



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE PATOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**EFFECTO DOSIS-RESPUESTA DE BOLDINA SOBRE VIABILIDAD Y TOXICIDAD
CELULAR EN MACRÓFAGOS HUMANOS.**

Débora Zamorano Riquelme

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asistente Dra. Anilei Hoare Teuche

Prof. Dr. Bruce Cassels

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1200098
Santiago - Chile
2022**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE PATOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**EFFECTO DOSIS-RESPUESTA DE BOLDINA SOBRE VIABILIDAD Y TOXICIDAD
CELULAR EN MACROFAGOS HUMANOS.**

Débora Zamorano Riquelme

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asistente Dra. Anilei Hoare Teuche

Prof. Dr. Bruce Cassels

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1200098
Santiago - Chile
2022**

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto FONDECYT 1200098 el cual permitió realizar este trabajo de investigación. A Sebastián Castro alumno de doctorado de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile por purificar y facilitar la boldina utilizada en este estudio.

Agradecer a mi familia, a mis padres Débora y José por el apoyo y paciencia incondicional durante el proceso. A mis hermanos Matías y Bastián por siempre sacarme una sonrisa y darme una palabra de ánimo. A los cuatro por el amor, cariño y confianza que siempre han tenido por mí. A mis tíos/as, primos/as, a mis abuelos/as, por siempre darme ánimos y creer en mí.

A Sebastián por acompañarme durante todas las etapas de este camino, incluidas las buenas y las no tan buenas, gracias por hacerme tan feliz.

A los amigos que conocí en la universidad Denny, Florencia, Carolina, Diego, gracias por todo, poder reír y llorar con ustedes fue gran parte de lo que me permitió continuar este camino, estoy muy feliz de poder llamarlos colegas en el futuro. A mis amigos de la vida Nicole y Ricardo por apoyarme incluso a la distancia.

A la Dra. Marcela Hernández por su infinita disposición para enseñar, guiar y compartir sus conocimientos. A todos los integrantes del laboratorio de biología periodontal, especialmente a Jessica y Pablo.

A todos los funcionarios, docentes y compañeros con los que pude compartir en la carrera.

Muchas gracias.

GLOSARIO

Abreviación	Significado
5HT	5 hidroxitriptamina (serotonina)
AAA	Absceso apical agudo
AAC	Absceso apical crónico
ARNm	ARN mensajero
CCF	Cromatografía en capa fina
Cx-HC	Hemicanales de conexina
DCM	Diclorometano
DSS	Dextrano sulfato de sodio
HCL	Ácido clorhídrico
HPLC-UV	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento con detección en el ultravioleta
ICD	Clasificación internacional de enfermedades
IFN-γ	Interferón gamma
IL-4	Interleuquina-4
IL-6	Interleuquina-6
IL-12	Interleuquina-12
IL-23	Interleuquina-23
IL-17	Interleuquina-17
IL-10	Interleuquina-10
JAK2	Janus quinasa 2
LPS	Lipopolisacárido
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIC	Nivel de inserción clínica
OC	Osteítis condensante
PA	Periodontitis apical
PAA	Periodontitis apical asintomática
PAMPs	Patrones moleculares asociados

a patógenos

PAS	Periodontitis apical sintomática
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
Th1	Linfocito T helper 1
Th2	Linfocito T helper 2
Th17	Linfocito T helper 17
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
- Patologías periodontales.....	10
- Macrófagos en inflamación periodontal.....	12
- Boldina como agente terapéutico	14
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
METODOLOGÍA	18
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	30
ANEXOS	39
- Anexo 1: Acta de aprobación comité de ética.....	39

RESUMEN

Introducción: Dentro de las enfermedades inflamatorias que afectan a los tejidos periodontales, encontramos aquellas que afectan al periodonto marginal (gingivitis, periodontitis) y al periodonto apical (periodontitis apicales). Los macrófagos corresponden a células clave en la regulación de la inflamación, respuesta inmune, homeostasis ósea y remodelación tisular en la respuesta inmune innata periapical y periodontal. El boldo es un árbol chileno, cuyas hojas han sido empleadas tradicionalmente para tratamiento de desórdenes digestivos y biliares. La boldina es uno de los alcaloides del boldo más ampliamente estudiados, por sus propiedades antiinflamatorias, antipiréticas, antitumorales, citoprotectoras, entre otras. En la literatura se han reportado distintos efectos de boldina sobre diferentes líneas celulares, sin embargo, se desconoce su efecto en la viabilidad celular y concentraciones de uso no tóxicas sobre macrófagos humanos.

Objetivo: Determinar el efecto de la concentración de boldina sobre la viabilidad y citotoxicidad en macrófagos humanos.

Metodología: La boldina fue previamente aislada de la corteza de *Peumus boldus* Molina, de acuerdo con reportes previos. Células monocíticas humanas de la línea THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos mediante la estimulación con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 10 nM y estimulados en presencia o ausencia de boldina en distintas concentraciones (0 -1000 µg/ml). Los macrófagos previamente diferenciados fueron estimulados en ausencia o presencia de distintas concentraciones de boldina (0 µg/ml - 250 µg/ml). Se evaluó la morfología y viabilidad celular mediante microscopía óptica, y citotoxicidad mediante ensayo MTT. El análisis estadístico se realizó a través del paquete estadístico STATA 12®. Se consideró significancia estadística si $p < 0,05$.

Resultados: Boldina en sus concentraciones más elevadas (≥ 200 µg/ml) mostró cambios morfológicos, efecto citotóxico y reducción de la viabilidad en comparación con el grupo control en macrófagos humanos. Por otro lado, las concentraciones entre 50 µg/ml y 150 µg/ml de boldina no afectaron la morfología,

viabilidad ni generaron citotoxicidad.

Conclusiones: En este trabajo de investigación se establecieron las concentraciones tóxicas y concentraciones viables de boldina en macrófagos, mediante análisis de morfología celular, viabilidad celular y citotoxicidad. Se determinó que la exposición a boldina en concentraciones sobre los 200 $\mu\text{g/ml}$ generan toxicidad creciente en macrófagos humanos. El uso de boldina en concentraciones iguales o menores a 100 $\mu\text{g/ml}$ son seguras y no generan cambios sobre la morfología y viabilidad de macrófagos humanos.

INTRODUCCIÓN

Patologías periodontales

Las enfermedades orales corresponden a un problema de salud pública mundial, por su elevada prevalencia e impacto negativo en la calidad de vida tanto en los individuos, como también en sus comunidades y la sociedad. Globalmente, se estima que 3,5 billones de personas padecen de enfermedades orales, en su mayoría, enfermedades crónicas y progresivas en naturaleza (Bernabe et al., 2020; Peres et al., 2019). Entre éstas, las infecciones odontogénicas son las más prevalentes. Las patologías de la cavidad oral son el motivo más habitual de consulta e intervención del odontólogo y afectan a toda la población, desde la infancia (caries) hasta el final de la vida (mayormente periodontitis), con un impacto considerable, tanto sobre la salud pública general, como sobre los recursos económicos dedicados a su tratamiento (Matesanz et al., 2005).

Las enfermedades periodontales son condiciones inflamatorias crónicas asociadas a la disbiosis de la biopelícula bacteriana subgingival que desencadena la respuesta inmune-inflamatoria del hospedero, llevando a la destrucción de los tejidos periodontales de soporte y la eventual pérdida dentaria (Meyle & Chapple, 2015). Por otro lado, la infección del sistema de canales endodónticos genera un cuadro inflamatorio similar, conocido como periodontitis apical, que se caracteriza por la destrucción de tejidos periapicales con formación de una lesión periapical (Caton et al., 2018; Gutmann et al., 2009). En conjunto, las periodontitis y PA representan las causas más importantes de pérdida dentaria en la población adulta (Nilsson et al., 2019; Terças et al., 2006). Se ha reportado que la mitad de la población global podría tener al menos un diente con una de las formas de periodontitis apical (Tibúrcio-Machado et al., 2021). Más aún, las periodontitis y PA representan un factor de riesgo independiente para el desarrollo de varias enfermedades no transmisibles, tales como la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares (Genco & Borgnakke, 2020; Jakovljevic et al., 2020; Kocher et al., 2018).

Con respecto a las enfermedades periodontales, la gingivitis corresponde a la forma menos severa. Esta se caracteriza por la inflamación producida debido a la acumulación de una biopelícula supra y subgingival. La gingivitis puede progresar a periodontitis (Tonetti et al., 2018), una condición multifactorial caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dentarios que se manifiesta través de la pérdida de inserción clínica (NIC) y pérdida ósea evaluada a través de una radiografía, presencia de sacos periodontales y sangrado al sondaje (Papapanou et al., 2018). Sobre la base de la fisiopatología de la periodontitis, se describen tres formas distintas: periodontitis necrotizante, periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas y periodontitis. La periodontitis necrotizante está caracterizada por historia de dolor, presencia de ulceraciones en el margen gingival y/o depósitos de fibrina en los sitios con papilas decapitadas y en algunos casos exposición del margen de hueso alveolar (Tonetti et al., 2018). La periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas sigue la clasificación de la enfermedad primaria de acuerdo con los códigos propuestos en la clasificación estadística de enfermedades y problemas de salud relacionados (ICD) (Albandar et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Por otra parte, respecto de la periodontitis apical (PA), la Asociación Americana de Endodoncia diferencia cinco formas clínicas: periodontitis apical sintomática (PAS), periodontitis apical asintomática (PAA), absceso apical agudo (AAA), absceso apical crónico (AAC) y osteítis condensante (OC) (AAE, 2009).

La PAS corresponde a la inflamación del periodonto apical, asociada a un cuadro de sintomatología aguda que incluye una respuesta dolorosa a la percusión y palpación del diente (AAE, 2009). Se ha propuesto que la PAS corresponde a un estado progresivo de la enfermedad en que habría una exacerbación de la respuesta inflamatoria y de la actividad resorptiva ósea (Salinas-Muñoz et al., 2017).

La PAA se define como la inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar. Se asocia a un diente asintomático con pulpa necrótica y radiográficamente con la presencia de un área radiolúcida periapical (Gutmann et

al., 2009). El AAA es una reacción inflamatoria a la infección pulpar y necrosis que se caracteriza por la aparición rápida de dolor espontáneo y formación de pus en los tejidos periapicales (AAE, 2009). Específicamente, sus formas crónicas se asocian con una lesión periapical osteolítica que se manifiesta como un área radiolúcida, como resultado de la activación de la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero (Garrido Flores et al., 2011). Se ha asociado también a un aumento de volumen localizado en el área mucogingival, el cual puede involucrar planos y espacios faciales (Gutmann et al., 2009). El AAC corresponde a una reacción inflamatoria frente a la pulpa infectada y necrótica, que se caracteriza por un inicio gradual, con pocas o bien en ausencia de molestias y con descargas intermitentes de pus a través de un trayecto fistular (AAE, 2009). La OC es una lesión radiopaca difusa que se localiza en el ápice de la raíz del diente (AAE, 2009). Corresponde a una respuesta proliferativa del hueso frente a un irritante crónico (Gutmann et al., 2009).

Macrófagos en inflamación periodontal

La estructura de las comunidades microbianas cambia entre estados de salud y enfermedad. En las enfermedades periodontales existe un aumento de la abundancia relativa de especies bacterianas patobiontes dominantes sin reemplazo de las asociadas a salud, mientras que en la periodontitis apical se produce la infección del sistema de canales radiculares con patobiontes de la cavidad oral (Lamont et al., 2018). Se ha detectado una gran variedad de especies bacterianas, asociadas tanto a las periodontitis como a las infecciones apicales. En ambas predominan especies Gram negativo y anaeróbicas que interactúan entre sí (Qian et al., 2019; Sanz et al., 2017). Específicamente, las enfermedades periodontales han sido asociadas con patobiontes como *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*. Más aún, estas bacterias se han asociado no solo a periodontitis severa y periimplantitis sino también a formas agudas y sintomáticas de PA (Acharya et al., 2015; Buonavoglia et al., 2011; Deng et al., 2017; Mysak et al., 2014). Por otro lado, *Porphyromonas endodontalis*, *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e

incluso *Candida albicans* han sido asociadas a infecciones apicales. Entre ellas, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, ambas bacterias anaeróbicas, Gram negativo, tienen un papel crítico en la patogénesis de la periodontitis apical (Martinho et al., 2016; Zhang et al., 2010).

Entre los factores de virulencia de las especies bacterianas asociados a periodontitis y PA, se han identificado fimbrias, exotoxinas, endotoxinas, cápsulas, entre otros, los cuales contribuyen a la patogenicidad de éstas en la interacción con el hospedero (Dahlen et al., 2019). La endotoxina o Lípido A, zona hidrofílica del lipopolisacárido (LPS), corresponde a una molécula glicolipídica anclada a la membrana externa de bacterias Gram negativo. La evidencia sostiene que la destrucción de los tejidos periodontales en las patologías periodontal y periapical se debe, en última instancia, a la respuesta inmune del hospedero inducida por la microbiota y sus factores de virulencia (Martinho et al., 2016; Xu et al., 2020).

Los macrófagos corresponden a una subpoblación celular clave en la respuesta inmune de hospedero. Éstos se encuentran entre los primeros tipos celulares que reconocen compuestos derivados de microorganismos patógenos y desempeñan un papel esencial en la regulación de la inflamación, respuesta inmune, homeostasis ósea y remodelación tisular (Derlindati et al., 2015). La activación de los macrófagos se lleva a cabo mediante la unión de los receptores tipo Toll (TLR) presentes en la superficie celular de los macrófagos, a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por ejemplo, el LPS, desencadenando procesos de fagocitosis, activación de respuestas humorales y celulares, y producción de mediadores inflamatorios (Martinho et al., 2016).

En respuesta a los mediadores inflamatorios liberados por los linfocitos activados o los tejidos dañados, los macrófagos pueden diferenciarse en subpoblaciones M1 (activación clásica) caracterizados por la secreción de interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-12 (IL-12), interleuquina-23 (IL-23) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Veloso et al., 2020) o M2 (activación alternativa) que secretan Interleuquina-10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Derlindati et al., 2015). A su vez, los macrófagos M1 promueven respuestas de

linfocitos T colaboradores (Th)1 y Th17, las cuales están estrechamente asociadas con la destrucción de los tejidos periodontales apicales a través de la secreción de Interleuquina-12 (IL-12) e Interleuquina-17 (IL-17), respectivamente. Los macrófagos M2, por otro lado, interactúan con las células Th2 y células T reguladoras (Treg), que se consideran protectoras periodontales a través de la secreción de Interleuquina-4 (IL-4) e IL-10, respectivamente (Hernández et al., 2011). El papel de los macrófagos y su polarización se refuerza con estudios recientes. La transferencia de macrófagos M2 en tejido periodontal en un modelo de periodontitis experimental inducida en ratón, reduce la severidad de la enfermedad, mediante un aumento de células T reguladoras, y disminución de la concentración de IL-6 y de la actividad osteoclástica (Miao et al., 2020). Por otro lado, en periodontitis apical se ha demostrado que la progresión de las lesiones asociadas a la periodontitis apical sintomática se asociaría con un cambio en el balance M1/M2 con predominio M1 (Veloso et al., 2020).

Boldina como agente terapéutico

Existe evidencia sobre el uso medicinal de las plantas y sus derivados desde hace miles de años y hasta la actualidad, que corresponden a una importante fuente de moléculas utilizadas en farmacología. La evidencia escrita más antigua de su uso medicinal data de hace 5.000 años y contenía recetas para preparaciones que incluían hasta 250 plantas diferentes, que incluían algunos alcaloides como amapola, beleño negro y mandrágora (Petrovska, 2012). Sin embargo, existen hallazgos más antiguos sobre el uso de plantas en forma medicinal. En Chile existe evidencia encontrada en el sitio arqueológico Monte Verde II ubicado en la región de Los Lagos. Arqueólogos descubrieron restos de algas y plantas que parecen haber sido utilizadas de forma medicinal hace 14.600 años. Dentro de los hallazgos, se recuperó un resto que había sido masticado formado por una variedad de plantas y algas. Al análisis se determinó que correspondía a una mezcla de *Sargassum* sp., *Peumus boldus*, *Juncus* sp. y otras plantas que no pudieron ser identificadas (Dillehay et al., 2008).

El boldo (*Peumus boldus* Molina), es un árbol chileno, encontrado principalmente entre las regiones de Valparaíso, Santiago y Concepción, cuyas hojas han sido empleadas tradicionalmente en medicina natural y es ampliamente reconocido por varias farmacopeas (O'Brien et al., 2006). Las aplicaciones tradicionales del boldo incluyen: dolor de oídos, dolor de cabeza, reumatismo, congestión nasal y tratamiento de desórdenes digestivos y biliares (Speisky & Cassels, 1994). En la actualidad el boldo es utilizado en Europa y algunos países de Latinoamérica en donde se puede obtener en forma de té, cápsulas y extractos vendidos como productos para mejorar la digestión (Villar & Gomez-Serranillos, 2006).

Las hojas, tallo y corteza del árbol de boldo son ricas en alcaloides en concentraciones muy variables. Entre ellos encontramos la boldina, coclaurina, laurolitsina, laurotetanina, reticulina, e isoboldina. Entre éstos, la boldina ([S]-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina) es uno de los alcaloides más abundantes en la corteza del árbol y más ampliamente estudiados, por sus propiedades antiinflamatorias, antipiréticas, antitumorales y citoprotectoras, entre otras (Fuentes-Barros et al., 2018). Recientemente, la boldina ha demostrado efectos antiinflamatorios en un modelo murino de edema, a través de la regulación a la baja de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 (Yang et al., 2018). De modo similar, se ha visto una reducción dosis-dependiente de la producción de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β en macrófagos *in vitro* estimulados con LPS de *Escherichia coli*, además de un efecto modulador sobre la reabsorción ósea en un modelo murino de osteoporosis (Chen et al., 2018; Wei et al., 2013).

En enfermedades orales, un estudio reciente realizado en un modelo murino de periodontitis inducida por ligadura por nuestro grupo de investigación reportó una reducción dosis-dependiente de la severidad de la destrucción periodontal, modulación de la respuesta inmune y disminución en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-12, interferón- γ (IFN- γ) y TNF- α , en ratones a los que se les administraron dosis de boldina a través de alimentación forzada (Cafferata et al., 2020).

Los efectos beneficiosos de boldina podrían ser utilizados en un futuro en el

tratamiento y control de las patologías orales con componente inflamatorio, tales como periodontitis y las periodontitis apicales. En estudios previos en macrófagos se ha utilizado un amplio rango de concentraciones de boldina. Macrófagos murinos han sido expuestos 50 µg/ml hasta 2mg/ml de boldina sin presentar toxicidad aparente (Moreira et al., 2001; Salama et al., 2017). Sin embargo, se desconoce su efecto sobre la viabilidad celular y citotoxicidad en macrófagos humanos.

HIPÓTESIS

Sobre la base de los efectos previamente reportados para boldina, proponemos que boldina en altas concentraciones induce toxicidad en macrófagos humanos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la concentración de boldina sobre la morfología y viabilidad celular, y su efecto citotóxico en macrófagos humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la boldina en concentraciones crecientes sobre la viabilidad y morfología celular de macrófagos humanos.
2. Determinar la citotoxicidad de la boldina en macrófagos humanos concentraciones crecientes.

METODOLOGÍA

Estudio experimental *in vitro*, aprobado por el comité de ética científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (**Anexo 1**).

Extracción y purificación de boldina

La boldina fue previamente aislada de la corteza de *P. boldus*, de acuerdo con reportes previos (Cafferata et al., 2020; Fuentes-Barros et al., 2018). La corteza seca fue sumergida en hexano a 50 °C durante 4 horas para eliminar grasas y ceras. El material vegetal fue secado y se extrajo utilizando ácido clorhídrico (HCl) en concentración 1 M. Se ajustó el pH de la solución filtrada (que supuestamente contendría los alcaloides en forma de sales), a bases libres (pH 9-10) añadiendo amoníaco concentrado (25%) para luego extraer la fase acuosa un total de 3 veces con diclorometano (DCM). El extracto de alcaloides crudos fue secado con Na₂SO₄ filtrado y concentrado. Finalmente, la boldina fue purificada por cromatografía de columna en gel de sílice 60 Å (40-63 µm), monitoreando las fracciones por cromatografía en capa fina (CCF) (EtOAc:MeOH 4:1 y DCM:MeOH 5:3) examinando los cromatogramas bajo luz UV a 254 y 365 nm y aplicando aerosol con reactivo de Dragendorff para detectar la presencia de alcaloides. Boldina fue identificada por espectrometría de resonancia magnética nuclear (¹H y ¹³C). Su pureza fue de > 98% según cromatografía líquida de alto rendimiento con detección en el ultravioleta (HPLC-UV). El clorhidrato fue preparado agregando la cantidad calculada de HCl concentrado (37%) a una solución de boldina en acetona y esta sal soluble en agua (PM: 363,8 g/mol) fue utilizada para la estimulación de los macrófagos. El proceso de extracción y purificación fue realizado por un estudiante (S.C.) del Programa de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Diferenciación de línea celular monocítica a macrófagos.

Las células monocíticas humanas de la línea THP-1 (ATCC TIB-202) fueron diferenciadas a macrófagos mediante la estimulación con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) con una concentración de 10 nM (Sigma-Aldrich, St. Louis,

Missouri, EE. UU.) durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humedecida de CO₂ 5% en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Posteriormente, las células no adheridas fueron removidas y las adherentes se lavaron con medio RPMI para luego ser incubadas por 24 horas en ausencia de PMA (Lund et al., 2016).

Viabilidad y morfología celular.

Las células THP-1 previamente diferenciadas a macrófagos, fueron estimuladas en presencia o ausencia de boldina en distintas concentraciones (0 - 1000 µg/ml) en placas de 6 pocillos (Falcon®) a una densidad de 1x10⁶ células por pocillo. Las células fueron incubadas nuevamente a 37 °C por 24 horas en 2 ml de medio RPMI suplementado con SFB 10%. Como control negativo, se utilizaron células diferenciadas a macrófagos sin exposición a boldina. Se tomaron fotografías representativas con un microscopio óptico invertido para el estudio de la morfología celular. Posteriormente las células adheridas fueron despegadas de las placas con la ayuda de un raspador y teñidas con azul de Tripán para realizar el conteo celular a través de un contador de células automático LUNA-II™ (Logos Biosystems, Annandale, Virginia, EE. UU.). La estimulación de macrófagos fue realizada en tres experimentos independientes por triplicado.

Citotoxicidad

Las células THP-1 previamente diferenciadas a macrófagos, fueron estimuladas en ausencia o presencia de distintas concentraciones de boldina (0 µg/ml - 250 µg/ml) en placas de 96 pocillos a una densidad de 1x10⁶ células por pocillo. Las células fueron incubadas nuevamente a 37 °C por 24 horas en 200 µl de medio RPMI suplementado con SFB 10%. Como control negativo, se utilizaron células diferenciadas a macrófagos. Se realizó el ensayo de MTT según las indicaciones del fabricante (Abcam, Cambridge, R. U.). El ensayo fue realizado en tres experimentos independientes en triplicado.

Análisis de datos

Los datos de toxicidad celular se expresaron como porcentaje de citotoxicidad y la

viabilidad celular, como porcentaje de células vivas. El análisis estadístico se realizó a través del paquete estadístico STATA 12 ® (StataCorpLP, College Station, Texas, EE. UU.). Los datos fueron analizados mediante Test ANOVA y prueba post-hoc de Bonferroni, sobre la base de la distribución normal de los datos determinada por prueba Shapiro-Wilk. Se consideró significancia estadística si $p < 0,05$. Los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Los gráficos fueron realizados con GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

RESULTADOS

Morfología celular

El análisis de morfología celular (**Figura 1**) demostró que a concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ (B) y 100 $\mu\text{g/ml}$ (C) de boldina las células conservaron una morfología similar al control negativo sin boldina (A). Por otro lado, en las concentraciones más altas, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de boldina (D, E y F respectivamente), se observaron cambios morfológicos, tales como pérdida de prolongaciones, forma ovalada y constricción celular, además de una menor densidad aparente de los macrófagos en comparación con el control.

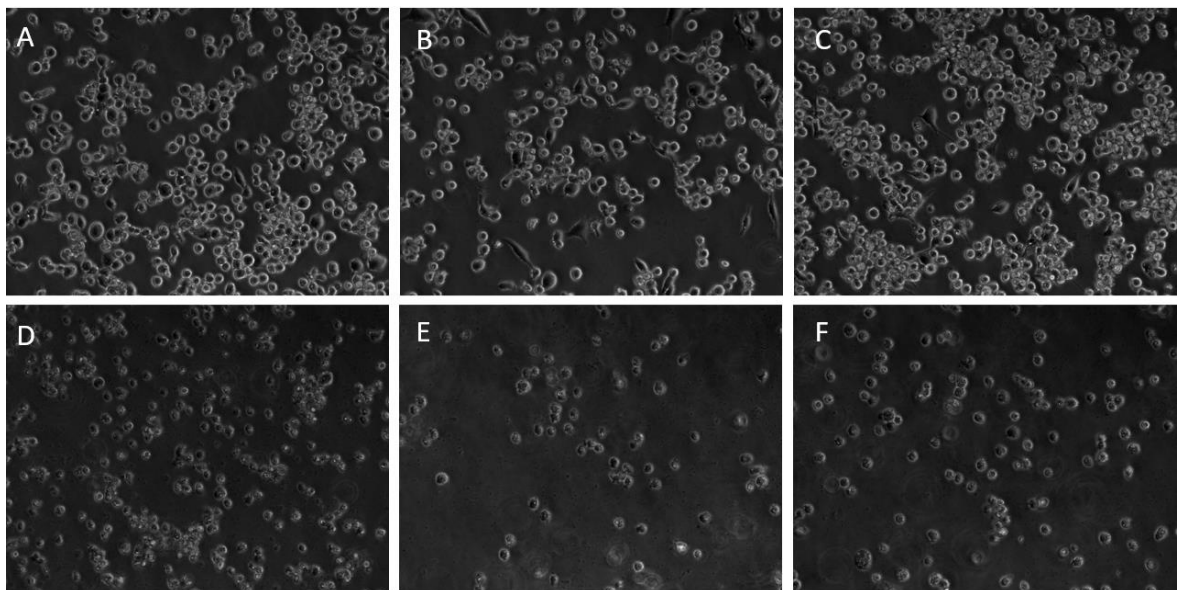


Figura 1. Morfología celular de macrófagos humanos estimulados con boldina. (A) Células THP-1 diferenciadas a macrófagos con 10 nM de PMA. (B) Macrófagos estimulados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (C) Macrófagos estimulados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (D) Macrófagos estimulados con 250 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (E) Macrófagos estimulados con 500 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (F) Macrófagos estimulados con 1000 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. Magnificación 20x.

Viabilidad celular

En las concentraciones más bajas de boldina (50 y 100 $\mu\text{g/ml}$), la viabilidad celular se mantuvo similar al grupo control sin boldina. Sin embargo, esta disminuyó frente a las concentraciones más altas de boldina con diferencias estadísticamente

significativas entre el grupo control versus 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Además, se observó una diferencia significativa en la viabilidad celular del grupo estimulado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de boldina y el grupo estimulado con 250 $\mu\text{g/ml}$ (**Figura 2**).

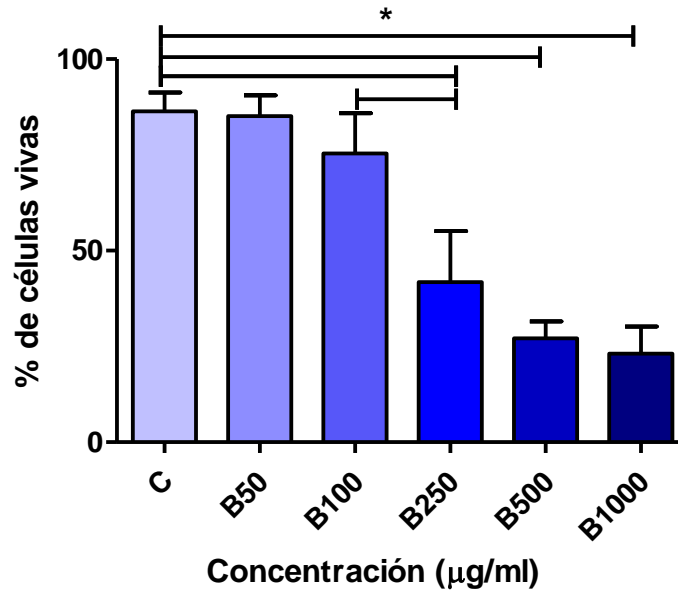


Figura 2. Porcentaje de viabilidad celular (células vivas) de macrófagos estimulados con diferentes concentraciones de boldina. (C) Macrófagos estimulados con 10 nM de PMA. (B50) Macrófagos estimulados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (B100) Macrófagos estimulados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (B250) Macrófagos estimulados con 250 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (B500) Macrófagos estimulados con 500 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. (B1000) Macrófagos estimulados con 1000 $\mu\text{g/ml}$ de boldina. Los datos fueron graficados como media y DS. * $p < 0,05$. $n=9$.

Citotoxicidad

Sobre la base de los resultados de viabilidad, a continuación, se evaluaron las concentraciones de boldina en un rango de 0 - 250 $\mu\text{g/ml}$. En los macrófagos estimulados con concentraciones de boldina más altas, entre 200 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$, la citotoxicidad aumentó de forma estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. Por otro lado, las concentraciones entre 50 $\mu\text{g/ml}$ y 150 $\mu\text{g/ml}$ de boldina no mostraron diferencias significativas respecto del

control negativo (**Figura 3**).

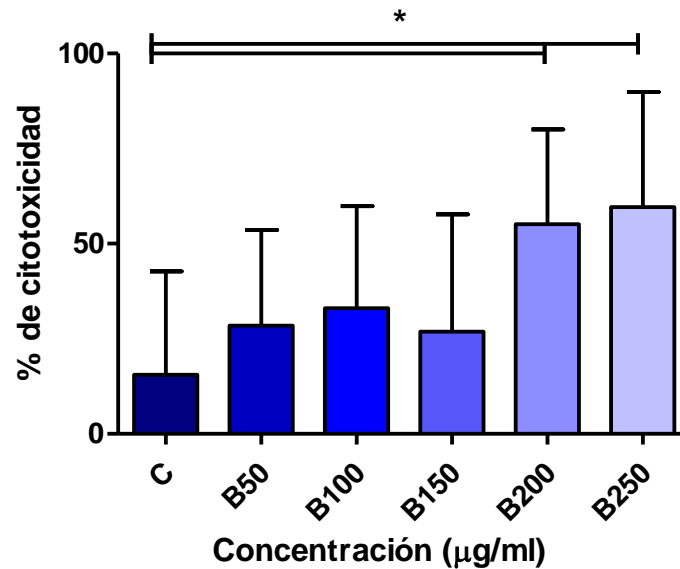


Figura 3. Porcentaje de citotoxicidad celular de macrófagos humanos estimulados con diferentes concentraciones de boldina. (C) Macrófagos estimulados con 10 nM de PMA. (B50) Macrófagos estimulados con 50 µg/ml de boldina. (B100) Macrófagos estimulados con 100 µg/ml de boldina. (B150) Macrófagos estimulados con 150 µg/ml de boldina. (B200) Macrófagos estimulados con 200 µg/ml de boldina. (B250) Macrófagos estimulados con 250 µg/ml de boldina. Los datos fueron graficados como promedio y desviación estándar. * $p < 0,05$ respecto del grupo control sin boldina. $n=9$.

DISCUSIÓN

Las enfermedades inflamatorias de la cavidad oral, tales como periodontitis y periodontitis apical, están caracterizadas por una respuesta inflamatoria crónica con destrucción de tejidos periodontales, característicamente del hueso alveolar (Silva et al., 2007). Entre estos, los macrófagos corresponden a células que juegan un papel crucial en la inmunidad innata, además de participar en el desarrollo tisular, mantención de la homeostasis de los tejidos y la regeneración tisular (Oishi & Manabe, 2018). La boldina, un alcaloide presente en el boldo, árbol endémico de Chile, ha demostrado propiedades antiinflamatorias, antipiréticas, antitumorales, antiagregantes plaquetarias y citoprotectoras, entre otras (Fuentes-Barros et al., 2018) y por tanto tiene potencial como agente terapéutico en enfermedades orales inflamatorias crónicas; sin embargo, se desconoce su potencial efecto citotóxico en macrófagos humanos en el contexto de sus potenciales aplicaciones terapéuticas. En este trabajo de investigación se establecieron las concentraciones tóxicas y concentraciones viables para la exposición de macrófagos humanos con boldina mediante evaluación de morfología celular, viabilidad celular y citotoxicidad.

En este estudio se determinó que los macrófagos presentaban cambios en su morfología y densidad aparente frente a concentraciones de boldina mayores o iguales a 250 $\mu\text{g/ml}$. Estos se caracterizaron por constricción celular, la adquisición de una morfología ovalada, pérdida de sus prolongaciones, además de una disminución aparente en la densidad de células. Se ha visto que los macrófagos son células mononucleares que normalmente pueden medir entre 10 y 30 μm de diámetro. Su estructura se modifica según su estado de actividad y su superficie presenta numerosas prolongaciones digitiformes. Los macrófagos activados tienen más prolongaciones de membrana, un mayor número de vacuolas, lisosomas, fagosomas y cuerpos residuales (Manascero, 2003). En la literatura, los cambios observados han sido descritos como cambios morfológicos asociados al proceso de muerte celular, particularmente aquellos que afectan al núcleo, que pueden involucrar apoptosis, evidenciada por constricción celular, formación de protuberancias irregulares de la membrana celular y/o la presencia de cuerpos

apoptóticos; o pueden involucrar necrosis, reconocida por tumefacción y extenso daño a la membrana citoplasmática (Catelas et al., 2005; Xiao et al., 2020). Se ha estudiado el tipo de muerte celular producida por boldina en líneas celulares cancerígenas. Se ha visto que induce apoptosis en células de cáncer de mama y vejiga, además de la detención del ciclo celular durante la fase G2/M (Gerhardt D et al., 2013; Looi C. Y. et al., 2014). Existe además evidencia de otros alcaloides derivados de plantas como por ejemplo berberina capaces de inducir muerte celular programada en modelos *in vitro* y en menor medida ha sido descrita muerte celular por autofagia y necrosis (Gali-Muhtasib H et al., 2015; Liu et al., 2019).

Por otro lado, las concentraciones de boldina asociadas con los cambios morfológicos anteriormente descritos coincidieron con reducciones crecientes en la viabilidad celular, evidenciables a 250 µg/ml, 500 µg/ml y 1000 µg/ml de boldina. Por el contrario, las concentraciones de boldina entre 0 y 100 µg/ml no afectaron la morfología ni la viabilidad celular. De este modo, se observó una la relación dosis-dependiente, con una tendencia a la disminución de la viabilidad, al aumentar la concentración de boldina a partir de 250 µg/ml.

En este estudio se observó toxicidad celular por medio del ensayo MTT a partir de 200 µg/ml de boldina. En un modelo *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón infectados con *Leishmania amazonensis* y tratados con boldina en concentraciones de 50 a 600 µg/ml no se evidenciaron cambios relacionados con toxicidad celular. Más aún, la concentración más alta (600 µg/ml) demostró valores de viabilidad significativamente mayores en el ensayo de MTT que Glucantime®, medicamento ampliamente usado en el tratamiento de leishmaniasis (Salama et al., 2017). En un modelo murino de macrófagos RAW 264.7 se utilizaron 3 concentraciones diferentes de un preparado de boldo; en la más baja (1000 µg/ml) no se observó toxicidad, sin embargo, en las concentraciones mayores 10000 µg/ml y 100000 µg/ml la citotoxicidad aumentó. En el mismo estudio, se observó que la estimulación con metanol al 5% tiene un potente efecto negativo en la viabilidad celular, el cual fue mitigado en la presencia de las concentraciones más altas del preparado de boldo (10000 y 100000 µg/ml), evidenciando un efecto citoprotector (Otero et al., 2022). Este efecto podría estar mediado por las

propiedades antioxidantes de boldina (Jiménez et al., 2000), puesto que ha sido demostrado que el metanol es capaz de aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula, aumentando significativamente la citotoxicidad (Ke et al., 2014). Esto podría señalar que concentraciones de boldina más altas podrían ser utilizadas al someter a las células a estímulos dañinos como, por ejemplo, patobiontes orales.

En línea con lo anterior, recientemente en un modelo murino de periodontitis experimental inducida por ligadura, la administración de boldina a través de alimentación forzada (10, 20, o 40 mg/kg) demostró una disminución dosis-dependiente en el ARNm de IL-1 β , IL-12, IFN- γ y TNF- α , reducción de la pérdida ósea alveolar y modulación de la razón Th17/Treg (Cafferata et al., 2020). Se ha evidenciado que los macrófagos humanos presentan fenotipos con variada plasticidad y diversidad que pueden modificar los patrones de diferenciación linfocitarios (Oishi & Manabe, 2018). Sin embargo, se desconoce el efecto de boldina sobre la diferenciación de macrófagos. En la actualidad, el tratamiento coadyuvante de las enfermedades orales inflamatorias se basa en el uso de adyuvantes químicos como colutorios de clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio en el caso de periodontitis, e irrigación y medicación intracanal para las periodontitis apicales. La boldina corresponde a un fitofármaco con potencial terapéutico a ser utilizado en estas etapas claves del tratamiento periodontal y endodóntico por sus notables propiedades antiinflamatorias y osteoprotectoras, demostradas en los modelos animales.

Aun así, actualmente el mecanismo de acción antiinflamatoria de la boldina es desconocido. Al respecto, se ha reportado que boldina inhibe la expresión de p65-NF- κ B en modelo murino con colitis inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS) y en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 estimulados con LPS, suprimiendo la fosforilación/degradación I κ B α y bloqueando la translocación de p65-NF- κ B (Pandurangan et al., 2016). Asimismo, se ha descrito que boldina es capaz de regular la expresión de citoquinas inflamatorias a través de la inhibición de las vías de señalización p-JAK2 y p-STAT3 en macrófagos; y al ser administrada en

conjunto con reticulina, es capaz de inhibir las vías JAK2/STAT3 y NF- κ B (Yang et al., 2018).

Por otro lado, se ha observado que boldina es capaz de bloquear los hemicanales de conexina (Cx HC) sin afectar las uniones de hendidura. Existe evidencia que sustenta que las condiciones inflamatorias conducen a mayor apertura de estos hemicanales, promoviendo la pérdida de la homeostasis y deterioro de la función celular al aumentar la permeabilidad de las células (Hernández-Salinas et al., 2013). A través del bloqueo de estos hemicanales (Cx43 y Cx45), boldina prevendría la activación de una vía de señalización intracelular dependiente de JNK que promueve la expresión de estas Cxs (Cea et al., 2019). Por lo tanto, boldina también ejerce un efecto sobre la homeostasis celular al prevenir la apertura de Cx-HC y manteniendo a las células acopladas entre sí, conservando la integridad de los tejidos (Hernández-Salinas et al., 2013).

Por otra parte, estudios sugieren que existe afinidad entre boldina y receptores ionotrópicos. La función deteriorada del receptor 5-HT₃ probablemente esté involucrada en la patogenia de los trastornos gastrointestinales funcionales; mientras que los antagonistas del receptor 5-HT₃ son tratamientos efectivos para las náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia y el síndrome de colon irritable. Boldina inhibe la activación inducida por 5-HT de los receptores 5-HT₃ mostrando actividad como antagonista competitivo de los receptores 5-HT_{3A} y 5-HT_{3AB} (Walstab et al., 2014). De igual forma, otro estudio sugiere que existe afinidad moderada entre el receptor 5-HT_{2A} y boldina actuando como agonista o antagonista, lo que podría contribuir a sus efectos sobre el sistema nervioso central (Chung et al., 2009). Mas aún, se ha descrito que la modificación de la molécula de boldina mejora su afinidad por receptores dopaminérgicos en modelo en ratas. Los resultados mostraron que la halogenación de la posición C-3 de la boldina aumenta su afinidad por los receptores de dopamina D₁ por sobre los receptores D₂ (Asencio et al., 2005).

A pesar de los interesantes y diversos efectos de boldina, se ha visto que al ser administrada por vía oral en ratas es absorbida y luego eliminada rápidamente

(Cermanova et al., 2016); de modo similar, su vida media también es corta luego de ser administrada por vía intravenosa (Zeng et al., 2014). Estas limitaciones han sido abordadas con cierto grado de éxito a través de modificaciones farmacológicas y relacionadas a la nanotecnología (Mondal et al., 2020; Mondal et al., 2018). Aun cuando presenta poca biodisponibilidad y una corta vida media, el alcaloide es capaz de ejercer efecto en sitios lejanos. En ratones, luego de administración oral, se ha encontrado principalmente en hígado, en menor cantidad en riñones y en aún menor concentración en otros órganos; su biodisponibilidad se ha visto significativamente aumentadas al ser administrado en forma de nanopartículas (Mondal et al., 2020). No obstante, para un posible uso como fitofármaco en odontología es necesario considerar que la forma de administración es principalmente tópica y el mecanismo de acción local al sitio de aplicación.

Otra interrogante que aún no tiene respuesta es el mecanismo por el cual boldina ingresa a la célula. Existe evidencia de que boldina se disuelve fácilmente en etanol y otros solventes orgánicos, sin embargo, es poco soluble en agua. Además, es capaz de formar variadas sales dentro de las cuales el clorhidrato es posiblemente la más común y posee buena solubilidad en agua (Cassels et al., 2021). Estas características podrían esclarecer el mecanismo de ingreso de boldina a la célula, al ser una molécula pequeña y soluble en solventes orgánicos podría difundir a través de la membrana citoplasmática.

En resumen, en el presente estudio se identificó el rango de concentración seguro para el uso terapéutico de boldina en macrófagos humanos. El uso de este posible fitofármaco podría ampliar el horizonte para el tratamiento, pronóstico y control de patologías orales inflamatorias crónicas en seres humanos.

CONCLUSIONES

El uso de boldina en concentraciones iguales o menores a 100 $\mu\text{g/ml}$ en macrófagos humanos podría considerarse inocuo sobre la base de los parámetros de morfología, viabilidad y citotoxicidad. La exposición a boldina en concentraciones $\geq 200 \mu\text{g/ml}$ puede tener un efecto citotóxico dosis-dependiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AAE. (2009). American Association of Endodontists Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology. In (Vol. 35, pp. 1634): *Journal of Endodontics*.
- Acharya, A., Koh, M. L., Kheur, S., Watt, R. M., Jin, L., & Mattheos, N. (2015). Salivary IL-1b and red complex bacteria as predictors of the inflammatory status in sub-peri-implant niches of subjects with peri-implant mucositis. In (Vol. 27(6), pp. 662-667). *Clinical Oral Implants Search*.
- Albandar, J. M., Susin, C., & Hughes, F. J. (2018). Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S171-S189. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12947>
- Asencio, M., Hurtado-Guzmán, C., López, J., Cassels, B., Protais, P., & Chagraoui, A. (2005). Structure-affinity relationships of halogenated predicentrine and glaucine derivatives at D-1 and D-2 dopaminergic receptors: halogenation and D-1 receptor selectivity. In (Vol. 13(11), pp. 3699-3704). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
- Bernabe, E., Marcenes, W., Hernandez, C. R., Bailey, J., Abreu, L. G., Alipour, V., Kassebaum, N. J. (2020). Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *Journal of Dental Research*, 99(4), 362-373. <https://doi.org/10.1177/0022034520908533>
- Buonavoglia, A., Latronico, F., Pirani, C., Greco, M. F., Corrente, M., & Prati, C. (2011). Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. In (Vol. 101, pp. 84-88). *Odontology* (2013).
- Cafferata, E. A., Castro-Saavedra, S., Fuentes-Barros, G., Melgar-Rodriguez, S., Rivera, F., Cortez, C., Vernal, R. (2020). Boldine inhibits the alveolar bone resorption during ligature-induced periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. In (Vol. 92, pp. 123-136). *Journal of Periodontology*.
- Cassels, B. K., Castro-Saavedra, S., & Fuentes-Barros, G. (2021). Chapter 21 - Boldine. In (pp. 491-508). *A Century of Valuable Plant Bioactives: Academic*

Press.

- Catelas, I., Petit, A., Vali, H., Fragiskatos, C., Meilleur, R., Zukor, D. J., & Huk, O. L. (2005). *Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro*. In (Vol. 26(15), pp. 2441-2453). Biomaterials: Elsevier.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S1-S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Cea, L., Balboa, E., Vargas, A., Puebla, C., Brañes, M., Escamilla, R., Sáez, J. (2019). De novo expression of functional connexins 43 and 45 hemichannels increases sarcolemmal permeability of skeletal myofibers during endotoxemia. In (Vol. 1865, pp. 2765-2773). *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*: Elsevier.
- Cermanova, J., Prasnicka, A., Dolezelova, E., Rozkydalova, L., Hroch, M., Chládek, J., Micuda, S. (2016). Pharmacokinetics of Boldine in Control and Mrp2-Deficient Rats. *Physiological Research*, S489-S497. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933520>
- Chen, K., Lv, Z.-t., Cheng, P., Zhu, W.-t., Liang, S., Yang, Q., Chen, A.-m. (2018). Boldine Ameliorates Estrogen Deficiency-Induced Bone Loss via Inhibiting Bone Resorption. In (Vol. 9). *Frontiers in Pharmacology*.
- Chung, L. Y., Lo, M. e. W., Rais Mustafa, M., Goh, S. H., & Imiyabir, Z. (2009). 5-Hydroxytryptamine_{2A} Receptor Binding Activity of Compounds from *Litsea sessilis*. In (Vol. 23, pp. 330-334). *PHYTOTHERAPY RESEARCH* Wiley InterScience.
- Dahlen, G., Basic, A., & Bylund, J. (2019). Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevice and in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1339. <https://doi.org/10.3390/jcm8091339>
- Deng, Z.-L., Szafranski, S. P., Jarek, M., Bhujju, S., & Wagner-Döbler, I. (2017). Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Scientific Reports*, 7(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03804-8>

- Derlindati, E., Dei Cas, A., Montanini, B., Spigoni, V., Curella, V., Aldigeri, R., Bonadonna, R. C. (2015). Transcriptomic Analysis of Human Polarized Macrophages: More than One Role of Alternative Activation? *PLOS ONE*, 10(3), e0119751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119751>
- Dillehay, T., Ramírez, C., Pino, M., Collins, M., Rossen, J., & Pino-Navarro, D. (2008). Monte Verde: seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. In (Vol. 320 (5877), pp. 784-786). Science.
- Fuentes-Barros, G., Castro-Saavedra, S., Liberona, L., Acevedo-Fuentes, W., Tirapegui, C., Mattar, C., & Cassels, B. K. (2018). Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). In (Vol. 127, pp. 179-185). Fitoterapia.
- Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, Tohme R, & N, D. (2015). Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. In (pp. 1531-1562). Apoptosis: Springer.
- Garrido Flores, M., Ordenes Vitali, T., Segú Cabrera, C., Baeza Paredes, M., García-Sesnich, J., & Hernández Ríos, M. (2011). Asociación entre niveles de TNF- α en fluido crevicular gingival de dientes con periodontitis apical asintomática. In (Vol. Vol. 4(3), pp. 130-133): Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.
- Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2020). Diabetes as a potential risk for periodontitis: association studies. In (Vol. 83, pp. 40-45). Periodontology 2000.
- Gerhardt D, Bertola G, Dietrich F, Figueiró F, Zanotto-Filho A, Moreira Fonseca JC, Salbego CG. (2013). B oldine induces cell cycle arrest and apoptosis in T24 human bladder cancer cell line via regulation of ERK, AKT, and GSK-3 β . In (Vol. 32, pp. 36e31-36e39): Elsevier.
- Gutmann, J. L., Baumgartner, J. C., Gluskin, A. H., Hartwell, G. R., & Walton, R. E. (2009). Identify and Define All Diagnostic Terms for Periapical/Periradicular Health and Disease States. In (Vol. 35(12), pp. 1658-1674). Journal of Endodontics.
- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., Gamonal, J. (2011). Host-Pathogen Interactions In Progressive Chronic Periodontitis. In (Vol. 90(10)). Journal of Dental Research.

- Hernández-Salinas, R., Vielma, A. Z., Arismendi, M. N., Boric, M. P., Sáez, J. C., & Velarde, V. (2013). Boldine Prevents Renal Alterations in Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2013/593672>
- Jakovljevic, A., Duncan, H. F., Nagendrababu, V., Jacimovic, J., Milasin, J., & Dummer, P. M. H. (2020). Association between cardiovascular diseases and apical periodontitis: an umbrella review. *International Endodontic Journal*, 53(10), 1374-1386. <https://doi.org/10.1111/iej.13364>
- Jiménez, I., Garrido, A., Bannach, R., Gotteland, M., & Speisky, H. (2000). Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis. In (Vol. 14, pp. 339-343). *Phytotherapy Research: Wiley Online Library*.
- Ke, Y.-H., Qin, X.-X., Liu, C.-L., Yang, R.-Z., & Dong, W.-S. (2014). *Oxidative esterification of ethylene glycol in methanol to form methyl glycolate over supported Au catalysts*. In (Vol. 4, pp. 3141-3150). *Catalysis Science & Technology: The royal society of chemistry*.
- Kocher, T., König, J., Borgnakke, W. S., Pink, C., & Meisel, P. (2018). Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. *Periodontology 2000*, 78(1), 59-97. <https://doi.org/10.1111/prd.12235>
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 745-759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
- Liu, L., Fan, J., Ai, G., Liu, J., Luo, N., Li, C., & Cheng, Z. (2019). Berberine in combination with cisplatin induces necroptosis and apoptosis in ovarian cancer cells. *Biological Research*, 52(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0243-6>
- Looi C. Y., Paydar M., Kamalidehghan B., Wong Y. L., Wong W. F., & R., M. M. (2014). Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. In (Vol. 8, pp. 719-733). *Drug Design, Development and Therapy: Dovepress*.
- Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. In (Vol. 430, pp. 64-70).

Journal of Immunological Methods.

- Manascero, A. R. (2003). Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. In (pp. 44-45): Pontificia Universidad Javeriana.
- Martinho, F. C., Leite, F. R. M., Nóbrega, L. M. M., Endo, M. S., Nascimento, G. G., Darveau, R. P., & Gomes, B. P. F. A. (2016). Comparison of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharides Clinically Isolated from Root Canal Infection in the Induction of Pro-Inflammatory Cytokines Secretion. *Brazilian Dental Journal*, 27(2), 202-207. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600572>
- Matesanz, P., Figuero, E., Giménez, M., Aguilar, L., Llor, C., Prieto, J., & Bascones, A. (2005). From knowledge of bacterial etiology to the treatment and prevention of the most prevalent infections in the community: odontological infections. In (Vol. 18(2), pp. 136-145). *Rev. Esp. Quimioter.*
- Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. In (pp. 7-17). *Periodontol 2000*.
- Miao, Y., He, L., Qi, X., & Lin, X. (2020). Injecting Immunosuppressive M2 Macrophages Alleviates the Symptoms of Periodontitis in Mice. In (Vol. 7). *Frontiers in Molecular Biosciences*.
- Mondal, J., Patra, M., AK., P., & Khuda-Bukhsh, A. (2020). Improved drug carriage and protective potential against Cisplatin-induced toxicity using Boldine-loaded PLGA nanoparticles. In (pp. 24-36). *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*.
- Mondal, J., Patra, M., Panigrahi, A., & Khuda-Bukhsh, A. (2018). Boldine-loaded PLGA nanoparticles have improved efficiency of drug carriage and protective potential against Cisplatin-induced toxicity. In (pp. 1-13). *Journal of Ayurveda and integrative medicine*.
- Moreira, R. R. D., Carlos, I. Z., & Vilegas, W. (2001). Release of Intermediate Reactive Hydrogen Peroxide by Macrophage Cells Activated by Natural Products. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(2), 201-204. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.201>
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Duskova, J. (2014). *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*, 2014, 1-8.

<https://doi.org/10.1155/2014/476068>

- Nilsson, H., Sanmartin Berglund, J., & Renvert, S. (2019). Longitudinal evaluation of periodontitis and tooth loss among older adults. In (Vol. 46, pp. 1041-1049). *Journal of Clinical Periodontology*.
- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., & Speisky, H. (2006). Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. In (Vol. 159(1), pp. 1-17). *Chemico-Biological Interactions*.
- Oishi, Y., & Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology*.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>
- Otero, C., Miranda-Rojas, S., Llancahuén, F. M., Fuentes, J. A., Atala, C., González-Silva, G., & Gordillo-Fuenzalida, F. (2022). *Biochemical characterization of Peumus boldus fruits: Insights of its antioxidant properties through a theoretical approach*. In (Vol. 370). *Food Chemistry*: Elsevier.
- Pandurangan, A. K., Mohebbali, N., Hasanpourghadi, M., Chung, Y. L., Mustafa, M. R., & Mohd Esa, N. (2016). Boldine suppresses dextran sulfate sodium-induced mouse experimental colitis: NF- κ B and IL-6/STAT3 as potential targets. In (Vol. 42, pp. 247-258). *BioFactors: International Union of Biochemistry and Molecular Biology*.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, S173-S182.
<https://doi.org/10.1002/jper.17-0721>
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249-260. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)31146-8)
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. In (Vol. 6(11), pp. 1-5).
- Qian, W., Ma, T., Ye, M., Li, Z., Liu, Y., & Hao, P. (2019). Microbiota in the apical root canal system of tooth with apical periodontitis. *BMC Genomics*, 20(S2).

<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5474-y>

- Salama, I. C., Arrais-Lima, C., & Arrais-Silva, W. W. (2017). Evaluation of Boldine Activity against Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis*. *The Korean Journal of Parasitology*, *55*(3), 337-340. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.3.337>
- Salinas-Muñoz, M., Garrido-Flores, M., Baeza, M., Huamán-Chipana, P., García-Sesnich, J., Bologna, R., Hernández, M. (2017). Bone resorptive activity in symptomatic and asymptomatic apical lesions of endodontic origin. In (Vol. 21, pp. 2613-2618). *Clin Oral Invest*.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., Zaura, E. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*, S5-S11. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12682>
- Silva, T. A., Garlet, G. P., Fukada, S. Y., Silva, J. S., & Cunha, F. Q. (2007). *Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease*. In (Vol. 86(4), pp. 306-319). *Journal of Dental Research*.
- Speisky, H., & Cassels, B. (1994). Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. In (Vol. 29(1), pp. 1-12). *Pharmacological Research*.
- Terças, A. G., Oliveira, A. E. F. D., Lopes, F. F., & Maia Filho, E. M. (2006). Radiographic study of the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in the adult population of São Luís, MA, Brazil. *Journal of Applied Oral Science*, *14*(3), 183-187. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572006000300007>
- Tibúrcio-Machado, C. S., Michelon, C., Zanatta, F. B., Gomes, M. S., Marin, J. A., & Bier, C. A. (2021). The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal*, *54*(5), 712-735. <https://doi.org/10.1111/iej.13467>
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, *89*, S159-S172.

<https://doi.org/10.1002/jper.18-0006>

- Veloso, P., Fernández, A., Terraza-Aguirre, C., Álvarez, C., Vernal, R., Escobar, A., & Hernández, M. (2020). Macrophages skew towards M1 profile through reduced CD163 expression in symptomatic apical periodontitis. *Clinical Oral Investigations*, 24(12), 4571-4581. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03324-2>
- Villar, A. M., & Gomez-Serranillos, P. (2006). Boldo: indicaciones terapéuticas. In (Vol. 20, pp. 74-78): Farmacia Profesional.
- Walstab, J., Wohlfarth, C., Hovius, R., Schmitteckert, S., Röth, R., Lasitschka, F., & Niesler, B. (2014). *Natural compounds boldine and menthol are antagonists of human 5-HT₃ receptors: implications for treating gastrointestinal disorders*. In (Vol. 26, pp. 810-820). *Neurogastroenterology & Motility*.
- Wei, Z.-F., Tong, B., Xia, Y.-F., Lu, Q., Chou, G.-X., Wang, Z.-T., & Dai, Y. (2013). Norisoboldine Suppresses Osteoclast Differentiation through Preventing the Accumulation of TRAF6-TAK1 Complexes and Activation of MAPKs/NF- κ B/c-Fos/NFATc1 Pathways. *PLoS ONE*, 8(3), e59171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059171>
- Xiao, Q., Che, X., Cai, B., Tao, Z., Zhang, H., Shao, Q., & Pu, J. (2020). Macrophage autophagy regulates mitochondria-mediated apoptosis and inhibits necrotic core formation in vulnerable plaques. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(1), 260-275. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14715>
- Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. In (Vol. 120, pp. 1623-1876). *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*: Elsevier.
- Yang, X., Gao, X., Cao, Y., Guo, Q., Li, S., Zhu, Z., Chai, X. (2018). Anti-inflammatory Effects of Boldine and Reticuline Isolated from Litsea cubeba through JAK2/STAT3 and NF- κ B Signaling Pathways. In (Vol. 84(01), pp. 20-25). *Planta Medica*.
- Zeng, R.-J., Li, Y., Chen, J.-Z., Chou, G.-X., Gao, Y., Shao, J.-W., & Wu, S.-S. (2014). *A novel UPLC-MS/MS method for sensitive quantitation of boldine in plasma, a potential anti-inflammatory agent: application to a pharmacokinetic study in rats*. In (Vol. 29, pp. 459-464). *Biomedical*

Chromatography.

Zhang, S., Wang, Q. Q., Zhang, C. F., & Soo, I. (2010). Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent apical periodontitis. In (Vol. 13(2), pp. 115-121). Chin. J. Den. Res.

ANEXOS

Anexo 1

Acta aprobación Comité de ética institucional

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Dr. Eduardo Fernández Pdte./ Sra. P. Navarrete Secr/ Dr. M. Cornejo Vice-Pdte/ Sr. R. La Rosa / Dr. R. Cabello/ Dr. Mauricio Baeza/ Dra. Weronika Weil / Dr. A. Molina

INFORME
N°:2016/08

1. **Acta de Aprobación de Proyecto FONDECYT titulado “Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica” Versión 04/2016.**

2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Sra. Paulina Navarrete
Secretaria CEC

Dr. Marco Cornejo
Vice Pdte. CEC

Dr. Mauricio Baeza
Miembro permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro permanente CEC

Dra. Weronika Weil
Miembro permanente CEC

Dr. Rodrigo Cabello
Miembro permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro alterno CEC

3. **Fecha de Aprobación: 29/06/2016**

8.- Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos:

- Fueron modificados en cuanto a formato y contenido el Consentimiento y Asentimiento Informado.
- Se agregaron beneficios por participar en el estudio (limpieza dental, y examen dental clínico y radiográfico, exámenes de perfil lipídico, CRP y hemoglobina glicosilada sin costo).
- Se incorpora un flujograma explicativo con los tiempos e intervenciones sobre los participantes en el proyecto.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica"


Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



UNIVERSIDAD DE CHILE
COMITÉ DE ÉTICA
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

c/c.: Investigador Principal y Secretaria C.E.C.