y crónica de la $\alpha$ -mangostina**

En varios estudios *in vivo* se ha demostrado la carencia de toxicidad aguda y crónica de varios de los compuestos de la *G. mangostana* en diversos modelos animales de enfermedad a las dosis evaluadas (Ovalle-Magallanes et al., 2017). Un estudio que evaluó la toxicidad de la  $\alpha$ -mangostina administrada por vía intraperitoneal durante 72 horas determinó que la dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) en ratones ICR de 6-8 semanas de edad fue de 150 mg/kg (Choi et al., 2014). Por otro lado, se demostró que la administración aguda y crónica de la  $\alpha$ -mangostina en ratas Winstar normales y diabéticas (10-2000 mg/kg una vez al día por 28 días) no generó toxicidad (Ovalle-Magallanes et al., 2017). Finalmente un modelo de colitis ulcerativa llevado a cabo en ratones, en el cual se administró la  $\alpha$ -mangostina a una dosis aproximada de 112 mg/kg en la dieta diariamente durante 18 o 25 días encontró una exacerbación de esta patología, ya que fue encontrado que los ratones a los que se les administró la dieta con  $\alpha$ -mangostina presentaron una mayor inflamación y daño a nivel intestinal, así como una mayor infiltración de células CD3<sup>+</sup> y F4/80<sup>+</sup> y una mayor expresión de mieloperoxidasa. Lo anterior fue asociado a la generación de una disbiosis, ya que la dieta suplementada con  $\alpha$ -mangostina promovió un incremento en las Proteobacterias y una disminución en los Firmicutes y los Bacteroidetes, el cual es un hallazgo encontrado en la colitis ulcerativa humana (Gutierrez-Orozco et al., 2014).

## **2. Planteamiento del problema y Justificación**

La artritis reumatoide es una enfermedad crónico degenerativa que se presenta en

aproximadamente 1% de la población a nivel mundial y que representa un alto impacto socioeconómico debido a la discapacidad física que ocasiona con el tiempo y al alto costo de los medicamentos que se utilizan para su control. Esta patología es altamente heterogénea, ya que existe una gran diversidad de mecanismos que participan en su fisiopatología, dentro de los cuales destacan la participación de linfocitos Th1 y Th17, la presentación de autoantígenos por las células dendríticas, la destrucción del cartílago articular por los sinoviocitos tipo A y tipo B, la remodelación ósea por los osteoclastos y los osteoblastos, la participación del estrés oxidante y la exacerbación de la inflamación y el daño articular por varios mediadores inflamatorios como citocinas proinflamatorias, quimiocinas y metabolitos del ácido araquidónico, entre otros. Debido a esto, por lo general es requerida una combinación de fármacos para el eficiente control de los distintos eventos que suceden en la AR. A pesar de ello, varios pacientes aún no responden de manera completa a la terapia con DMARDs. Aunado a lo anterior, varios de estos medicamentos pueden presentar efectos adversos importantes a largo plazo, lo cual precisa su discontinuación. Es por ello, que surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas que sean más eficientes en el control de los distintos eventos que suceden en la AR y que presenten una menor incidencia de efectos adversos a largo plazo.

Desde hace ya algunos años, se ha demostrado que los polifenoles exhiben utilidad terapéutica en varios modelos animales de inflamación así como en varias enfermedades crónico degenerativas debido a sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Estos metabolitos secundarios de las plantas tienen la ventaja de presentar múltiples mecanismos de acción a diferencia de algunos DMARDs que sólo actúan sobre un blanco en específico. Además, la mayoría de estas moléculas ha presentado mínima toxicidad y pocos efectos adversos con su uso a largo plazo en los estudios que se han llevado a cabo.

La  $\alpha$ -mangostina es una xantona prenilada que pertenece al grupo de los polifenoles y que ha presentado una alta capacidad antioxidante y anti-inflamatoria en varios modelos de inflamación, incluyendo modelos de artritis. Sin embargo, varios de estos modelos no fueron modelos de artritis autoinmune y cuando lo fueron, la  $\alpha$ -mangostina fue

administrada antes o durante la inducción de la enfermedad y no a partir de que la artritis se encontraba establecida, lo cual apunta a su papel preventivo de la enfermedad más que al terapéutico.

Este proyecto pretende establecer las bases necesarias para proponer una nueva alternativa terapéutica para el control de la artritis reumatoide determinando los procesos que subyacen a la capacidad anti-inflamatoria y antioxidante de la  $\alpha$ -mangostina en un modelo de CIA establecido en ratones DBA/ 1J. La comprensión de estos procesos redituará probablemente; no sólo en su uso para el control de la artritis reumatoide sino también en el de diferentes enfermedades que cursan con componentes similares a la AR, como lo son: el desbalance en el equilibrio Th17/ Tregs, la producción de autoanticuerpos y la participación de los linfocitos Th1 y de las células dendríticas, las cuales favorecen una respuesta tipo Th1 y Th17, entre otros.

### **3. Hipótesis**

La  $\alpha$ -mangostina ejercerá efectos anti-inflamatorios y antioxidantes *in vitro* e *in vivo* que resultarán en la disminución de la signología clínica y del daño articular en un modelo de artritis autoinmune experimental murina.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 General**

Identificar *in vitro* e *in vivo* los efectos anti-inflamatorios y antioxidantes de la  $\alpha$ -mangostina que subyacen en el control del proceso inflamatorio y del daño articular inducido por la artritis autoinmune experimental murina.

## **4.2 Específicos**

### **Efectos de la $\alpha$ -mangostina *in vivo***

4.2.1 Identificar la dosis óptima de la  $\alpha$ -mangostina capaz de disminuir la severidad clínica de la artritis y la inflamación en un modelo experimental de artritis desarrollado en DBA/1J.

4.2.2 Caracterizar el estado inflamatorio/anti-inflamatorio y oxidante/antioxidante local y sistémico asociados a la disminución de la severidad clínica de la artritis por la administración de la  $\alpha$ -mangostina (actividad de enzimas antioxidantes, citocinas pro y anti-inflamatorias).

### **Efectos de la $\alpha$ -mangostina *in vitro***

4.2.3 Evaluar la capacidad de la  $\alpha$ -mangostina de generar células dendríticas con un fenotipo tolerogénico.

4.2.4 Evaluar la capacidad de la  $\alpha$ -mangostina de inducir células con un fenotipo regulador *in vitro* ante condiciones polarizantes Th1 y Th17.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Reactivos**

El medio RPMI-1640, la L-glutamina, el  $\beta$ -mercaptoetanol y el suero fetal bovino (SFB) fueron de Gibco (Gaithersburg, MD, USA). La gentamicina fue de Laboratorios Tornel (Naucalpan, MEX, México). El HEPES utilizado fue de Promega (Madison, WI, USA). El factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas recombinante murino (rmGM-CSF) fue de Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). El lipopolisacárido (LPS), el dimetilsulfóxido (DMSO), el formaldehído, el Adyuvante Completo de Freund (CFA), el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) y todos los reactivos utilizados para determinar el estrés oxidante y la

actividad de las enzimas antioxidantes fueron de Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). El ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) fue de Spectrum (New Brunswick, NJ, USA). La colágena bovina tipo II fue de Chondrex (Redmond, WA, USA). El metotrexato utilizado fue de Laboratorios Teva (North Wales, PA, USA). Todos los anticuerpos ocupados para la realización de la citometría de flujo en los cultivos de células dendríticas derivadas de precursores de la médula ósea de ratón (CDMO), la Anexina V, el anticuerpo anti-CD3 y las citocinas recombinantes IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12 y el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) fueron de Biolegend (San Diego, CA, USA). La 7-amino-actinomicina D (7-AAD) y los anticuerpos anti-INF $\gamma$ , anti-IL-4 y anti-CD28 fueron de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). La citocina recombinante IL-23 fue de R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). Todos los anticuerpos empleados para la citometría de flujo en los cultivos polarizados hacia linfocitos Th1 y Th17 fueron de eBioscience (San Diego, CA, USA).

## **5.2 Obtención de la $\alpha$ -mangostina**

La  $\alpha$ -mangostina se obtuvo a partir de la cáscara del fruto de la *Garcinia mangostana*, siguiendo un protocolo anteriormente descrito (Pedraza-Chaverrí et al., 2009). Brevemente, la cáscara seca de la *Garcinia mangostana* se maceró con una mezcla v/v de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH a temperatura ambiente por 3 semanas. Se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida. El extracto crudo orgánico se sometió a cromatografía en una columna de sílica-gel y se eluyó con hexano (1:1) para obtener 7 fracciones primarias (F1-F7). La  $\alpha$ -mangostina cristalizó espontáneamente como principal componente de la Fracción F7 como un sólido amarillo. Para corroborar la identificación de la  $\alpha$ -mangostina se determinaron los siguientes parámetros: punto de fusión de 179-180°C; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  320 (3.5) nm y; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 13.8, 6.8, 6.25, 5.25, 4.10, 3.8, 3.40, 1.82, 1.79 y 1.65; los cuales coincidieron con datos informados previamente (Ee et al., 2006)(Ji et al., 2007).

## **5.3 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones de las cepas DBA/1J, BALB/cAnN y C57BL/6, machos de 7-8 semanas de edad para la realización de los estudios *in vivo* e *in vitro*, los cuales se obtuvieron del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se alojaron 5 ratones por caja. Los animales se colocaron en cajas estáticas de polisulfonato con microaislador [de acuerdo a las recomendaciones de alojamiento de la Guía de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM (CICUAL)], en un ambiente controlado tipo “barrera” libre de patógenos en donde se realizaron 20 cambios totales de aire por hora y con un ciclo de luz de 12 X 12 con un rango de temperatura de 18 a 22°C y mantenidos con alimento y agua estéril *ad libitum*. Los animales se alojaron en las instalaciones del Bioterio libre de patógenos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los procedimientos experimentales conducidos en animales en este proyecto de investigación fueron aprobados por el CICUAL, Número de Protocolo: 186 y por el SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES EXPERIMENTALES de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (SICUAE).

#### **5.4 Medición de endotoxina en la $\alpha$ -mangostina**

Para determinar que la  $\alpha$ -mangostina se encontraba dentro de los valores permisivos de endotoxina para que una sustancia (<0.5 unidades de endotoxina (UE)/ml) sea apta para cultivo o administración intravenosa se utilizó el ensayo cromogénico de LAL (Lisado de Amebocitos de *Limulus*) de Charles River (San Diego, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, este ensayo consistió en mezclar 100  $\mu$ l del reactivo de LAL, el cual viene adicionado con un cromóforo (*para* nitro-anilina, pNA) con 100  $\mu$ l de la concentración del fármaco a analizar (en este caso se utilizó 1 mg/ml de  $\alpha$ -mangostina). La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora y se realizaron lecturas a 405 nm (pico de absorbancia del cromóforo) cada minuto durante esa hora en un espectrofotómetro (Biotek Synergy HT, Winoosky, VT, USA). Posteriormente los resultados

de cada lectura se compararon contra una curva estándar de endotoxina y se expresaron como UE/ml.

## ***5.5 Evaluación de la capacidad de la $\alpha$ -mangostina de controlar el daño en animales con AR***

### **5.5.1 Grupos experimentales**

Se manejaron cinco grupos de 6 ratones cada uno: sin artritis y sin tratamiento (Control negativo), con artritis y aceite de maíz (vehículo utilizado para diluir la  $\alpha$ -mangostina), con artritis y con metotrexato a 0.5 mg/kg (Control positivo a un tratamiento clínico usado para la artritis reumatoide) y con artritis y con tratamiento con  $\alpha$ -mangostina (Grupo experimental). Se evaluaron dos distintas dosis de  $\alpha$ -mangostina 10 y 40 mg/kg con base en informes previos de su uso como anti-inflamatoria en varios modelos animales de inflamación (Gopalakrishnan et al., 1980)(Chen et al., 2008)(Nguemfo et al., 2009)(Jang et al., 2012)(Nava Catorce et al., 2016). Los tratamientos se administraron por vía oral diariamente por 33 días consecutivos mediante sondeo orogástrico en un volumen final de 100  $\mu$ l por ratón a partir del día 35 después de la primera inmunización, que es el tiempo en el cual, la mayoría de los ratones ya presentan un proceso inflamatorio evidente en las articulaciones de los miembros torácicos y/o pélvicos, lo cual significa que la CIA se encuentra establecida.

### **5.5.2 Modelo experimental de artritis**

Se utilizó el modelo de artritis inducida por la administración de adyuvante y colágena tipo II en ratones de la cepa DBA/1J machos, de 7-8 semanas de edad, modelo ampliamente utilizado por distintos grupos de investigación (Terato et al., 1985)(Durie et al., 1993)(Haqqi et al., 1999)(He et al., 2010)(Fitzpatrick et al., 2011). Brevemente, se utilizó una solución de colágena tipo II (2 mg/ml) en ácido acético 0.05 M. La solución se emulsificó con un

volumen igual de adyuvante completo de Freund, el cual contenía 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. Se inmunizaron grupos de 6 ratones subcutáneamente al día 0 en la base de la cola con 100 µl de la emulsión utilizando una aguja de calibre 25G. Los ratones se inmunizaron nuevamente 21 días después con la misma colágena pero emulsificada en adyuvante incompleto de Freund y se administraron 60 µl de la mezcla subcutáneamente a 1.5 cm de la base de la cola. Se determinó la evolución de la enfermedad por 68 días contando desde la primera inmunización a través de la valoración de una escala clínica.

### **5.5.3 Evaluación de la escala clínica**

Para la determinación de la escala clínica, se realizaron inspecciones visuales de los animales tres veces por semana a partir del día 21 después de la primera inmunización, las cuales permitieron establecer la severidad clínica y la inflamación articular con base en el grado de afección de las articulaciones de la pata de acuerdo a una escala subjetiva propuesta por otros autores (Cho et al., 2009). Esta escala se basa en observar el grado de edema que presentan las 4 patas individualmente y se les asigna una escala de acuerdo al grado de inflamación: grado 0, sin edema y sin inflamación (normal); grado 1, ligera inflamación y eritema en los dedos; grado 2, inflamación y eritema moderados y confinados a la región distal o media de la pata (metatarsos); grado 3, inflamación y eritema más pronunciados con extensión al tobillo y; grado 4, inflamación y eritema severos con rigidez articular del tobillo y/o extensión a la pata entera (Cho et al., 2009). De esta manera, la escala clínica de cada ratón se determinó por la suma del puntaje de cada extremidad, con lo cual la máxima escala clínica obtenida por cada ratón fue de 16 puntos. Posteriormente, el promedio del registro de artritis se determinó por la suma del registro de todas las articulaciones de todos los ratones y dividiendo el resultado entre el número de ratones en el grupo. Finalmente, la valoración de la escala clínica se llevó a cabo por dos investigadores que desconocían el tratamiento al cual estaba asignado cada uno de los animales experimentales.

#### **5.5.4 Evaluación de la escala histopatológica**

68 días posteriores a la primera inmunización, los ratones fueron eutanasiados mediante una sobredosis de sevoflurano y una posterior dislocación cervical y se obtuvieron las articulaciones de la rodilla y de los tarsos de cada grupo, se fijaron en formaldehído al 10% amortiguado con PBS pH 7.4 durante 72 horas, se descalcificaron con una solución de EDTA al 10% durante 7 días, la cual se recambió cada 48 horas, se colocaron en un histoquinete para su deshidratación y se incluyeron en parafina. Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y Tricrómica de Masson (TM) para caracterizar el fenómeno inflamatorio; así como la destrucción del cartílago articular. Se evaluó el grado de inflamación y el daño al cartílago presentes en la articulación, para lo cual se establecieron los siguientes criterios: 0=sin inflamación y sin destrucción; 1=Ligero engrosamiento de la capa de revestimiento con mínima erosión; 2=Ligero engrosamiento de la capa de revestimiento más algunas células infiltradas en la subcapa de revestimiento con erosión de ligera a moderada; 3=Engrosamiento de la capa de revestimiento, entrada de células en la subcapa de revestimiento y presencia de células en el espacio sinovial con erosión más extensa y; 4=Sinovio altamente infiltrado con muchas células inflamatorias con destrucción generalizada (Camps et al., 2005).

#### **5.5.5 Determinación de los niveles de anticuerpos anti-colágena IgG1 e IgG2a**

Al día 68 posterior a la primera inmunización con colágena, se obtuvo una muestra de sangre a través de la punción del seno retro orbitario con tubos capilares heparinizados previa anestesia con sevoflurano. Los sueros se separaron por centrifugación a 5,000 rpm (3,500 xg) durante 10 minutos y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Se determinó la presencia de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-colágena a través de un ensayo de ELISA (Mouse Anti-Type II Collagen IgG Subtype Assay Kit with TMB de Chondrex, Inc.®) utilizando la misma colágena que se utilizó para la inmunización como antígeno (Colágena Bovina) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó la adición de

una solución bloqueadora durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se incubaron por otras 2 horas con los anticuerpos estándares o con las muestras de suero diluidas a 1:1,000 para la IgG1 y a 1:20,000 para la IgG2a, respectivamente en una solución estándar de acuerdo a las instrucciones del fabricante a temperatura ambiente, para posteriormente adicionar el anticuerpo secundario (IgG1 e IgG2a anti-ratón conjugado con peroxidasa) e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se adicionaron 100  $\mu$ l de TMB a cada pozo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro.

### **5.5.6 Preparación de los homogeneizados de tejido**

Los riñones, el hígado y las articulaciones se obtuvieron y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las muestras de hígado y riñón se homogeneizaron en un politrón durante 10 s en un amortiguador de fosfatos frío (50 mM, pH 7.4) en una proporción 1:10 w/v. Los homogeneizados se centrifugaron a  $10,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y se obtuvieron los sobrenadantes para cuantificar las proteínas totales por el método de Lowry, determinar la actividad de las enzimas antioxidantes [catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD)], el contenido de glutatión (GSH) y realizar la medición de los marcadores de estrés oxidante (lipoperoxidación, proteínas oxidadas y actividad de la NADPH oxidasa) (Sharma et al., 2011). Las muestras articulares se homogeneizaron de la manera siguiente: se obtuvieron las articulaciones afectadas durante todo el experimento (carpos, tarsos y rodillas) de los ratones de cada grupo y se pulverizaron con nitrógeno líquido mediante un mortero. Posteriormente, la muestra pulverizada de las articulaciones de cada ratón se pesó y se dividió en dos; destinándose una parte para la medición del estrés oxidante y la otra parte para la medición de citocinas. La muestra destinada a la medición del estrés oxidante se homogeneizó en proporción 1:5 w/v en un amortiguador de fosfatos frío (50 mM, pH 7.4), mientras que la muestra destinada a la medición de citocinas se homogeneizó en proporción 1:4 w/v en un amortiguador de lisis frío (Tris base 20 mM pH 7.4, NaCl 250 mM, EDTA 2 mM pH 7.4, Tritón X-100 al 1% y glicerol al 10%) que contenía 1

mM de PMSF. El homogeneizado se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 30 minutos y los sobrenadantes se recolectaron, se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

### **5.5.7 Determinación del estado inflamatorio/anti-inflamatorio**

#### **5.5.7.1 Evaluación de los niveles de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en suero y articulaciones**

Se determinaron los niveles de PGE<sub>2</sub> en el suero y las articulaciones de cada uno de los animales experimentales a través de un ensayo de ELISA de competencia, para lo cual se utilizó el Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y los resultados se expresaron en ng de PGE<sub>2</sub>/ml de suero y ng de PGE<sub>2</sub>/mg de proteína en los homogeneizados articulares después de la realización de una regresión logística de 4 parámetros.

#### **5.5.7.2 Evaluación de los niveles de citocinas y quimiocinas a nivel articular**

Para la determinación de los niveles de citocinas y quimiocinas presentes en los homogeneizados de las articulaciones se utilizó la tecnología Magpix (Merck Millipore®); la cual permite la determinación de múltiples analitos en una sola muestra mediante el uso de perlas magnéticas. La medición de citocinas y quimiocinas se realizó utilizando el EMD Millipore's MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor y el análisis de los datos se realizó a través de un analizador Luminex (MAGPIX) (EMD Millipore) y el Software Luminex xPONENT®, el cual realiza una regresión logística de 5 parámetros para el análisis de datos. Los niveles de IL-1β y de IL-18 a nivel articular se determinaron de manera independiente a través de la técnica de ELISA y el empleo del Mouse IL-1β ELISA MAX Standard Kit (Biolegend) y del Mouse IL-18 Platinum ELISA Kit (eBioscience) siguiendo

las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como pg/mg de proteína.

### **5.5.7.3 Inmunohistoquímica**

Para la determinación de la expresión de IL-33 a nivel articular, se usaron secciones de tejido de 3  $\mu\text{m}$ . La peroxidasa endógena presente en los tejidos se inhibió por incubación con 10% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en metanol durante 10 minutos en 2 ocasiones previo al tratamiento con anticuerpos. Posteriormente, el bloqueo de uniones inespecíficas se realizó mediante la incubación con suero de cabra al 4% y albúmina sérica bovina (ASB) al 1% diluida en PBS más Tritón X-100 al 0.1% durante 1 hora a 37°C. Posterior al bloqueo, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario de conejo IL-33 anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) a una dilución 1:100 en 0.1% de ASB-PBS-Tritón X-100 al 0.01% e incubados durante toda la noche a 4°C. El control negativo se realizó sin la adición del anticuerpo primario en cada uno de los cortes de tejido. Al siguiente día, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (PHR) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) a una dilución 1:100 en 0.1% de ASB-PBS-Tritón X-100 al 0.01% durante 1 hora a 37°C. Posterior a la incubación, la unión específica de los anticuerpos sobre el tejido se visualizó utilizando la 3, 3'-diaminobencidina (DAB) (Zymed, Carlton Court, CA) como sustrato durante 10 minutos bajo continua observación al microscopio. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina para la evaluación del tejido y la inmunoreactividad. Para determinar el área de expresión de la IL-33 en cada uno de los tejidos articulares, cada tejido se evaluó a través de su observación en un microscopio Olympus BX-500 y su análisis con el programa Infinity v 6.3.0. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{m}^2$  como el área de expresión de la IL-33.

### **5.5.8 Determinación de marcadores de estrés oxidante**

#### **5.5.8.1 Evaluación de la lipoperoxidación**

Se determinó el malondialdehído (MDA), el cual es un producto final de la lipoperoxidación

mediante un método colorimétrico descrito previamente (Gérard-Monnier et al., 1998) y que se basa en la medición a 586 nm de un complejo colorido formado por el MDA y el 1-metil-2-fenilindol en medio ácido. Los resultados se expresaron como nmoles de MDA/mg de proteína. Para este ensayo se utilizaron 60  $\mu$ l de muestra del homogeneizado de riñón e hígado y 180  $\mu$ l de muestra en el caso del homogeneizado de las articulaciones.

#### **5.5.8.2 Determinación de proteínas oxidadas**

Se utilizó un método colorimétrico previamente descrito (Reznick and Packer, 1994) que se basa en la reactividad de los grupos carbonilo (originados por la acción de las EROs sobre las proteínas) con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar un complejo proteína-hidrazona que absorbe a 370 nm. El resultado se expresó como nmoles de carbonilos/mg de proteína y se calculó en base a un coeficiente de absorción de  $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Para este ensayo se utilizaron 150  $\mu$ l del homogeneizado de cada uno de los tejidos.

#### **5.5.8.3 Actividad de NADPH oxidasa**

Para la determinación de la actividad de la NADPH oxidasa se empleó la técnica de quimioluminiscencia que consistió en añadir una mezcla de reacción que contenía un amortiguador de fosfatos (75 mM, pH 7.4), 10 mM de ácido etilenglicol tetra-acético (EGTA), 300 mM de sucrosa, 20 mM de lucigenina y 2 mM de NADPH (volumen final de 200  $\mu$ l) a las muestras de los sobrenadantes de los homogeneizados de los distintos tejidos que presuntamente contenían la NADPH oxidasa. Tras la reacción, se generaron EROs por la NADPH oxidasa, las cuales reaccionaron con la lucigenina que capta los electrones de alta energía emitidos por las especies excitadas de oxígeno producidas por la actividad de la NADPH oxidasa. La luminiscencia generada por la lucigenina es directamente proporcional a la actividad de la NADPH oxidasa y el máximo de actividad se presentó a los 15 minutos de iniciada la reacción. Los resultados se expresaron en U de QL (mV.s). Para este ensayo se utilizaron 20  $\mu$ l de la muestra sin diluir de los sobrenadantes de los homogeneizados de las articulaciones, del hígado y del riñón.

## **5.5.9 Determinación de la actividad de los sistemas antioxidantes**

### **5.5.9.1 Determinación de glutatión reducido**

Para estimar el nivel de GSH presente en los diferentes tejidos se utilizó un método fluorométrico descrito previamente (Fernández-Checa and Kaplowitz, 1990). Este ensayo mide la formación de aductos de GSH con el monoclorobimano (MCB), el cual fluoresce cuando se conjuga con el GSH a 478 nm a través de una reacción catalizada por la GST. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{moles}$  de GSH/mg de proteína. Para este ensayo se utilizaron 100  $\mu\text{l}$  de muestra de los sobrenadantes de los homogeneizados de cada tejido.

### **5.5.9.2 Actividad de catalasa**

Se utilizó un método descrito previamente, el cual se basa en el cambio en la densidad óptica a 240 nm debido a la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la CAT (Aebi, 1984). La degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se midió cada 15 segundos durante 30 segundos a 240 nm. Los resultados se expresaron como  $k/\text{mg}$  de proteína donde  $k$  es usada como la unidad de la actividad de la catalasa. Para este ensayo se utilizaron 6.66  $\mu\text{l}$  de muestra sin diluir del sobrenadante del homogeneizado de las articulaciones, 6.66  $\mu\text{l}$  de muestra de una dilución 1:10 del sobrenadante del homogeneizado de hígado y 6.66  $\mu\text{l}$  de muestra de una dilución 1:30 del sobrenadante del homogeneizado de riñón.

### **5.5.9.3 Actividad de glutatión reductasa**

Se determinó a través de un ensayo previamente descrito que se basa en una reacción cinética en la cual la GR convierte el glutatión disulfuro (GSSG) a GSH en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) como cofactor (Carlberg and Mannervik, 1975). La reacción se basa en la disminución de la densidad óptica a 340 nm del NADPH. Los resultados se expresaron en unidades (U)/mg de proteína, donde 1 U = 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH consumido por minuto. Para este ensayo se utilizaron 16.5  $\mu\text{l}$  de la muestra sin diluir de los sobrenadantes de los homogeneizados de las

articulaciones y 4.12  $\mu\text{l}$  de la muestra sin diluir de los sobrenadantes de los homogeneizados de riñón e hígado.

#### **5.5.9.4 Actividad de glutatión peroxidasa**

Se midió indirectamente por un método previamente descrito, en el que por medio de un par de reacciones en las que en presencia de esta enzima y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se produce GSSG, el cual a su vez es reducido por la GR utilizando NADPH como cofactor (Lawrence and Burk, 1976). Ya que el NADPH absorbe a 340 nm, la determinación se basa en la disminución de la densidad óptica por la desaparición del NADPH. Los resultados se expresaron en U/ mg de proteína, donde 1 U es la cantidad de enzima requerida para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH/ min. Para este ensayo se utilizaron 12  $\mu\text{l}$  de la muestra sin diluir de los sobrenadantes de los homogeneizados de las articulaciones, 35  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:50 de la muestra de los sobrenadantes de los homogeneizados de hígado y 3.5  $\mu\text{l}$  de la muestra sin diluir de los sobrenadantes de los homogeneizados de riñón.

#### **5.5.9.5 Actividad de glutatión-S-transferasa**

Se utilizó un método previamente descrito, en el cual la GST cataliza la conjugación del GSH con el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), formando un conjugado que absorbe a 340 nm (Habig et al., 1974). El resultado se expresó como unidades de conjugado formado/ min/ mg de proteína usando un coeficiente de extinción de  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La unidad del conjugado se definió como la cantidad de enzima que conjuga 1  $\mu\text{mol}$  de GSH/minuto. Para este ensayo se utilizaron 20  $\mu\text{l}$  de la muestra sin diluir de los sobrenadantes de los homogeneizados de las articulaciones, 2  $\mu\text{l}$  de la muestra sin diluir del sobrenadante del homogeneizado de hígado y 12  $\mu\text{l}$  de la muestra sin diluir del sobrenadante del homogeneizado de riñón.

#### **5.5.9.6 Actividad de superóxido dismutasa**

Se determinó mediante la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por el radical  $\text{O}_2^{\cdot -}$

producido por la reacción de la xantina oxidasa sobre la xantina a través de un método previamente descrito (Oberley and Spitz, 1984). La reducción de NBT generó formazán que se absorbe a 560 nm, de esta manera, la enzima presente en las muestras evitó la reducción del NBT, al transformar en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup> generados. Los resultados se expresaron como unidades de SOD por mg de proteína. Una unidad de SOD se definió como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT. Para este ensayo se utilizaron 4 µl de muestra sin diluir del sobrenadante del homogeneizado de las articulaciones, 66 µl de muestra de una dilución 1:100 del sobrenadante del homogeneizado de hígado y 66 µl de muestra de una dilución 1:25 del sobrenadante del homogeneizado de riñón.

### ***5.6 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre la activación de células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón (CDMO)***

Ratones BALB/cAnN (machos de 7-8 semanas de edad) se sacrificaron por dislocación cervical y se bañaron inmediatamente con etanol al 70% para desinfectarlos. Utilizando pinzas y tijeras de disección se retiró la piel que recubre las extremidades posteriores (fémur y tibia), mismas que se extirparon y se colocaron en una caja de Petri bacteriológica de 60 mm con PBS. Con tijeras se retiró la mayor parte de músculo que recubre el fémur y la tibia de cada pata, para finalmente eliminar el tejido restante adherido al hueso utilizando una gasa estéril. Los huesos intactos se sumergieron en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) sin suplementar. En una campana de flujo laminar para cultivo celular se cortaron las epífisis de cada hueso y se expulsó la médula ósea de cada fémur y tibia en una caja de Petri bacteriológica de 60 mm mediante inyecciones sucesivas con medio de cultivo R-10 que consistió de medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con: 20 µg/ml de gentamicina, 2 mM de L-glutamina, 50 µM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM de HEPES y 5% de suero fetal bovino (FBS) descomplementado por calor (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) utilizando una jeringa de 1 ml acoplada a una aguja 25G. La suspensión de células obtenida se centrifugó a 1,200 rpm (190 xg) durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se tiró el sobrenadante y los leucocitos

presentes en la médula ósea (LMO) se contaron en una cámara de Neubauer, excluyendo a las células muertas utilizando azul tripán (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

La diferenciación de células dendríticas a partir de células precursoras presentes en la médula ósea de ratón se realizó conforme a una modificación de un protocolo previamente descrito (Lutz et al., 1999). En el día 0 de cultivo,  $6 \times 10^6$  LMO se sembraron por cada caja de Petri bacteriológica de 60 mm (BD Falcon, Bedford, MA, USA) en 6 ml de medio R-10 suplementado con 20 ng/ml de GM-CSF recombinante (Prepotech Inc.). Las cajas se mantuvieron en una incubadora para cultivo celular a 37°C con un flujo de 5% de CO<sub>2</sub>. En el día 3 de cultivo cada caja se alimentó adicionando 6 ml de medio suplementado con 20 ng/ml de GM-CSF. Al día 6 de cultivo se obtuvieron las CDMO y cada caja se alimentó con 3 ml de medio R-10 suplementado con 4 ng/ml de GM-CSF recombinante. Posteriormente, las CDMO se estimularon con LPS (100 ng/ml) en presencia o ausencia de  $\alpha$ -mangostina (previamente diluida en DMSO) a las dosis de 0.5, 1, 3, 5, 7 y 10  $\mu$ g/ml durante 4 o 24 horas. Las células dendríticas se cosecharon a las 4 o 24 horas y se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo de los distintos grupos, para la medición de citocinas pro y anti-inflamatorias, los cuales se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Las CDMO se evaluaron por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) después de teñir las células durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con los anticuerpos CD11c-FITC, CD86-PE, CD80-PerCpCy5.5, CD40-APC, el ligando de muerte programada 1 (PD-L1)-PE y el anticuerpo IA/IE biotinilado para determinar el porcentaje de células CD11c+ y valorar su estado de maduración mediante la expresión de MHC de clase II (células CD11c+ IA/IE+), CD80 (células CD11c+ CD80+), CD86 (células CD11c+ CD86+) y CD40 (células CD11c+ CD40+), así como de su estado tolerogénico mediante la expresión de PDL1 (CD11c+ PDL1+). Finalmente, las células se analizaron usando el programa FCS Express.

### ***5.7 Evaluación de la capacidad de la $\alpha$ -mangostina de inhibir la polarización de células Th1 y Th17 y de inducir células Tregs in vitro***

Se obtuvieron las células de bazo de ratones C57BL/6 y se lisaron los eritrocitos. Las células remanentes (esplenocitos) se colocaron en una relación  $2 \times 10^6$ /pozo en placas de 24 pozos comerciales y se adicionaron 5  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo anti-CD3 y 1  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo anti-CD28 para completar su activación. Las células se mantuvieron en cultivo por 6 días con una mezcla de citocinas que favorecieron su diferenciación hacia células Th17 o Th1. Para la diferenciación de células hacia el subtipo Th17 se utilizaron 5 ng/ml de TGF- $\beta$ , 20 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml de IL-23, 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  y 5 ng/ml de TNF $\alpha$  y se añadieron 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IFN- $\gamma$  y 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IL-4 para evitar su polarización hacia Th1 y Th2, respectivamente. Para la diferenciación de células hacia el subtipo Th1 se utilizaron 10 ng/ml de IL-12 y 10 ng/ml de IL-2 y se añadieron 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IL-4 para evitar su polarización hacia Th2. Al tercer día de cultivo se adicionaron 5 ng/ml de TGF- $\beta$ , 20 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml de IL-23, 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  y 5 ng/ml de TNF $\alpha$  más 1 ml de medio de cultivo nuevo a cada uno de los pozos de los cultivos polarizados hacia Th17 y 10 ng/ml de IL-12 y 10 ng/ml de IL-2 más 1 ml de medio de cultivo nuevo a cada uno de los pozos para los cultivos polarizados hacia Th1. El efecto de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina (0.5, 1, 3 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) diluida en dimetilsulfóxido (DMSO) al 2% (stock de 1 mg/ml) sobre los cultivos de células polarizadas hacia Th17 o Th1 se evaluó al cultivar las células con las diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina al día 0 en condiciones polarizantes hacia Th17 o Th1. Seis días después del cultivo en cada una de las condiciones se trataron las células por 6 h con el Cell Activation Cocktail de Biolegend® el cual contiene 2.5 mg/ml de Brefeldina A (BFA), 40.5  $\mu\text{M}$  de Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 669.3  $\mu\text{M}$  de ionomicina y del cual se agregaron 2  $\mu\text{l/ml}$  a cada pozo. Al cabo de este tiempo, las células se cosecharon y se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> que expresaron el factor de transcripción Foxp3 en comparación a las células CD4<sup>+</sup> que expresaron la IL-17 en presencia o ausencia de cada uno de los tratamientos en los cultivos polarizados hacia Th17 y el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> que expresaron el factor de transcripción Foxp3 en comparación a las células CD4<sup>+</sup> que expresaron INF- $\gamma$  en presencia o ausencia de cada uno de los tratamientos en los cultivos polarizados hacia Th1. Brevemente, se contaron las células, se colocaron  $5 \times 10^5$  células/pozo en placas de 96 pozos comerciales. Las células se marcaron con el anticuerpo FITC

anti mouse CD4 (eBioscience) y el anticuerpo APC anti mouse CD25 (BD Pharmingen™) por 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se lavaron tres veces con una solución para FACS (PBS 1X, NaN<sub>3</sub> al 0.2% y SFB al 5%). Las células se fijaron y permeabilizaron toda la noche con la solución CytoFix- Cytoperm Wash Solution (BD Pharmingen™). Posteriormente se trataron con la solución Perm-Wash Solution (BD Pharmingen™) y una vez permeabilizadas un grupo de células marcadas con un anticuerpo anti-CD4 y anti-CD25 se expuso al anticuerpo PE anti-mouse Foxp3 (eBioscience) mientras que otro de los grupos de células marcadas con el anticuerpo anti-CD4 se expuso al anticuerpo PerCP anti-mouse IL-17 (eBioscience) para los cultivos polarizados hacia Th17 y al anticuerpo PerCP anti-mouse INF- $\gamma$  (eBioscience) para los cultivos polarizados hacia Th1. Las células se incubaron por 30 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron tres veces y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur. Finalmente, las células se analizaron con el programa FCS Express para determinar el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> (Th17) para el caso de los cultivos polarizados hacia Th17 y el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>INF $\gamma$ <sup>+</sup> (Th1) para el caso de los cultivos polarizados hacia Th1. También se obtuvieron los sobrenadantes de cada uno de los pozos en tratamiento para realizar la medición de citocinas pro y anti-inflamatorias, los cuales se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

### ***5.8 Determinación de la viabilidad celular***

La viabilidad celular se determinó siguiendo el protocolo de Apoptosis de Anexina V/ 7-AAD. Brevemente, las DCMO y los linfocitos polarizados hacia Th1 o Th17 de cada grupo experimental se cosecharon una vez terminados los tiempos establecidos para cada tratamiento y  $1 \times 10^6$  células se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de unión a Anexina V 1X, el cual contenía 10 mM de HEPES/ NaOH pH 7.4, 140 mM de NaCl y 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Posteriormente, 100  $\mu$ l de esta suspensión celular se incubaron con 1  $\mu$ l del anticuerpo Anexina V-FITC y 5  $\mu$ l de 7-AAD durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) en oscuridad. Finalmente, las células se analizaron por citometría de flujo dentro de

1 hora una vez realizada la tinción.

### ***5.9 Determinación de los parámetros inflamatorios y anti-inflamatorios en cultivos in vitro inducidos por la administración de la $\alpha$ -mangostina***

La presencia de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-12(p70), TGF- $\beta$  e INF- $\gamma$  se determinó en los sobrenadantes de los cultivos de células dendríticas utilizando los ELISA MAX™ Standard Sets (Biolegend) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, excepto en el caso del TGF- $\beta$  para lo cual se utilizó el Mouse TGF- $\beta$  1 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se realizó la determinación de las citocinas INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10 en los sobrenadantes del cultivo de células polarizadas hacia Th1 en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina. Mientras que en los sobrenadantes del cultivo de células polarizadas hacia Th17 se realizó la determinación de las citocinas IL-17, TGF- $\beta$  e IL-10. Para la medición de la IL-17 se utilizó el Mouse IL-17A ELISA MAX™ Standard Set (Biolegend) siguiendo las instrucciones descritas por los proveedores. Brevemente para los ELISA MAX™ Standard Sets (Biolegend), un ELISA en sándwich se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Immuno Plate Maxisorp™, Rosekilde, Denmark). Las microplacas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos de captura IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12(p70), IL-10 e INF- $\gamma$ . Posteriormente las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 (0.05%), se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente con PBS-Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, y se lavaron 4 veces más. Las placas se incubaron toda la noche con 100  $\mu$ l de los estándares para cada citocina o con los sobrenadantes del homogeneizado de las articulaciones sin diluir a 4°C. Posteriormente se lavaron 4 veces y se incubaron con los anticuerpos de detección correspondientes por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se detectaron con el conjugado avidina-HRP diluido 1:1000 (Biolegend Inc.). El TMB se usó como sustrato (Biolegend Inc.). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico al 2 N después de unos 10 a 15 minutos y la lectura de densidad óptica a 450 nm se realizó en un

espectrofotómetro.

### **5.10 Análisis estadístico**

Cada experimento *in vitro* se repitió al menos por triplicado. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico JMP® versión 5.0.1. Los datos son presentados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La comparación de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de comparaciones múltiples Tukey y el LS means contrast test para los datos paramétricos y mediante la Prueba de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Para determinar si los datos eran paramétricos o no se realizó la Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk y las Pruebas de Homogeneidad de Varianzas de Levene y Bartlett.

## **6. Resultados**

### **6.1 Niveles de endotoxina en la $\alpha$ -mangostina**

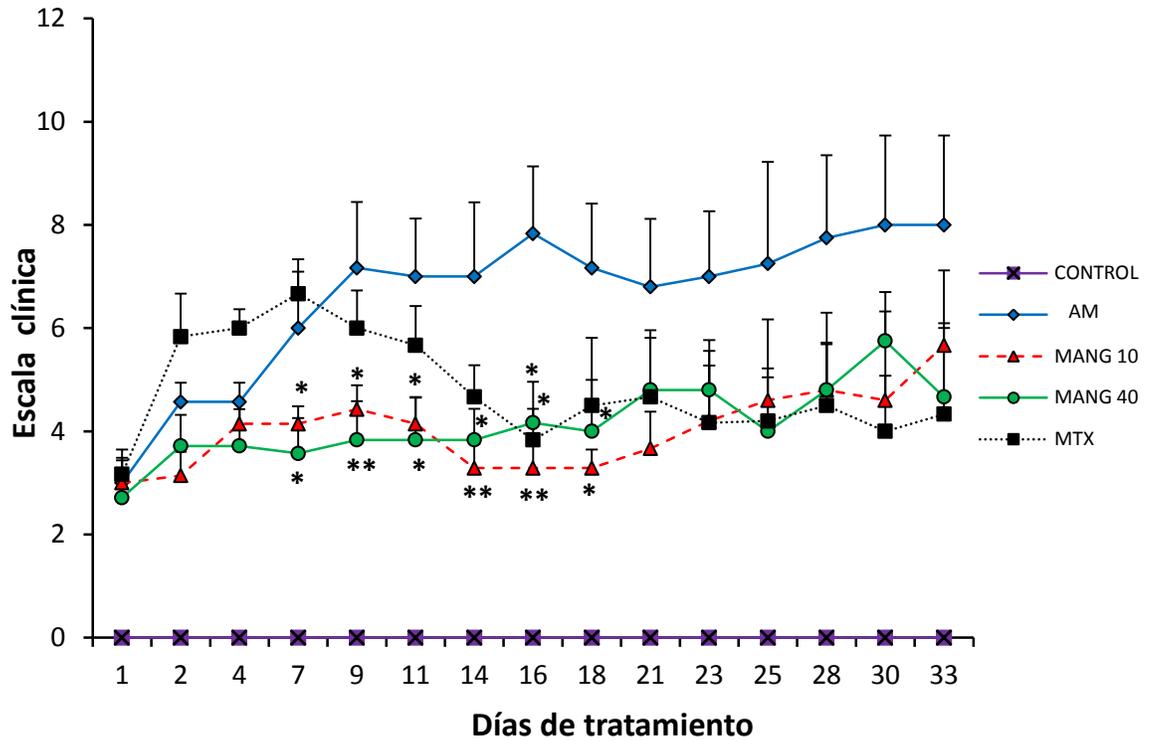
Para determinar que la  $\alpha$ -mangostina se encontraba dentro de los valores permisivos de endotoxina para que una sustancia pueda ser utilizada para cultivo celular o administración intravenosa se utilizó el ensayo cromogénico de LAL. Se determinó que la concentración de endotoxina en 1 mg/ml de  $\alpha$ -mangostina fue menor a 0.05 UE/ml (equivalente a 0.005 ng/ml de LPS), con lo cual se corroboró que se encontraba dentro de los rangos permitidos para el agua estéril (<0.5 UE/ml) de acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA). Adicionalmente, en estudios previos se ha demostrado que estos niveles de endotoxina no afectan la secreción de citocinas ni la expresión de moléculas de activación en varios fenotipos de células dendríticas humanas (Schwarz et al., 2014), lo cual eliminó la posibilidad de cualquier interferencia con los tratamientos instaurados en los cultivos de

CDMO.

## **6.2 Efecto terapéutico de la $\alpha$ -mangostina sobre la CIA establecida**

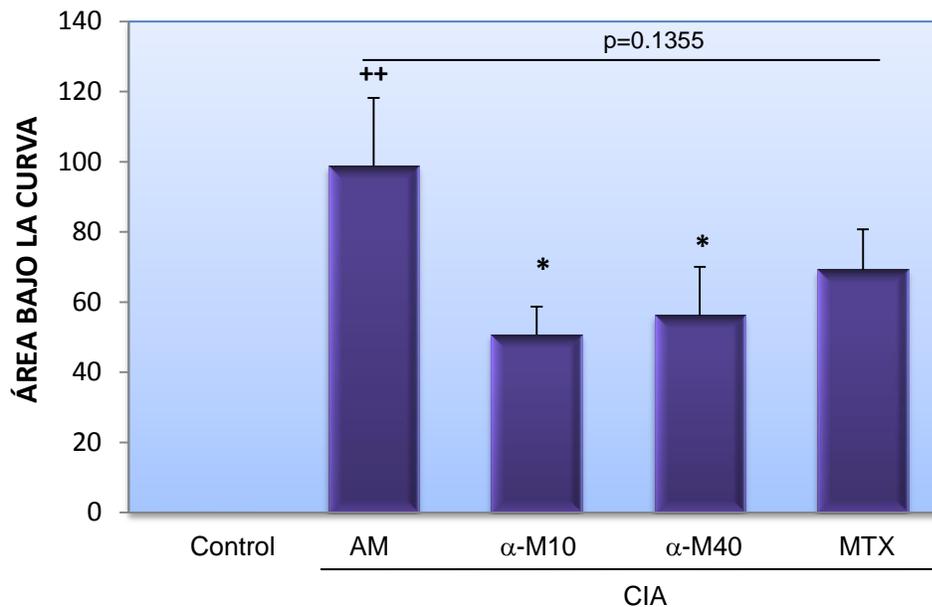
Para evaluar el efecto terapéutico de la  $\alpha$ -mangostina sobre la CIA establecida en ratones DBA/1J se probaron dos dosis de  $\alpha$ -mangostina por vía oral 10 y 40 mg/kg. Además se contrastó su efecto terapéutico con el del metotrexato, un fármaco de referencia comúnmente utilizado para tratar la artritis reumatoide humana a una dosis de 0.5 mg/kg por vía oral. Los tratamientos se administraron a partir del día 35 cuando los signos clínicos de la artritis fueron evidentes en los animales experimentales y se dieron diariamente por vía oral durante 33 días consecutivos. Se obtuvo una escala clínica a partir del día 21 contando desde la primera inmunización y se realizó 3 veces por semana. En la *Figura 8* se puede observar que la escala clínica presentó continuos incrementos en el grupo de CIA + Aceite de Maíz (Vehículo utilizado para diluir la  $\alpha$ -mangostina) desde el día 1 hasta el 16 de tratamiento. Posteriormente, esta escala clínica permaneció relativamente estable. Además, también se puede observar que mientras las escalas clínicas del grupo de CIA tratado con el vehículo y el grupo de Metotrexato se van incrementando conforme al tiempo de manera considerable, las escalas clínicas de los grupos a los cuales se les administraron las distintas dosis de  $\alpha$ -mangostina sólo aumentan ligeramente no permitiendo nunca alcanzar los niveles que alcanza el grupo CIA tratado con el vehículo conforme pasa el tiempo. Tanto el grupo de  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg como el grupo de  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg muestran una disminución de la inflamación en el modelo de CIA desde el día 7 hasta el día 18 de tratamiento. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las dos dosis de  $\alpha$ -mangostina probadas durante este tiempo. Aunque se observó una diferencia significativa de estos dos grupos ( $p < 0.05$ ) comparados con el grupo de CIA más vehículo a partir del día 7 de tratamiento; esta diferencia no se sostuvo durante todo el tratamiento, ya que a partir del día 21 de tratamiento todos los grupos presentaron nuevamente un incremento en la escala clínica, con lo cual esta disminución ya no alcanzó a ser significativa. El grupo de Metotrexato no alcanzó a presentar

diferencias significativas con respecto al grupo de CIA tratado con el vehículo durante los primeros días sino hasta el día 16 de tratamiento.



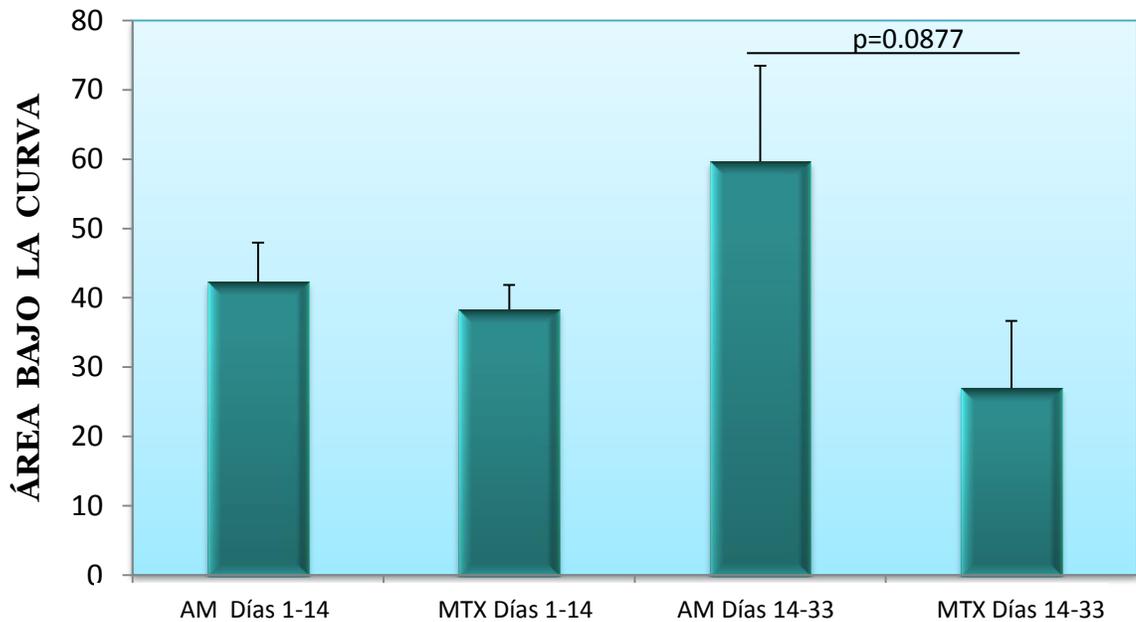
**Figura 8.** Escala clínica de los distintos grupos experimentales durante los 33 días de duración del tratamiento. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. CONTROL= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina). MANG 10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg. MANG 40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo es diferente significativamente con una \* $p < 0.05$  o con una \*\* $p < 0.01$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

Se obtuvieron las áreas bajo la curva de cada uno de los grupos experimentales para observar globalmente el comportamiento de cada grupo durante los 33 días de tratamiento y se encontró que sólo las dosis de 10 y 40 mg/kg de  $\alpha$ -mangostina presentaron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo de CIA tratado con el vehículo (Figura 9). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre estas dos dosis.



**Figura 9.** Comportamiento global de cada uno de los tratamientos desde el día 1 hasta el día 33 de tratamiento representados como el Área bajo la curva. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. Control= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg.  $\alpha$ -M40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una  $^{++}p < 0.01$  al grupo Control. El grupo es diferente significativamente con una  $^{*}p < 0.05$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

Debido a que gráficamente se observa que el grupo de Metotrexato conforme avanza el tiempo comienza a disminuir la escala clínica con respecto al grupo de CIA más vehículo, pero esta disminución no alcanza a ser significativa; se decidió medir el área bajo la curva de este grupo desde el día 1 hasta el día 14 de tratamiento y desde el día 14 hasta el día 33 de tratamiento para observar su comportamiento con respecto al grupo de CIA tratado con el vehículo en estos dos rangos de tiempo. En la *Figura 10* podemos observar que aunque no alcanza a ser significativa la diferencia entre el grupo de CIA más vehículo y el de Metotrexato ( $p=0.0877$ ) del día 14 al 33 de tratamiento; el grupo de Metotrexato ya muestra una tendencia fuerte a disminuir la escala clínica con respecto al grupo de CIA tratado con el vehículo.

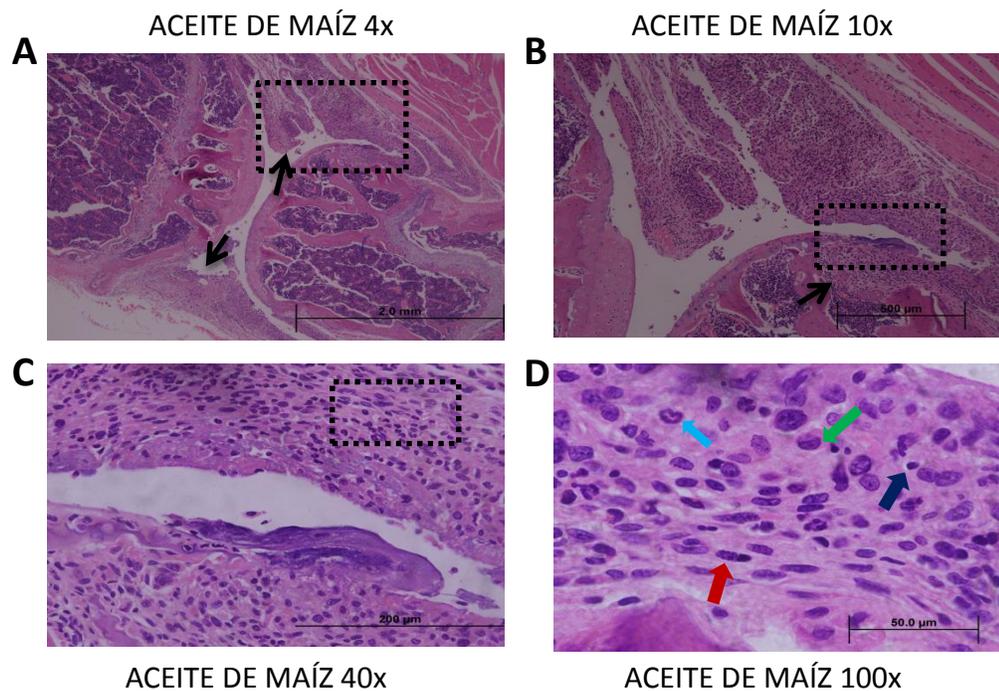


**Figura 10.** Área bajo la curva del Metotrexato durante los días 1-14 (etapa temprana de la CIA) y durante los días 14-33 (etapa tardía de la CIA) de tratamiento en comparación al grupo de Aceite de Maíz. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyó la  $\alpha$ -mangostina). MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg.

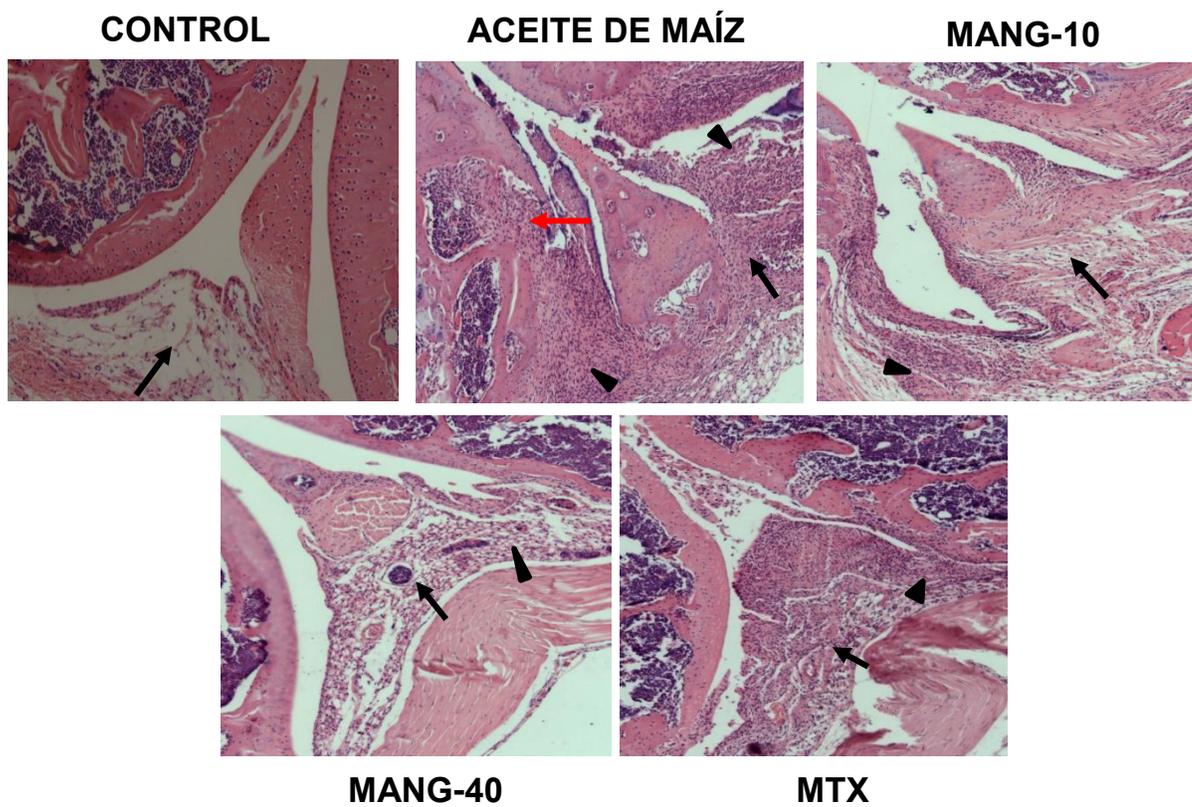
### **6.3 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre los cambios histopatológicos en ratones con CIA**

Para determinar que la  $\alpha$ -mangostina era capaz de controlar la inflamación y el daño articular presente en ratones con CIA se realizó la evaluación histopatológica de las articulaciones de la rodilla y de los tarsos de los ratones de los diferentes grupos experimentales. La evaluación histológica de las articulaciones de los ratones con CIA reveló hiperplasia sinovial, infiltración abundante de células inflamatorias dentro del espacio articular, daño extenso al cartílago y al hueso subcondral y formación de pannus. El infiltrado inflamatorio a nivel articular estuvo compuesto en su mayoría por linfocitos,

macrófagos y fibroblastos, aunque también se encontraron algunos neutrófilos (*Figura 11*). En la *Figura 12* se puede observar en las articulaciones de la rodilla de los distintos grupos experimentales que el tratamiento con  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg es el más eficiente en disminuir el infiltrado inflamatorio, la formación de pannus y la erosión del cartílago y del hueso subcondral en comparación al grupo de CIA tratado con aceite de maíz, a diferencia de los demás grupos experimentales.

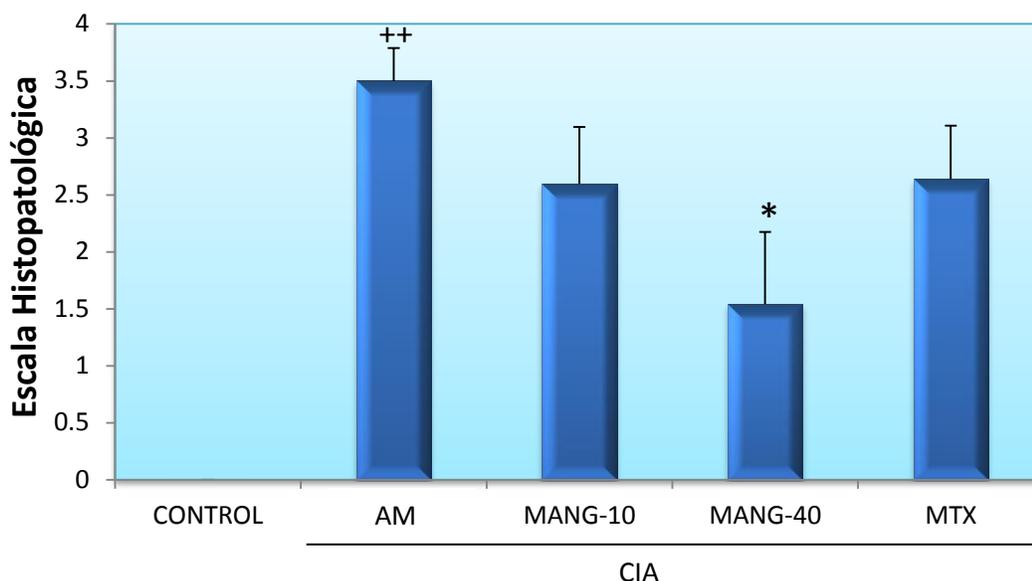


**Figura 11.** Microfotografías a diferentes aumentos de la articulación de la rodilla de un ratón con CIA tratado con Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina) teñido con Hematoxilina-Eosina. Los datos son representativos de este grupo experimental. n=6. Las flechas negras en A y B representan la hiperplasia sinovial, el infiltrado inflamatorio, la formación de pannus y la erosión del cartílago y del hueso subcondral que se presenta en los ratones con CIA. Los rectángulos en las figuras A, B y C representan el área de magnificación hacia el siguiente aumento. En la figura D, las flechas azul claro representan la presencia de neutrófilos, las flechas verdes la presencia de macrófagos, las flechas azul oscuro la presencia de linfocitos y las flechas color rojo la presencia de fibroblastos en el infiltrado inflamatorio articular que se presenta durante la CIA.



**Figura 12.** Microfotografías a 10X de la articulación de la rodilla de los distintos grupos experimentales teñidas con Hematoxilina-Eosina. Los datos son representativos de cada grupo experimental. n=6. Las flechas negras representan la membrana sinovial. Las cabezas de flecha indican el infiltrado inflamatorio y la hiperplasia sinovial dentro de la articulación de la rodilla. Las flechas rojas indican la erosión del cartílago y del hueso subcondral por el pannus. CONTROL= Grupo sin CIA. ACEITE DE MAÍZ= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina). MANG-10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg. MANG-40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg.

En la *Figura 13* se presenta la escala histopatológica que se obtuvo de las articulaciones de cada grupo y donde se observó un incremento significativo de la misma en el grupo de los ratones con CIA + Aceite de Maíz con respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ). También se observa que el único grupo capaz de disminuir de manera significativa la escala histopatológica con respecto al grupo de CIA + Aceite de Maíz fue el grupo de CIA +  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg ( $p < 0.05$ ).



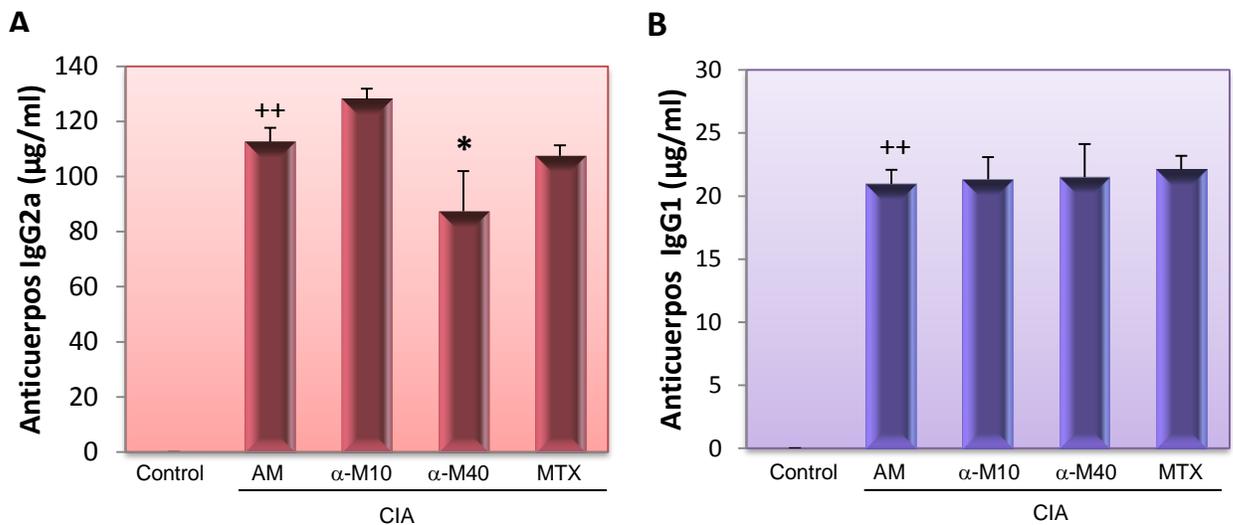
**Figura 13.** Escala histopatológica de los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. CONTROL= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina). MANG-10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg. MANG-40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una  $^{**}p < 0.01$  al grupo Control. El grupo es diferente significativamente con una  $^{*}p < 0.05$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA y el LS means contrast test.

#### **6.4 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a anticolágena en la CIA establecida**

Se determinó el efecto del tratamiento con  $\alpha$ -mangostina sobre la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a anticolágena en ratones con CIA establecida después de 33 días de tratamiento, ya que se ha encontrado con anterioridad que la producción de anticuerpos anticolágena II es crítica para la generación de la CIA y muestra una alta correlación con la severidad de la enfermedad (Williams et al., 1998). Todos los ratones en el grupo de CIA tratados con el vehículo produjeron anticuerpos IgG1 e IgG2a anticolágena a diferencia de los controles sin artritis, los cuales no produjeron anticuerpos (Figura 14).

Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ). El incremento en la producción de anticuerpos IgG2a anticolágena predominó sobre la producción de anticuerpos IgG1 anticolágena en los ratones con CIA + Aceite de Maíz.

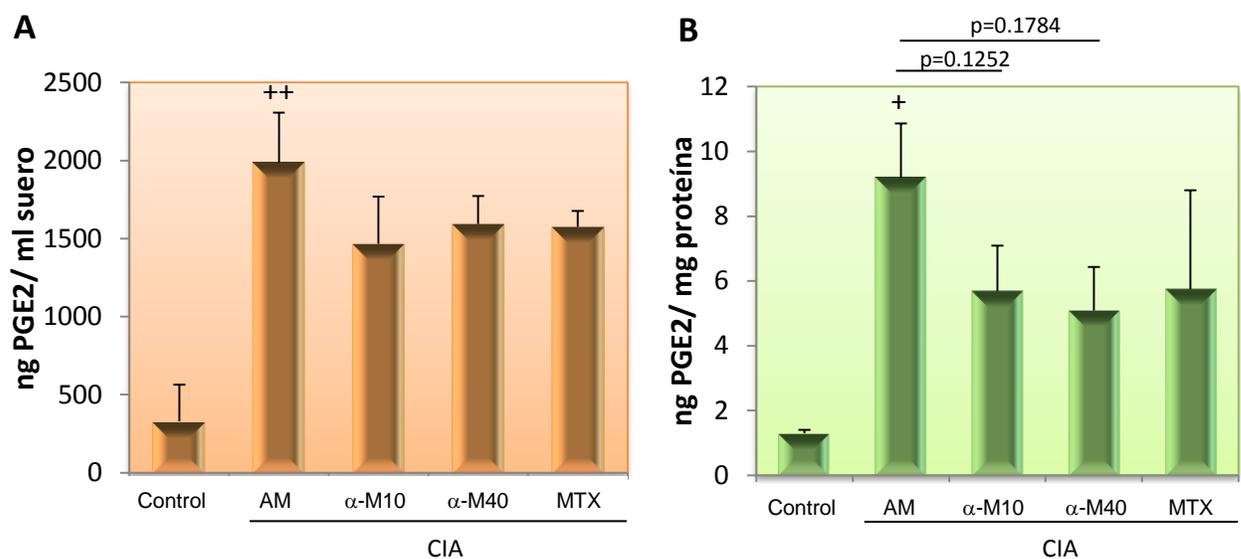
En la *Figura 14* se representan los resultados obtenidos de la medición de los anticuerpos IgG1 e IgG2a anticolágena en los diferentes grupos experimentales. El único grupo capaz de disminuir la producción de anticuerpos IgG2a anticolágena con respecto al grupo de CIA tratado con el vehículo fue el grupo de 40 mg/kg de  $\alpha$ -mangostina ( $p < 0.05$ ). Mientras, que ninguno de los tratamientos instaurados fue capaz de disminuir la producción de anticuerpos IgG1 anticolágena.



**Figura 14.** Niveles de autoanticuerpos (A) IgG2a e (B) IgG1 anticolágena II en los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM.  $n=6$ . Control= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg.  $\alpha$ -M40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una ++ $p < 0.01$  al grupo Control. El grupo es diferente significativamente con una \* $p < 0.05$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA y el LS means contrast test.

## 6.5 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre los mediadores inflamatorios producidos a nivel articular y sistémico durante la CIA

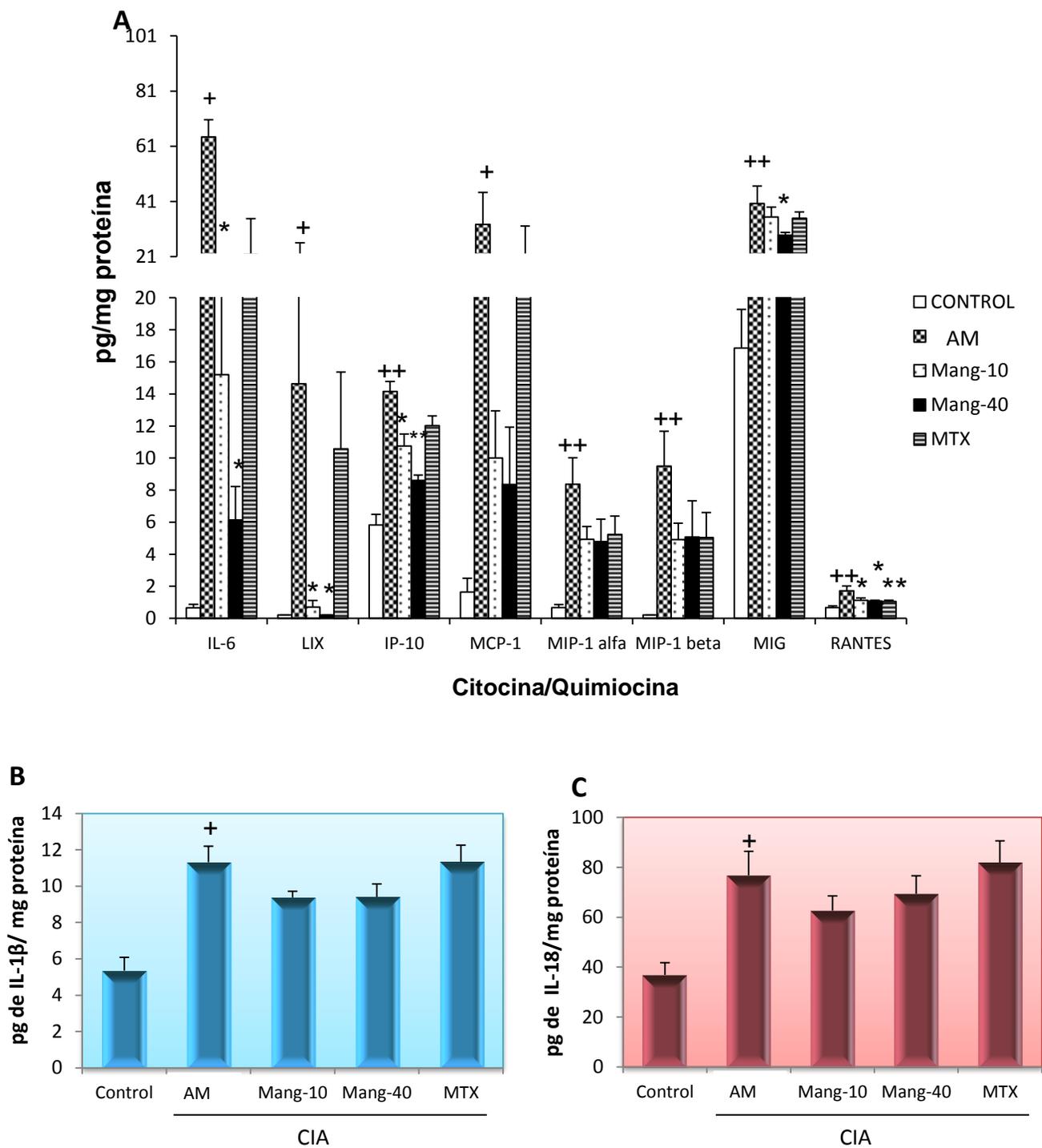
En estudios previos se ha demostrado la participación de ciertas citocinas, quimiocinas y algunos otros mediadores inflamatorios como la  $\text{PGE}_2$  en el proceso inflamatorio y la destrucción articular que se lleva a cabo en la AR (Iwamoto et al., 2008)(Choy, 2012)(Caselli et al., 2018)(Hoxha, 2018). Por lo cual, se decidió evaluar el efecto del tratamiento con la  $\alpha$ -mangostina sobre estos mediadores de la inflamación. La *Figura 15* muestra los resultados de la medición de  $\text{PGE}_2$  en el suero y en los homogeneizados de las articulaciones de los diferentes grupos experimentales después de 33 días de tratamiento. Se demostró que los niveles de  $\text{PGE}_2$  se incrementaron tanto en el suero como en las articulaciones de los ratones con CIA que sólo se trataron con el vehículo en comparación a los ratones del grupo control. Por otro lado, aunque la  $\alpha$ -mangostina y el metotrexato lograron disminuir este mediador inflamatorio en el suero y en las articulaciones, siendo más notable el efecto en este último sitio; esta disminución no alcanzó a ser significativa. Aunque, si alcanzó a presentar una tendencia a nivel articular para el caso de la dosis de 10 mg/kg de  $\alpha$ -mangostina ( $p=0.1252$ ) y la dosis de 40 mg/kg de  $\alpha$ -mangostina ( $p=0.1784$ ).



**Figura 15. Producción de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en (A) suero y a (B) nivel articular en los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento.** Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. Control= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg.  $\alpha$ -M40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una <sup>+</sup>p < 0.05 o una <sup>++</sup>p < 0.01 al grupo Control por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

La determinación de la producción de citocinas y quimiocinas en ratones con CIA se evaluó sólo a nivel articular así como el efecto de cada uno de los tratamientos en los ratones con CIA. Como se puede observar en las *Figura 16* se presentó un incremento significativo en la producción de las citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-18 y las quimiocinas LIX (CXCL5), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), MIG (CXCL9) y RANTES (CCL5) en los ratones con CIA + Aceite de Maíz con respecto al grupo control (p < 0.01 excepto para IL-6, LIX y MCP-1 (p < 0.05)).

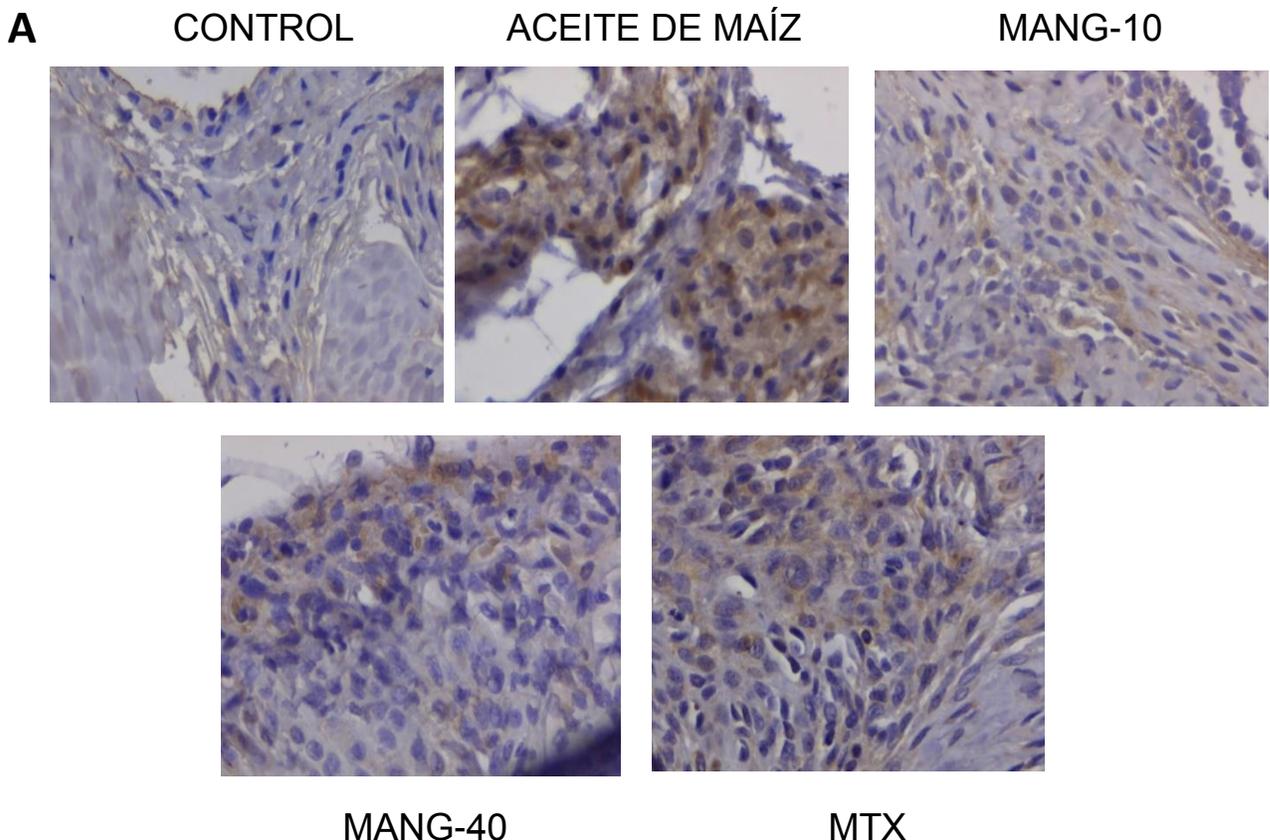
En la *Figura 16A* también se puede observar que la dosis de 10 mg/kg de  $\alpha$ -mangostina fue capaz de disminuir la producción de IL-6, LIX, IP-10 y RANTES con respecto al grupo de CIA + Aceite de Maíz (p < 0.05) mientras que la dosis de 40 mg/kg no sólo fue capaz de disminuir la producción de IL-6 y de estas quimiocinas, sino también de MIG con respecto al grupo de CIA + Aceite de Maíz (p < 0.05 excepto para IP-10 donde la p < 0.01). No se presentaron diferencias significativas entre las dos dosis utilizadas de la  $\alpha$ -mangostina; sin embargo, la dosis de 40 mg/kg mostró una significancia ligeramente más alta que la dosis de 10 mg/kg en disminuir la producción de IL-6 y de algunas quimiocinas a nivel articular. El metotrexato, por otro lado, sólo disminuyó la producción de la quimiocina RANTES con respecto al grupo de CIA + Aceite de Maíz (p < 0.01). Con respecto, a la producción de IL-1 $\beta$  y de IL-18 a nivel articular no se encontraron diferencias significativas con ninguno de los tratamientos instaurados con respecto al grupo de CIA tratado solamente con el vehículo (*Figura 16B y 16C*).

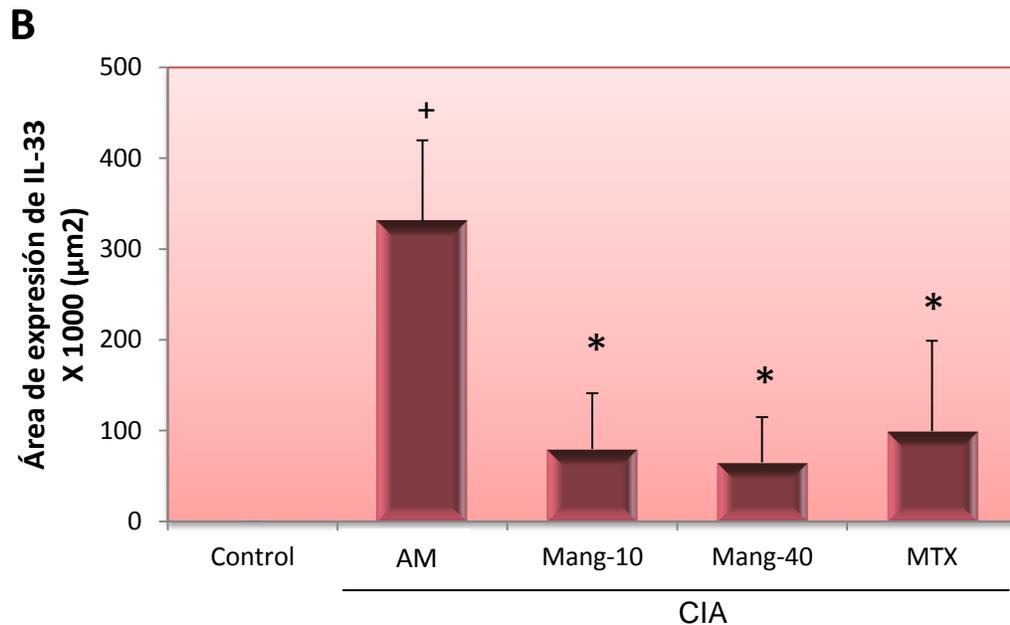


**Figura 16.** (A) Producción de citocinas y quimiocinas determinada por la tecnología Luminex xMAP y producción de (B) IL-1 $\beta$  e (C) IL-18 determinada por ELISA en los distintos grupos experimentales después de 68 días de la inducción de la CIA. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. CONTROL= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo el  $\alpha$ -mangostina). Mang-10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg. Mang-40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se

administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una <sup>+</sup>p < 0.05 o una <sup>++</sup>p < 0.01 al grupo Control. El grupo es diferente significativamente con una \*p < 0.05 o una \*\*p < 0.01 en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

La expresión de IL-33, una citocina emergente recientemente asociada a la fisiopatología de la AR, también se estudió a nivel articular mediante inmunohistoquímica. Se determinó que la expresión de IL-33 se encontraba incrementada de manera significativa en los tejidos articulares de los ratones con CIA que se trataron solamente con el vehículo con respecto a los ratones control sin artritis (p < 0.05). La expresión de esta citocina fue más predominante en fibroblastos y células mononucleares que se encontraban infiltrando el espacio articular. Tanto el tratamiento con ambas dosis de  $\alpha$ -mangostina como el tratamiento con metotrexato lograron disminuir de manera significativa la expresión de IL-33 en los tejidos articulares de los ratones con CIA con respecto a los ratones con CIA tratados con el vehículo (p < 0.05) (*Figura 17*)





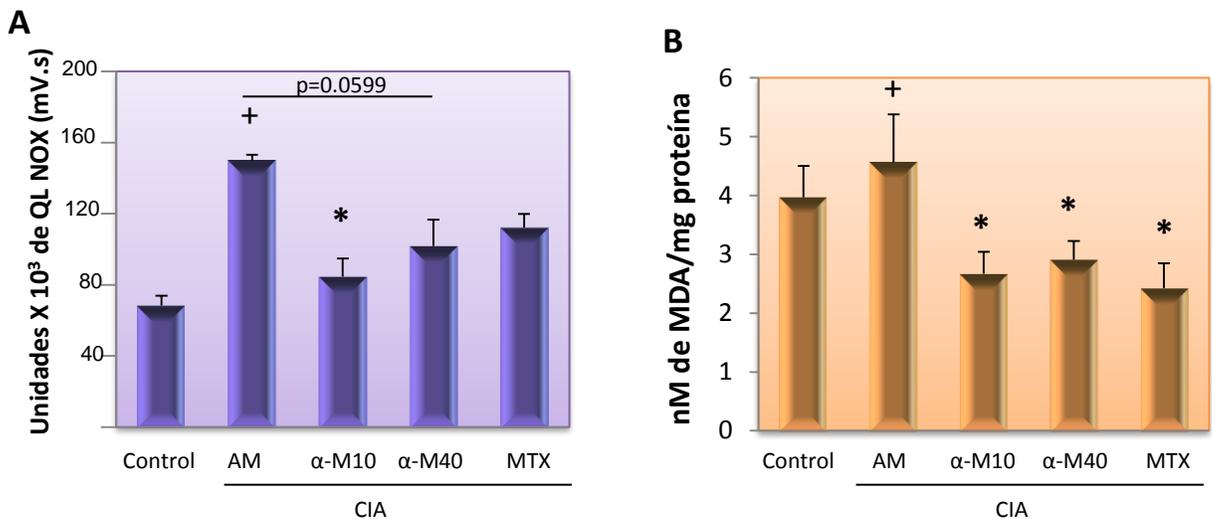
**Figura 17.** (A) Microfotografías a 40x de la inmunohistoquímica para IL-33 en los tejidos articulares de los ratones de los diferentes grupos experimentales en donde se puede apreciar la inmunoreactividad para esta citocina en color café en el infiltrado inflamatorio y el área correspondiente al pannus dentro de la articulación. (B) Área de expresión de la IL-33 expresada en  $\mu\text{m}^2$  en los diferentes grupos experimentales después de 33 días de tratamiento. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM.  $n=6$ . CONTROL= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyó la  $\alpha$ -mangostina). Mang-10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg. Mang-40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una  $^+p < 0.05$  o una  $^{**}p < 0.01$  al grupo Control. El grupo es diferente significativamente con una  $*p < 0.05$  o una  $^{**}p < 0.01$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

### 6.6 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre el estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes en ratones con CIA establecida

Debido a la estrecha relación que existe entre el proceso inflamatorio y el estrés oxidante que se da en la AR y a estudios previos en los que se ha demostrado la actividad antioxidante de la  $\alpha$ -mangostina tanto *in vitro* como *in vivo*, se decidió evaluar el efecto de

la  $\alpha$ -mangostina sobre varios parámetros del estrés oxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes a nivel hepático, renal y articular en ratones con CIA (Hitchon and El-Gabalawy, 2004)(Sampath and Vijayaraghavan, 2007)(Mirshafiey and Mohsenzadegan, 2008). Se encontró que los ratones con CIA tratados solamente con el vehículo tenían un incremento significativo en los niveles de MDA (producto final de la lipoperoxidación) así como en la actividad de la NADPH oxidasa con respecto a los ratones control sin artritis ( $p < 0.05$ ). En contraste, estos ratones con CIA tratados con el vehículo presentaron menores niveles de GSH (uno de los principales sistemas de defensa antioxidante) a nivel articular en comparación a los ratones control sin tratar ( $p < 0.05$ ). Como se puede observar en la *Figura 18B*, tanto las dos diferentes dosis de  $\alpha$ -mangostina como el metotrexato lograron disminuir de manera significativa la producción de MDA/ mg de proteína a nivel articular en ratones con CIA con respecto al grupo de CIA + Aceite de Maíz ( $p < 0.05$ ).

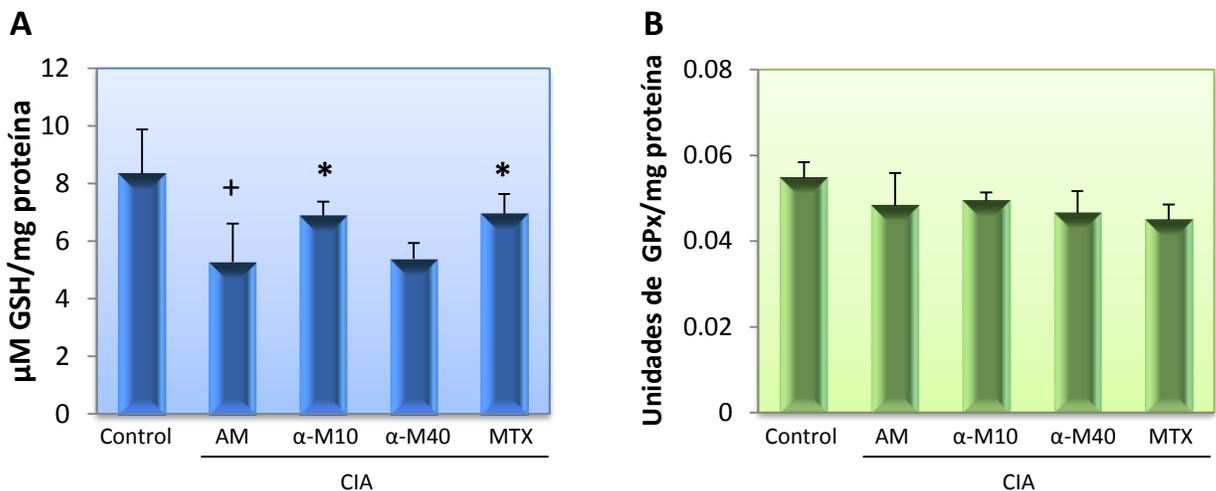
En la *Figura 18A* podemos observar que el único grupo que disminuyó de manera significativa la actividad de la NADPH oxidasa con respecto al grupo de CIA tratado con el vehículo ( $p < 0.05$ ) fue el de la  $\alpha$ -mangostina administrada a una dosis de 10mg/kg. Mientras, que la dosis de 40 mg/kg de  $\alpha$ -mangostina aunque mostró una fuerte tendencia a disminuir la actividad de la NADPH oxidasa ( $p=0.0599$ ) no alcanzó a ser significativa.

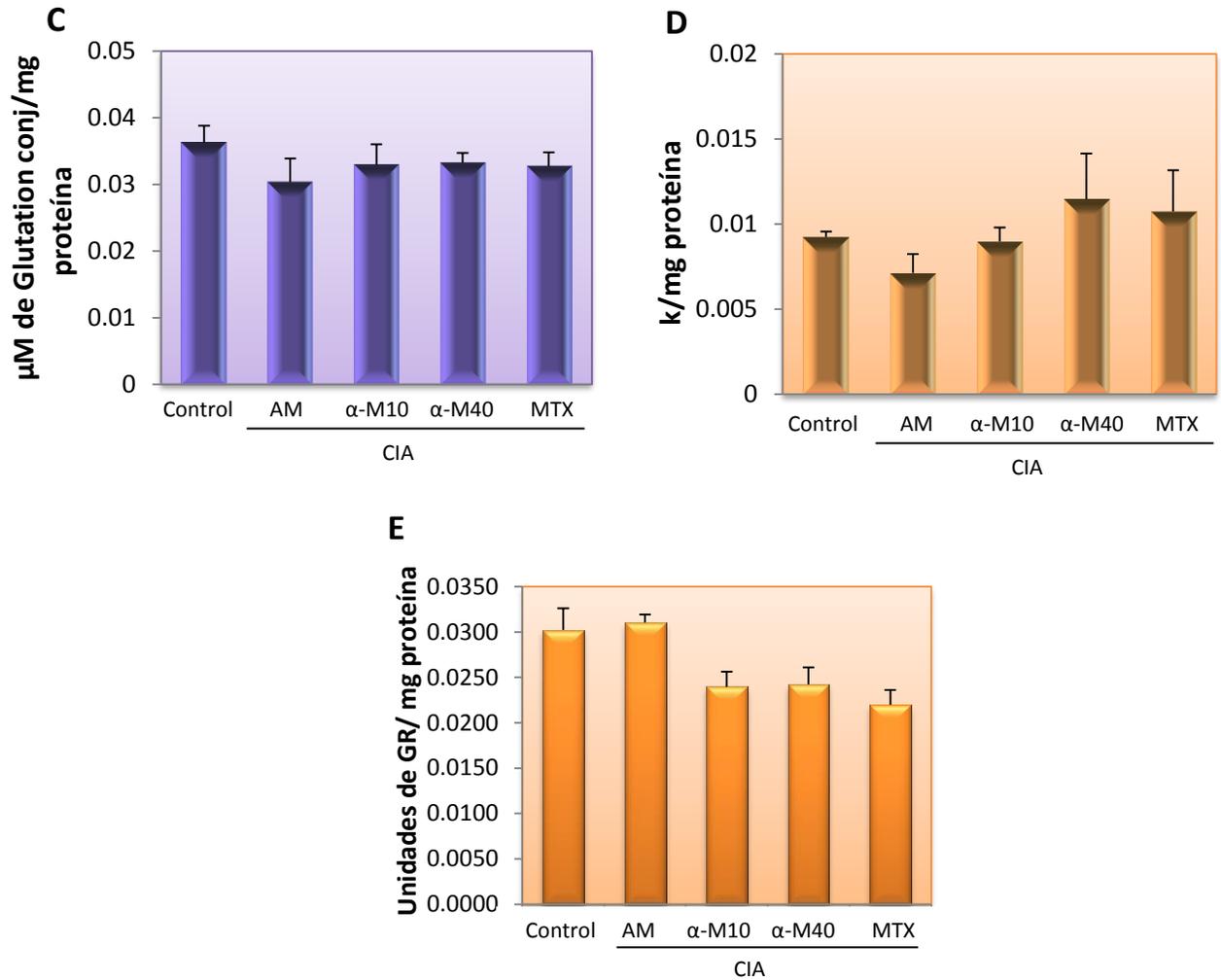


**Figura 18.** (A) Actividad de la NADPH oxidasa (NOX) y (B) producción de Malondialdehído (MDA)

**(producto final de la lipoperoxidación) en los homogeneizados de las articulaciones de los ratones de los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento.** La actividad de la NADPH oxidasa es expresada como unidades de quimioluminiscencia (QL) (mV.s) de la NOX y la lipoperoxidación como nM de MDA/ mg de proteína. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. Control= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyó la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg.  $\alpha$ -M40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una  $^+p < 0.05$  al grupo Control. El grupo es diferente significativamente con una  $*p < 0.05$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

En la *Figura 19A* podemos observar que tanto el grupo de 10 mg/kg de  $\alpha$ -mangostina como el grupo de metotrexato lograron incrementar la cantidad de GSH/ mg de proteína en las articulaciones de los ratones con CIA con respecto al grupo de CIA tratado con el vehículo de manera significativa ( $p < 0.05$ ). En contraste, las actividades de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GPx, GST y SOD no presentaron diferencias significativas a nivel articular entre los distintos grupos experimentales (Figuras 19B, 19C, 19D y 19E).

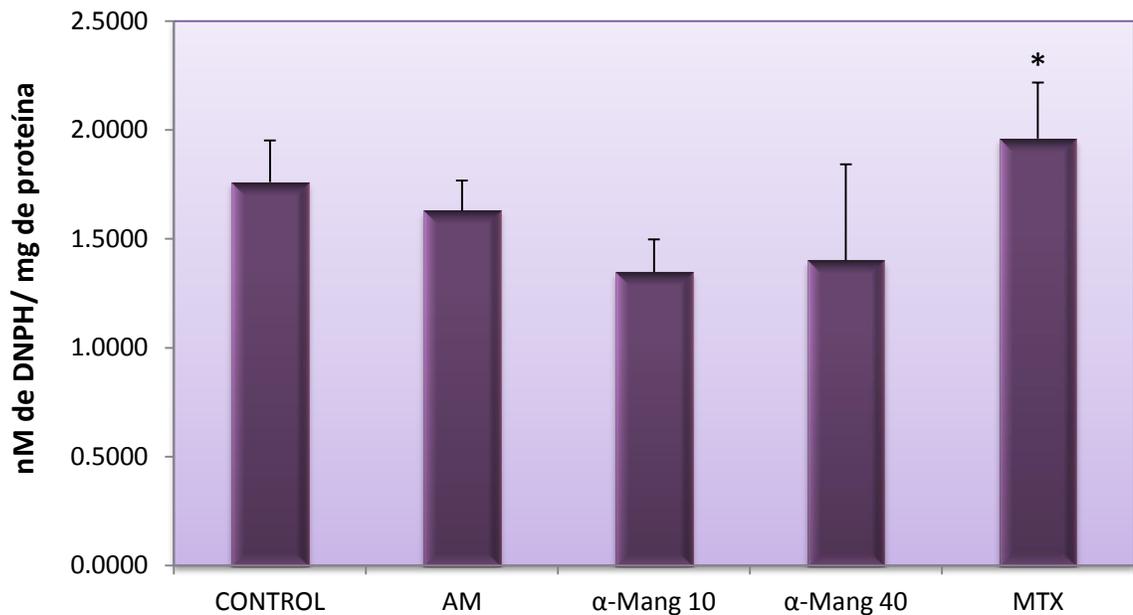




**Figura 19.** (A) Niveles de glutatión (GSH), (B) Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), (C) Actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), (D) Actividad de la catalasa (CAT) y (E) Actividad de la glutatión reductasa (GR) en los homogeneizados de las articulaciones de los ratones de los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM. n=6. Control= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg.  $\alpha$ -M40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo AM es significativamente diferente con una  $^+p < 0.05$  al grupo Control. El grupo es diferente significativamente con una  $*p < 0.05$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

La determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GPx, GST y SOD, el contenido de GSH y la medición de los marcadores de estrés oxidante

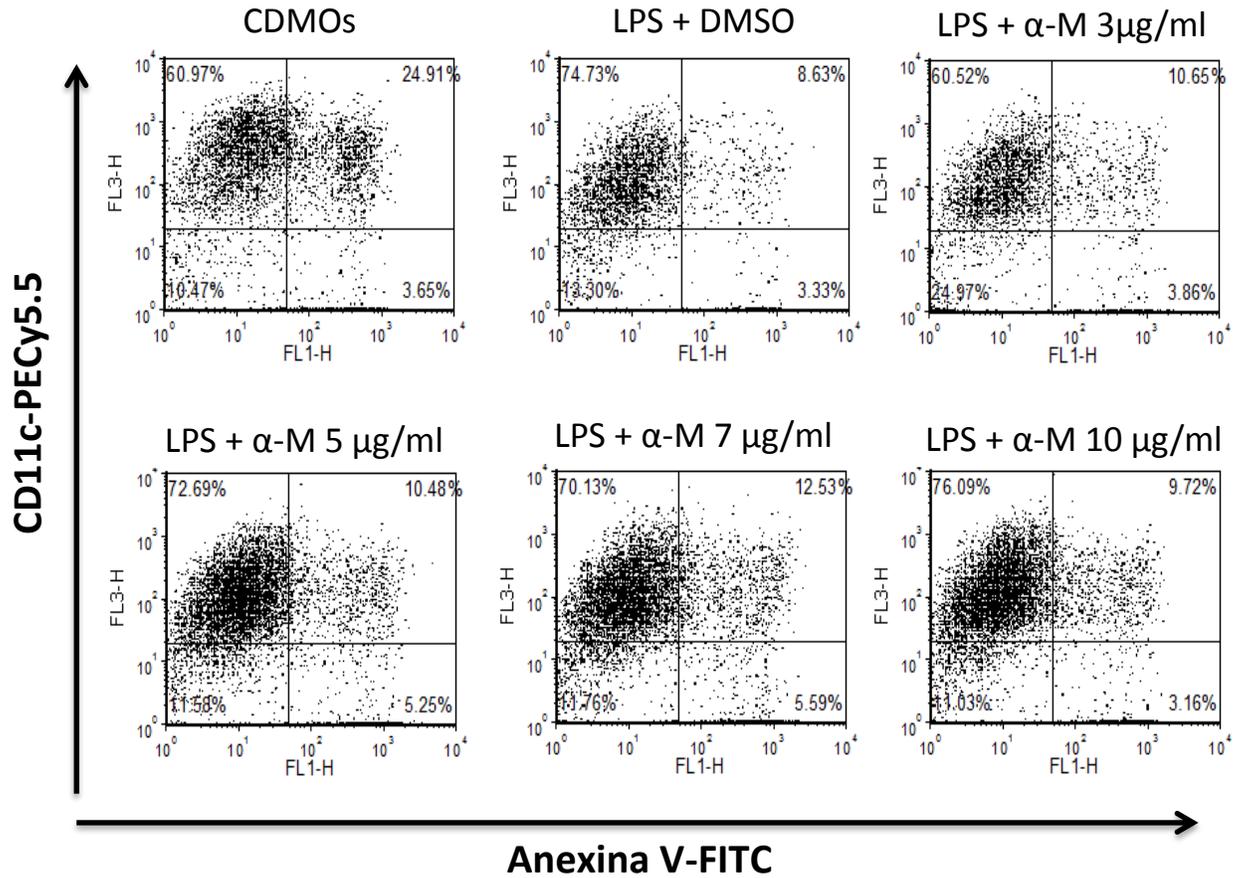
(lipoperoxidación y actividad de la NADPH oxidasa) no presentó diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales a nivel renal y hepático (Datos no mostrados). Finalmente, de manera interesante, se encontró un incremento significativo en la generación de proteínas oxidadas a nivel hepático en el grupo de ratones con CIA que recibió metotrexato como tratamiento ( $p < 0.05$ ) (Figura 20).



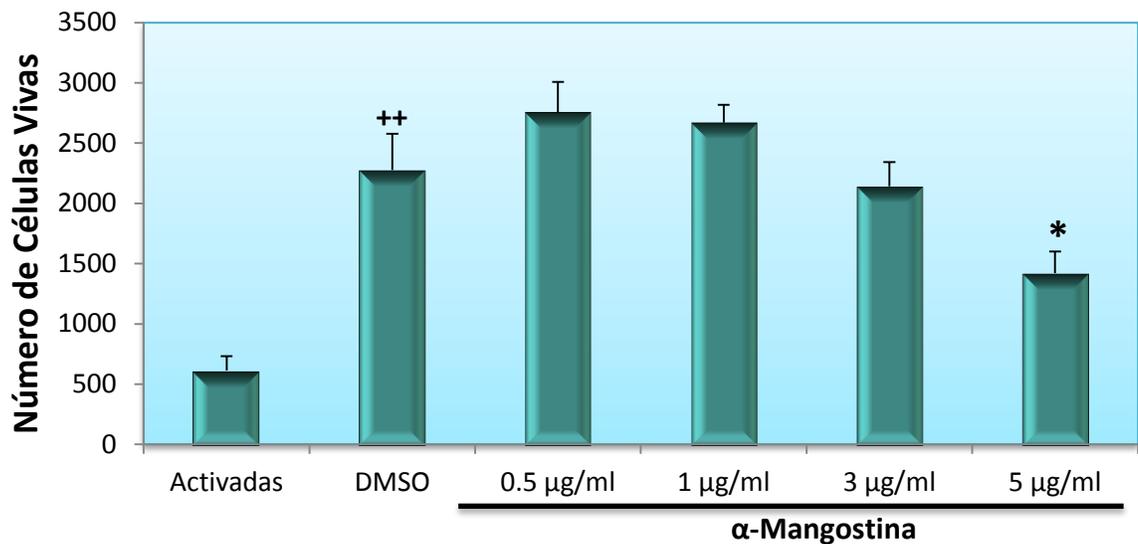
**Figura 20.** Niveles de proteínas oxidadas en los homogeneizados de hígado de los ratones en los distintos grupos experimentales después de 33 días de tratamiento. Los niveles de proteínas oxidadas son expresados como nM de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)/ mg de proteína. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM.  $n=6$ . Control= Grupo sin CIA. AM= Grupo con CIA al que se administró Aceite de Maíz (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M10= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 10 mg/kg.  $\alpha$ -M40= Grupo con CIA al que se administró  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg. MTX= Grupo con CIA al que se administró Metotrexato a 0.5 mg/kg. El grupo es diferente significativamente con una  $*p < 0.05$  en comparación al grupo AM por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

### 6.7 Citotoxicidad de la $\alpha$ -mangostina en CMDO y linfocitos polarizados hacia Th1 y Th17

La  $\alpha$ -mangostina posee efectos anti-inflamatorios sobre diversos tipos celulares que participan en la inflamación incluyendo varias líneas de macrófagos (Tewtrakul et al., 2009). Por lo cual, para tratar de profundizar aún más en su capacidad anti-inflamatoria en el modelo de CIA, se decidió evaluar su efecto *in vitro* sobre las CMDO y los linfocitos polarizados hacia Th1 y Th17, participantes claves en el proceso fisiopatológico de la AR. Debido a que en informes previos se ha documentado la citotoxicidad de la  $\alpha$ -mangostina en una variedad de células incluyendo líneas de células tumorales, se decidió evaluar la citotoxicidad de esta molécula en los cultivos de las CMDO y de los linfocitos polarizados hacia Th17 y Th1 mediante un ensayo de apoptosis con Anexina V y 7-AAD (Nakagawa et al., 2007)(Doi et al., 2009)(Liu et al., 2015). Lo anterior, con la finalidad de determinar que el efecto observado no se debiera a la citotoxicidad de la  $\alpha$ -mangostina sobre estas células. La  $\alpha$ -mangostina no fue citotóxica para las CMDO a las concentraciones utilizadas (0.5 – 10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante los tiempos que duraron los tratamientos (4 y 24 horas) (Figura 21). Sin embargo, sí demostró citotoxicidad sobre los linfocitos activados y polarizados hacia Th1 y hacia Th17 donde se evidenció que a partir de la dosis de 3  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina el porcentaje de células en apoptosis temprana en la población  $\text{CD4}^+$  comienza a incrementarse, mientras el número de células vivas comienza a disminuir (alrededor de un 6%). Finalmente, esta disminución es mucho más notable a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  (37.6%) con respecto al grupo control que sólo contiene DMSO, donde ya alcanza a ser significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 22).



**Figura 21.** Ausencia de citotoxicidad de la  $\alpha$ -mangostina en las distintas concentraciones empleadas sobre las CDMO activadas con LPS durante 4 o 24 horas mediante citometría de flujo. La población CD11c<sup>+</sup> Anexina V<sup>+</sup> fue considerada como las DCMO en apoptosis (cuadrante superior derecho). Los datos son presentados como dot plots y son representativos de 3 experimentos independientes. CDMOs= Células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón sin LPS. LPS + DMSO= CDMOs estimuladas con LPS y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina). LPS +  $\alpha$ -M 3  $\mu$ g/ml= CDMOs estimuladas con LPS y 3  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina. LPS +  $\alpha$ -M 5  $\mu$ g/ml= CDMOs estimuladas con LPS y 5  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina. LPS +  $\alpha$ -M 7  $\mu$ g/ml= CDMOs estimuladas con LPS y 7  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina. LPS +  $\alpha$ -M 10  $\mu$ g/ml= CDMOs estimuladas con LPS y 10  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.

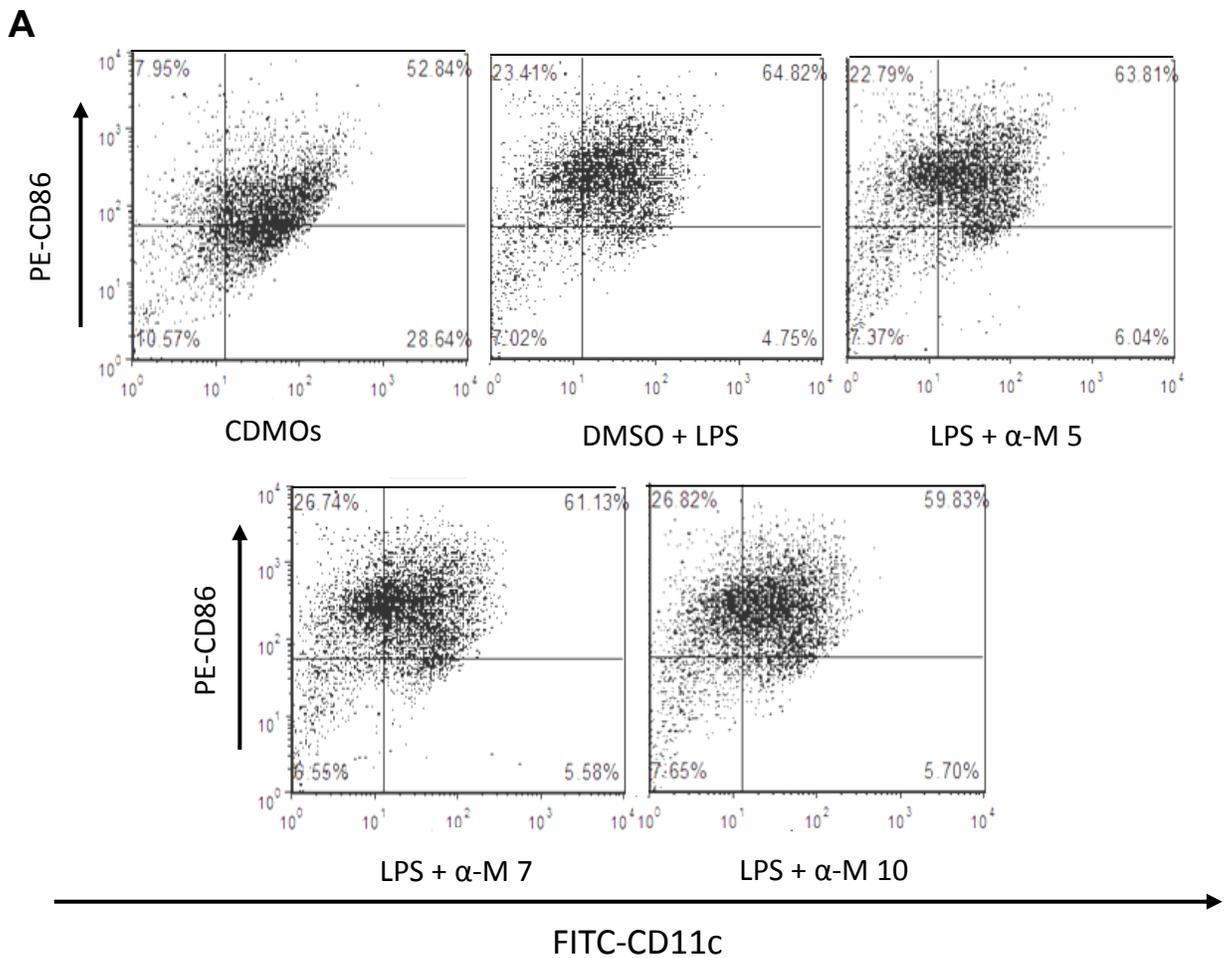


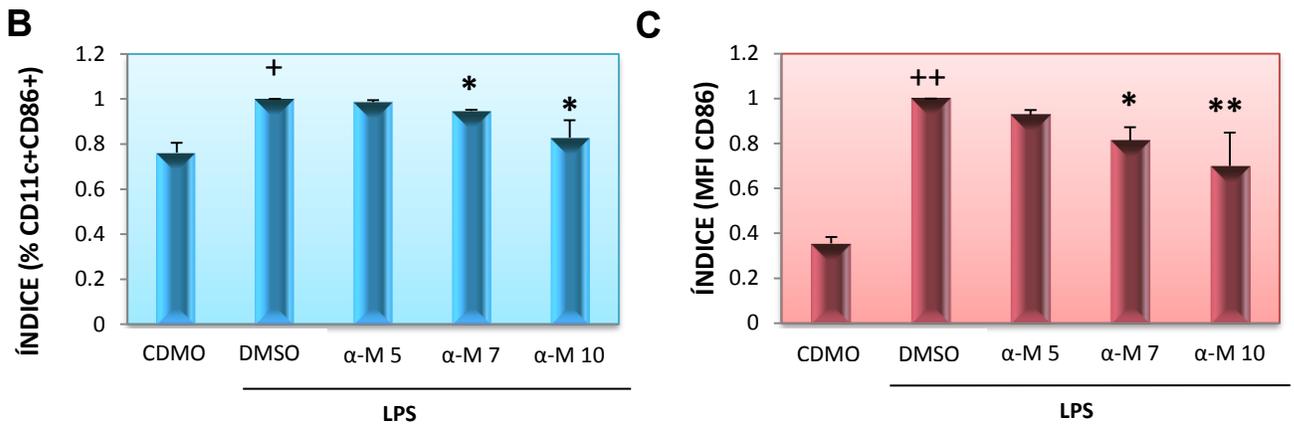
**Figura 22.** Citotoxicidad de la  $\alpha$ -mangostina en las distintas concentraciones empleadas sobre los linfocitos polarizados hacia Th17 durante 6 días mediante citometría de flujo. La citotoxicidad es expresada por la disminución en el número de células vivas con las distintas concentraciones de la  $\alpha$ -mangostina donde las células vivas representan la población  $CD4^+$  Anexina V<sup>-</sup> 7-Amino-actinomicina D (7-AAD)<sup>-</sup>. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Activadas= Células activadas con CD3 y CD28. DMSO= Linfocitos polarizados hacia Th17 y estimulados con Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina). 0.5 µg/ml= Linfocitos polarizados hacia Th17 y estimulados con 0.5 µg/ml de  $\alpha$ -mangostina. 1 µg/ml= Linfocitos polarizados hacia Th17 y estimulados con 1 µg/ml de  $\alpha$ -mangostina. 3 µg/ml= Linfocitos polarizados hacia Th17 y estimulados con 3 µg/ml de  $\alpha$ -mangostina. 5 µg/ml= Linfocitos polarizados hacia Th17 y estimulados con 5 µg/ml de  $\alpha$ -mangostina. El grupo DMSO es significativamente diferente con una  $^{++}p < 0.01$  al grupo de Células Activadas. El grupo es diferente significativamente con una  $^*p < 0.05$  en comparación al grupo DMSO por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

### 6.8 Efecto de la $\alpha$ -mangostina sobre las CMDO activadas con LPS

El análisis por citometría de flujo reveló que el 75% de las células fueron positivas para CD11c del total del área correspondiente a los monocitos (90% del total de las células) y la adición de LPS (100 ng/ml) a las CDMO incrementó los porcentajes de células CD11c+ que expresan las moléculas de activación CD86 y CD40 de manera significativa con respecto al grupo CDMO sin LPS ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente). El porcentaje de células CD11c+ CD86+ disminuyó de manera significativa con la adición de  $\alpha$ -mangostina en las dosis de 7 y

10  $\mu\text{g/ml}$  con respecto al grupo de DMSO ( $p < 0.05$ ); al igual que el porcentaje de células CD11c+ CD40+, el cual disminuyó de manera significativa en las dosis de 5, 7 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina con respecto al grupo de DMSO ( $p < 0.0001$ ). Además, la dosis de 10  $\mu\text{g/ml}$  mostró ser superior a las de 5 y 7  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina en disminuir los porcentajes de células CD11c+ CD40+ ( $p=0.0029$  y  $p=0.0446$ ) (Figuras 23 y 24). Sin embargo, los porcentajes de células CD11c+ CD80+, CD11c+ MHC-II+ y CD11c+ PDL1+ no se modificaron por la adición de las distintas dosis de  $\alpha$ -mangostina con respecto al grupo de DMSO.

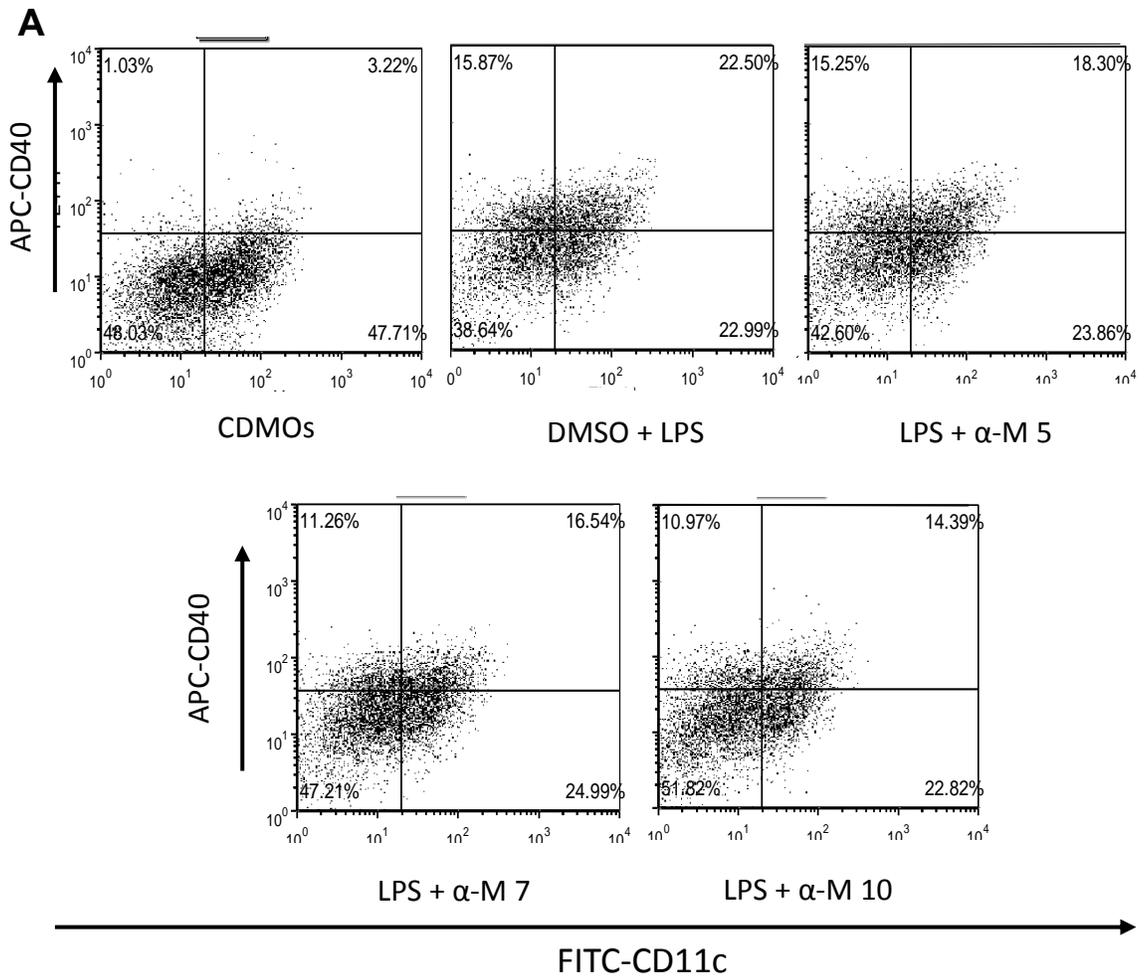


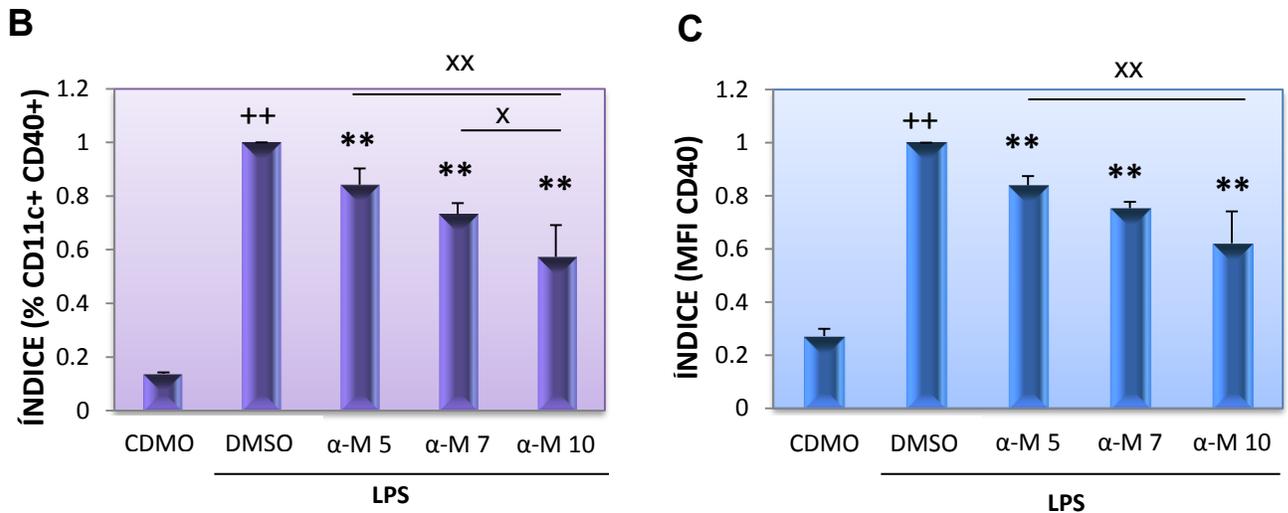


**Figura 23.** Efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre la expresión de CD86 en CDMOs activadas con LPS durante 4 horas mediante citometría de flujo. (A) Dot plots representativos del porcentaje de la expresión de CD86 en células CD11c<sup>+</sup> en los distintos grupos tratados con  $\alpha$ -mangostina. (B) Índice del porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales. (C) Índice de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CD86 en células CD11c<sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. CDMOs= Células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón sin LPS. DMSO= CDMOs estimuladas con LPS y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M 5= CDMOs estimuladas con LPS y 5  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 7= CDMOs estimuladas con LPS y 7  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 10= CDMOs estimuladas con LPS y 10  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina. El grupo DMSO es significativamente diferente con una <sup>+</sup>p < 0.05 o una <sup>++</sup>p < 0.01 al grupo de CDMOs. El grupo es diferente significativamente con una <sup>\*</sup>p < 0.05 o una <sup>\*\*</sup>p < 0.01 en comparación al grupo DMSO. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por la prueba de Kruskal-Wallis para los Índices de porcentajes y por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test para los Índices de la IMF.

Con respecto, a la IMF de cada una de las moléculas de activación en células CD11c<sup>+</sup> se observó un aumento significativo en la expresión de CD86 en todos los grupos experimentales con respecto al grupo de CDMO sin LPS ( $p < 0.0001$ ) y una disminución significativa en la expresión de esta molécula en las dosis de 7 y 10  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina con respecto al grupo de DMSO + LPS ( $p=0.0106$  y  $p=0.0004$ ) (Figura 23C). Adicionalmente, la IMF de CD40 en células CD11c<sup>+</sup> presentó también un aumento significativo en todos los grupos experimentales con respecto al grupo de CDMO sin LPS ( $p < 0.0001$ ) como se puede observar en la Figura 24C. Por otro lado, la IMF de CD40 en células CD11c<sup>+</sup> disminuyó de

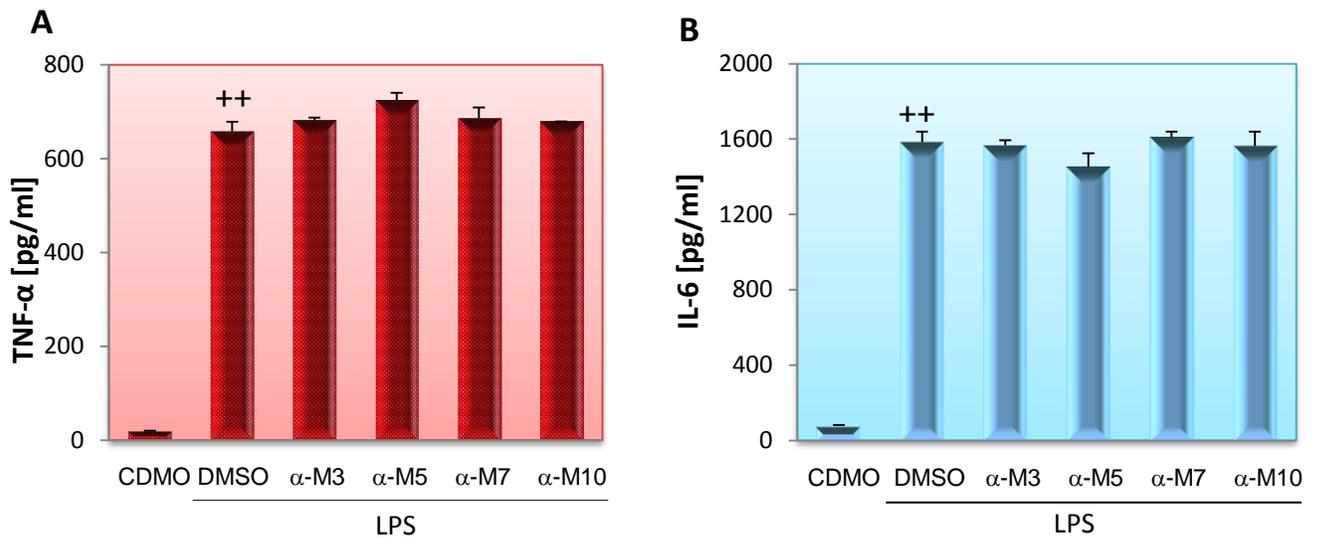
manera significativa en las dosis de 5, 7 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina con respecto al grupo de DMSO ( $p < 0.0001$ ). Además, la dosis de 10  $\mu\text{g/ml}$  mostró ser superior a la dosis de 5  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina en disminuir la IMF de CD40 en células CD11c+ ( $p=0.0084$ ). Finalmente, la expresión de CD80, MHC-II y PDL1 en células CD11c+ no presentó diferencias significativas entre los grupos tratados con  $\alpha$ -mangostina y el grupo de DMSO.





**Figura 24.** Efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre la expresión de CD40 en CDMOs activadas con LPS durante 4 horas mediante citometría de flujo. (A) Dot plots representativos del porcentaje de la expresión de CD40 en células CD11c<sup>+</sup> en los distintos grupos tratados con  $\alpha$ -mangostina. (B) Índice del porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales. (C) Índice de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CD40 en células CD11c<sup>+</sup> en los distintos grupos experimentales. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. CDMOs= Células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón sin LPS. DMSO= CDMOs estimuladas con LPS y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M 5= CDMOs estimuladas con LPS y 5  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 7= CDMOs estimuladas con LPS y 7  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 10= CDMOs estimuladas con LPS y 10  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina. El grupo DMSO es significativamente diferente con una <sup>+</sup>p < 0.05 o una <sup>++</sup>p < 0.01 al grupo de CDMOs. El grupo es diferente significativamente con una \*p < 0.05 o una \*\*p < 0.01 en comparación al grupo DMSO. Diferencias significativas con una <sup>X</sup>p < 0.05 o una <sup>XX</sup>p < 0.01 entre los grupos señalados por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

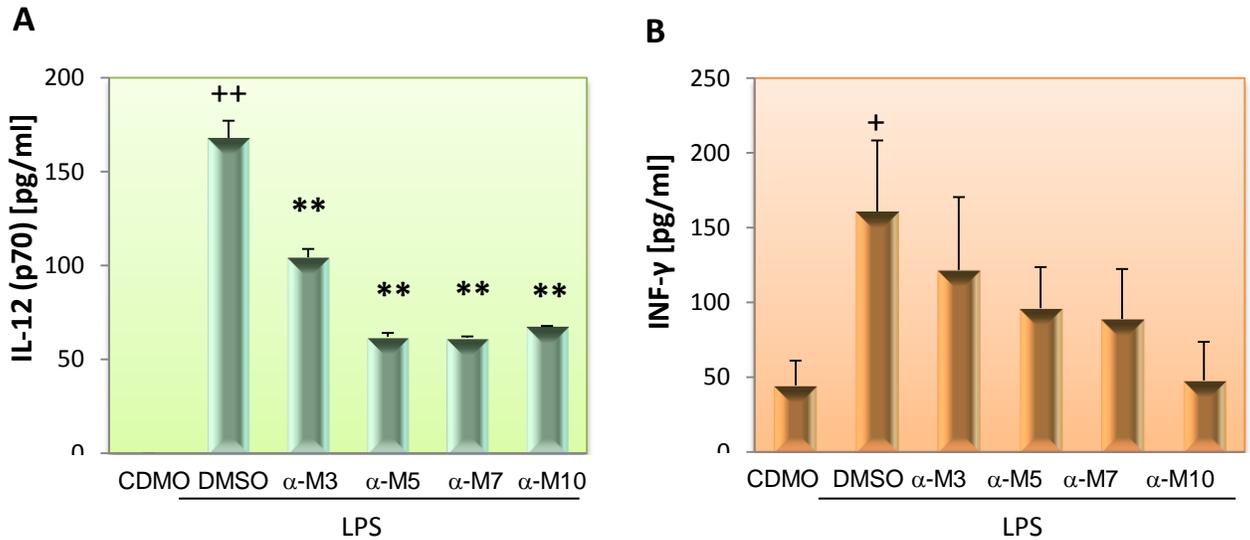
La producción de citocinas proinflamatorias evaluadas en los sobrenadantes de los cultivos no presentó disminuciones significativas en la producción de IL-6 (pg/ml) ni de TNF- $\alpha$  (pg/ml) con las distintas dosis de  $\alpha$ -mangostina evaluadas con respecto al grupo de DMSO + LPS. Únicamente se presentó un aumento significativo en la producción de esta citocina en los distintos grupos experimentales con respecto al grupo de CDMO sin LPS (p < 0.01) como se puede apreciar en las Figuras 25A y 25B.



**Figura 25.** Producción de las citocinas proinflamatorias (A) TNF $\alpha$  e (B) IL-6 en sobrenadantes de CDMOs estimuladas con LPS y  $\alpha$ -mangostina en distintas concentraciones durante 4 horas. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. CDMOs= Células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón sin LPS. DMSO= CDMOs estimuladas con LPS y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M 3= CDMOs estimuladas con LPS y 3  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 5= CDMOs estimuladas con LPS y 5  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 7= CDMOs estimuladas con LPS y 7  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 10= CDMOs estimuladas con LPS y 10  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina. El grupo DMSO es significativamente diferente con una <sup>++</sup>p < 0.01 al grupo de CDMOs por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

La producción de IL-12 (p70) presentó un aumento significativo en el grupo de DCMO estimuladas con LPS y DMSO con respecto al grupo de DCMO sin LPS ( $p < 0.0001$ ) y a partir de la dosis de 3  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina ( $p < 0.0001$ ) hasta la dosis de 10  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina ( $p < 0.0001$ ) se presentaron disminuciones significativas en la producción de esta citocina con respecto al grupo de DMSO con LPS, como se puede apreciar en la *Figura 26A*. También se evaluó la producción de INF- $\gamma$ ; sin embargo, no se logró detectar esta citocina después del estímulo de 4 horas con LPS sino hasta las 24 horas donde se encontró un aumento significativo en la producción de INF- $\gamma$  en el grupo de DMSO con LPS con respecto al grupo de CDMO sin LPS ( $p < 0.05$ ). Además, esta citocina presentó una disminución en su producción a partir de la dosis de 3  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -mangostina hasta la dosis

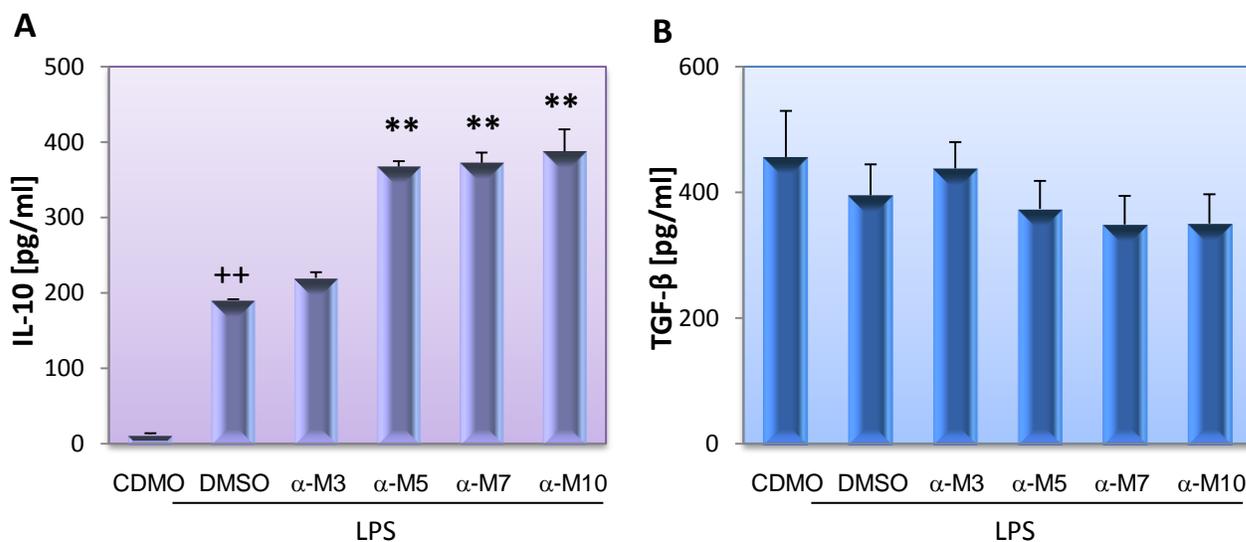
de 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina, aunque ésta no alcanzó a ser significativa ( $p = 0.07$ ) (Figura 26B).



**Figura 26.** Producción de las citocinas asociadas a una respuesta tipo Th1 (A) IL-12 (p70) e (B) INF- $\gamma$  en sobrenadantes de CDMOs estimuladas con LPS y  $\alpha$ -mangostina en distintas concentraciones durante 4 horas para IL-12 (p70) y durante 24 horas para INF- $\gamma$ . Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. CDMOs= Células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón sin LPS. DMSO= CDMOs estimuladas con LPS y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vehículo donde se diluyo la  $\alpha$ -mangostina).  $\alpha$ -M 3= CDMOs estimuladas con LPS y 3  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 5= CDMOs estimuladas con LPS y 5  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 7= CDMOs estimuladas con LPS y 7  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina.  $\alpha$ -M 10= CDMOs estimuladas con LPS y 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina. El grupo DMSO es significativamente diferente con una  $^+p < 0.05$  o una  $^{++}p < 0.01$  al grupo de CDMOs. El grupo es diferente significativamente con una  $^{**}p < 0.01$  en comparación al grupo DMSO por la prueba de ANOVA, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el LS means contrast test.

La producción de IL-10 (pg/ml) presentó aumentos significativos en los distintos grupos experimentales con respecto al grupo de CDMO sin LPS ( $p < 0.0001$ ). Además, se lograron detectar incrementos significativos en la producción de esta citocina en los grupos de 5, 7 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -mangostina con respecto al grupo de DMSO más LPS ( $p < 0.0001$ ) como se puede apreciar en la Figura 27A. En cuanto, a la producción de TGF- $\beta$  no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Figura

27B).



**Figura 27.** Producción de las citocinas anti-inflamatorias (A) IL-10 y (B) TGF-β en sobrenadantes de CDMOs estimuladas con LPS y α-mangostina en distintas concentraciones durante 4 horas. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. CDMOs= Células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón sin LPS. DMSO= CDMOs estimuladas con LPS y Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vehículo donde se diluyo la α-mangostina). α-M 3= CDMOs estimuladas con LPS y 3 μg/ml de α-mangostina. α-M 5= CDMOs estimuladas con LPS y 5 μg/ml de α-mangostina. α-M 7= CDMOs estimuladas con LPS y 7 μg/ml de α-mangostina. α-M 10= CDMOs estimuladas con LPS y 10 μg/ml de α-mangostina. El grupo DMSO es significativamente diferente con una ++p < 0.01 al grupo de CDMOs. El grupo es diferente significativamente con una \*\*p < 0.01 en comparación al grupo DMSO por la prueba de Kruskal-Wallis.

### 6.9 Efecto de la α-mangostina sobre los linfocitos polarizados hacia Th1 y hacia Th17

Se ha informado que la α-mangostina posee efectos sobre la proliferación y la producción de citocinas en los linfocitos (Roseghini et al., 2007). Sin embargo, hasta el momento es desconocido si esta molécula posee efectos sobre la polarización de linfocitos hacia un subtipo en particular o sobre la inducción de linfocitos Tregs. Por lo cual, se decidió investigar su efecto en la polarización de linfocitos hacia Th1 o Th17 y su capacidad de

inducir linfocitos Tregs bajo estas condiciones. Se encontró que la dosis de 5 µg/ml de α-mangostina fue capaz de lograr una disminución en la población Th17 y en la población Th1. Las dosis de 0.5, 1 y 3 µg/ml no lograron disminuir las poblaciones de linfocitos Th17 ni de linfocitos Th1 y tampoco lograron incrementar la población de linfocitos Tregs. La producción de IL-17A y de IL-10 se vio disminuida con la dosis de 5 µg/ml de α-mangostina. Sin embargo, como ya se mencionó con anterioridad, este efecto se debió a que la dosis de 5 µg/ml de α-mangostina ya ocasiona una apoptosis importante en el número de linfocitos (37.6%).

## 7 Discusión

La α-mangostina posee actividad anti-inflamatoria en varios modelos de inflamación incluyendo artritis (Ibrahim et al., 2016). Sin embargo, varios de los estudios conducidos hasta el momento han utilizado modelos de artritis que no son autoinmunes o han empleado la α-mangostina justo en el momento de la inducción de la enfermedad o aún antes de inducirla (Gopalakrishnan et al., 1980)(Lee et al., 2013)(Ibrahim et al., 2016). Por lo cual, nuestro estudio se enfocó en evaluar los efectos terapéuticos de esta xantona en la CIA establecida (un modelo de artritis autoinmune que simula varios de los eventos fisiopatológicos que suceden en la AR humana, canina y felina). Se encontró que ambas dosis de α-mangostina fueron capaces de disminuir la escala clínica de ratones con CIA establecida. Sin embargo, la dosis más efectiva fue la de 40 mg/kg, ya que esta dosis también se acompañó de una disminución significativa en la infiltración de células inflamatorias, la hiperplasia sinovial y el daño al cartílago y al hueso subcondral a nivel articular en ratones con CIA establecida. Por otro lado, es de notar que este efecto fue significativo sólo durante los primeros 18 días de tratamiento. Mientras, que el metotrexato, por el contrario, comenzó su efecto más tardíamente aproximadamente al día 16 de tratamiento. Lo cual coincide con estudios previos, en los que se ha descrito que la respuesta terapéutica al metotrexato comienza después de 3-6 semanas de iniciado el tratamiento y alcanza su máximo efecto después de 12 semanas o más en pacientes con

AR (Weinblatt, 2013). Lo anterior es interesante, ya que presenta la posibilidad que la combinación de ambos tratamientos pueda mejorar la respuesta terapéutica en pacientes con AR, ya que mientras la  $\alpha$ -mangostina estaría cubriendo tiempos tempranos de la enfermedad, el metotrexato estaría cubriendo tiempos a más largo plazo.

La disminución en la escala clínica e histopatológica en ratones con CIA establecida y tratados con  $\alpha$ -mangostina a 40 mg/kg puede ser debido en parte a la disminución en la producción de anticuerpos IgG2a anticolágena, ya que se ha descrito previamente que la producción de autoanticuerpos como el factor reumatoide, los anticuerpos contra péptidos citrulinados y anticuerpos contra componentes propios de la articulación como lo son los anticuerpos contra la colágena tipo II y algunos peptidoglicanos juegan un papel importante en la fisiopatología de la AR (Duskin and Eisenberg, 2010)(Frisenda et al., 2013)(Trouw et al., 2013). De hecho, un trabajo previamente publicado encontró que existían dos tipos distintos de pacientes con AR, aquéllos que presentaban los autoanticuerpos tradicionales encontrados en la AR como el factor reumatoide y los anticuerpos contra péptidos citrulinados y que están relacionados a una inflamación y destrucción articular tardía y aquéllos que presentaban anticuerpos contra la colágena tipo II en los cuales se presenta una inflamación y destrucción articular temprana. Ellos postularon que estos anticuerpos contra la colágena tipo II pueden formar complejos inmunes capaces de activar macrófagos y fibroblastos a nivel sinovial, los cuales una vez activados, por un lado producirán metaloproteasas y por otro lado inducirán la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y algunas quimiocinas como IL-8. Todo lo anterior contribuiría a la presentación de un proceso inflamatorio y a una destrucción articular temprana en este fenotipo de pacientes con AR (Mullazehi et al., 2012). Además, la deposición de los complejos inmunes no sólo podría darse en el tejido articular sino también en otros tejidos que se han encontrado afectados en pacientes con AR (Boissier et al., 2012)(Schaeffer et al., 2012). Con base en lo anterior la  $\alpha$ -mangostina, al reducir la producción de los anticuerpos IgG2a anticolágena, podría contribuir por un lado a modular la generación y deposición de complejos inmunes y por otro lado a limitar las respuestas tipo Th1 (ya que sólo afecta la producción de los

anticuerpos IgG2a anticólagena y no la producción de los anticuerpos IgG1 anticólagena); y de esa manera ayudar a limitar el proceso inflamatorio y la destrucción articular generada en la CIA.

Aunado a la disminución en la producción de los anticuerpos IgG2a anticólagena, otro de los efectos encontrados en este estudio que puede estar asociado a la disminución de la signología clínica y del daño articular en ratones con CIA establecida es la disminución de ciertos mediadores de la inflamación. Por ejemplo, la PGE<sub>2</sub>, la cual es un metabolito de la vía del ácido araquidónico que es producida por los condrocitos y los fibroblastos sinoviales de pacientes con AR (Hoxha, 2018). Esta PGE<sub>2</sub>, al unirse a su receptor prostanoide tipo E 4 puede aumentar la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-6 y la IL-23, ésta última al ser producida por DCs activadas va a promover la diferenciación de linfocitos Th17 en el sinovio reumático. Además de lo anterior, la unión de la PGE<sub>2</sub> a este receptor, puede también promover la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) el cual se asocia a angiogénesis y el incremento en la degradación de la colágena tipo II a nivel articular (Konya et al., 2013)(Jia et al., 2014)(Hoxha, 2018). Si bien la  $\alpha$ -mangostina no presentó una disminución significativa en la producción de este mediador de la inflamación, si presentó una tendencia a disminuir la producción del mismo a nivel articular, lo cual, podría estar limitando en parte los efectos producidos por esta prostaglandina ya mencionados con anterioridad. De hecho, el uso de un antagonista del receptor 4 de la PGE<sub>2</sub> recientemente publicado es efectivo en reducir la inflamación y el daño articular en ratones y ratas con CIA (Caselli et al., 2018).

Además del efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre la producción de PGE<sub>2</sub>, esta xantona también fue capaz de disminuir la producción de IL-6 a nivel articular en ambas dosis probadas. Este hecho es de vital importancia debido a que la IL-6 es una citocina que participa de manera importante en la fisiopatología de la AR, promoviendo la migración de neutrófilos hacia la articulación y la diferenciación de los linfocitos Th17 y, participando en la maduración de los osteoclastos y de los linfocitos B y la proliferación

del pannus. Todos estos eventos participan de manera importante en la inflamación y la destrucción del cartílago y del hueso articular que se presentan en la AR (Srirangan and Choy, 2010)(Yoshida and Tanaka, 2014). De hecho, el papel de esta citocina en la patofisiología de la AR es tan importante, que su bloqueo por anticuerpos monoclonales (tocilizumab) ha mostrado ser un tratamiento efectivo en varios ensayos clínicos de fase III en humanos (Srirangan and Choy, 2010)(Mijnheer et al., 2013) y por otra parte también se ha visto que la ausencia de esta citocina retrasa el comienzo y reduce la severidad de la CIA en ratones (Sasai et al., 1999). Además, la disminución de los niveles de esta citocina durante los primeros 12 meses de tratamiento está relacionado con mejores resultados clínicos en pacientes con AR (Yoshida and Tanaka, 2014).

Otra citocina que recientemente ha emergido por su contribución en la fisiopatología de la AR es la IL-33. Esta citocina es capaz de activar la vía de NF- $\kappa$ B y la vía de las MAPK en macrófagos generando que éstos produzcan citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 y quimiocinas como MCP-1 (Chen et al., 2017). Lo anterior, puede estar asociado a una exacerbación del fenómeno inflamatorio en la AR, ya que su administración exógena exagera la CIA en ratones (Carrasco et al., 2015)(Chen et al., 2017). La  $\alpha$ -mangostina disminuyó significativamente la expresión de esta citocina en las articulaciones de ratones con CIA establecida, lo cual también pudo contribuir a la disminución del daño articular y de la signología de artritis que se aprecia en los ratones con CIA establecida tratados con  $\alpha$ -mangostina, ya que el bloqueo de la vía de señalización de la IL-33 (T1/ST2) por anticuerpos disminuye la severidad de la CIA en ratones (Palmer et al., 2009).

Con respecto a la modulación por la  $\alpha$ -mangostina de otros mediadores de la inflamación como son las quimiocinas se encontró que la quimiocina CXC inducida por lipopolisacárido (LIX o CXCL5), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2), las proteínas inflamatorias de macrófagos MIP-1 $\alpha$  (CCL3) y MIP-1 $\beta$  (CCL4), la quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (RANTES o CCL5), la quimiocina inducida por INF $\gamma$  (MIG o CXCL9) y la proteína 10 inducida

por INF- $\gamma$  (IP-10 o CXCL10) se aumentaron en los ratones a los que se les indujo la CIA. Este hecho concuerda con lo mencionado por otros autores como Iwamoto et al., 2008 y Szekanecz et al., 2009 que reportan el incremento de estas quimiocinas en el líquido sinovial de pacientes con AR. Recientemente, varios estudios han dirigido su atención al estudio de quimiocinas que participan de manera importante en la AR y el efecto que tiene el bloqueo de las mismas en la progresión de la enfermedad encontrando algunos resultados alentadores. La  $\alpha$ -mangostina redujo significativamente la producción de LIX/CXCL5, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 y RANTES/CCL5 a nivel articular. LIX/CXCL5 es una de las principales quimiocinas involucradas en el reclutamiento de neutrófilos en ratones; además, está asociada a la producción de TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos y los mastocitos gracias a su unión con el receptor CXCR2. Adicionalmente, la ENA-78/CXCL5, el equivalente en humanos de LIX, participa de manera importante en la angiogénesis que se da en el sinovio reumático de pacientes con AR (Vieira et al., 2009). Por su parte, IP-10 cuyo receptor es CXCR3 es expresada en macrófagos infiltrantes y fibroblastos sinoviales en el sinovio de pacientes con AR. Recientemente, esta quimiocina se ha encontrado elevada a nivel tisular y sérico en animales con CIA y se ha visto que RANKL promueve su expresión en células precursoras de osteoclastos y que esta quimiocina a su vez modula la expresión de RANKL en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, lo cual puede ser responsable de iniciar o agravar la inflamación y el daño articular que se genera en la AR. Así mismo, se ha visto que el bloqueo de esta quimiocina incrementa la tasa de respuesta a la terapia con metotrexato en pacientes con AR con una inadecuada respuesta a este fármaco en un ensayo clínico de fase II humano (Antonelli et al., 2014). Aunado al papel de IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 es otra quimiocina implicada en el reclutamiento de linfocitos T activados y linfocitos Th1 que también es expresada en los fibroblastos sinoviales de pacientes con AR y es inducida por la presencia de INF- $\gamma$ . Se ha descrito que esta quimiocina está involucrada en la infiltración temprana de células plasmáticas dentro del sinovio reumático, lo cual se encuentra asociado a la generación de autoanticuerpos (Tsubaki et al., 2005)(Iwamoto et al., 2008). Además, la participación en conjunto de las quimiocinas IP-10/CXCL10 y RANTES/CCL5 pueden aumentar la actividad proteolítica de los fibroblastos sinoviales, ya que incrementan su producción de colagenasa y gelatinasa

(Iwamoto et al., 2008). MIP-1 $\alpha$ /CCL3 junto con RANTES/CCL5 son dos quimiocinas que generan quimiotaxis hacia células T, monocitos y células NK (Natural Killer) en la AR (Collins et al., 2017). Además, RANTES/CCL5 es expresada por linfocitos T activados, fibroblastos sinoviales y células mononucleares del sinovio reumático de pacientes con AR (Mellado et al., 2015). Esta quimiocina participa en la expresión de iNOS e IL-6 y la producción de MMP-3 en los condrocitos y en la inhibición de la síntesis de proteoglicanos en estas mismas células, contribuyendo de esta forma a la degradación del cartílago articular en pacientes con AR (Iwamoto et al., 2008). Con base en lo anterior, la disminución de estas quimiocinas por la  $\alpha$ -mangostina a nivel articular podría no sólo estar implicada en la disminución en el reclutamiento de células inflamatorias hacia la articulación sino también en la disminución del daño articular y en el retraso en la aparición de los signos de la enfermedad observado en los ratones con CIA establecida.

Debido a la estrecha relación que existe entre la inflamación y el estrés oxidante en diversas patologías inflamatorias incluida la AR, las EROs y las ERNs han sido consideradas elementos importantes que participan en la perpetuación de la inflamación y el daño al cartílago que se presenta en la AR (Mateen et al., 2016). Además, se ha determinado que varias EROs y ERNs se encuentran incrementadas en pacientes con AR, presumiblemente por el incremento en su producción por neutrófilos y monocitos que infiltran la articulación, mientras que varias de las enzimas que participan en la defensa antioxidante se encuentran disminuidas debido a su consumo durante esta patología. Lo anterior genera un desequilibrio en el balance oxido-reducción a favor del primero generando un estrés oxidante que conlleva al daño a proteínas, lípidos y DNA en pacientes con AR (Quinonez-Flores et al., 2016). Aunado a lo anterior, las EROs y las ERNs pueden hacer resistentes a la apoptosis a los linfocitos autoreactivos que se encuentran en la articulación y generar mutaciones en el gen p53 en los fibroblastos sinoviales, lo cual les confiere su característica altamente invasiva (Hitchon and El-Gabalawy, 2004)(Griffiths, 2005)(Quinonez-Flores et al., 2016). En nuestro estudio, los ratones con CIA establecida presentaron un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa y la lipoperoxidación así como una depleción en los niveles de GSH a nivel articular, lo cual significó la presencia de

estrés oxidante a este nivel. La  $\alpha$ -mangostina disminuyó la actividad de la NADPH oxidasa a nivel articular en ratones con CIA establecida, lo cual a su vez podría contribuir a la disminución en la generación de  $O_2^{\cdot -}$  por esta enzima y por lo tanto del estrés oxidante; y al incremento en la protección del sistema de defensa antioxidante. Aunado a lo anterior, la disminución en la actividad de esta enzima también podría participar en la disminución del fenómeno inflamatorio en la CIA establecida, ya que las EROs generadas por esta enzima pueden activar la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B y por lo tanto la generación de citocinas y enzimas que participan en la inflamación. Por otro lado, la  $\alpha$ -mangostina también fue eficiente en la reducción de la producción de MDA (un producto final de la lipoperoxidación) a nivel articular y en la preservación de los niveles de GSH en la articulación.

La  $\alpha$ -mangostina posee propiedades anti-inflamatorias en algunos tipos celulares del sistema inmune como en la línea celular de macrófagos RAW 264.5 en la que es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico y  $PGE_2$ , así como la expresión de la enzima iNOS en estas células después de haber sido estimuladas con LPS. Por otro lado, también la  $\alpha$ -mangostina ha demostrado efectos sobre algunas células que participan de manera importante en la AR como en la línea MH7A de fibroblastos sinoviales provenientes de humanos con AR en los que genera apoptosis (Chen et al., 2008)(Zhang et al., 2018). Sin embargo, el efecto de la  $\alpha$ -mangostina sobre células dendríticas y linfocitos Th1 y Th17, células clave en la fisiopatología de la AR, aún es desconocido, por lo cual se decidió en este estudio investigar su efecto sobre estas células. Se ha demostrado en diversos estudios que los pacientes con AR presentan un incremento de DCs en el tejido sinovial y que éstas tienen un aumento en la expresión de marcadores de activación y por lo tanto, un incremento en su capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T y su producción de citocinas (INF- $\gamma$ , IL-17 e IL-4) bajo estimulación (Yu and Langridge, 2017). En este estudio se demostró que la  $\alpha$ -mangostina fue capaz de disminuir la expresión de las moléculas de activación CD86 y CD40 en CDMO activadas con LPS, lo cual podría tener impacto sobre la presentación de antígenos propios a linfocitos T autoreactivos y de esta manera modular el daño a la articulación. Aunado a lo anterior, la  $\alpha$ -mangostina también

fue capaz de disminuir la producción de IL-12 (p70) y mostró una tendencia a disminuir la producción de INF- $\gamma$  en estas células activadas con LPS, lo cual podría estar limitando las respuestas tipo Th1 que participan de manera importante en la fisiopatología de la artritis reumatoide (Mosmann and Coffman, 1989). También se encontró que la  $\alpha$ -mangostina incrementó la producción de IL-10 en CDMO activadas con LPS, lo cual podría ayudar a disminuir la inflamación en un cuadro inflamatorio como el que se presenta en la artritis reumatoide, ya que la IL-10 es una de las principales citocinas relacionadas con el control de diversas patologías inflamatorias (Lyer and Cheng, 2013)(Siqueira Mietto et al., 2015)(Ip et al., 2017).

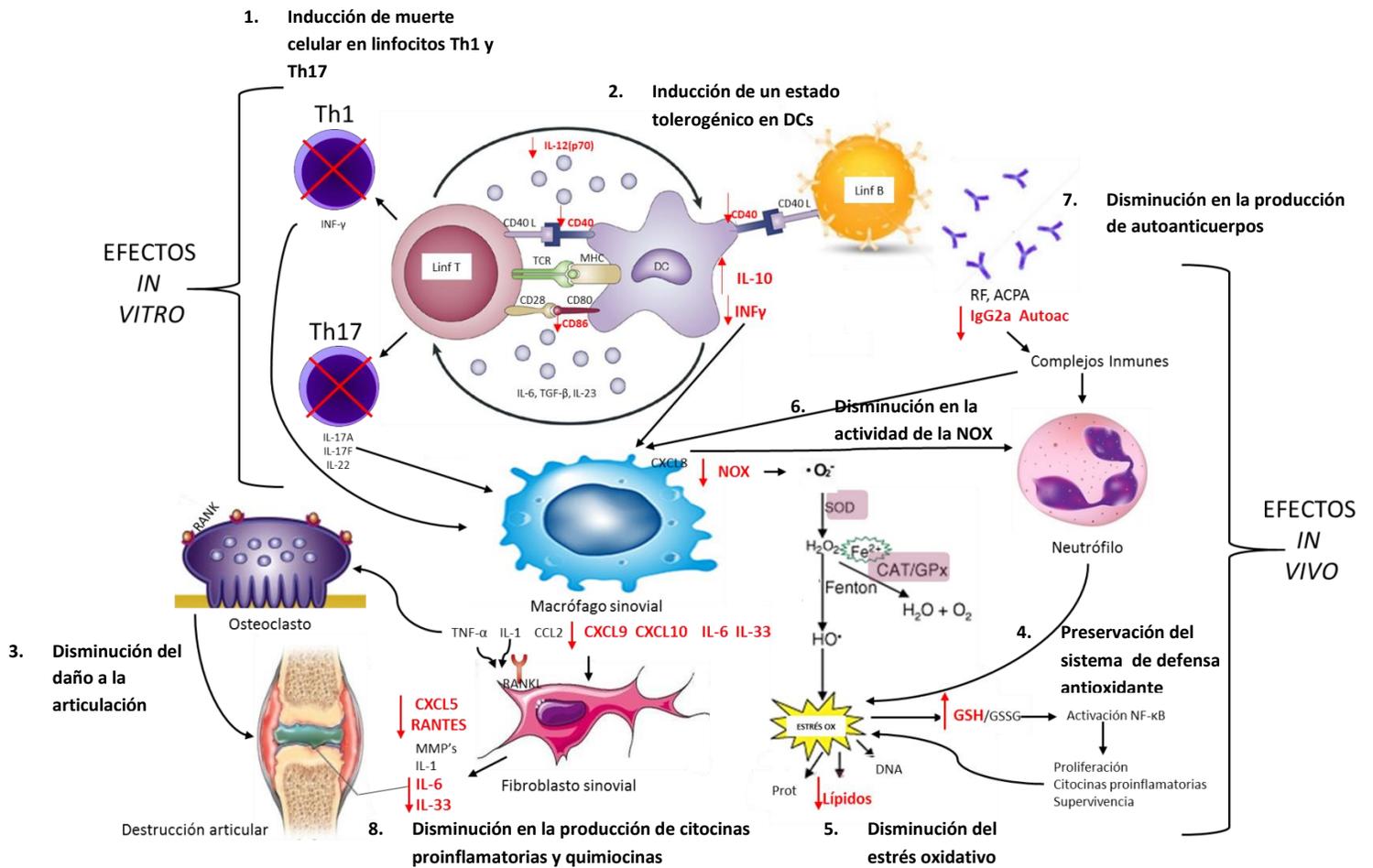
Los linfocitos Th1 y Th17 son de las principales células del sistema inmune adaptativo involucradas en la fisiopatología de la AR. Se ha demostrado que los linfocitos Th17 se encuentran incrementados en el suero, la médula ósea y en el líquido sinovial de pacientes con AR, donde participan en la destrucción del cartílago articular a través de la producción de IL-17A, la cual participa en la osteoclastogénesis y en el reclutamiento de neutrófilos hacia la articulación (Gaffen, 2009)(Sarkar et al., 2010)(Kotake et al., 2017). Por otro lado, los linfocitos Th1 también se han asociado a la osteoclastogénesis, ya que incrementan la expresión del ligando del receptor activador de NF- $\kappa$ B (RANKL) y también se ha visto que se encuentran aumentados tanto en el líquido sinovial como en la médula ósea de pacientes con AR (Li et al., 2017). Estos dos subtipos de linfocitos en algún momento durante la AR van a tratar de ser contrarrestados por la población T reguladora a nivel articular, sin embargo, estos últimos pueden verse sobrepasados por los primeros en número o los linfocitos T reguladores pueden llegar a ser disfuncionales o incluso revertir su fenotipo hacia un fenotipo Th17 durante el proceso de la enfermedad, lo cual conlleva a una perpetuación de la inflamación y del daño articular (de Kleer et al., 2004)(Van Amelsfort et al., 2007)(Oh et al., 2010). Por todo lo anterior, en nuestro estudio se decidió investigar la capacidad de la  $\alpha$ -mangostina para favorecer la polarización de linfocitos hacia un fenotipo regulador bajo condiciones polarizantes hacia Th1 o Th17, ya que algunos polifenoles disminuyen la generación de linfocitos Th1 y Th17 mientras promueven la inducción de linfocitos T reguladores en algunos modelos

animales de artritis (Rogers et al., 2010)(Park et al., 2011)(Xuzhu et al., 2012). En nuestro estudio se demostró que la  $\alpha$ -mangostina no fue capaz de favorecer un fenotipo regulador bajo condiciones polarizantes hacia Th1 o Th17; sin embargo, sí generó apoptosis de estas dos poblaciones, lo cual podría tener impacto en la disminución de la inflamación durante la CIA, ya que estas células promueven y perpetúan el fenómeno inflamatorio durante la enfermedad. Aunado a lo anterior, varios polifenoles incluyendo el resveratrol, presentan como parte de su mecanismo de acción la generación de apoptosis de linfocitos T activados, lo cual está relacionado con sus propiedades anti-inflamatorias en diversas enfermedades (Radkar et al., 2007).

Finalmente, los efectos anti-inflamatorios y antioxidantes de la  $\alpha$ -mangostina sobre la CIA establecida en ratones encontrados en este estudio son resumidos en el diagrama 1. Sus efectos *in vivo* e *in vitro* sobre células dendríticas y linfocitos polarizados hacia Th1 y Th17 son presentados.

## 8 Conclusiones

En conclusión, se demostró que la  $\alpha$ -mangostina podría ser eficiente como terapéutico en la CIA establecida en ratones durante la fase temprana de la enfermedad (primeros 18 días de tratamiento), ya que fue capaz de reducir los signos clínicos y el daño articular a través de la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, modulación del estrés oxidante, inducción de un fenotipo regulador en células dendríticas y la generación de apoptosis de linfocitos Th1 y Th17. Sin embargo, no se logró mantener este efecto a largo plazo; por lo tanto, será interesante en futuros estudios evaluar la combinación de esta molécula con algún otro fármaco anti-reumático modificador de la enfermedad (DMARD) que cubra tiempos más tardíos como el metotrexato y evaluar así la eficacia en el control de la enfermedad a largo plazo.



**Diagrama 1.** Representación esquemática de los efectos *in vitro* de la  $\alpha$ -mangostina sobre las células dendríticas activadas con LPS y los linfocitos polarizados hacia Th1 y Th17 así como de sus efectos anti-inflamatorios y antioxidantes en la terapéutica de la CIA establecida en ratones DBA/1J. Th= Linfocitos T cooperadores, DC= Célula Dendrítica, Linf B= Linfocito B, Linf T= Linfocito T, IL= Interleucina, INF- $\gamma$ = Interferón gamma, IgG2a Autoac= Autoanticuerpos IgG2a anticógena II, RF= Factor reumatoide, ACPA= Autoanticuerpos contra péptidos citrulinados, NOX= NADPH oxidasa, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>= Anión superóxido, SOD= Superóxido dismutasa, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= Peróxido de hidrógeno, CAT= Catalasa, GPx= Glutación peroxidasa, HO<sup>•</sup>= Radical hidróxilo, GSH= Glutación, GSSG= Glutación disulfuro, NF- $\kappa$ B= Factor nuclear  $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ = Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , TGF- $\beta$ = Factor de crecimiento transformador  $\beta$ , RANTES= Quimiocina regulada, expresada y secretada por la activación de linfocitos T normales, RANK= Receptor activador del Factor nuclear  $\kappa$ B, RANKL= Ligando del Receptor activador del Factor nuclear  $\kappa$ B, MMP's= Metaloproteinasas de matriz

## 9 Perspectivas

- ✓ Evaluar el efecto terapéutico de la combinación de la  $\alpha$ -mangostina con algún

otro DMARD como el metotrexato en el control de la inflamación y el daño articular en la CIA establecida.

✓ Evaluar el efecto de distintas concentraciones de la  $\alpha$ -mangostina sobre otros tipos celulares claves en la fisiopatología de la AR como condrocitos, osteoclastos, etc.

✓ Evaluar que vías de señalización pueden estar involucradas en el control de la inflamación por la  $\alpha$ -mangostina como NF- $\kappa$ B, la vía de las MAPK, SIRT-1, etc.

## 10 Bibliografía

1. Aebi, H., 1984. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
2. Ahmed, S., Wang, N., Lalonde, M., Goldberg, V., Haqqi, T., 2003. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Differentially Inhibits Interleukin-1 -Induced Expression of Matrix Metalloproteinase-1 and -13 in Human Chondrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 767–73. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.059220>
3. Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 701–721. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
4. Alam, J., Jantan, I., Nasir, S., Bukhari, A., 2017. Rheumatoid arthritis : Recent advances on its etiology , role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 92, 615–633. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.055>
5. Alamanos, Y., Drosos, A.A., 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 4, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.09.002>

6. Anderson, A.E., Isaacs, J.D., 2008. Tregs and Rheumatoid Arthritis. *Acta Reumatol. Port.* 33, 17–33.
7. Andriamanalijaona, R., Baugé, C., Renard, E., Legendre, F., Raoudi, M., Kyriotou, M., Boumediene, K., Gatto, H., Monginoux, P., Pujol, J.P., 2005. Comparative effects of 2 antioxidants, selenomethionine and epigallocatechin-gallate, on catabolic and anabolic gene expression of articular chondrocytes. *J. Rheumatol.* 32, 1658–67. <https://doi.org/0315162X-32-1958> [pii]
8. Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Étienne-Selloum, N., Li, H., Martínez, M.C., Schini-Kerth, V.B., Laher, I., 2012. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br. J. Nutr.* 108, 1532–49. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003406>
9. Antonelli, A., Ferrari, S.M., Giuggioli, D., Ferrannini, E., Ferri, C., Fallahi, P., 2014. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 13, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.10.010>
10. Arend, W.P., 2001. The innate immune system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44, 2224–34. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)44:10<2224::AID-ART384>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)44:10<2224::AID-ART384>3.0.CO;2-H)
11. Banchereau, J., Pascual, V., O’Garra, A., 2012. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* 13, 925–931. <https://doi.org/10.1038/ni.2406>
12. Bar-Shai, M., Reznick, A.Z., 2006. Reactive nitrogen species induce nuclear factor- $\kappa$ B-mediated protein degradation in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 2112–25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.009>
13. Bell, S.C., Carter, S.D., Bennett, D., 1991. Canine distemper viral antigens and antibodies in dogs with rheumatoid arthritis. *Res. Vet. Sci.* 50, 64–68. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90054-R](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90054-R)
14. Bettelli, E., Dastrange, M., Oukka, M., 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5138–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501675102>

15. Birbara, C., 2012. Management of inadequate response to TNF- $\alpha$  antagonist therapy in rheumatoid arthritis: what are the options? *Internet J. Rheumatol.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.5580/1ddb>
16. Boissier, M.C., Semerano, L., Challal, S., Saidenberg-Kermanac'h, N., Falgarone, G., 2012. Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J. Autoimmun.* 39, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.05.021>
17. Bumrungpert, A., Kalpravidh, R.W., Chitchumroonchokchai, C., Chuang, C.-C., West, T., Kennedy, A., McIntosh, M., 2009. Xanthones from mangosteen prevent lipopolysaccharide-mediated inflammation and insulin resistance in primary cultures of human adipocytes. *J. Nutr.* 139, 1185–91. <https://doi.org/10.3945/jn.109.106617>
18. Camps, M., Rückle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, F., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Françon, B., Martin, T., Gretener, D., Perrin, D., Leroy, D., Vitte, P.-A., Hirsch, E., Wymann, M.P., Cirillo, R., Schwarz, M.K., Rommel, C., 2005. Blockade of PI3K $\gamma$  suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 11, 936–43. <https://doi.org/10.1038/nm1284>
19. Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480. <https://doi.org/5480>
20. Carrasco, T.G., Morales, R.A., Pérez, F., Terraza, C., Yáñez, L., Campos-Mora, M., Pino-Lagos, K., 2015. Alarmin' immunologists: IL-33 as a putative target for modulating T cell-dependent responses. *Front. Immunol.* 6, 4–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00232>
21. Carter, S.D., Barnes, A., Gilmore, W.H., 1999. Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 69, 201–214. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00054-9)
22. Carter, S.D., Bell, S.C., Bari, A.S.M., Bennett, D., 1989. Immune complexes and rheumatoid factors in canine arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* 48, 986–991. <https://doi.org/10.1136/ard.48.12.986>
23. Caselli, G., Bonazzi, A., Lanza, M., Ferrari, F., Maggioni, D., Ferioli, C., Giambelli, R., Comi, E., Zerbi, S., Perrella, M., Letari, O., Di Luccio, E., Colovic, M., Persiani, S., Zanelli, T., Mennuni, L., Piepoli, T., Rovati, L.C., 2018. Pharmacological characterisation of CR6086, a

- potent prostaglandin E2receptor 4 antagonist, as a new potential disease-modifying anti-rheumatic drug. *Arthritis Res. Ther.* 20, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1537-8>
24. Cerhan, J.R., Saag, K.G., Merlino, L.A., Mikuls, T.R., Criswell, L.A., 2003. Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. *Am. J. Epidemiol.* 157, 345–354. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf205>
25. Chae, H.S., Oh, S.R., Lee, H.K., Joo, S.H., Chin, Y.W., 2012. Mangosteen xanthones,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -mangostins, inhibit allergic mediators in bone marrow-derived mast cell. *Food Chem.* 134, 397–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.075>
26. Chairungsrilerd, N., Furukawa, K., Ohta, T., Nozoe, S., Ohizumi, Y., 1996. Pharmacological properties of alpha-mangostin, a novel histamine H1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 314, 351–6.
27. Chen, L.G., Yang, L.L., Wang, C.C., 2008. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food Chem. Toxicol.* 46, 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.096>
28. Chen, S., Chen, B., Wen, Z., Huang, Z., Ye, L., 2017. IL-33/ST2-mediated inflammation in macrophages is directly abrogated by IL-10 during rheumatoid arthritis. *Oncotarget* 8, 32407–32418. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16299>
29. Cho, M. La, Heo, Y.J., Park, M.K., Oh, H.J., Park, J.S., Woo, Y.J., Ju, J.H., Park, S.H., Kim, H.Y., Min, J.K., 2009. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. *Immunol. Lett.* 124, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.05.001>
30. Choi, S.I., Brahn, E., 2010. Rheumatoid arthritis therapy: Advances from bench to bedside. *Autoimmunity* 43, 478–92. <https://doi.org/10.3109/08916931003674717>
31. Choi, Y., Arron, J.R., Townsend, M.J., 2009. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 543–8. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.175>
32. Choi, Y.H., Han, S.Y., Kim, Y.J., Kim, Y.M., Chin, Y.W., 2014. Absorption, tissue distribution, tissue metabolism and safety of alpha-mangostin in mangosteen extract using mouse models. *Food Chem. Toxicol.* 66, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.028>
33. Choy, E., 2012. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of

rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51, v3–v11.  
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes113>

34. Choy, E., Panayi, F., 2001. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 344, 907–16.
35. Collins, F.L., Williams, J.O., Bloom, A.C., Singh, R.K., Jordan, L., Stone, M.D., McCabe, L.R., Wang, E.C.Y., Williams, A.S., 2017. CCL3 and MMP-9 are induced by TL1A during death receptor 3 (TNFRSF25)-dependent osteoclast function and systemic bone loss. *Bone* 97, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.002>
36. Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D. a a, 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
37. de Kleer, I.M., Wedderburn, L.R., Taams, L.S., Patel, A., Varsani, H., Klein, M., de Jager, W., Pugayung, G., Giannoni, F., Rijkers, G., Albani, S., Kuis, W., Prakken, B., 2004. CD4+CD25bright Regulatory T Cells Actively Regulate Inflammation in the Joints of Patients with the Remitting Form of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J. Immunol.* 172, 6435–6443. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6435>
38. Deschamps, J.D., Gautschi, J.T., Whitman, S., Johnson, T.A., Gassner, N.C., Crews, P., Holman, T.R., 2007. Discovery of platelet-type 12-human lipoxygenase selective inhibitors by high-throughput screening of structurally diverse libraries. *Bioorganic Med. Chem.* 15, 6900–6908. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.015>
39. Doi, H., Shibata, M.A., Shibata, E., Morimoto, J., Akao, Y., Iinuma, M., Tanigawa, N., Otsuki, Y., 2009. Panaxanthone isolated from pericarp of *Garcinia mangostana* L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer. *Anticancer Res.* 29, 2485–2495. <https://doi.org/VL - 29>
40. Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
41. Durie, F.H., Fava, R.A., Foy, T.M., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Noelle, R.J., 1993. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* (80-. ). 261, 1328–30. <https://doi.org/10.1126/science.7689748>
42. Duskin, A., Eisenberg, R.A., 2010. The role of antibodies in inflammatory arthritis.

- Immunol. Rev. 233, 112–125. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00856.x>
43. Edwards, J.C., 1994. The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *J. Anat.* 184 ( Pt 3, 493–501.
44. Ee, G.C.L., Daud, S., Taufiq-Yap, Y.H., Ismail, N.H., Rahmani, M., 2006. Xanthones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat. Prod. Res.* 20, 1067–1073. <https://doi.org/10.1080/14786410500463114>
45. Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D. a, Mauri, C., 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* 200, 277–285. <https://doi.org/10.1084/jem.20040165>
46. Epstein, J., Docena, G., MacDonald, T.T., Sanderson, I.R., 2010. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. *Br. J. Nutr.* 103, 824–32. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992510>
47. Ernst, P.B., Garrison, J.C., Thompson, L.F., 2010. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology. *J Immunol Ref. J. Immunol.* 185, 1993–1998. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000108>
48. Estrada-Capetillo, L., Hernández-Castro, B., Monsiváis-Urenda, A., Alvarez-Quiroga, C., Layseca-Espinosa, E., Abud-Mendoza, C., Baranda, L., Urzainqui, A., Sánchez-Madrid, F., González-Amaro, R., 2013. Induction of Th17 lymphocytes and Treg cells by monocyte-derived dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 584303. <https://doi.org/10.1155/2013/584303>
49. Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N., 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal. Biochem.* 190, 212–219. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90183-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90183-A)
50. Filippin, L.I., Vercelino, R., Marroni, N.P., Xavier, R.M., 2008. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 152, 415–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03634.x>
51. Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., Anderton, S.M., 2002. B cells

- regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944–50.  
<https://doi.org/10.1038/ni833>
52. Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356–61.  
<https://doi.org/10.1038/nature01661>
53. Fitzpatrick, L.R., Green, C., Frauenhoffer, E.E., French, K.J., Zhuang, Y., Maines, L.W., Upson, J.J., Paul, E., Donahue, H., Mosher, T.J., Smith, C.D., 2011. Attenuation of arthritis in rodents by a novel orally-available inhibitor of sphingosine kinase. *Inflammopharmacology* 19, 75–87. <https://doi.org/10.1007/s10787-010-0060-6>
54. Flores-Borja, F., Mauri, C., Ehrenstein, M.R., 2008. Restoring the balance: Harnessing regulatory T cells for therapy in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 38, 934–935.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200738107>
55. Flores-García, Y., Talamás-Rohana, P., 2012. Interleucina 17, funciones biológicas y su receptor. *Reb* 31, 3–9.
56. Frisenda, S., Perricone, C., Valesini, G., 2013. Cartilage as a target of autoimmunity: A thin layer. *Autoimmun. Rev.* 12, 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.10.003>
57. Gaffen, S.L., 2009. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 11, 365–370. <https://doi.org/10.1007/s11926-009-0052-y>
58. García-gonzález, A., Gaxiola-robles, R., Zenteno-savín, T., 2015. Oxidative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Rev. Investig. clínica* 67, 46–53.
59. Geboes, L., Dumoutier, L., Kelchtermans, H., Schurgers, E., Mitera, T., Renauld, J.C., Matthys, P., 2009. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum.* 60, 390–395.  
<https://doi.org/10.1002/art.24220>
60. Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.-C., Chaudière, J., 1998. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1176–1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>
61. Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G., Mirshafiey, A., 2012. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis* 2012, 805875. <https://doi.org/10.1155/2012/805875>

62. González-Gallego, J., Victoria García-Mediavilla, M., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., 2010. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br. J. Nutr.* 104, S15–S27. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003910>
63. González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M.D., Zarzuelo, a, Martínez-Augustin, O., Sánchez de Medina, F., 2011. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 331–362. <https://doi.org/10.1080/10408390903584094>
64. Gopalakrishnan, C., Shankaranarayanan, D., Kameswaran, L., Nazimudeen, S.K., 1980. Effect of mangostin, a xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. in immunopathological & inflammatory reactions. *Indian J. Exp. Biol.* 18, 843–846.
65. Grande, J.P., Croatt, A.J., 2003. Animal Model. *Am. J. Pathol.* 162, 2079–2090. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.08.004.Laterality>
66. Gravalles, E.M., Goldring, S.R., 2000. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 2143–51.
67. Griffiths, H.R., 2005. ROS as signalling molecules in T cells—evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. *Redox Rep* 10, 273–280. <https://doi.org/10.1179/135100005X83680>
68. Gutierrez-orocho, F., Chitchumroonchokchai, C., Lesinski, G.B., Suksamrarn, S., Failla, M.L., 2013.  $\alpha$ -Mangostin: Anti-Inflammatory Activity and Metabolism by Human Cells. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3891–3900.
69. Gutierrez-Orozco, F., Thomas-Ahner, J.M., Berman-Booty, L.D., Galley, J.D., Chitchumroonchokchai, C., Mace, T., Suksamrarn, S., Bailey, M.T., Clinton, S.K., Lesinski, G.B., Failla, M.L., 2014. Dietary  $\alpha$ -mangostin, a xanthone from mangosteen fruit, exacerbates experimental colitis and promotes dysbiosis in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1226–1238. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300771>
70. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139. <https://doi.org/10.14026/j.cnki.0253-9705.2010.23.013>
71. Hanna, F.Y., 2005. Disease modifying treatment for feline rheumatoid arthritis. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 18, 94–99.

72. Haqqi, T.M., Anthony, D.D., Gupta, S., Ahmad, N., Lee, M.S., Kumar, G.K., Mukhtar, H., 1999. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4524–4529. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4524>
73. Haskó, G., Cronstein, B., 2013. Regulation of inflammation by adenosine. *Front. Immunol.* 4, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00085>
74. Haynes, D.R., 2007. Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 9, 104. <https://doi.org/10.1186/ar2213>
75. He, Y., Li, J., Zhuang, W., Yin, L., Chen, C., Li, J., Chi, F., Bai, Y., Chen, X.-P., 2010. The inhibitory effect against collagen-induced arthritis by *Schistosoma japonicum* infection is infection stage-dependent. *BMC Immunol.* 11, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-28>
76. Hegemann, N., Wondimu, A., Ullrich, K., Schmidt, M.F.G., 2003. Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00005-9)
77. Henrotin, Y.E., Bruckner, P., Pujol, J.P.L., 2003. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 11, 747–755. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(03\)00150-X](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(03)00150-X)
78. Hewicker-Trautwein, M., Carter, S.D., Bennett, D., Kelly, D.F., 1999. Immunocytochemical demonstration of lymphocyte subsets and MHC class II antigen expression in synovial membranes from dogs with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 341–357. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00229-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00229-3)
79. Hirano, T., 2010. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 86, 717–30. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.717>
80. Hitchon, C.A., El-Gabalawy, H.S., 2011. The synovium in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol. J.* 5, 107–14. <https://doi.org/10.2174/1874312901105010107>
81. Hitchon, C.A., El-Gabalawy, H.S., 2004. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6, 265. <https://doi.org/10.1186/ar1447>

82. Hou, Y., Wu, J., Huang, Q., Guo, L., 2009. Luteolin inhibits proliferation and affects the function of stimulated rat synovial fibroblasts. *Cell Biol. Int.* 33, 135–47. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.10.005>
83. Hoxha, M., 2018. A systematic review on the role of eicosanoid pathways in rheumatoid arthritis. *Adv. Med. Sci.* 63, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.06.004>
84. Hughes, S.D., Ketheesan, N., Haleagrahara, N., 2017. The therapeutic potential of plant flavonoids on rheumatoid arthritis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 3601–3613. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1246413>
85. Ibrahim, M.Y., Hashim, N.M., Mariod, A.A., Mohan, S., Abdulla, M.A., Abdelwahab, S.I., Arbab, I.A., 2016.  $\alpha$ -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn: An updated review of its pharmacological properties. *Arab. J. Chem.* 9, 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.02.011>
86. Ip, W.K.E., Hoshi, N., Shouval, D.S., Snapper, S., Medzhitov, R., 2017. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science (80-. )*. 356, 513–519. <https://doi.org/10.1126/science.aal3535>
87. Islam, M.A., Alam, F., Solayman, M., Khalil, M.I., Kamal, M.A., Gan, S.H., 2016. Dietary Phytochemicals: Natural Swords Combating Inflammation and Oxidation-Mediated Degenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 5137431. <https://doi.org/10.1155/2016/5137431>
88. Itoh, T., Ohguchi, K., Iinuma, M., Nozawa, Y., Akao, Y., 2008. Inhibitory effect of xanthenes isolated from the pericarp of *Garcinia mangostana* L. on rat basophilic leukemia RBL-2H3 cell degranulation. *Bioorganic Med. Chem.* 16, 4500–4508. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.054>
89. Iwamoto, T., Okamoto, H., Toyama, Y., Momohara, S., 2008. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: Chemokines in the joints of patients. *FEBS J.* 275, 4448–4455. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06580.x>
90. Jang, H.Y., Kwon, O.K., Oh, S.R., Lee, H.K., Ahn, K.S., Chin, Y.W., 2012. Mangosteen xanthenes mitigate ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4042–4050. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.037>
91. Ji, X., Avula, B., Khan, I.A., 2007. Quantitative and qualitative determination of six

- xanthenes in *Garcinia mangostana* L . by LC – PDA and LC – ESI-MS. *Water*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.10.018>
92. Jia, X.Y., Chang, Y., Sun, X.J., Dai, X., Wei, W., 2014. The role of prostaglandin E2 receptor signaling of dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 23, 163–169.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.024>
93. Jung, H.-A., Su, B.-N., Keller, W.J., Mehta, R.G., Kinghorn, A.D., 2006. Antioxidant Xanthenes from the Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J. Agric. Food Chem.* 54, 2077–2082. <https://doi.org/10.1021/jf052649z>
94. Katayama, M., Ohmura, K., Yukawa, N., Terao, C., Hashimoto, M., Yoshifuji, H., Kawabata, D., Fujii, T., Iwakura, Y., Mimori, T., 2013. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of Arthritis. *PLoS One* 8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062231>
95. Katayama, S., Kukita, T., Ishikawa, E., Nakashima, S., Masuda, S., Kanda, T., Akiyama, H., Teshima, R., Nakamura, S., 2013. Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells. *Food Chem.* 138, 757–761.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.076>
96. Khan, A.Q., Zubair, S., Mateen, S., Zafar, A., Moin, S., 2016. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta* 455, 161–171.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.02.010>
97. Khatlani, T.S., Ma, Z., Okuda, M., Inokuma, H., Onishi, T., 2003. Autoantibodies against T-Cell costimulatory molecules are produced in canine autoimmune diseases. *J. Immunother.* 26, 12–20.
98. Kim, H.M., Kim, Y.M., Huh, J.H., Lee, E.S., Kwon, M.H., Lee, B.R., Ko, H., Chung, C.H., 2017.  $\alpha$ -Mangostin ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance by inhibition C-C chemokine receptor 2. *PLoS One* 12, 1–16.
99. Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 229–45.  
<https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ04003X>
100. Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin.*

Nutr. 76, 560–568.

101. Kobayashi, S., Momohara, S., Kamatani, N., Okamoto, H., 2008. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: Role of environmental factors. *FEBS J.* 275, 4456–4462. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06581.x>
102. Komatsu, N., Takayanagi, H., 2012. *Autoimmune Arthritis. The Interface Between the Immune System and Joints.*, 1st ed, *Advances in Immunology.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394299-9.00002-3>
103. Konya, V., Marsche, G., Schuligoi, R., Heinemann, A., 2013. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol. Ther.* 138, 485–502. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.03.006>
104. Kotake, S., Yago, T., Kobashigawa, T., Nanke, Y., 2017. The Plasticity of Th17 Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Med.* 6, 67. <https://doi.org/10.3390/jcm6070067>
105. Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Koyasu, S., 2013. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes to Cells* 18, 247–265. <https://doi.org/10.1111/gtc.12039>
106. Lambert, N., Lescoulié, P.L., Yassine-Diab, B., Enault, G., Mazières, B., De Préval, C., Cantagrel, A., 1998. Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 269–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00621.x>
107. Laurindo, I.M.M., Mello, S.B.V., Cossermelli, W., 1995. Influence of low doses of methotrexate on superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 22, 633–8.
108. Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90747-6)
109. Lee, L.T., Tsai, Y.F., Hu, N.Y., Wang, C.W., Huang, K.K., Hsiao, J.K., Shih, Y.C., Munekazu, I., 2013. Anti-arthritis effect of mangostins from *G.Mangostana*. *Biomed. Prev. Nutr.* 3, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.10.002>
110. Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C.,

- Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Regev, A., Kuchroo, V.K., 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* 13, 991–999. <https://doi.org/10.1038/ni.2416>; 10.1038/ni.2416
111. Lee, Y., Kuchroo, V., 2015. Defining the functional states of Th17 cells. *F1000Research* 4, 1–7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6116.1>
112. Leech, M.T., Morand, E.F., 2013. Fibroblasts and synovial immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 565–569. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.04.001>
113. Lemetayer, J., Taylor, S., 2014. Inflammatory joint disease in cats. *J. Feline Med. Surg.* 16, 547–562. <https://doi.org/10.1177/1098612x14539086>
114. Li, Q., Han, D., Cong, B., Shan, B., Zhang, J., Chen, H., Ma, C., Liyanage, S.S., 2011. Cholecystokinin octapeptide significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice by inhibiting Th17 polarization primed by dendritic cells. *Cell. Immunol.* 272, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.09.007>
115. Li, S., Yin, H., Zhang, K., Wang, T., Yang, Y., Liu, X., Chang, X., Zhang, M., Yan, X., Ren, Y., Pan, W., Zhang, L., 2017. Effector T helper cell populations are elevated in the bone marrow of rheumatoid arthritis patients and correlate with disease severity. *Sci. Rep.* 7, 4776. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05014-8>
116. Liacini, A., Sylvester, J., Li, W.Q., Huang, W., Dehnade, F., Ahmad, M., Zafarullah, M., 2003. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF- $\alpha$  is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF- $\kappa$ B transcription factors in articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 288, 208–17. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00180-0)
117. Liew, F.Y., Pitman, N.I., McInnes, I.B., 2010. Disease-associated functions of IL-33: The new kid in the IL-1 family. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 103–10. <https://doi.org/10.1038/nri2692>
118. Liu, Y., Park, J.M., Chang, K.H., Chin, Y.W., Lee, M.Y., 2015.  $\alpha$ - and  $\gamma$ -mangostin cause shape changes, inhibit aggregation and induce cytolysis of rat platelets. *Chem. Biol. Interact.* 240, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.021>
119. Lubberts, E., 2010. Th17 cytokines and arthritis. *Semin. Immunopathol.* 32, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0189-9>
120. Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G.,

1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77–92. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00204-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00204-X)
121. Lyer, S.S., Cheng, G., 2013. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and autoimmune disease. *Natl. Inst. Heal.* 10, 54–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2250.Digestion>
122. Magrone, T., Jirillo, E., 2010. Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness. *Proc. Nutr. Soc.* 69, 279–285. <https://doi.org/10.1017/S0029665110000121>
123. Mateen, S., Moin, S., Zafar, A., Khan, A.Q., 2016. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clin. Chim. Acta* 463, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.10.007>
124. Mauri, C., Ehrenstein, M.R., 2008. The “short” history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 29, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.10.004>
125. May, C., Hughes, D.E., Carter, S.D., Bennett, D., 1992. Lymphocyte populations in the synovial membranes of dogs with rheumatoid arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31, 289–300. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90016-J](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90016-J)
126. McInnes, I.B., Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 429–42. <https://doi.org/10.1038/nri2094>
127. Mellado, M., Martínez-Muñoz, L., Cascio, G., Lucas, P., Pablos, J.L., Rodríguez-Frade, J.M., 2015. T cell migration in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* 6, 384. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00384>
128. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673–751.
129. Mijnheer, G., Prakken, B.J., van Wijk, F., 2013. The effect of autoimmune arthritis treatment strategies on regulatory T-cell dynamics. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 260–7. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835d0ee4>
130. Milenkovic, D., Jude, B., Morand, C., 2013. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* 64, 40–51.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.046>

131. Mirshafiey, A., Mohsenzadegan, M., 2008. The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* <https://doi.org/07.04/ijaai.195202>
132. Morelli, A.E., Thomson, A.W., 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 610–621. <https://doi.org/10.1038/nri2132>
133. Moret, F.M., Hack, C.E., Van Der Wurff-Jacobs, K.M.G., De Jager, W., Radstake, T.R.D.J., Lafeber, F.P.J.G., Van Roon, J.A.G., 2013. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity. *Arthritis Res. Ther.* 15, R155. <https://doi.org/10.1186/ar4338>
134. Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
135. Möttönen, M., Heikkinen, J., Mustonen, L., Isomäki, P., Luukkainen, R., Lassila, O., 2005. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 360–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02754.x>
136. Moynagh, P.N., 2005. The NF- $\kappa$ B pathway. *J. Cell Sci.* 118, 4589–4592. <https://doi.org/10.1242/jcs.02579>
137. Mullazehi, M., Wick, M.C., Klareskog, L., van Vollenhoven, R., Rönnelid, J., 2012. Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R100. <https://doi.org/10.1186/ar3825>
138. Nakagawa, Y., Iinuma, M., Naoe, T., Nozawa, Y., Akao, Y., 2007. Characterized mechanism of  $\alpha$ -mangostin-induced cell death: Caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorganic Med. Chem.* 15, 5620–5628. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.04.071>
139. Nava Catorce, M., Acero, G., Pedraza-Chaverri, J., Fragoso, G., Govezensky, T., Gevorkian, G., 2016. Alpha-mangostin attenuates brain inflammation induced by

- peripheral lipopolysaccharide administration in C57BL/6J mice. *J. Neuroimmunol.* 297, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.008>
140. Nguemfo, E.L., Dimo, T., Dongmo, A.B., Azebaze, A.G.B., Alaoui, K., Asongalem, A.E., Cherrah, Y., Kamtchouing, P., 2009. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae). *Inflammopharmacology* 17, 37–41. <https://doi.org/10.1007/s10787-008-8039-2>
141. Nichols, J.A., Katiyar, S.K., 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 71–83. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>
142. Oberley, L.W., Spitz, D.R., 1984. [61] Assay of Superoxide Dismutase Activity in Tumor Tissue. *Methods Enzymol.* 105, 457–464. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05064-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05064-3)
143. Oh, S., Rankin, A.L., Caton, A.J., 2010. CD4+CD25+regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol. Rev.* 233, 97–111. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00848.x>
144. Ollier, W.E.R., Kennedy, L.J., Thomson, W., Barnes, A.N., Bell, S.C., Bennett, D., Angles, J.M., Innes, J.F., Carter, S.D., 2001. Dog MHC alleles containing the human RA shared epitope confer susceptibility to canine rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 53, 669–673. <https://doi.org/10.1007/s002510100372>
145. Ovalle-Magallanes, B., Eugenio-Pérez, D., Pedraza-Chaverri, J., 2017. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.): A comprehensive update. *Food Chem. Toxicol.* 109, 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.021>
146. Palmer, G., Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Toy, D., Seemayer, C.A., Viatte, S., Finckh, A., Smith, D.E., Gabay, C., 2009. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 738–749. <https://doi.org/10.1002/art.24305>
147. Pan, H.F., Li, X.P., Zheng, S.G., Ye, D.Q., 2013. Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.07.002>
148. Pandey, K., Rizvi, S., 2009. Current Understanding of Dietary Polyphenols and their

- Role in Health and Disease. *Curr. Nutr. Food Sci.* 5, 249–263.  
<https://doi.org/10.2174/157340109790218058>
149. Park, M.K., Park, J.S., Cho, M. La, Oh, H.J., Heo, Y.J., Woo, Y.J., Heo, Y.M., Park, M.J., Park, H.S., Park, S.H., Kim, H.Y., Min, J.K., 2011. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) differentially regulates Foxp3 + regulatory and IL-17 + pathogenic T cell in autoimmune arthritis. *Immunol. Lett.* 135, 50–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.09.011>
150. Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., Pérez-Rojas, J.M., 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem. Toxicol.* 46, 3227–3239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.024>
151. Pedraza-Chaverri, J., Reyes-Fermín, L.M., Nolasco-Amaya, E.G., Orozco-Ibarra, M., Medina-Campos, O.N., González-Cuahutencos, O., Rivero-Cruz, I., Mata, R., 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of  $\alpha$ -mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 491–501.  
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.11.002>
152. Picerno, V., Ferro, F., Adinolfi, A., Valentini, E., Tani, C., Alunno, A., Ferro, F., Adinolfi, A., Valentini, E., Tani, C., 2017. One year in review 2017: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 33, 551–558. <https://doi.org/9715> [pii]
153. Quinonez-Flores, C.M., Gonzalez-Chavez, S.A., Del Rio Najera, D., Pacheco-Tena, C., 2016. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res. Int.* 2016, 6097417.  
<https://doi.org/10.1155/2016/6097417>
154. Radkar, V., Hardej, D., Lau-Cam, C., Billack, B., 2007. Evaluation of resveratrol and piceatannol cytotoxicity in macrophages, T cells, and skin cells. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 58, 293–304. <https://doi.org/10.2478/v10004-007-0020-8>
155. Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A., 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1439–1452.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.004>
156. Reznick, A.Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357–363.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)

157. Rogers, N.M., Kireta, S., Coates, P.T.H., 2010. Curcumin induces maturation-arrested dendritic cells that expand regulatory T cells in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 460–473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04232.x>
158. Rosas-Ballina, M., Tracey, K.J., 2009. The Neurology of the Immune System: Neural Reflexes Regulate Immunity. *Neuron* 64, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.039>
159. Roseghini, R., Rocha, D.S., Clarêncio, J., Costa, S.L., Costa, M.F.D., Tardy, M., Nascimento, R., Schaer, R., Velozo, E., Meyer, R., Freire, S., 2007. Flavonoid rutin alters the viability and function of mitogen-stimulated splenocytes and thymocytes compared with non stimulated cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 29, 271–285. <https://doi.org/10.1080/08923970701512940>
160. Ryu, S., Lee, J.H., Kim, S.I., 2006. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin. Rheumatol.* 25, 16–20. <https://doi.org/10.1007/s10067-005-1081-1>
161. Sakaguchi, S., 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101, 455–458. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80856-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80856-9)
162. Sampath, P.D., Kannan, V., 2009. Mitigation of mitochondrial dysfunction and regulation of eNOS expression during experimental myocardial necrosis by alpha-mangostin, a xanthonic derivative from *Garcinia mangostana*. *Drug Chem. Toxicol.* 32, 344–352. <https://doi.org/10.1080/01480540903159210>
163. Sampath, P.D., Vijayaraghavan, K., 2007. Cardioprotective effect of alpha-mangostin, a xanthone derivative from Mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 336–339. <https://doi.org/10.1002/jbt.20199>
164. Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanita* 43, 394–405.
165. Sarkar, S., Cooney, L.A., Fox, D.A., 2010. The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 159, 225–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2249.2009.04016.x

166. Sasai, M., Saeki, Y., Ohshima, S., Nishioka, K., Mima, T., Tanaka, T., Katada, Y., Yoshizaki, K., Suemura, M., Kishimoto, T., 1999. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 42, 1635–1643. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199908\)42:8<1635::AID-ANR11>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199908)42:8<1635::AID-ANR11>3.0.CO;2-Q)
167. Schaefferbeke, T., Truchetet, M. élise, Richez, C., 2012. When and where does rheumatoid arthritis begin? *Jt. Bone Spine* 79, 550–554. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.09.004>
168. Schett, G., Stach, C., Zwerina, J., Voll, R., Manger, B., 2008. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 2936–2948. <https://doi.org/10.1002/art.23951>
169. Schmidt, A., Oberle, N., Krammer, P.H., 2012. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* 3, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>
170. Schwarz, H., Schmittner, M., Duschl, A., Horejs-Hoeck, J., 2014. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113840>
171. Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A., 2010. Antioxidants and the immune system. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.* 69, 273–8. <https://doi.org/10.1017/S002966511000162X>
172. Shankaranarayan, D., Gopalakrishnan, C., Kameswaran, L., 1979. Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. *Arch. Int. Pharmacodyn. thérapie* 239, 257–69.
173. Sharma, S., Sahu, D., Das, H.R., Sharma, D., 2011. Amelioration of collagen-induced arthritis by *Salix nigra* bark extract via suppression of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.013>
174. Shen, C.L., Smith, B.J., Lo, D.F., Chyu, M.C., Dunn, D.M., Chen, C.H., Kwun, I.S., 2012. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1367–1377. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.04.001>
175. Shevach, E.M., DiPaolo, R.A., Andersson, J., Zhao, D.M., Stephens, G.L., Thornton, A.M., 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25 +Foxp3+ regulatory T cells.

- Immunol. Rev. 212, 60–73. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00415.x>
176. Singh, R., Akhtar, N., Haqqi, T.M., 2010. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: Inflammation and arthritis. *Life Sci.* 86, 907–918. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.04.013>
177. Siqueira Mietto, B., Kroner, A., Girolami, E.I., Santos-Nogueira, E., Zhang, J., David, S., 2015. Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *J. Neurosci.* 35, 16431–16442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-15.2015>
178. Smith, J.B., Haynes, M.K., 2002. Rheumatoid Arthritis—A Molecular Understanding. *Ann. Intern. Med.* 136, 908–922. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-136-12-200206180-00012>
179. Smolen, J.S., Aletaha, D., McInnes, I.B., 2016. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 388, 2023–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
180. Sojka, D.K., Huang, Y.H., Fowell, D.J., 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - A diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124, 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x>
181. Srirangan, S., Choy, E.H., 2010. The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2, 247–256. <https://doi.org/10.1177/1759720X10378372>
182. Stangl, V., Dreger, H., Stangl, K., Lorenz, M., 2007. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 73, 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.08.022>
183. Sung, J.Y., Hong, J.H., Kang, H.S., Choi, I., Lim, S.D., Lee, J.K., Seok, J.H., Lee, J.H., Hur, G.M., 2000. Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology* 47, 35–44. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(99\)00185-X](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(99)00185-X)
184. Szekanecz, Z., Pakozdi, A., Szentpetery, A., Besenyei, T., Koch, A.E., 2009. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 1, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.011>
185. Terato, B.Y.K., Hasty, K.A., Cremer, M.A., Stuart, J.M., Townes, A.S., Kang, A.A.H.,

1985. Collagen-induced arthritis in mice. Localization of an arthritogenic determinant to a fragment of the type II collagen molecule. *J. Exp. Med.* 162, 637–646.
186. Tewtrakul, S., Wattanapiromsakul, C., Mahabusarakam, W., 2009. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.* 121, 379–382. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.007>
187. Tran, C.N., Thacker, S.G., Louie, D.M., Oliver, J., White, P.T., Endres, J.L., Urquhart, A.G., Chung, K.C., Fox, D.A., 2008. Interactions of T Cells with Fibroblast-Like Synoviocytes: Role of the B7 Family Costimulatory Ligand B7-H3. *J. Immunol.* 180, 2989–98. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.022>
188. Trouw, L.A., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., 2013. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens—common principles. *Ann. Rheum. Dis.* 72, ii132–ii136. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202349>
189. Tsubaki, T., Takegawa, S., Hanamoto, H., Arita, N., Kamogawa, J., Yamamoto, H., Takubo, N., Nakata, S., Yamada, K., Yamamoto, S., Yoshie, O., Nose, M., 2005. Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 363–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02850.x>
190. Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., Palucka, A.K., Banchereau, J., 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219, 118–142. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x>
191. Van Amelsfort, J.M.R., Jacobs, K.M.G., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., Taams, L.S., 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: Differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 50, 2775–2785. <https://doi.org/10.1002/art.20499>
192. Van Amelsfort, J.M.R., Van Roon, J.A.G., Noordegraaf, M., Jacobs, K.M.G., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., Taams, L.S., 2007. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 732–742. <https://doi.org/10.1002/art.22414>

193. van den Berg, W.B., 2009. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res. Ther.* 11, 250. <https://doi.org/10.1186/ar2803>
194. Vieira, S.M., Lemos, H.P., Grespan, R., Napimoga, M.H., Dal-Secco, D., Freitas, A., Cunha, T.M., Verri, W.A., Souza, D.A., Jamur, M.C., Fernandes, K.S., Oliver, C., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Cunha, F.Q., 2009. A crucial role for TNF- $\alpha$  in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br. J. Pharmacol.* 158, 779–789. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00367.x>
195. Vincent, T.L., Williams, R.O., Maciewicz, R., Silman, A., Garside, P., Bevan, S., Chanalaris, A., Chapman, V., Cope, A., Cruwys, S., Dell’Accio, F., Gaskin, P., Gilroy, D., Glasson, S., Hegen, M., McDougall, J., Moore, A., du Sert, N.P., Perretti, M., Pitsillides, A., Robinson, V., Seed, M., Thompson, S., Walsh, D.A., Williams, N., 2012. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatol. (United Kingdom)* 51, 1931–1941. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes035>
196. Vivier, E., Ugolini, S., 2009. Regulatory Natural Killer Cells: New Players in the IL-10 Anti-Inflammatory Response. *Cell Host Microbe* 6, 493–495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.001>
197. Wehr, P., Purvis, H., Law, S.-C., Thomas, R., 2018. Dendritic cells, T cells and their interaction in Rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* <https://doi.org/10.1111/cei.13256>
198. Weinblatt, M.E., 2013. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 124, 16–25.
199. Williams, P., Ongsakul, M., Proudfoot, J., Croft, K., Beilin, L., 1995. Mangostin Inhibits the Oxidative Modification of Human Low Density Lipoprotein. *Free Radic. Res.* <https://doi.org/10.3109/10715769509064030>
200. Williams, P.J., Jones, R.H.V., Rademacher, T.W., 1998. Correlation between IgG anti-type II collagen levels and arthritic severity in murine arthritis. *Autoimmunity* 27, 201–207. <https://doi.org/10.3109/08916939808993831>
201. Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L., Rao, A., 2006. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375–387.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.042>

202. Xinqiang, S., Fei, L., Nan, L., Yuan, L., Fang, Y., Hong, X., Lixin, T., Juan, L., Xiao, Z., Yuying, S., Yongzhi, X., 2010. Therapeutic efficacy of experimental rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate by increasing partially CD4+CD25+Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines. *Biomed. Pharmacother.* 64, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.01.007>
203. Xuzhu, G., Komai-Koma, M., Leung, B.P., Howe, H.S., McSharry, C., McInnes, I.B., Xu, D., 2012. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 129–135. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.149831>
204. Yao, R., Fu, Y., Li, S., Tu, L., Zeng, X., Kuang, N., 2011. Regulatory effect of daphnetin, a coumarin extracted from *Daphne odora*, on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.019>
205. Yoon, J.H., Baek, S.J., 2005. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.* 46, 585–596. <https://doi.org/10.3349/ymj.2005.46.5.585>
206. Yoshida, Y., Tanaka, T., 2014. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res. Int.* 2014, 698313. <https://doi.org/10.1155/2014/698313>
207. You, B.H., Chae, H.-S., Song, J., Ko, H.W., Chin, Y.-W., Choi, Y.H., 2017.  $\alpha$ -Mangostin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis through inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.* 49, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.040>
208. Yu, M.B., Langridge, W.H.R., 2017. The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 37, 1043–1051. <https://doi.org/10.1007/s00296-017-3671-z>
209. Zafar, A., Fatima, N., Mateen, S., Moin, S., Khan, A.Q., 2016. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 11, e0152925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152925>
210. Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant

and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 33–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

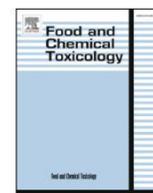
211. Zhang, J., Chen, Q., Wang, S., Li, T., Xiao, Z., Lan, W., Huang, G., Cai, X., 2018.  $\alpha$ -Mangostin, A Natural Xanthone, Induces Apoptosis and ROS Accumulation in Human Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocyte MH7A Cells. *Curr. Mol. Med.* 17, 375–380.  
<https://doi.org/10.2174/1566524018666171205123220>



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Alpha-mangostin: Anti-inflammatory and antioxidant effects on established collagen-induced arthritis in DBA/1J mice <sup>Ch</sup><sub>up</sub>

Diana Rocio Herrera-Aco<sup>a</sup>, Omar Noel Medina-Campos<sup>b</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>b</sup>,  
Edda Sciutto-Condé<sup>c</sup>, Gabriela Rosas-Salgado<sup>d</sup>, Gladis Fragosó-González<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria s/n, Ciudad de México, 04650, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria s/n, Ciudad de México, 04650, Mexico

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria s/n, Ciudad de México, 04650, Mexico

<sup>d</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, 62350, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

$\alpha$ -mangostin  
Inflammation  
Oxidative stress  
Collagen-induced arthritis  
Rheumatoid arthritis

### ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that causes physical disability in people worldwide. Despite progress made in RA treatment in the past decade, new drugs with high efficacy but few long-term adverse effects are still needed.

This study focused on evaluating the therapeutic potential of  $\alpha$ -mangostin on established collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1J mice. Arthritic DBA/1J mice were orally administered with two doses of  $\alpha$ -mangostin (10 and 40 mg/kg) daily, for 33 days. Alpha-mangostin significantly decreased the clinical score in the short term at both doses and decreased the histopathological score at the higher dose. This improvement was accompanied by a reduction on serum levels of anti-collagen IgG2a autoantibodies and of the production of LIX/ CXCL5, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, RANTES/CCL5, IL-6 and IL-33 in the joints of CIA mice. Alpha-mangostin also exhibited an anti-oxidant effect decreasing the NADPH oxidase activity and lipid peroxidation and preserving the levels of reduced glutathione in the arthritic joints. In vitro this xanthone demonstrated modulatory properties on LPS-activated dendritic cells, although in Th1 and Th17-polarized lymphocytes promotes a proapoptotic phenotype.

Altogether this study illustrates the capacity of  $\alpha$ -mangostin to ameliorate the early clinical and histological signs of established CIA by reducing the inflammatory and oxidative responses.

### 1. Introduction

Alpha-mangostin is one of the major xanthenes isolated from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn), a tropical tree that grows in the southeast of Asia. Different parts of mangosteen have been used in the traditional medicine to treat several health conditions such as infected wounds, diarrhea, abdominal pain, dysentery and fever (Pedraza-Chaverri et al., 2008; Jang et al., 2012; Lee et al., 2013).

This xanthone has shown to possess diverse biological activities, i.e. antineoplastic (Shan et al., 2014), antioxidant (Márquez-Valadez et al., 2009), antibacterial (Pedraza-Chaverri et al., 2008; Al-Massarani et al., 2013), anti-inflammatory (Pedraza-Chaverri et al., 2008; Jang et al., 2012; Lee et al., 2013), cardioprotector (Sampath and Vijayaraghavan, 2007), antidiabetic (Nelli et al., 2013), antimycotic (Ibrahim et al., 2016) and antiparasitic (Ibrahim et al., 2016). Regarding its antioxidant properties, this xanthone has proved to diminish protein oxidation and

Abbreviations: 7-AAD, 7-Amino-Actinomycin D; CAT, catalase; CFA, complete Freund's adjuvant; CIA, collagen-induced arthritis; COX-2, cyclooxygenase-2; DMSO, dimethyl sulfoxide; EU, endotoxin units; Foxp3, forkhead box P3; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GST, glutathione-S-transferase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HE, hematoxylin-eosin; IFA, incomplete Freund adjuvant; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; iNOS, induced nitric oxide synthase; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; LIX, LPS-inducible CXC chemokine; LPS, lipopolysaccharide; mBMDs, murine bone marrow-derived dendritic cells; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MDA, malondialdehyde; MIG, monokine induced by gamma interferon; MIP-1 $\alpha$ , macrophage inflammatory protein 1 alpha; MIP-1 $\beta$ , macrophage inflammatory protein 1 beta; MT, Masson trichrome; NF- $\kappa$ B, nuclear transcription factor  $\kappa$ B; NO, nitric oxide; NOX, nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate oxidase; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion; PD-L1, programmed death-ligand 1; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; RA, rheumatoid arthritis; RANTES, regulated on activation normal T expressed and secreted; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Treg, regulatory T cell

\* Corresponding author.

E-mail address: [gladis@unam.mx](mailto:gladis@unam.mx) (G. Fragosó-González).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.018>

Received 10 August 2018; Received in revised form 23 November 2018; Accepted 13 December 2018

Available online 14 December 2018

0278-6915/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

lipid peroxidation both in vitro and in vivo. Moreover,  $\alpha$ -mangostin has the capacity to preserve the activity of several antioxidant enzymes (glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and one of the main intracellular antioxidant systems, reduced glutathione (GSH) in some animal models of disease (Sampath and Vijayaraghavan, 2007). Concerning the anti-inflammatory properties of  $\alpha$ -mangostin, its oral and intraperitoneal administration (50 mg/kg) has shown to exhibit anti-inflammatory activity in rats with hind paw edema induced by carrageenan administration, cotton pellet-induced granuloma and granuloma with bag techniques (Gopalakrishnan et al., 1980). In addition to the preceding,  $\alpha$ -mangostin has demonstrated to inhibit the primary and secondary responses of arthritis induced by complete Freund's adjuvant (CFA) administration (Gopalakrishnan et al., 1980).  $\alpha$ -mangostin has also proved to be a blocking agent of histaminergic and serotonergic receptors (Chairungsrierd et al., 1996) and an inhibitor of several mediators of inflammation such as nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), induced nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-4 (Chen et al., 2008) and human lipoxygenase-12 (LOX-12) (Deschamps et al., 2007).

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease which represents about 1% of world's population (Iwamoto et al., 2008). The age of onset is between 40 and 50 years although it can occur at all ages (Alamanos and Drosos, 2005). The etiology of RA involves a combination of genetic and environmental factors. The latter ones comprise infectious processes and smoking which result in the development of inflammatory processes that cause damage to the joint tissue, in part due to the generation of oxidative stress (Kobayashi et al., 2008). The pathology begins with a significant inflammatory process, mainly in the peripheral synovial joints. This process becomes chronic and over time can provoke structural damage to the cartilage, bones and ligaments (Goronzy and Weyand, 2005). Regarding the inflammatory cells which play an essential role in the RA, the major players are the T helper lymphocytes (Th1 and Th17). Both types of lymphocytes are producers of cytokines which perpetuate and exacerbate the inflammatory joint process and are mostly responsible for the increased production of metalloproteinases and the recruitment and activation of cells of the innate immune system (macrophages and dendritic cells) as well as the activation of cells at the local level (type B synoviocytes and osteoclasts) (Smith and Haynes, 2002; Lubberts, 2010; Li et al., 2011). In addition to this, some of the cytokines produced in RA, such as TNF- $\alpha$  can cause the activation of the enzyme nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate oxidase (NOX) which is involved in the production of reactive oxygen species (ROS). ROS are responsible in conjunction with reactive nitrogen species (RNS) for the development of oxidative stress in RA and the depletion of GSH that occurs at the intracellular level. This latter event perpetuates inflammation by inducing activation of the nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Filippin et al., 2008). Different animal models have been used to study this disease; however, one of most commonly employed at present is collagen-induced arthritis because this model resembles several aspects that occur in human RA (Vincent et al., 2012).

To date, a cure for this disease has not been found, and treatment is limited to reduce the symptomatology of RA. Besides, most of the currently available treatments have several disadvantages, such as the generation of long-term adverse effects or their high cost (Mijnheer et al., 2013). For this reason, there is a need to find new anti-inflammatory molecules that exhibit minimal adverse effects.

In the present study, the effectiveness of  $\alpha$ -mangostin to reduce the clinical signs and the inflammatory and oxidant processes in DBA/1J mice with established CIA was evaluated. Mechanisms underlying this efficacy are further explored.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents

RPMI-1640 medium, L-glutamine,  $\beta$ -mercaptoethanol and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco (Gaithersburg, MD, USA). Gentamicin was obtained from Tornel (Naucalpan, MEX, Mexico). HEPES was purchased from Promega (Madison, WI, USA). Recombinant murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rmGM-CSF) was obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), formaldehyde, CFA, incomplete Freund adjuvant (IFA) and all reagents used to determine oxidative stress and the activity of antioxidant enzymes were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) was obtained from Spectrum (New Brunswick, NJ, USA). Bovine type II collagen solution was obtained from Chondrex (Redmond, WA, USA). Methotrexate was purchased from Teva (North Wales, PA, USA). All the antibodies used for flow cytometry in mBMDCs cultures, Annexin V, anti-CD3 antibodies and recombinant cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12 and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) were purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA). 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) and antiIFN $\gamma$ , anti-IL-4 and anti-CD28 antibodies were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). The recombinant cytokine IL-23 was purchased from R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). All the antibodies used for flow cytometry in Th1 and Th17 cultures were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA).

### 2.2. Extraction and isolation of $\alpha$ -mangostin

$\alpha$ -mangostin was obtained from the pericarp of *Garcinia mangostana* as previously described (Pedraza-Chaverri et al., 2009). Briefly, the dried pericarp of *G. mangostana* was extracted by maceration with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:1) at room temperature for 3 weeks. After filtration and evaporation of the solvent under reduced pressure, the combined crude organic extract was obtained. The extract was subjected to chromatography over a silica gel column and eluted with hexane/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) to obtain seven primary fractions (F1eF7).  $\alpha$ -mangostin crystallized spontaneously from fraction F7 as a major component, as a yellow solid: melting point 179–180 °C; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  320 (3.5) nm; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 13.8, 6.8, 6.25, 5.25, 4.10, 3.8, 3.40, 1.82, 1.79 and 1.65, which was consistent with previously reported data (Ee et al., 2006; Ji et al., 2007).

### 2.3. Animals

Male DBA/1J, BALB/c and C57BL/6 mice of 7–8 weeks of age were obtained from Biomedical Research Institute. Five mice were housed in each cage and were kept under standard conditions with a controlled temperature at 23 °C and a 12-h light/dark cycle. Animals were fed with standard laboratory chow and water ad libitum. All experiments followed the guidelines in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and experimental protocols were reviewed and approved by the Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (Protocol Number 186) at the Biomedical Research Institute at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### 2.4. Endotoxin assay

The chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) assay from Charles River (San Diego, CA, USA) was used according to the supplier's instructions to determine the endotoxin level of the  $\alpha$ -mangostin. Briefly, this test consisted of mixing 100  $\mu$ l of the LAL reagent containing a chromophore (para nitroaniline, pNA) with 100  $\mu$ l of 1 mg/ml  $\alpha$ -mangostin stock solution. The reaction was

incubated at 37 °C for 1 h, and readings were done at 405 nm (every minute for 1 h) in a spectrophotometer (Biotek Synergy HT, Winoosky, VT, USA). The results of each reading were compared against a standard endotoxin curve and expressed as EU/ml.

### 2.5. Experimental groups

Five experimental groups of 6 mice each were established: the control group (without CIA), the CIA group plus vehicle (corn oil where  $\alpha$ -mangostin was diluted), the CIA group plus methotrexate at 0.5 mg/kg and the CIA group plus  $\alpha$ -mangostin at two different doses selected according to previous reports using  $\alpha$ -mangostin as an anti-inflammatory molecule (10 and 40 mg/kg) (Gopalakrishnan et al., 1980; Chen et al., 2008; Nguemfo et al., 2009; Jang et al., 2012; Nava Catorce et al., 2016). Treatments were initiated from day 35, once the signs of arthritis were evident in mice (redness and/or swelling in digits or other parts of the paws), and were given orally daily by an orogastric catheter in a final volume of 100  $\mu$ l per mouse. Treatments were administered for 33 days.

### 2.6. Induction of collagen-induced arthritis

Induction of CIA was performed according to the protocol provided by Chondrex, Inc. with minor modifications. Briefly, 0.1 ml emulsion of bovine type II collagen solution (2 mg/ml in 0.05 M acetic acid) and CFA containing 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* was injected subcutaneously at the base of the tail. A booster injection with 60  $\mu$ l emulsion of collagen and IFA was administered at 1.5 cm from the base of the tail on day 21.

### 2.7. Clinical assessment of arthritis

To determine the severity of arthritis, visual inspections of the animals were conducted by two investigators blinded to the arthritis treatment three times per week from day 21 counting from the first immunization, which allowed to establish clinical severity and joint inflammation based on the degree of affection of the paw joints according to a previously described subjective scale (Cho et al., 2009). Briefly, the degree of edema and inflammation presented by each of the four limbs is individually registered and assigned a numeric value: 0 = no edema or swelling, 1 = slight edema and erythema limited to the foot or ankle, 2 = slight edema and erythema from the ankle to the tarsal bone, 3 = moderate edema and erythema from the ankle to the tarsal bone, and 4 = edema and erythema from the ankle to the entire leg. The arthritic score for each mouse was expressed as the sum of the scores of four limbs. The maximum clinical score obtained by each mouse was 16 points. The mean arthritis index for each experimental group was determined by summing the scores of each mouse and dividing the result by the number of mice in the group.

### 2.8. Histopathological assessment of arthritis

A hind limb of each mouse was fixed with 10% formalin for 72 h, decalcified with a solution of 10% EDTA for 7 days and embedded in paraffin. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson Trichrome (MT) stainings were performed to characterize the inflammatory phenomenon as well as the destruction of articular cartilage. The degree of inflammation and damage to the cartilage present in the joint was evaluated, according to the following criteria, previously reported (Camps et al., 2005): 0 = no inflammation, 1 = slight thickening of the lining layer or some infiltrating cells in the sublining layer, 2 = slight thickening of the lining layer plus some infiltrating cells in the sublining layer, 3 = thickening of the lining layer, influx of cells in the sublining layer, and presence of cells in the synovial space, and 4 = synovium highly infiltrated with many inflammatory cells.

### 2.9. Measurement of IgG subtypes

A blood sample of all experimental mice was obtained through orbital sinus puncture, and the sera were separated by centrifugation at 3500 $\times$ g for 10 min and stored at -70 °C until processing. The presence of anti-collagen II IgG1 and IgG2a antibodies was determined using the Mouse Anti-Type II ELISA Collagen IgG Subtype Assay Kit with TMB (Chondrex, Inc.) according to the instructions described by the manufacturer.

### 2.10. Preparation of tissue homogenates

The kidneys, liver and joints were obtained and stored at -70 °C until processing. Liver and kidney samples were homogenized in a polytron for 10 s in a cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) in a 1:10 w/v ratio, while the joint samples were pulverized with liquid nitrogen using a mortar. For the latter, one part was homogenized in a cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) in a 1:5 w/v ratio and the other was homogenized in a cold lysis buffer (20 mM Tris base pH 7.4, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.4, 1% Triton X-100 and 10% glycerol) containing 1 mM PMSF in a 1:4 w/v ratio. The homogenates were centrifuged at 10,000 $\times$ g at 4 °C for 30 min, and the supernatants were obtained to quantify the total proteins according to a previously described method (Lowry et al., 1951). Finally, the homogenates in cold phosphate buffer were used to determine the activity of the antioxidant enzymes [CAT, glutathione reductase (GR), GPx, GST and SOD], GSH content and to perform measurement of oxidative stress markers (lipid peroxidation, oxidized proteins and NOX activity). The homogenates in cold lysis buffer containing 1 mM PMSF were used to determine the cytokines and chemokines present in the joints.

### 2.11. Measurement of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in serum and joints

PGE<sub>2</sub> levels were determined in serum and joints of the different experimental groups using a Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). The assay was performed according to the supplier's instructions, and the results were expressed in ng of PGE<sub>2</sub>/ml serum and ng of PGE<sub>2</sub>/mg protein in the joint homogenates.

### 2.12. Measurement of cytokines and chemokines in joints

#### 2.12.1. Determination of cytokines and chemokines in joint homogenates

EMD Millipore's MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) was employed according to the supplier's instructions to determine the cytokines and chemokines present in joint homogenates of each experimental group. The Luminex analyzer (MAGPIX) (EMD Millipore) and Luminex xPONENT acquisition software were used to analyze the data obtained using 5-parameter logistic regression. The IL-1 $\beta$  and IL-18 levels present in the joints were determined using the Mouse IL-1 $\beta$  ELISA MAX Standard Kit (Biolegend) and the Mouse IL-18 Platinum ELISA Kit (eBioscience) according to the instructions provided by the manufacturer.

#### 2.12.2. Immunohistochemistry

Briefly, to evaluate IL-33 expression in joint tissues, 3  $\mu$ m tissue sections were blocked with 4% goat serum and 1% bovine serum albumin (BSA) plus 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h at 37 °C. After blocking, the tissues were stained with rabbit anti-mouse IL-33 antibody (1:100 dilution) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) overnight at 4 °C. The next day, the samples were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:100 dilution) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) for 1 h at 37 °C followed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin. To determine the area of expression of IL-33 in the joint tissues, each tissue was evaluated with an Olympus BX-500 microscope

and analyzed with Infinity Software v 6.3.0.

### 2.13. Determination of *in vivo* oxidative stress and antioxidant activity

#### 2.13.1. Determination of GPx, GR and GST activity

The activity of GPx was measured indirectly following a previously described method (Lawrence and Burk, 1976). This method is based on the decrease in absorbance at 340 nm due to the disappearance of NADPH, which is used by the GR to regenerate the GSH employed by the GPx to reduce hydroperoxides. The results were expressed in U/mg protein, where 1 U is the amount of enzyme required to oxidize 1  $\mu\text{mol}$  of NADPH/min.

The activity of GR was determined using a previously reported assay (Carlberg and Mannervik, 1975). This method consists of monitoring the disappearance of NADPH at 340 nm, which is used as a cofactor by the GR to generate GSH from glutathione oxidized (GSSG). The results were expressed in U/mg protein where 1 U of the enzyme is equal to 1  $\mu\text{mol}$  of oxidized NADPH/min.

The activity of GST was obtained using a previously described method (Habig et al., 1974). In this method, GST catalyzes the conjugation of GSH with the 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and the final adduct formed absorbs at 340 nm. The results were expressed as  $\mu\text{moles}$  of GSH-CDNB conjugate formed/min/mg protein using an extinction coefficient of  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.13.2. Determination of CAT and SOD activity

Catalase activity was assessed following a previous methodology (Aebi, 1984). The fundament of this method is based on the decrease in the absorbance of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) due to its degradation by the enzyme present in the sample. The degradation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is monitored at 240 nm every 15 s for 30 s. The results were expressed as k/mg protein where k is used as the unit of catalase activity.

The activity of SOD was measured by the ability of this enzyme to avoid the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) according to a previously described assay (Oberley and Spitz, 1984). Briefly, the xanthine-xanthine oxidase system is used to generate superoxide anions ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), which reduce the NBT to formazan that is detected at 560 nm. If the SOD is present in the sample, the generated  $\text{O}_2^{\cdot-}$  is transformed into  $\text{H}_2\text{O}_2$  and this avoids the formazan generation. The results were expressed as units of SOD/mg protein where 1 unit of the enzyme is defined as the quantity of SOD required to produce 50% inhibition of NBT reduction.

#### 2.13.3. Determination of NOX activity

To evaluate the NOX activity, a chemiluminescence (CL) technique was used. Reaction mixture (final volume 200  $\mu\text{l}$ ) contained 75 mM phosphate buffer (pH 7.4), 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 300 mM sucrose, 20 mM lucigenin and 2 mM NADPH. The reaction was started by adding 20  $\mu\text{l}$  of the sample of the supernatants of the homogenates of the different tissues presumably containing NOX. After the reaction, ROS were generated by NADPH oxidase, which reacted with lucigenin that captures the high energy electrons. The luminescence generated by lucigenin was directly proportional to the activity of NOX, and the maximum activity was obtained 15 min after the start of the reaction. The results were expressed in U of CL (mV.s).

#### 2.13.4. Determination of GSH

To estimate the GSH level present in different tissues, a previously described fluorimetric method was used (Fernández-Checa and Kaplowitz, 1990). This assay is based in the formation of a stable, fluorescent adduct of monochlorobimane (itself nonfluorescent) with GSH in a reaction catalyzed by GST. The fluorescence is measured at excitation wavelength of 385 nm and an emission wavelength of 478 nm and the results were expressed in  $\mu\text{mol}$ /mg protein.

#### 2.13.5. Estimation of lipid peroxidation

Measurement of the malondialdehyde (MDA) levels (an end product of lipid peroxidation) expressed as nmol/mg protein in different tissues was determined using a previously described colorimetric assay (Gérard-Monnier et al., 1998). This test is based on the detection of a colorful compound formed between MDA and 1-methyl-2-phenylindole in acid medium, which is detected at 586 nm.

#### 2.13.6. Estimation of oxidized proteins

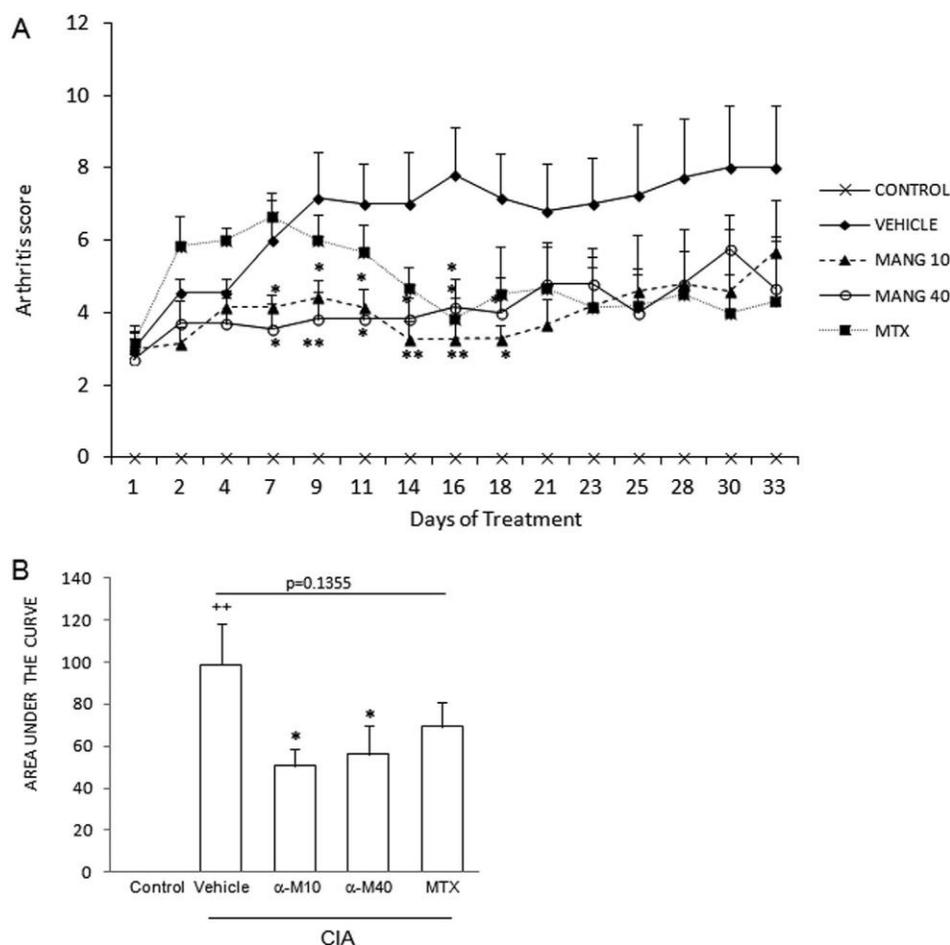
To evaluate the oxidized proteins, a previously described colorimetric method was employed (Reznick and Packer, 1994). This assay is based on the reactivity of the carbonyl groups originated by the action of ROS on proteins with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form a protein-hydrazone complex which absorbs at 370 nm. Protein carbonyl contents were calculated using an absorption coefficient of  $22\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The results were expressed as nmol of carbonyls/mg protein.

### 2.14. Bone marrow-derived dendritic cells culture

Murine bone marrow-derived dendritic cells (mBMDs) were generated from the bone marrow cells of the tibia and femur of 7–8 week old male BALB/c mice following the procedures previously described, with minor modifications (Lutz et al., 1999). Briefly, at day 0,  $6 \times 10^6$  bone marrow cells were cultured in 60 mm Petri dishes containing 6 ml RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 5% heat-inactivated FBS, gentamicin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and 10 mM HEPES. Bone marrow cells were differentiated to mBMDs by the addition of rmGM-CSF (20 ng/ml) to the culture medium for 6 days. At day 6 all medium was removed, and mBMDs were fed with 3 ml culture medium containing rmGM-CSF (4 ng/ml). Additionally, mBMDs were stimulated with LPS (100 ng/ml) and different doses of  $\alpha$ -mangostin dissolved in DMSO (0.5, 1, 3, 5, 7 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 4 or 24 h. After 4 or 24 h of stimulation with LPS and  $\alpha$ -mangostin, the cells were harvested and evaluated by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) after staining cells with FITC-CD11c, PE-CD86, PerCpCy5.5-CD80, APC-CD40, PE-programmed death-ligand 1 (PD-L1) and Biotin-IA/IE antibodies. Finally, the cells were analyzed using the FCS Express software. Cell culture supernatants of each condition were obtained and stored at  $-70^\circ\text{C}$  to measure soluble factors.

### 2.15. Th1 and Th17 polarization and stimulation

Spleen cells were obtained from C57BL/6J mice and erythrocytes were lysed. The remaining cells (splenocytes) were placed in a ratio of  $2 \times 10^6$  lymphocytes per well in commercial 24-well plates, and anti-CD3 antibody (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and anti-CD28 antibody (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added to complete their activation. Cells were maintained in culture for 6 days with a mixture of cytokines that favored differentiation into Th17 or Th1 cells. For Th17 cells-polarizing conditions, splenocytes were stimulated with TGF- $\beta$  (5 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), IL-23 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) and TNF- $\alpha$  (5 ng/ml) as well as anti-IFN- $\gamma$  (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and anti-IL-4 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) antibodies to avoid their polarization towards Th1 and Th2, respectively. For Th1 cells-polarizing conditions, splenocytes were stimulated with IL-12 (10 ng/ml) and IL-2 (10 ng/ml) as well as anti-IL-4 antibody (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to avoid their polarization towards Th2. The effect of different concentrations of  $\alpha$ -mangostin (0.5, 1, 3 and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on cultures of cells polarized towards Th17 or Th1 was evaluated by culturing the cells under polarizing conditions towards Th17 or Th1 concurrently with the different concentrations of  $\alpha$ -mangostin during 6 days. Six days post-culture the cells were treated for 6 h with Cell Activation Cocktail with brefeldin A (Biolegend). After this time, the cells were harvested, and the percentages of  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^{\text{high}} \text{Foxp3}^+$  and  $\text{CD4}^+ \text{IFN-}\gamma^+$  cells were evaluated by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer and FCS Express software in the Th1-polarized cultures.



**Fig. 1.** Therapeutic effects of  $\alpha$ -mangostin on arthritis score from day 1–33 of treatment after CIA was established (A). Area under the curve of each experimental group that represents the overall behavior of each group during 33 days of treatment (B). Control, non-arthritic mice; Vehicle, arthritic mice treated with vehicle (corn oil); Mang 10, arthritic mice treated with 10 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; Mang 40, arthritic mice treated with 40 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; MTX, arthritic mice treated with methotrexate. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.  $n = 6$ . Group curve is significantly different  $^{++}p < 0.01$  versus control group;  $*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$  versus vehicle group (by ANOVA, Tukey test and LS means contrast test).

The percentages of  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$  and  $CD4^+IL-17^+$  cells were evaluated in the Th17-polarized cultures. Supernatants from each experimental condition were obtained and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until used.

### 2.16. Cell viability

Cell viability was measured using the Annexin V/7-AAD Apoptosis Assay. Briefly, mBMDCs and Th1 and Th17 cells of each experimental group were harvested and  $1 \times 10^6$  cells/ml were resuspended in 1X Binding Buffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Subsequently, 100  $\mu\text{l}$  of this solution ( $1 \times 10^5$  cells) were stained with FITC Annexin V and 7-AAD. The cells were incubated for 15 min at RT ( $25^\circ\text{C}$ ) in the dark and analyzed by flow cytometry within 1 h.

### 2.17. Analysis of secreted inflammatory mediators

The cytokine levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 (p70), IFN- $\gamma$  and IL-10 were measured in the supernatants of cultured dendritic using ELISA MAX<sup>TM</sup> Standard Sets kits (Biolegend) according to the provider's instructions. The Mouse TGF- $\beta$  1 ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience Inc.) was used to measure TGF- $\beta$  in culture supernatants. IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$  were measured in the supernatants of Th1-polarized cultures and IL-17A, IL-10 and TGF- $\beta$  in the Th17-polarized cultures by ELISA. The Mouse IL-17 A ELISA MAX<sup>TM</sup> Standard Sets kit (Biolegend) was used for the measurement of IL-17A in accordance with the provider's instructions.

### 2.18. Statistical analysis

Each in vitro experiment was performed at least in triplicate. Data were analyzed using the JMP 5.0.1 statistical software program and expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test for multiple comparisons and LS means contrast test were used to analyze parametric data. The Kruskal-Wallis test was used to analyze non-parametric data. P values  $< 0.05$  were considered to be significant.

## 3. Results

### 3.1. Levels of endotoxin in $\alpha$ -mangostin

Because endotoxins can activate cells of the innate immune system and promote the secretion of proinflammatory cytokines, the endotoxin level in the isolated  $\alpha$ -mangostin was measured to avoid any interference in the observed effects. The endotoxin level of 1 mg/ml  $\alpha$ -mangostin was determined by the chromogenic LAL assay and was found lower than 0.05 EU/ml (equivalent to 0.005 ng/ml of LPS) which was within the endotoxin level allowed for sterile water by Food and Drug Administration (FDA). Additionally, it has been proven that these levels of endotoxin do not affect cytokine secretion and the expression of activation markers in some phenotypes of human DCs (Schwarz et al., 2014).

### 3.2. Therapeutic effect of $\alpha$ -mangostin on established CIA

To evaluate the therapeutic potential of  $\alpha$ -mangostin in a model of CIA developed in mice, two oral doses 10 and 40 mg/kg were tested. Methotrexate, a drug frequently used to ameliorate the symptoms of rheumatoid arthritis in human patients was employed as a reference drug. Treatments were administered from day 35 when the signs of arthritis were evident, and the CIA was established in mice. Each treatment was administered daily for 33 consecutive days. An arthritis score was used to determine the clinical severity of arthritis and joint inflammation. The arthritis score exhibited continuous increases in vehicle-treated mice from day 1 to day 16 of treatment; afterward, it remained relatively stable. A significant decrease in the arthritis score was found in  $\alpha$ -mangostin-treated mice regardless of the dose used from day 7 to day 18 of treatment compared to vehicle-treated mice. No significant differences between both doses during this time were found. After the 18th day of treatment, none of the doses of  $\alpha$ -mangostin demonstrated significant differences with vehicle-treated mice. In contrast, methotrexate did not significantly reduce the arthritis score in the first days of treatment until the 16th day of treatment (Fig. 1A).

The area under the curve of each of the experimental groups from day 1 to day 33 of treatment was estimated to evaluate the overall behavior of each of the treatments over time. Both doses of  $\alpha$ -mangostin exhibited a significant decrease in the area under the curve with respect to vehicle-treated mice ( $p < 0.05$ ). However, they did not show significant differences between them (Fig. 1B). Mice treated with methotrexate did not show significant differences with vehicle-treated mice although it did demonstrate a tendency to decrease the area under the curve in the last days of treatment ( $p = 0.0877$ ) (data not shown). These results could mean that  $\alpha$ -mangostin might have an early effect on the arthritis signs whereas methotrexate has a late effect in the arthritis control.

### 3.3. Histological changes in knee joints of CIA mice treated with $\alpha$ -mangostin

To determine if  $\alpha$ -mangostin was able to control inflammation and damage to joint cartilage in CIA mice, histological sections of the knee joint of each of the experimental groups were evaluated according to the Materials and Methods section. The knee joints of vehicle-treated mice revealed synovial hyperplasia, massive infiltration of inflammatory cells within the joint space, extensive cartilage and bone erosions and pannus formation. The inflammatory infiltrate in vehicle-treated mice was composed mainly of mononuclear cells (macrophages and lymphocytes) and fibroblasts, although some neutrophils within the joint space were also found (Fig. 2A). The higher dose of  $\alpha$ -mangostin significantly reduced the histological score. However, the lower dose of  $\alpha$ -mangostin and methotrexate did not present a significant effect on the histopathological changes found in vehicle-treated mice (Fig. 2B).

### 3.4. Effect of $\alpha$ -mangostin on the production of anti-collagen II IgG1 and IgG2a antibodies

Anti-CII IgG antibodies are critical in the development of CIA, and it has been shown to have a high correlation with the severity of arthritis in CIA mice (Williams et al., 1998). Therefore, the effect of  $\alpha$ -mangostin on the production of anti-CII IgG antibodies was evaluated. Both anti-CII IgG1 and anti-CII IgG2a antibodies were significantly increased in the vehicle-treated mice compared to those in the control group. Moreover, levels of anti-CII IgG2a antibodies showed a 5-fold increase compared to levels of anti-collagen IgG1 antibodies. A significant decrease in anti-CII IgG2a antibodies was found only in mice treated with the higher dose of  $\alpha$ -mangostin (Fig. 3A). However, none of the treatments affected the production of anti-CII IgG1 antibodies (Fig. 3B).

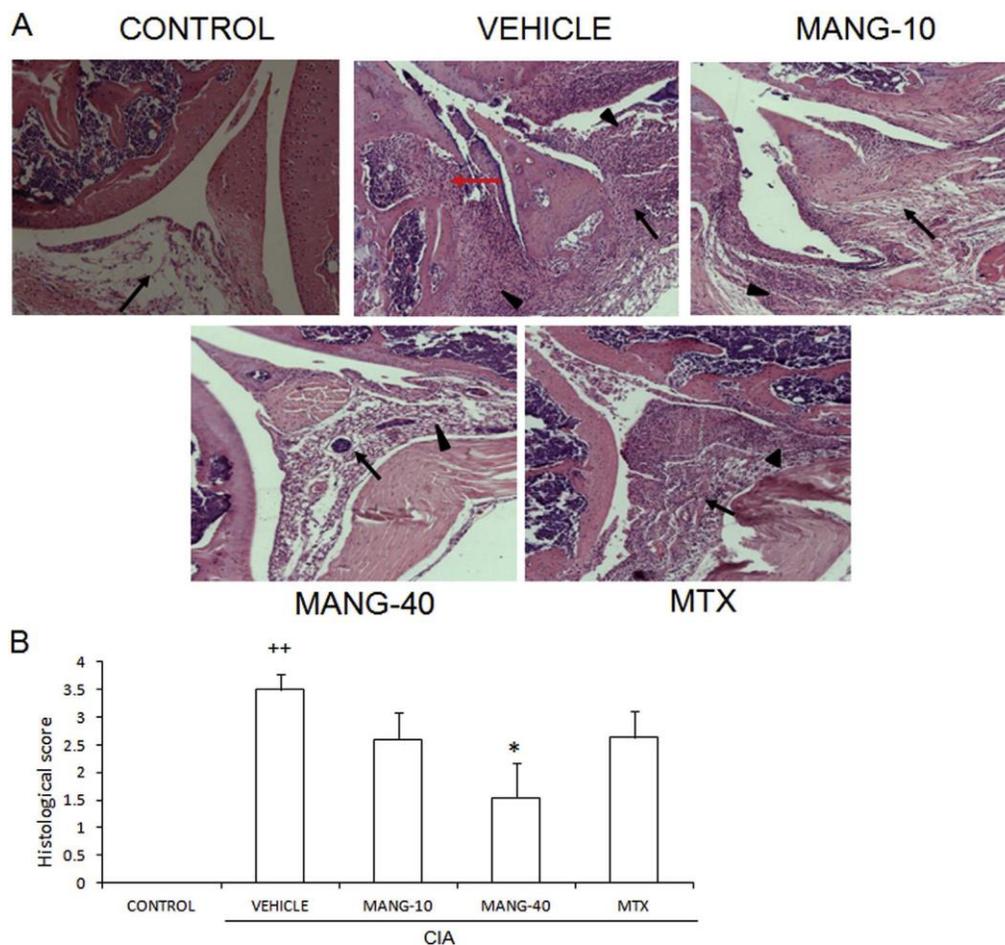
### 3.5. Effect of $\alpha$ -mangostin on joint inflammatory mediators

It has been demonstrated by different research groups that cytokines, chemokines and other inflammatory mediators such as PGE<sub>2</sub> play a key role

in inflammation and joint destruction that occurs in RA (Feldmann and Maini, 2008; Hoxha, 2018). Chemokines are mostly involved in the recruitment of inflammatory cells to the joint, while cytokines and PGE<sub>2</sub> are also involved in the destruction and damage to the joint (Hoxha, 2018; Iwamoto et al., 2008; Choy, 2012; Caselli et al., 2018). We explored whether  $\alpha$ -mangostin could modify the production of these cytokines and chemokines in the CIA joint and the PGE<sub>2</sub> release at peripheral and local level. PGE<sub>2</sub> levels in both serum and joints were found to be increased in the vehicle-treated mice compared to those in the control group. Treatments with either the different doses of  $\alpha$ -mangostin or methotrexate showed a decrease in the production of PGE<sub>2</sub> in serum and joints, this reduction being more noticeable in the latter. However, these reductions were not significant in any of treatments (Fig. 3C and D). Moreover, it was found that CIA mice treated only with vehicle had a significant increase in the production of the cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18 and IL-33 and the chemokines LIX (CXCL5), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), MIG (CXCL9) and RANTES (CCL5) compared to control mice. As observed in Fig. 4A, the dose of 10 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin exhibited a significant decrease in the production of IL-6 and the chemokines LIX, IP-10 and RANTES ( $p < 0.05$ ) while the dose of 40 mg/kg not only significantly decreased the IL-6 and these three chemokines but also significantly decreased the MIG chemokine ( $p < 0.05$ ). Although no significant differences were found between the two doses of  $\alpha$ -mangostin employed, the dose of 40 mg/kg demonstrated significance slightly higher than the dose of 10 mg/kg in reducing the production of IL-6 and these chemokines. On the other hand, methotrexate only showed an efficient reduction in the production of LIX and RANTES chemokines ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) (Fig. 4A), whereas the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 were not affected by any of the treatments used (Fig. 4B and C). The expression of IL-33 was found to be significantly increased in the joint of vehicle-treated mice compared to those in the control group ( $p < 0.05$ ) being this expression more evident in the fibroblasts and the mononuclear cells of the inflammatory infiltrate (Fig. 5A). The treatments with both doses of  $\alpha$ -mangostin and methotrexate decreased the expression of IL-33 in joint tissues significantly with respect to vehicle-treated mice (Fig. 5A and B).

### 3.6. Effect of $\alpha$ -mangostin on oxidative stress and the activity of antioxidant enzymes

It has been documented that the production of ROS and RNS may be increased and the activity of some of the enzymes of the antioxidant defense system reduced in patients with RA. This imbalance in redox equilibrium can cause damage to cartilage and extracellular matrix components as well as activate inflammatory pathways such as NF- $\kappa$ B (Hitchon and El-Gabalawy, 2004; Mirshafiey and Mohsenzadegan, 2008). We evaluated the effect of  $\alpha$ -mangostin on oxidative stress and the preservation of the antioxidant defense system in the joints, liver and kidney of CIA mice. The levels in the activity of NOX and MDA (an end product of lipid peroxidation) were found increased in the joints of vehicle-treated mice ( $p < 0.05$ ). In addition, GSH levels (one of the central antioxidant defense systems) were found to be decreased at the joint level in this same group compared to control mice ( $p < 0.05$ ). The dose of 10 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin was able effectively to decrease the NOX activity and the generation of MDA and demonstrated to preserve the levels of GSH in the joints of CIA mice ( $p < 0.05$ ). The dose of 40 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin only decreased lipid peroxidation in the joints of CIA mice ( $p < 0.05$ ). On the other hand, methotrexate was also able to decrease MDA production and preserve GSH levels significantly in the joints of CIA mice ( $p < 0.05$ ). The GPx, GST and CAT activities did not exhibit significant differences between the different experimental groups at the joint level (Fig. 6). No significant differences were found in the levels of MDA, GSH and NOX, GPx, GST, SOD, GR and CAT activities in the liver and kidney of mice of the different experimental groups. Nevertheless, a significant increase in the number of oxidized proteins was found in the liver of mice treated with methotrexate ( $p$



**Fig. 2.** Histological analysis of knee joints on day 68 (hematoxylin and eosin stained joint tissue sections). Original magnification 10X. Photomicrographs are representative of histopathology of six mice ( $n = 6$ ) per experimental group. Black arrows indicate the synovial membrane, head arrows indicate the inflammatory infiltrate and synovial hyperplasia into the joint and red arrows indicate the cartilage and bone destruction by pannus (A). Histological scores obtained by the evaluation of formation of pannus, synovial hyperplasia, amount of inflammatory infiltrate and magnitude of damage to articular cartilage and bone in the joints of each experimental group (B). Control, non-arthritic mice; Vehicle, arthritic mice treated with vehicle (corn oil); Mang 10, arthritic mice treated with 10 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; Mang 40, arthritic mice treated with 40 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; MTX, arthritic mice treated with methotrexate. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.  $n = 6$ . Group is significantly different,  $^{++}p < 0.01$  versus control group;  $^{*}p < 0.05$  versus vehicle group (by ANOVA and LS means contrast test). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

$< 0.05$ ) (data not shown).

### 3.7. Cytotoxicity of $\alpha$ -mangostin

$\alpha$ -mangostin has been shown to possess anti-inflammatory effects on several cells of the innate immune system including various macrophage lines (Tewtrakul et al., 2009). In order to get a deeper understanding about the mechanisms involved in the anti-inflammatory capacity of  $\alpha$ -mangostin on CIA, we decided to study its effect on activated dendritic cells and polarized Th1 and Th17 lymphocytes which play a central role in the immunopathogenesis of RA. Because several studies have demonstrated that  $\alpha$ -mangostin possesses cytotoxic effects on different cell types (Liu et al., 2015) including several tumor cell lines (Nakagawa et al., 2007; Doi et al., 2009), we first investigated its cytotoxic effect on LPS activated mBMDCs and lymphocytes activated and polarized towards Th1 and Th17.  $\alpha$ -mangostin did not demonstrate cytotoxic effects on mBMDCs activated with LPS for 4 and 24 h at any of the concentrations evaluated (0.5–10  $\mu$ g/ml). However, it did reveal cytotoxic effects on lymphocytes activated and polarized towards Th1 and Th17, inducing a significant decrease in cell viability ( $p < 0.05$ ) approximately of 37% with the dose of 5  $\mu$ g/ml (data not shown).

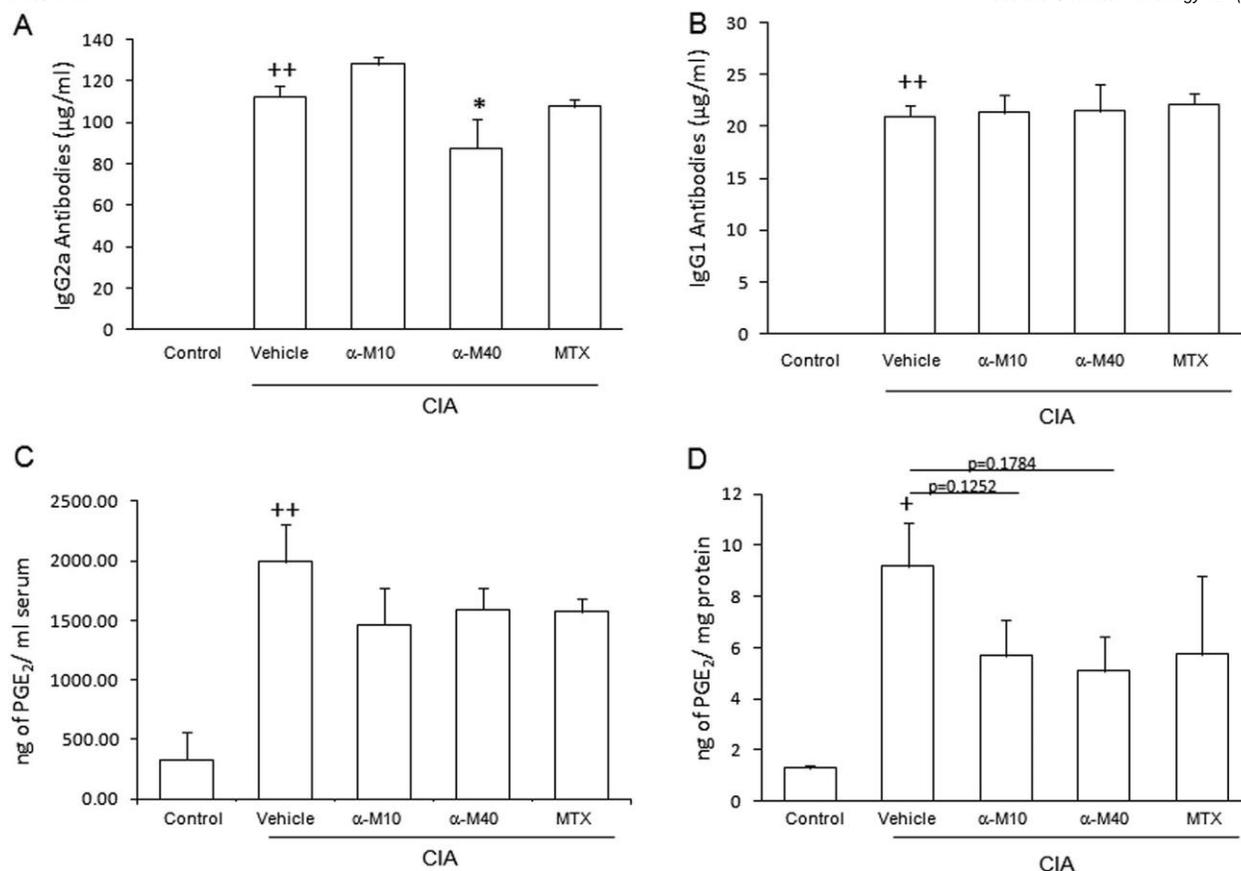
### 3.8. Effect of $\alpha$ -mangostin on mBMDCs activated with LPS

Once it was determined that  $\alpha$ -mangostin has no cytotoxic effects on mBMDCs activated with LPS, we explored the ability of  $\alpha$ -mangostin to modify

the expression of activation molecules as well as the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in these mBMDCs. The mBMDCs activated with LPS showed a significant increase both in the percentage of CD86 expression ( $p < 0.05$ ) and mean fluorescence intensity (MFI) for CD86 ( $p < 0.01$ ) with respect to unstimulated mBMDCs.  $\alpha$ -mangostin significantly decrease the percentage of CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cells in doses between 7 and 10  $\mu$ g/ml with respect to mBMDCs activated with LPS that only received the vehicle ( $p < 0.05$ ). In addition, MFI for CD86 was also significantly reduced in CD11c<sup>+</sup> cells at the same doses (Fig. 7).

The percentage and MFI of CD40 were significantly increased in LPS-activated mBMDCs compared to non-stimulated mBMDCs ( $p < 0.01$ ).  $\alpha$ -mangostin proved to be capable of significantly decrease both the percentage and MFI of CD40 in LPS-activated mBMDCs from the dose of 5  $\mu$ g/ml. The higher dose of  $\alpha$ -mangostin proved to be the best in decreasing the percentage of CD40 in CD11c<sup>+</sup> cells and better than the 5  $\mu$ g/ml dose in decreasing the MFI of CD40 in CD11c<sup>+</sup> cells ( $p < 0.01$ ) (Fig. 8). The expression of CD80, IA/IE and PD-L1 in CD11c<sup>+</sup> cells were also examined, but no changes were found with any of the doses of  $\alpha$ -mangostin evaluated (data not shown).

To determine the effect of  $\alpha$ -mangostin on the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in mBMDCs activated with LPS, the production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 (p70), IL-10 and TGF- $\beta$  was evaluated. mBMDCs activated with LPS exhibited a significant increase in the production of IL-12 (p70), TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 after 4 h of stimulation ( $p < 0.01$ ) and a significant increase of IFN- $\gamma$  after of 24 h of stimulation ( $p < 0.05$ ) with respect to unstimulated mBMDCs.  $\alpha$ -mangostin significantly decreased the production of IL-



**Fig. 3.** Serum antibody levels of IgG2a (A) and IgG1 (B) anti-CII on day 68. The antibodies concentration was expressed in µg/ml and was determined by ELISA. PGE<sub>2</sub> levels in serum (C) and joints (D) of mice of the different experimental groups. PGE<sub>2</sub> levels were expressed in ng/ml of serum or ng/mg of protein and were determined by a competitive enzyme immunoassay. Control, non-arthritis mice; Vehicle, arthritis mice treated with vehicle (corn oil); Mang 10, arthritis mice treated with 10 mg/kg of α-mangostin; Mang 40, arthritis mice treated with 40 mg/kg of α-mangostin; MTX, arthritis mice treated with methotrexate. Data are represented as mean ± SEM. n = 6. Group is significantly different, <sup>+</sup>p < 0.05, <sup>++</sup>p < 0.01 versus control group; <sup>\*</sup>p < 0.05 versus vehicle group (by ANOVA and LS means contrast test).

12 (p70) at doses of 3 µg/ml, and increased the production of IL-10 at doses of 5 µg/ml with regard to the LPS activated BMDCs that only received DMSO after 4 h of stimulation ( $p < 0.01$ ). A decrease in the levels of INF-γ was also found from the dose of 3 µg/ml of α-mangostin but was not statistically significant ( $p = 0.07$ ). The secretion of TNF-α, IL-6 and TGF-β did not present changes in any doses of α-mangostin tested (Fig. 9). These results indicate that α-mangostin possess immunomodulatory effects on mBMDCs activated with LPS, which are due to the decrease in the expression of costimulatory molecules, the decrease in cytokines that polarize towards Th1 cells (IL-12 p70) and the increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10.

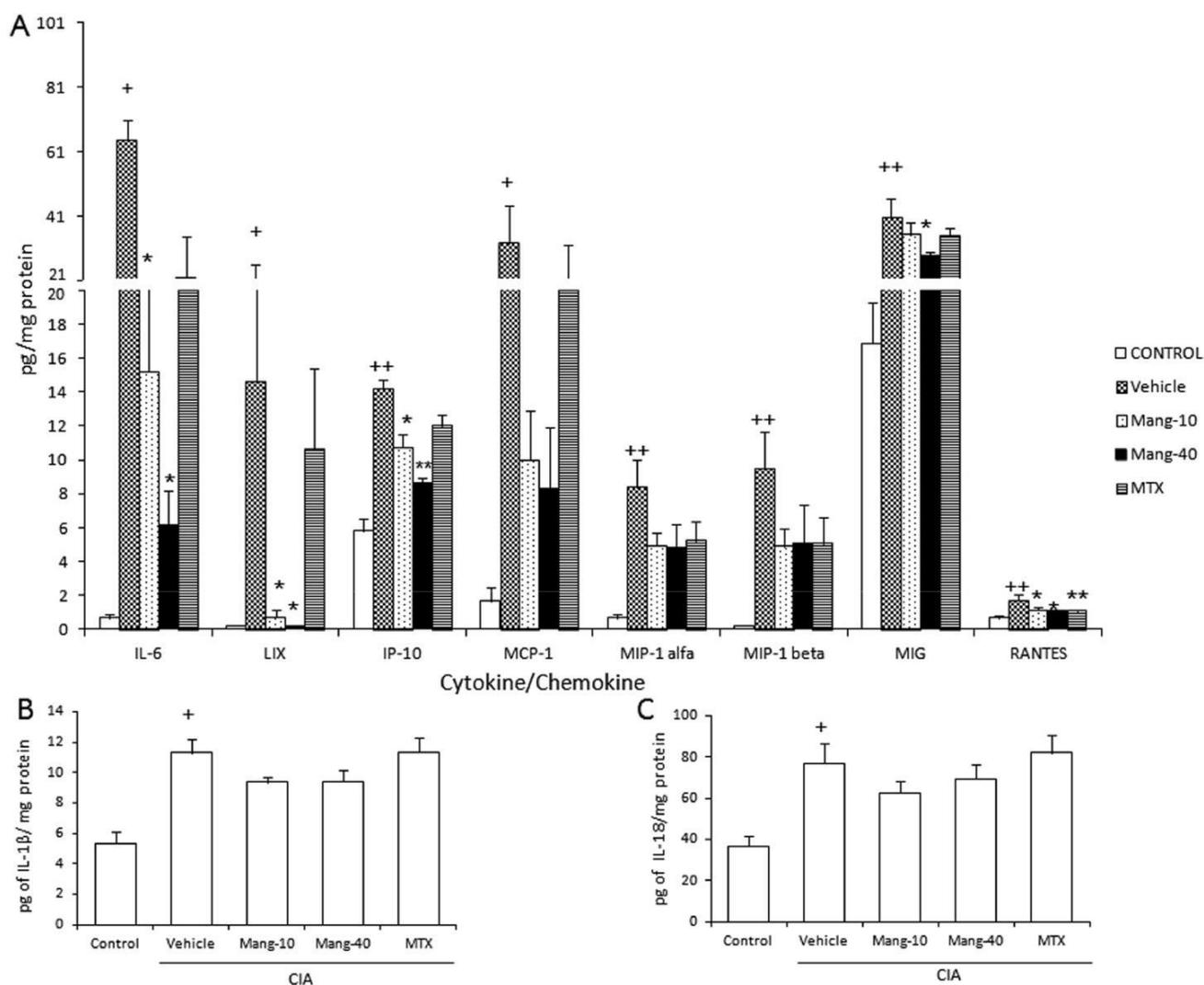
### 3.9. Effect of α-mangostin on Th1 and Th17 polarization

Several studies have shown that some polyphenols possess the ability to prevent proliferation or modify the production of cytokines in lymphocytes (Roseghini et al., 2007). At present, it is unknown whether α-mangostin, which belongs to the polyphenols group, is capable of modifying the polarization of lymphocytes from one phenotype to another. Therefore, the capacity of α-mangostin to avoid the polarization of lymphocytes towards a Th1 or Th17 phenotype favoring polarization towards a regulatory phenotype (Treg) was studied. α-mangostin demonstrated no effects on the polarization of Th1 and Th17 lymphocytes in doses of 0.5–3 µg/ml, nor did it show increases in the regulatory phenotype in any of these doses. Doses starting at 5 µg/ml of α-man-

gostin exhibited decreases in the populations of both Th17 and Th1 lymphocytes, as well as a decrease in the production of some cytokines such as IL-17A and IL-10. However, these decreases were probably due to a proapoptotic effect of this molecule on activated lymphocytes, since cell viability was reduced by 37% at this dose as was mentioned in section 3.7 (data not shown). These data show that α-mangostin is not capable of modifying the polarization of Th1 or Th17 cells towards a regulatory phenotype in the doses tested; however, it is capable of inducing apoptosis in activated T lymphocytes and polarized towards a Th1 or Th17 phenotype.

## 4. Discussion

α-mangostin has been shown to possess anti-inflammatory properties in several animal models of disease including arthritis (Ibrahim et al., 2016). The results obtained in the present study demonstrate the effectiveness of α-mangostin to decrease the clinical signs, inflammation and joint destruction in DBA/1J mice with established CIA. A higher effectiveness was exhibited by the higher dose of α-mangostin (40 mg/kg) because it significantly decreased the infiltration of inflammatory cells, synovial hyperplasia and the cartilage and bone damage in CIA mice. This effect was only observed during the first 18 days of treatment. This is particularly interesting since the therapeutic response to methotrexate an anti-inflammatory drug frequently used for arthritis treatment begins after 3–6 weeks of starting treatment and reaches its maximal improvement after 12 weeks or more (Weinblatt, 2013). Thus, it is feasible that the combination of both treatments may



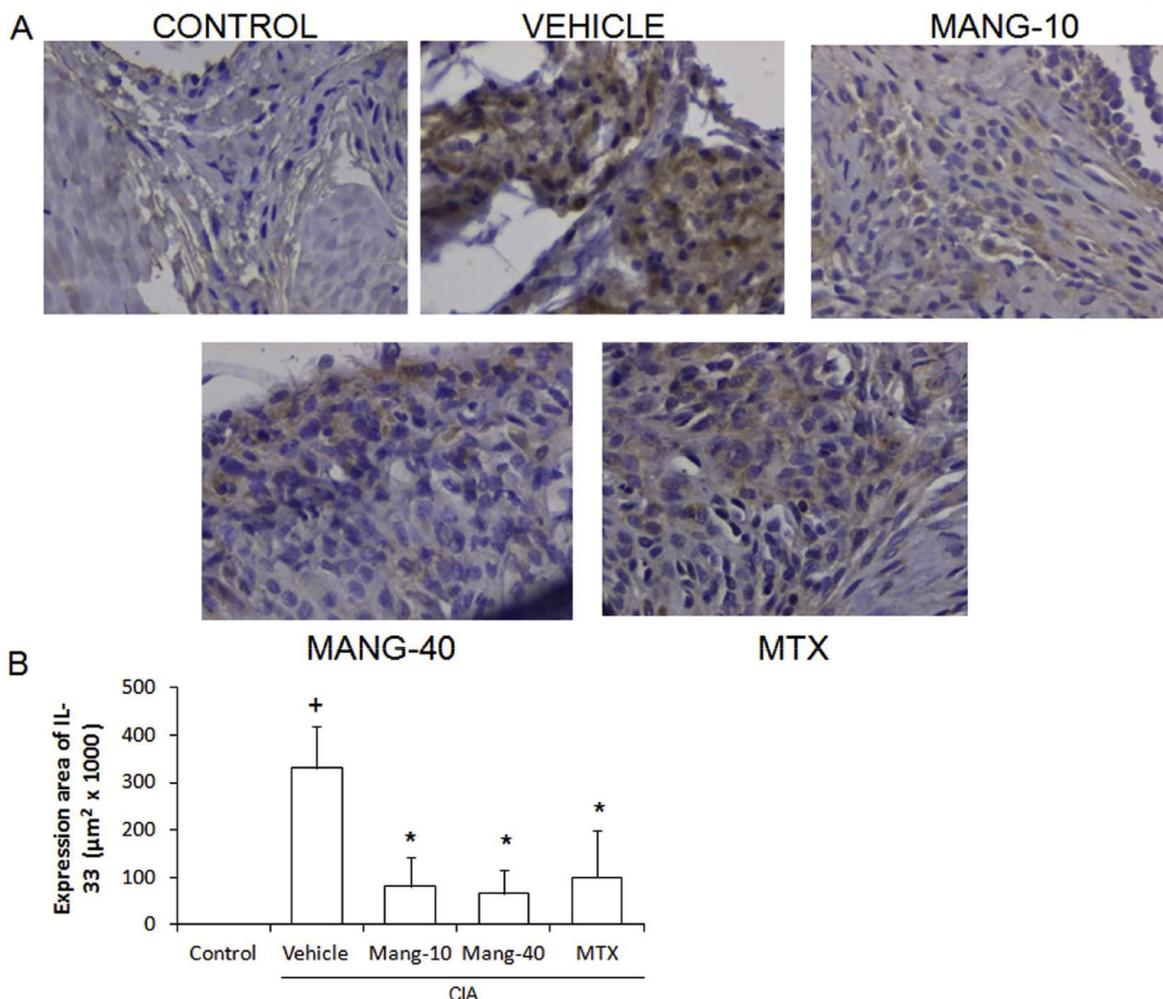
**Fig. 4.** Cytokines and chemokines levels in joint homogenates of CIA mice after 33 days of treatment. The concentration was expressed in pg/mg of protein and was determined by Luminex xMAP Technology (A) and ELISA test (B and C). Control, non-arthritis mice; Vehicle, arthritis mice treated with vehicle (corn oil); Mang 10, arthritis mice treated with 10 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; Mang 40, arthritis mice treated with 40 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; MTX, arthritis mice treated with methotrexate. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM.  $n = 6$ . The group is significantly different, <sup>+</sup> $p < 0.05$ , <sup>++</sup> $p < 0.01$  versus control group; <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  versus vehicle group (by ANOVA, Tukey test and LS means contrast test).

improve the current treatment. Previous evidence also point to the potential of  $\alpha$ -mangostin in the arthritis treatment. However, most studies conducted to demonstrate its anti-inflammatory capacity in arthritis have used non-autoimmune arthritis models or have administered  $\alpha$ -mangostin at the time of induction of disease or even before inducing it when arthritis is still not established, and the inflammatory and joint destruction processes are not yet clinically evident (Gopalakrishnan et al., 1980; Ibrahim et al., 2016; Lee et al., 2013).

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease in which both humoral immunity and cellular immunity are involved. The generation of autoantibodies such as rheumatoid factor, anti-citrullinated protein antibodies and antibodies against specific components of the joint (i.e. collagen type II and some peptidoglycans) play a critical role in the pathophysiology of the disease (Duskin and Eisenberg, 2010; Trouw et al., 2013; Frisenda et al., 2013). Indeed, these antibodies can even appear before the clinical manifestations of the disease and give rise to immune complexes which can be placed in other tissues besides the joint tissue and in this way exacerbate the inflammation and joint destruction (Schaeverbeke et al., 2012; Boissier et al., 2012).  $\alpha$ -mangostin was shown to

decrease the generation of anti-collagen II IgG2a antibodies at the dose of 40 mg/kg. This might indicate that part of mechanisms by which  $\alpha$ -mangostin had anti-inflammatory activity in murine CIA may be due to it affects the humoral response during disease, which is reflected in decreasing of autoantibodies production and probably in the generation of immune complexes. Furthermore, its effect in reducing only the generation of anti-collagen II IgG2a antibodies and not anti-collagen IgG1 antibodies could point towards an effect of  $\alpha$ -mangostin on Th1 responses.

For many years, several inflammatory mediators have been identified in the synovial fluid of RA patients including high levels of prostaglandins (PGs). PGE<sub>2</sub> is a metabolite of the arachidonic acid pathway, which is produced by chondrocytes and synovial fibroblasts from RA patients (Hoxha, 2018). The binding of PGE<sub>2</sub> to its E-type prostanoid receptor 4 exerts proinflammatory activity in the rheumatic synovium because it modifies the cytokine production, i.e., IL-6, IL-23 and vascular endothelial growth factor, promotes Th17 cells differentiation by stimulating IL-23 secretion by activated DCs and increases type II collagen degradation (Hoxha, 2018; Jia et al., 2014; Konya et al., 2013). As observed,  $\alpha$ -mangostin showed a tendency to decrease the production of PGE<sub>2</sub> in joints, which might be at



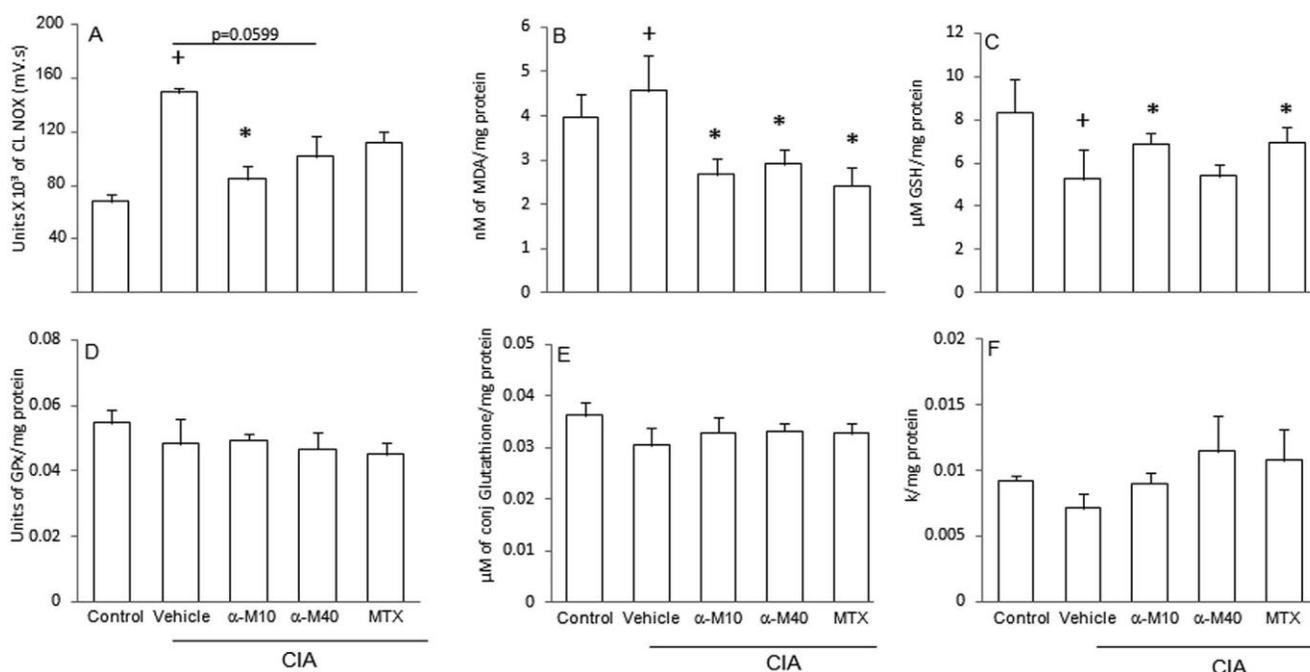
**Fig. 5.** Expression of IL-33 cytokine in joint tissues of CIA mice after 33 days of treatment. The IL-33 presence was determined by immunochemistry (A) and was expressed in surface area ( $\mu\text{m}^2$ ) (B). Control, non-arthritis mice; Vehicle, arthritis mice treated with vehicle (corn oil); Mang 10, arthritis mice treated with 10 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; Mang 40, arthritis mice treated with 40 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; MTX, arthritis mice treated with methotrexate. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM.  $n = 4$ . The group is significantly different, <sup>+</sup>  $p < 0.05$  versus control group; \* $p < 0.05$  versus vehicle group (by ANOVA, Tukey test and LS means contrast test).

least partially limiting the damage to specific proteins of the joint and modulating certain proinflammatory effects that are orchestrated by the PGE<sub>2</sub> pathway in CIA mice as mentioned above. In fact, a study has recently published the use of a PGE<sub>2</sub> receptor 4 antagonist which has demonstrated to be an effective treatment in reducing inflammation and joint damage in mice and rats with CIA (Caselli et al., 2018).

In addition to PGE<sub>2</sub>, other inflammatory mediators such as several cytokines and chemokines have been implicated in the pathogenesis of RA. It has been demonstrated that the imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in favor of the former can promote self-immunity and participate in the maintenance of inflammation and joint destruction during RA (McInnes et al., 2007). Some of these proinflammatory cytokines (i.e., TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6) are so important in the development of pathology, that development of monoclonal antibodies to block their function has significantly decreased pain, signs and joint damage in RA patients (Devine et al., 2011). In our CIA model, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18 and IL-33 cytokines were significantly increased in the synovial joint; however, only IL-6 and IL-33 were significantly reduced by the treatment with  $\alpha$ -mangostin. Since IL-6 is a pleiotropic cytokine which has several functions in RA, such as collaborating in the production of autoantibodies by promoting the maturation of B cells, participating in the differentiation of Th17 cells, stimulating the production of IL-8 and MCP-1 by endothelial cells (allowing neutrophils and monocytes recruitment), inducing

the synovioyte proliferation and the osteoclast differentiation and increasing the production of matrix metalloproteinases (MMPs) (Srirangan and Choy, 2010; Yoshida and Tanaka, 2014); its reduction could be related to the anti-inflammatory effect observed in the clinical and histopathological score. Moreover, it has been demonstrated that the decrease in IL-6 levels during the first 12 months of treatment is related to better clinical results and the blocking of IL-6 signaling by monoclonal antibodies such as tocilizumab rapidly improves the RA disease activity (Mijnheer et al., 2013; Yoshida and Tanaka, 2014). Therefore, molecules such as  $\alpha$ -mangostin that affect the production of this cytokine could have a beneficial effect on RA.

On the other hand, IL-33 has recently emerged as a cytokine involved in the pathophysiology of RA since it is able to activate NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in macrophages inducing the production of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-6, and chemokines such as MCP-1 among others (Chen et al., 2017). Furthermore, it has been shown that exogenous administration of IL-33 promotes the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines which exacerbates the inflammatory process in CIA mice (Chen et al., 2017; Carrasco et al., 2015). Conversely, antibodies that block the signaling pathway of IL-33 (T1/ST2) have been shown to decrease the severity of CIA in mice (Palmer et al., 2009). In the light of the above results, the decrease in the production of this cytokine in CIA mice by  $\alpha$ -mangostin could contribute to control the inflammatory process and joint



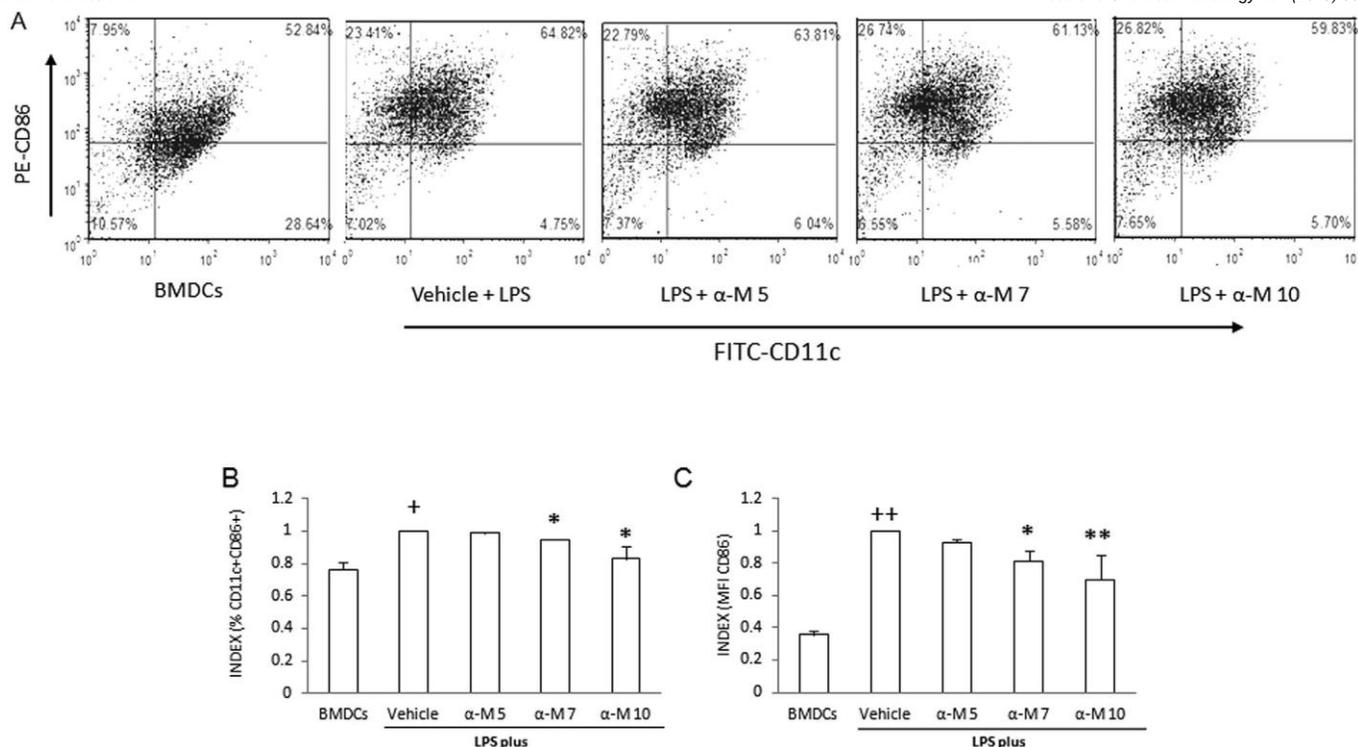
**Fig. 6.** Effects of  $\alpha$ -mangostin on oxidative stress and the preservation of antioxidant defense systems in CIA mice joints. Results of (A) NOX activity expressed as units of chemiluminescence (CL)  $\times 10^3$  (mV.s), (B) lipid peroxidation in nmoles of MDA/mg protein, (C) GSH levels in  $\mu$ moles of GSH/mg protein, (D) GPx activity in units of GPx/mg protein, (E) GST activity in  $\mu$ moles of conjugated glutathione/mg protein and (F) CAT activity in k unit/mg protein. Control, non-arthritis mice; Vehicle, arthritis mice treated with vehicle (corn oil); Mang 10, arthritis mice treated with 10 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; Mang 40, arthritis mice treated with 40 mg/kg of  $\alpha$ -mangostin; MTX, arthritis mice treated with methotrexate. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM. n = 6. The group is significantly different, <sup>+</sup>p < 0.05 versus control group; \*p < 0.05 versus vehicle group (by ANOVA, Tukey test and LS means contrast test).

damage that occur in this disease.

Several cell types have been identified in the inflammatory process and joint destruction that occurs in RA, many of which are recruited from the periphery to synovial joints, i.e., monocytes, T cells, B cells, neutrophils and dendritic cells, among others through small molecules called chemokines (Iwamoto et al., 2008). Several chemokines have been found present in the joints of RA patients, i.e. IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, epithelial neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78)/CXCL5, growth-related oncogene (GRO $\alpha$ )/CXCL1, connective tissue activating peptide III (CTAP-III)/CXCL7, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 and MIP-1 $\beta$ /CCL4, among others (Iwamoto et al., 2008; Koch, 2005). Although the principal function of these chemokines is the recruitment of inflammatory cells to the rheumatic synovium, some of them may also exhibit other functions such as promoting angiogenesis (Koch, 2005; Rump et al., 2017).  $\alpha$ -mangostin was shown to significantly reduce the production of LIX/CXCL5, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 and RANTES/CCL5. LIX/CXCL5 is one of the main chemokines involved in the recruitment of neutrophils in mice and plays a significant role in the production of TNF- $\alpha$  in macrophages and mast cells through the binding with its receptor (CXCR2). Moreover, in humans, ENA-78/CXCL5 has been shown to be increased in the synovium of RA patients where it participates significantly in angiogenesis (Vieira et al., 2009). On the other hand, IP-10/CXCL10 is expressed mainly in infiltrating macrophage-like cells and fibroblast-like synoviocytes in joints of RA patients where it recruits mainly T cells that express its receptor (CXCR3). Furthermore, there is also evidence that this chemokine may be partly responsible for bone erosion that occurs in RA since it mediates the expression of RANKL in CD4<sup>+</sup> T cells which is involved in the osteoclast differentiation (Antonelli et al., 2014). In addition to IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 is another cytokine implied in the recruitment of activated T cells and Th1 cells, is expressed in synovial fibroblasts of RA patients, induced by IFN- $\gamma$  and plays an essential role in the early infiltration of plasma cells into rheumatic synovium (Iwamoto et al., 2008;

Tsubaki et al., 2005). Moreover, this chemokine in concert with IP-10/CXCL10 and RANTES/CCL5 have been shown to increase the proteolytic activity of fibroblast-like synoviocytes by increasing its collagenase and gelatinase activity (Iwamoto et al., 2008). On the other hand, RANTES/CCL5 is a chemokine expressed by activated T cells, fibroblast-like synoviocytes and mononuclear cells into synovium of RA patients (Mellado et al., 2015). This chemokine promotes the expression of iNOS and the IL-6 and MMP-3 production in chondrocytes and also inhibits the synthesis of proteoglycans in these same cells, contributing therefore to the degradation of articular cartilage (Iwamoto et al., 2008). In light of the above, the decrease of LIX/CXCL5, IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 and RANTES/CCL5 by  $\alpha$ -mangostin could not only be impacting the recruitment of inflammatory cells to the synovium but also the processes of angiogenesis and bone and cartilage destruction that take place in the joints of RA patients.

Because inflammation and oxidative stress are closely interlinked in certain diseases including RA, ROS and RNS are other critical elements considered to be involved in the damage to bone and cartilage in RA patients (Mateen et al., 2016). Several studies have shown that total ROS, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radical are increased in patients with RA since some cells such as monocytes and neutrophils rise their production. On the other hand, certain antioxidant defenses, i.e.,  $\beta$ -carotene, vitamin E, and SH groups are diminished, while others, such as SOD, CAT, GPx, and GR activities and GSH levels have had variable results. The above induces the generation of an environment in favor of oxidative stress, which finally causes damage to lipids, proteins and DNA in RA patients (Quinonez-Flores et al., 2016). In addition to being directly involved in damage to the joint components, ROS and RNS can also have an effect on several cells of the immune system, i.e., T lymphocytes can become refractory to the induction of cell death and fibroblast-like synoviocytes can generate mutations of p53 gene (Quinonez-Flores et al., 2016; Hitchon and El-Gabalawy, 2004; Griffiths, 2005). In the CIA model, an increase of NOX (an O<sub>2</sub><sup>-</sup>-generating enzyme) and a decrease of GSH was observed.  $\alpha$ -mangostin was shown to decrease the activity of NOX and lipid peroxidation, as well as to increase the levels of GSH, one of the principal intracellular antioxidant defense systems. These findings point to a protective effect of  $\alpha$ -mangostin against



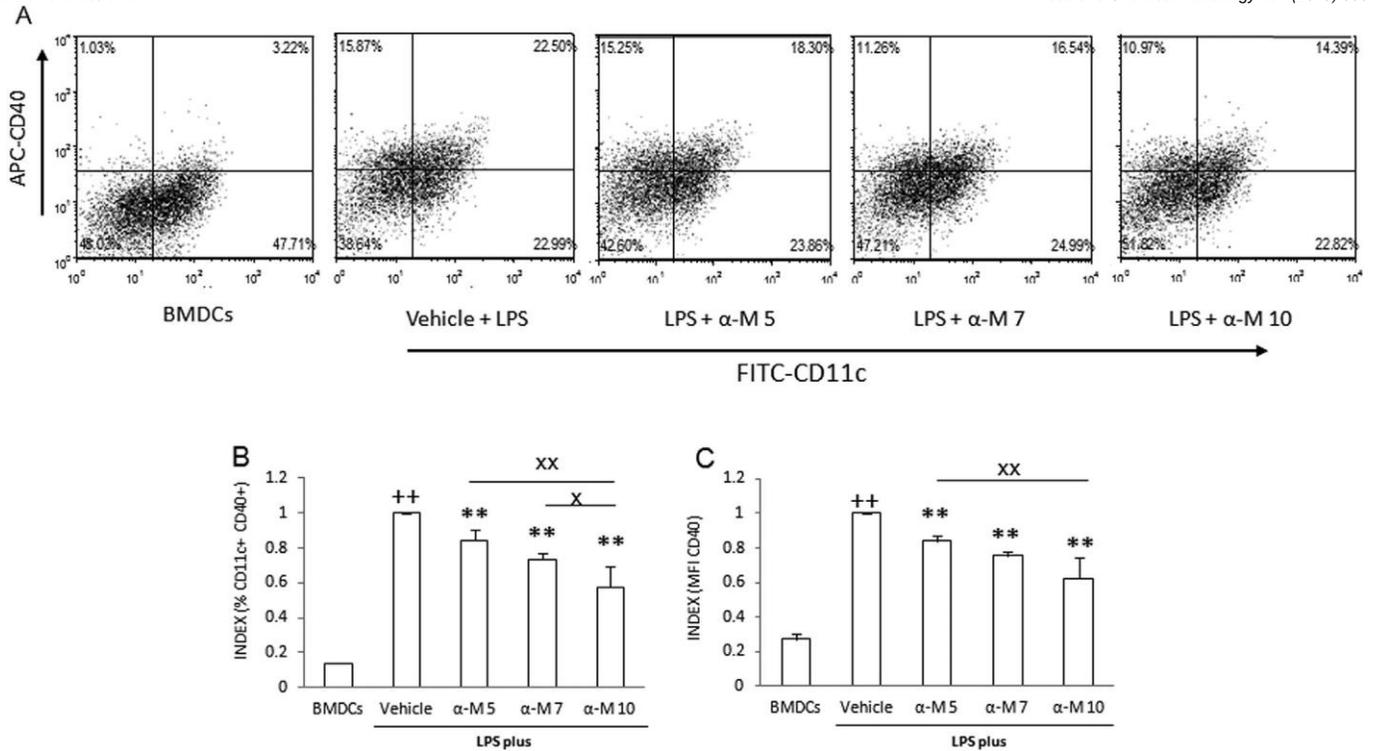
**Fig. 7.** Effect of  $\alpha$ -mangostin on mBMDCs activated with LPS. The effect was evaluated by flow cytometry, and data were analyzed using the FCS Express software. Representative dot plots of the effect of  $\alpha$ -mangostin on the expression of CD86 in CD11c<sup>+</sup> cells (mBMDCs) activated with LPS for 4 h after staining cells with PE-CD86 and FITC-CD11c antibodies (A). Index of the percentage of CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cells of each experimental group (B). Index of mean fluorescence intensity (MFI) for CD86 in CD11c<sup>+</sup> cells of each experimental group (C). Data are representative of three independent experiments. BMDCs, murine bone marrow-derived dendritic cells without stimulus; Vehicle + LPS, BMDCs treated with lipopolysaccharide (LPS) and dimethyl sulfoxide (DMSO); LPS +  $\alpha$ -M 5, BMDCs treated with LPS and 5  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin; LPS +  $\alpha$ -M 7, BMDCs treated with LPS and 7  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin; and LPS +  $\alpha$ -M 10, BMDCs treated with LPS and 10  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. The group is significantly different, <sup>+</sup>p < 0.05, <sup>++</sup>p < 0.01 versus non-stimulated mBMDCs; <sup>\*</sup>p < 0.05, <sup>\*\*</sup>p < 0.01 versus vehicle group (by Kruskal-Wallis test for Index of the percentage of CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cells and by ANOVA, Tukey test and LS means contrast test for CD86 MFI).

the oxidative stress generated in CIA mice, which could not only be limiting the direct damage to the joint tissue but also the inflammatory process due to the actions of ROS and RNS on the aforementioned immune cells.

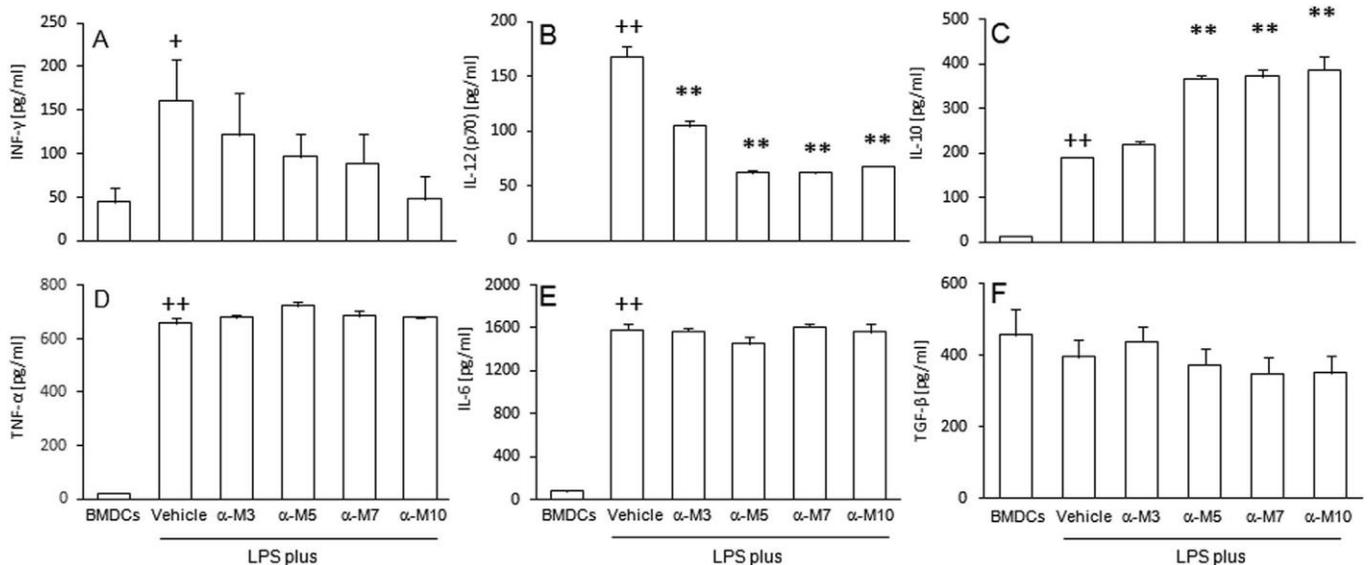
$\alpha$ -mangostin has been shown to possess anti-inflammatory effects on several cell types that play essential roles in RA. For example, in vitro  $\alpha$ -mangostin is able to inhibit NO and PGE<sub>2</sub> release and iNOS expression in LPS-stimulated murine macrophage RAW 264.5 cells and is capable of inducing apoptosis in human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte MH7A cells (Chen et al., 2008; Zhang et al., 2018). However, its effect on activated dendritic cells as well as on Th1 and Th17 lymphocytes, critical players in the disease process of RA, has not been completely clarified. In this work, it was demonstrated that  $\alpha$ -mangostin is able to decrease the expression of co-stimulatory molecules such as CD86 and CD40 in LPS-activated BMDCs, which might have an impact on its capability to present antigens to autoreactive T cells. In addition, it was also able to decrease the production of IL-12 p70 and showed a tendency to decrease the production of IFN- $\gamma$  in these cells, which could be limiting Th1 responses. On the other hand,  $\alpha$ -mangostin also increased IL-10 production in LPS-activated BMDCs, an anti-inflammatory cytokine that has been related with the control of several inflammatory pathologies (Lyer and Cheng, 2013; Siqueira Mietto et al., 2015; Ip et al., 2017). All these aforementioned  $\alpha$ -mangostin effects on activated DCs indicate that this xanthone can promote a regulatory dendritic cells phenotype, which could be useful to reduce inflammation and consequently the joint damage that occurs in RA patients. Because, it has been proven that DCs in synovial joint tissues of patients with RA are raised, and these DCs show an increased expression of activation markers as well as an enhanced capability to induce the proliferation of

T lymphocytes and their production of cytokines (i.e., IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-4) under stimulation (Yu and Langridge, 2017).

Th1 and Th17 lymphocytes are the main subsets of T cells involved in RA. Th17 cells have been found increased in peripheral blood, bone marrow and synovial fluid of RA patients and it is known that they participate importantly in joint destruction through the production of IL-17A which promotes osteoclastogenesis and is involved in the recruitment of neutrophils to the joint (Gaffen, 2009; Sarkar et al., 2010; Kotake et al., 2017). Th1 cells have also been found increased in the synovial fluid and bone marrow of patients with RA and have been associated with osteoclastogenesis due to an increase in the expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) (Li et al., 2017). On the other hand, it is well known that T cells with a regulatory phenotype (Tregs) are able to control Th1 and Th17 cell responses (Li et al., 2007; Kleinewietfeld and Hafler, 2013; Shrestha et al., 2015). In this study we investigated whether  $\alpha$ -mangostin has the ability to favor the generation of regulatory T cells in an environment that promotes polarization towards Th17 or Th1 cells because Th1 and Th17 lymphocytes polarization has been shown to be favored in the synovial joints of RA patients, and several polyphenols have been demonstrated to decrease the generation of these Th17 and Th1 cells through the induction of regulatory T cells in some animal models of arthritis (Park et al., 2011; Xuzhu et al., 2012; Rogers et al., 2010). Our results show that while  $\alpha$ -mangostin was not able to modify the polarization in both Th1 and Th17 cells towards a regulatory phenotype, it was able to induce apoptosis of these two activated cellular subtypes. This could be of importance since the generation of apoptosis of both Th1 and Th17 cells could contribute to the reduction of inflammation and joint damage generated by these cells. In fact, some other



**Fig. 8.** Effect of  $\alpha$ -mangostin on mBMDCs activated with LPS. The effect was evaluated by flow cytometry, and data were analyzed using the FCS Express software. Representative dot plots of the effect of  $\alpha$ -mangostin on the expression of CD40 in CD11c<sup>+</sup> cells (mBMDCs) activated with LPS for 4 h after staining cells with APC-CD40 and FITC-CD11c antibodies (A). Index of the percentage of CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>+</sup> cells of each experimental group (B). Index of mean fluorescence intensity (MFI) for CD40 in CD11c<sup>+</sup> cells of each experimental group (C). Data are representative of three independent experiments. BMDCs, murine bone marrow-derived dendritic cells without stimulus; Vehicle + LPS, BMDCs treated with lipopolysaccharide (LPS) and dimethyl sulfoxide (DMSO); LPS +  $\alpha$ -M 5, BMDCs treated with LPS and 5  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin; LPS +  $\alpha$ -M 7, BMDCs treated with LPS and 7  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin; and LPS +  $\alpha$ -M 10, BMDCs treated with LPS and 10  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. ++  $p$  < 0.01 versus non-stimulated mBMDCs; \*\* $p$  < 0.01 for significant differences in a group versus vehicle group or <sup>x</sup> $p$  < 0.05, <sup>xx</sup> $p$  < 0.01 for significant differences between groups (by ANOVA, Tukey test and LS means contrast test).



**Fig. 9.** Effect of  $\alpha$ -mangostin on cytokines production in culture supernatants of mBMDCs activated with LPS for 4 or 24 h. The concentration was expressed in pg/ml and was determined by ELISA. Cytokine production was measured after 4 h of activation with LPS for every case except for INF- $\gamma$  (24 h). (A) interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) production, (B) interleukin-12 (p70) (IL-12 p70) production, (C) interleukin-10 (IL-10) production, (D) tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production, (E) interleukin-6 (IL-6) production, and (F) transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) production. Data are representative of three independent experiments. BMDCs, murine bone marrow-derived dendritic cells without stimulus; Vehicle + LPS, BMDCs treated with lipopolysaccharide (LPS) and dimethyl sulfoxide (DMSO); LPS +  $\alpha$ -M 3, BMDCs treated with LPS and 3  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin; LPS +  $\alpha$ -M 5, BMDCs treated with LPS and 5  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin; LPS +  $\alpha$ -M 7, BMDCs treated with LPS and 7  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin; and LPS +  $\alpha$ -M 10, BMDCs treated with LPS and 10  $\mu$ g/ml of  $\alpha$ -mangostin. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. The group is significantly different, +  $p$  < 0.05, ++  $p$  < 0.01 versus non-stimulated mBMDCs; \*\* $p$  < 0.01 versus vehicle group (by ANOVA, Tukey test and LS means contrast test for all cytokines except for IL-10 (Kruskal-Wallis test)).

polyphenols such as resveratrol that have anti-inflammatory properties in different diseases have been shown to generate apoptosis of activated T lymphocytes as part of their mechanism of action (Radkar et al., 2007).

In conclusion, our results demonstrate that  $\alpha$ -mangostin possess anti-inflammatory and antioxidant capacity on established CIA in mice that effectively improve the onset of the disease during the first 18 days. Therefore,  $\alpha$ -mangostin could be combined with methotrexate or another disease-modifying antirheumatic drug (DMARD) to cover early stages of RA and improve the quality of life of RA patients. Mechanisms involved in the  $\alpha$ -mangostin effectiveness begin to be revealed.

### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Acknowledgements

The authors thank Beatriz Hernández, MSc Evelyn Pulido, Raquel Guerrero and DSc Armando Pérez for their support in carrying out the histological techniques, to Jorge García and Isabel Herrera for their assistance in the handling of laboratory animals and tissue extraction and to Rubí Zavala and Monica Martínez for animal care. This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACYT CB-2012-169011) and Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. The authors gratefully acknowledge the financial assistance of CONACYT to Diana Rocio Herrera-Aco from Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM, who received the fellowship254086.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.018>.

### Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.018>.

### References

- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Al-Massarani, S.M., El Gamal, A.A., Al-Musayeib, N.M., Mothana, R.A., Basudan, O.A., Al-Rehaily, A.J., Farag, M., Assaf, M.H., El Tahir, K.H., Maes, L., 2013. Phytochemical, antimicrobial and antiprotozoal evaluation of *Garcinia Mangostana* pericarp and  $\alpha$ -mangostin, its major xanthone derivative. *Molecules* 18, 10599–10608. <https://doi.org/10.3390/molecules180910599>.
- Alamanos, Y., Drosos, A.A., 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 4, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.09.002>.
- Antonelli, A., Ferrari, S.M., Giuggioli, D., Ferrannini, E., Ferri, C., Fallahi, P., 2014. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 13, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.10.010>.
- Boissier, M.C., Semerano, L., Challal, S., Saldenber-Kermanac'h, N., Falgarone, G., 2012. Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J. Autoimmun.* 39, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.05.021>.
- Camps, M., Rückle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, F., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Françon, B., Martin, T., Gretener, D., Perrin, D., Leroy, D., Vitte, P.-A., Hirsch, E., Wymann, M.P., Cirillo, R., Schwarz, M.K., Rommel, C., 2005. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 11, 936–943. <https://doi.org/10.1038/nm1284>.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480. <https://doi.org/10.1074/jbc.250.11.5475>.
- Carrasco, T.G., Morales, R.A., Pérez, F., Terraza, C., Yáñez, L., Campos-Mora, M., Pino-Lagos, K., 2015. Alarmin immunologists: IL-33 as a putative target for modulating T cell-dependent responses. *Front. Immunol.* 6, 4–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00232>.
- Caselli, G., Bonazzi, A., Lanza, M., Ferrari, F., Maggioni, D., Ferioli, C., Giambelli, R., Comi, E., Zerbi, S., Perrella, M., Letari, O., Di Luccio, E., Colovic, M., Persiani, S., Zanelli, T., Mennuni, L., Piepoli, T., Rovati, L.C., 2018. Pharmacological characterisation of CR6086, a potent prostaglandin E2 receptor 4 antagonist, as a new potential disease-modifying anti-rheumatic drug. *Arthritis Res. Ther.* 20, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1537-8>.
- Chairungrilerd, N., Furukawa, K., Ohta, T., Nozoe, S., Ohizumi, Y., 1996. Pharmacological properties of alpha-mangostin, a novel histamine H1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 314, 351–356.
- Chen, L.G., Yang, L.L., Wang, C.C., 2008. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food Chem. Toxicol.* 46, 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.096>.
- Chen, S., Chen, B., Wen, Z., Huang, Z., Ye, L., 2017. IL-33/ST2-mediated inflammation in macrophages is directly abrogated by IL-10 during rheumatoid arthritis. *Oncotarget* 8, 32407–32418. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16299>.
- Cho, M. La, Heo, Y.J., Park, M.K., Oh, H.J., Park, J.S., Woo, Y.J., Ju, J.H., Park, S.H., Kim, H.Y., Min, J.K., 2009. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates col-lagen-induced arthritis. *Immunol. Lett.* 124, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.05.001>.
- Choy, E., 2012. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51, v3–v11. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes113>.
- Deschamps, J.D., Gautschi, J.T., Whitman, S., Johnson, T.A., Gassner, N.C., Crews, P., Holman, T.R., 2007. Discovery of platelet-type 12-human lipoxygenase selective inhibitors by high-throughput screening of structurally diverse libraries. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6900–6908. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.015>.
- Devine, E.B., Alfonso-Cristancho, R., Sullivan, S.D., 2011. Effectiveness of biologic therapies for rheumatoid arthritis: an indirect comparisons approach. *Pharmacotherapy* 31, 39–51. <https://doi.org/10.1592/phco.31.1.39>.
- Doi, H., Shibata, M.A., Shibata, E., Morimoto, J., Akao, Y., Iinuma, M., Tanigawa, N., Otsuki, Y., 2009. Panaxanthone isolated from pericarp of *Garcinia mangostana* L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer. *Anticancer Res.* 29, 2485–2495. <https://doi.org/10.3233/015387029013114>.
- Duskin, A., Eisenberg, R.A., 2010. The role of antibodies in inflammatory arthritis. *Immunol. Rev.* 233, 112–125. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00856.x>.
- Ee, G.C.L., Daud, S., Taufiq-Yap, Y.H., Ismail, N.H., Rahmani, M., 2006. Xanthones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat. Prod. Res.* 20, 1067–1073. <https://doi.org/10.1080/14786410500463114>.
- Feldmann, M., Maini, S.R.N., 2008. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: An education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol. Rev.* 223, 7–19. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00626.x>.
- Fernández-Checa, J.C., Kaplowitz, N., 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal. Biochem.* 190, 212–219. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90183-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90183-A).
- Filippin, L.I., Vercelino, R., Marroni, N.P., Xavier, R.M., 2008. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 152, 415–422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03634.x>.
- Frisenda, S., Perricone, C., Valesini, G., 2013. Cartilage as a target of autoimmunity: A thin layer. *Autoimmun. Rev.* 12, 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.10.003>.
- Gaffen, S.L., 2009. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 11, 365–370. <https://doi.org/10.1007/s11926-009-0052-y>.
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.-C., Chaudière, J., 1998. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1176–1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>.
- Gopalakrishnan, C., Shankaranarayanan, D., Kameswaran, L., Nazimudeen, S.K., 1980. Effect of mangostin, a xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. in immunopathological & inflammatory reactions. *Indian J. Exp. Biol.* 18, 843–846.
- Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2005. Rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 204, 55–73. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00245.x>.
- Griffiths, H.R., 2005. ROS as signalling molecules in T cells—evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. *Redox Rep.* 10, 273–280. <https://doi.org/10.1179/135100005X83680>.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139. <https://doi.org/10.1021/jb00267a013>.
- Hitchon, C.A., El-Gabalawy, H.S., 2004. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6, 265–278. <https://doi.org/10.1186/ar1447>.
- Hoxha, M., 2018. A systematic review on the role of eicosanoid pathways in rheumatoid arthritis. *Adv. Med. Sci.* 63, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.advm.2017.06.004>.
- Ibrahim, M.Y., Hashim, N.M., Mariod, A.A., Mohan, S., Abdulla, M.A., Abdelwahab, S.I., Arbab, I.A., 2016.  $\alpha$ -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn: An updated review of its pharmacological properties. *Arab. J. Chem.* 9, 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.arabj.2014.02.011>.
- Ip, W.K.E., Hoshi, N., Shouval, D.S., Snapper, S., Medzhitov, R., 2017. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* 356, 513–519. <https://doi.org/10.1126/science.1253535>.
- Iwamoto, T., Okamoto, H., Toyama, Y., Momohara, S., 2008. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: Chemokines in the joints of patients. *FEBS J.* 275, 4448–4455. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06580.x>.
- Jang, H.Y., Kwon, O.K., Oh, S.R., Lee, H.K., Ahn, K.S., Chin, Y.W., 2012. Mangosteen xanthones mitigate ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4042–4050. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.037>.

- Ji, X., Avula, B., Khan, I.A., 2007. Quantitative and qualitative determination of six xanthones in *Garcinia mangostana* L. by LC-PDA and LC-ESI-MS. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 43, 1270–1276. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.10.018>.
- Jia, X.Y., Chang, Y., Sun, X.J., Dai, X., Wei, W., 2014. The role of prostaglandin E2 re-ceptor signaling of dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharm.* 23, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.024>.
- Kleinewietfeld, M., Hafler, D.A., 2013. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin. Immunol.* 3425, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.009>.
- Kobayashi, S., Momohara, S., Kamatani, N., Okamoto, H., 2008. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: Role of environmental factors. *FEBS J.* 275, 4456–4462. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06581.x>.
- Koch, A.E., 2005. Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: Future targets? *Arthritis Rheum.* 52, 710–721. <https://doi.org/10.1002/art.20932>.
- Konya, V., Marsche, G., Schuligoi, R., Heinemann, A., 2013. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol. Ther.* 138, 485–502. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.03.006>.
- Kotake, S., Yago, T., Kobashigawa, T., Nanke, Y., 2017. The Plasticity of Th17 Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Med.* 6, 67. <https://doi.org/10.3390/jcm6070067>.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90747-6).
- Lee, L.T., Tsai, Y.F., Hu, N.Y., Wang, C.W., Huang, K.K., Hsiao, J.K., Shih, Y.C., Munekazu, I., 2013. Anti-arthritis effect of mangostins from *G.Mangostana*. *Biomed. Prev. Nutr.* 3, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.10.002>.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Flavell, R.A., 2007. T Cell-Produced Transforming Growth Factor- $\beta$  Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* 26, 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.014>.
- Li, Q., Han, D., Cong, B., Shan, B., Zhang, J., Chen, H., Ma, C., Liyanage, S.S., 2011. Cholecystokinin octapeptide significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice by inhibiting Th17 polarization primed by dendritic cells. *Cell. Immunol.* 272, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.09.007>.
- Li, S., Yin, H., Zhang, K., Wang, T., Yang, Y., Liu, X., Chang, X., Zhang, M., Yan, X., Ren, Y., Pan, W., Zhang, L., 2017. Effector T helper cell populations are elevated in the bone marrow of rheumatoid arthritis patients and correlate with disease severity. *Sci. Rep.* 7, 4776. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05014-8>.
- Liu, Y., Park, J.M., Chang, K.H., Chin, Y.W., Lee, M.Y., 2015.  $\alpha$ - and  $\gamma$ -mangostin cause shape changes, inhibit aggregation and induce cytolysis of rat platelets. *Chem. Biol. Interact.* 240, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.021>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4).
- Lubbers, E., 2010. Th17 cytokines and arthritis. *Semin. Immunopathol.* 32, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0189-9>.
- Lutz, M.B., Kutsch, N., Ogilvie, A.L., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G., 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77–92. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00204-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00204-X).
- Lyer, S.S., Cheng, G., 2013. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and autoimmune disease. *Natl. Inst. Heal.* 10, 54–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2250.Digestion>.
- Márquez-Valadez, B., Lugo-Huitrón, R., Valdivia-Cerda, V., Miranda-Ramírez, L.R., Pérez-De La Cruz, V., González-Cuahutencos, O., Rivero-Cruz, I., Mata, R., Santamaría, A., Pedraza-Chaverri, J., 2009. The natural xanthone alpha-mangostin reduces oxidative damage in rat brain tissue. *Nutr. Neurosci.* 12, 35–42. <https://doi.org/10.1179/147683009X388850>.
- Mateen, S., Moin, S., Zafar, A., Khan, A.Q., 2016. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clin. Chim. Acta* 463, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.10.007>.
- McInnes, I.B., McInnes, I.B., Schett, G., Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 429–442. <https://doi.org/10.1038/nri2094>.
- Mellado, M., Martínez-Muñoz, L., Cascio, G., Lucas, P., Pablos, J.L., Rodríguez-Frade, J.M., 2015. T cell migration in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* 6, 384. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00384>.
- Mijnheer, G., Prakken, B.J., van Wijk, F., 2013. The effect of autoimmune arthritis treatment strategies on regulatory T-cell dynamics. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 260–267. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835d0ee4>.
- Mirshafiey, A., Mohsenzadegan, M., 2008. The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* 7, 195–202. <https://doi.org/10.7411/ijaa.195202>.
- Nakagawa, Y., Inuma, M., Naoe, T., Nozawa, Y., Akao, Y., 2007. Characterized mechanism of  $\alpha$ -mangostin-induced cell death: Caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 5620–5628. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.04.071>.
- Nava Catorce, M., Acero, G., Pedraza-Chaverri, J., Fragoso, G., Govezensky, T., Gevorkian, G., 2016. Alpha-mangostin attenuates brain inflammation induced by peripheral lipopolysaccharide administration in C57BL/6J mice. *J. Neuroimmunol.* 15, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.008>.
- Nelli, G.B., K. A.S., Kilari, E.K., 2013. Antidiabetic effect of alpha-mangostin and its protective role in sexual dysfunction of streptozotocin induced diabetic male rats. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 59, 319–328. <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.820369>.
- Nguemfo, E.L., Dimo, T., Dongmo, A.B., Azebaze, A.G.B., Alaoui, K., Asongalem, A.E., Cherrah, Y., Kamtchouing, P., 2009. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae). *Inflammopharmacology* 17, 37–41. <https://doi.org/10.1007/s10787-008-8039-2>.
- Oberley, L.W., Spitz, D.R., 1984. [61] Assay of Superoxide Dismutase Activity in Tumor Tissue. *Methods Enzymol.* 105, 457–464. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05064-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05064-3).
- Palmer, G., Talbot-Ayer, D., Lamacchia, C., Toy, D., Seemayer, C.A., Viatte, S., Finckh, A., Smith, D.E., Gabay, C., 2009. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 738–749. <https://doi.org/10.1002/art.24305>.
- Park, M.K., Park, J.S., Cho, M. La, Oh, H.J., Heo, Y.J., Woo, Y.J., Heo, Y.M., Park, M.J., Park, H.S., Park, S.H., Kim, H.Y., Min, J.K., 2011. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) differentially regulates Foxp3 + regulatory and IL-17 + pathogenic T cell in autoimmune arthritis. *Immunol. Lett.* 135, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.09.011>.
- Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., Pérez-Rojas, J.M., 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem. Toxicol.* 46, 3227–3239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.024>.
- Pedraza-Chaverri, J., Reyes-Fermín, L.M., Nolasco-Amaya, E.G., Orozco-Ibarra, M., Medina-Campos, O.N., González-Cuahutencos, O., Rivero-Cruz, I., Mata, R., 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.11.002>.
- Quinonez-Flores, C.M., Gonzalez-Chavez, S.A., Del Rio Najera, D., Pacheco-Tena, C., 2016. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *BioMed Res. Int.* 2016, 6097417 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2016/6097417>.
- Radkar, V., Hardej, D., Lau-Cam, C., Billack, B., 2007. Evaluation of resveratrol and pi-ceatannol cytotoxicity in macrophages, T cells, and skin cells. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 58, 293–304. <https://doi.org/10.2478/v10004-007-0020-8>.
- Reznick, A.Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7).
- Rogers, N.M., Kireta, S., Coates, P.T.H., 2010. Curcumin induces maturation-arrested dendritic cells that expand regulatory T cells in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 460–473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04232.x>.
- Roseghini, R., Rocha, D.S., Clarêncio, J., Costa, S.L., Costa, M.F.D., Tardy, M., Nascimento, R., Schaefer, R., Velozo, E., Meyer, R., Freire, S., 2007. Flavonoid rutin alters the viability and function of mitogen-stimulated splenocytes and thymocytes compared with non stimulated cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 29, 271–285. <https://doi.org/10.1080/08923970701512940>.
- Rump, L., Matthey, D.L., Kehoe, O., Middleton, J., 2017. An initial investigation into endothelial CC chemokine expression in the human rheumatoid synovium. *Cytokine* 97, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.023>.
- Sampath, P.D., Vijayaraghavan, K., 2007. Cardioprotective effect of  $\alpha$ -mangostin, a xanthone derivative from Mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 336–339. <https://doi.org/10.1002/jbt.20199>.
- Sarkar, S., Cooney, L.A., Fox, D.A., 2010. The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 159, 225–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04016.x>.
- Schaeferbeke, T., Truchetet, M. Élise, Richez, C., 2012. When and where does rheumatoid arthritis begin? *Jt. Bone Spine* 79, 550–554. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.09.004>.
- Schwarz, H., Schmittner, M., Duschl, A., Horejs-Hoec, J., 2014. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One* 9, 103840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113840>.
- Shan, T., Cui, X., Li, W., Lin, W., Lu, H., Li, Y., Chen, X., Wu, T., 2014.  $\alpha$ -Mangostin suppresses human gastric adenocarcinoma cells in vitro via blockade of Stat3 signaling pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 1065–1073. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.43>.
- Shrestha, S., Yang, K., Guy, C., Vogel, P., Neale, G., Chi, H., 2015. Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. *Nat. Immunol.* 16, 178–187. <https://doi.org/10.1038/ni.3076>.
- Siqueira Mietto, B., Kroner, A., Girolami, E.I., Santos-Nogueira, E., Zhang, J., David, S., 2015. Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *J. Neurosci.* 35, 16431–16442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-15.2015>.
- Smith, J.B., Haynes, M.K., 2002. Rheumatoid Arthritis—A Molecular Understanding. *Ann. Intern. Med.* 136, 908–922. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-136-12-200206180-00012>.
- Srirangan, S., Choy, E.H., 2010. The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2, 247–256. <https://doi.org/10.1177/1759720X10378372>.
- Tewtrakul, S., Wattanapiromsakul, C., Mahabarakam, W., 2009. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.* 121, 379–382. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.007>.
- Trouw, L.A., Huijzinga, T.W.J., Toes, R.E.M., 2013. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens—common principles. *Ann. Rheum. Dis.* 72, ii132–ii136. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202349>.
- Tsubaki, T., Takegawa, S., Hanamoto, H., Arita, N., Kamogawa, J., Yamamoto, H., Takubo, N., Nakata, S., Yamada, K., Yamamoto, S., Yoshie, O., Nose, M., 2005. Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 363–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02850.x>.
- Vieira, S.M., Lemos, H.P., Grespan, R., Napimoga, M.H., Dal-Secco, D., Freitas, A., Cunha, T.M., Verri, W.A., Souza, D.A., Jamur, M.C., Fernandes, K.S., Olivero, C., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Cunha, F.Q., 2009. A crucial role for TNF- $\alpha$  in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and

- LIX/CXCL5. *Br. J. Pharmacol.* 158, 779–789. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00367.x>.
- Vincent, T.L., Williams, R.O., Maciewicz, R., Silman, A., Garside, P., Bevan, S., Chanalaris, A., Chapman, V., Cope, A., Cruwys, S., Dell'Accio, F., Gaskin, P., Gilroy, D., Glasson, S., Hegen, M., McDougall, J., Moore, A., du Sert, N.P., Perretti, M., Pitsillides, A., Robinson, V., Seed, M., Thompson, S., Walsh, D.A., Williams, N., 2012. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatol. (United Kingdom)* 51, 1931–1941. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes035>.
- Weinblatt, M.E., 2013. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 124, 16–25.
- Williams, P.J., Jones, R.H.V., Rademacher, T.W., 1998. Correlation between IgG anti-type collagen levels and arthritic severity in murine arthritis. *Autoimmunity* 27, 201–207. <https://doi.org/10.3109/08916939808993831>
- Xuzhu, G., Komai-Koma, M., Leung, B.P., Howe, H.S., McSharry, C., McInnes, I.B., Xu, D., 2012. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 129–135. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.149831>.
- Yoshida, Y., Tanaka, T., 2014. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *BioMed Res. Int.* 2014, 698313 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2014/698313>.
- Yu, M.B., Langridge, W.H.R., 2017. The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 37, 1043–1051. <https://doi.org/10.1007/s00296-017-3671-z>.
- Zhang, J., Chen, Q., Wang, S., Li, T., Xiao, Z., Lan, W., Huang, G., Cai, X., 2018.  $\alpha$ -Mangostin, A Natural Xanthone, Induces Apoptosis and ROS Accumulation in Human Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocyte MH7A Cells. *Curr. Mol. Med.* 17, 375–380. <https://doi.org/10.2174/1566524018666171205123220>