

EN ÉPOCA DE MEDICINA DE PRECISIÓN, PARA TRATAR ASMA NEUTROFÍLICA, FIBROSIS PULMONAR Y ARTRITIS REUMATOIDEA: NARINGINA (¿O D'ARTAGNAN? "UNO PARA TODOS" *). UNA MIRADA DESDE LO BÁSICO

In the era of precision medicine, to treat neutrophilic asthma, pulmonary fibrosis and rheumatoid arthritis: naringin (or D'Artagnan? "one for all" *). A look at the basics

Cossy Isasi S¹, de Barayazarra S², Vanoni S³, Gómez RM⁴, Cazaux A⁵, Ordoñez M⁶, Muiño JC⁷

RESUMEN

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias desencadenada principalmente por eosinófilos, basófilos, mastocitos y neutrófilos. El 50% de los casos pertenecen al fenotipo neutrofílico. La activación de neutrófilos implica la movilización de balsas en la membrana plasmática. La naringina (NGN), el glucósido natural de naringenina, tiene fuertes propiedades antiinflamatorias. Para saber si el efecto de NGN depende de una vía específica de señalización o de un proceso más inespecífico, simulamos cajas cúbicas con suspensiones de lípidos y con membranas enriquecidas con NGN, ambas construidas usando CHARMM-GUI, para probar la estabilidad estructural de y la miscibilidad de NGN en las membranas celulares. La composición de las membranas era palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC), palmitoil oleoil fosfatidiletanolamina (POPE) y palmitoil oleoil fosfatidilserina (POPS) en una proporción mol/mol de 2:2:4 eventualmente enriquecidas con esfingomielina (PSM) y colesterol (CHL) o NGN, gangliósido GM1 en 3:3:2 mol/mol. Determinamos la asociación de lípidos (moléculas más cercanas dentro de 5 Å) en dinámicas de 100 ns a 310 K y 1 atm con GROMACS 2023.2. PSM formó balsas con POPC y POPE. CHL asociado con PSM y aumento de la tensión superficial de la membrana. Cuando NGN reemplazó a CHL, se distribuyó aleatoriamente, disminuyó la tensión superficial y se asoció principalmente con POPC o en los límites POPC-PSM. En membranas con CHL, NGN ocupó parches sin CHL. NGN se asoció con el GM1 sin formar balsas. El tratamiento de neutrófilos con NGN podría perjudicar el proceso de señalización debido a la aleatorización de la distribución de PSM y GM1 en la superficie de la membrana.

Palabras claves: asma, activación de neutrófilos, NGN, naringina, actividad antiinflamatoria, balsas o rafts de membranas celulares.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways triggered primarily by eosinophils, basophils, mast cells, and neutrophils. 50% of cases belong to the neutrophilic phenotype. Neutrophil activation involves the mobilization of rafts in the plasma membrane. Naringin (NGN), the natural glycoside of naringenin, has strong anti-inflammatory properties. To find out whether the effect of NGN depends on a specific signaling pathway or on a more nonspecific process, we simulated cubic boxes with lipid suspensions and with NGN-enriched membranes, both constructed using CHARMM-GUI, to test the structural stability of and miscibility of NGN in cell membranes. The composition of the membranes was palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine (POPC), palmitoyl oleoyl phosphatidylethanolamine (POPE) and palmitoyl oleoyl phosphatidylserine (POPS) in a mol/mol ratio of 2:2:4 eventually enriched with sphingomyelin (PSM) and cholesterol (CHL) or NGN, GM1 ganglioside in 3:3:2 mol/mol. We determined the association of lipids (molecules closest within 5 Å) in dynamics of 100 ns at 310 K and 1 atm with GROMACS 2023.2. PSM formed rafts with POPC and POPE. CHL associated with PSM and increased membrane surface tension. When NGN replaced CHL, it was randomly distributed, decreased surface tension, and was mainly associated with POPC or at the POPC-PSM boundaries. In membranes with CHL, NGN occupied patches without CHL. NGN partnered with GM1 without forming rafts. Treatment of neutrophils with NGN could impair the signaling process due to randomization of the distribution of PSM and GM1 on the membrane surface.

Key words: asthma, neutrophil activation, NGN, naringin, anti-inflammatory activity, cell membrane rafts.

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2024;55(3):115-119. <https://DOI.org/10.53108/AAIC/202403/0115-0119>

1. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Medicina, FCM-UNC Córdoba, Argentina
2. Profesora Asociada de Alergia Inmunología, HNC-FCM-UNC Córdoba, Argentina
3. Clínica Médica, Hospital San Roque FCM-UNC Córdoba, Argentina
4. FCS-UC. Salta Argentina
5. Ex Jefe de Sección Neumología, actual Jefe de Servicio de Clínica Médica Hospital Rawson, Córdoba, Argentina
6. Jefe de Servicio de Alergia e Inmunología Hospital Misericordia Nuevo Siglo
7. Ex Director Carrera Alergia e Inmunología, FCM-UNC Córdoba, Argentina

Correspondencia: secretaria@aaaic.org.ar

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 07/08/2024 | Aceptado: 20/08/2024

**"Les Trois Mousquetaires" de A. Dumas:
"Todos para uno y uno para todos"*

INTRODUCCIÓN

El asma bronquial es una enfermedad respiratoria crónica que afecta a personas de todas las edades. Comúnmente implica inflamación crónica de las vías respiratorias y síntomas de magnitud variable con el tiempo, que incluyen disnea, opresión endotorácica y tos [1]. Tiene alta prevalencia y morbilidad y niveles considerables de mortalidad [2]. Según la Iniciativa Global para el Asma (GINA), "El asma es una enfermedad heterogénea, con diferentes procesos subyacentes. Los grupos distinguibles por factores demográficos, clí-

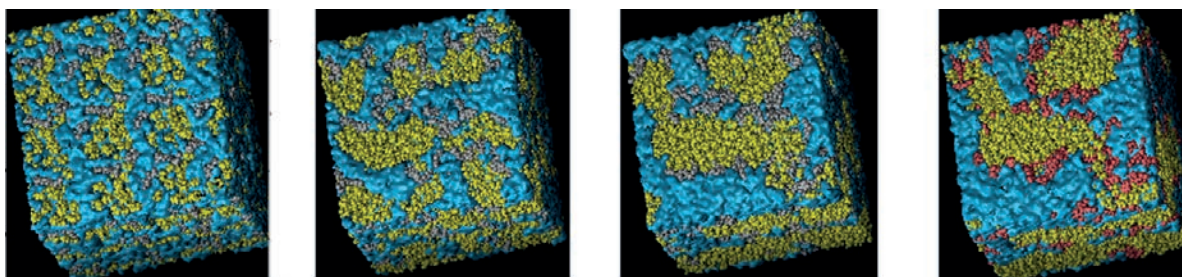


Figura 1. Set 1. Secuencia temporal que muestra la evolución del sistema ternario agua W: ciclohexano CYHE: naringina NGN, 8:1,2:0,8 mol:mol:mol. Esta composición particular es similar a las proporciones calculadas de sistemas biológicos en los que se documentaron los efectos antiinflamatorios de la NGN. El sistema evoluciona a través de la autoagregación de CYHE, luego la agregación parcial de NGN y finalmente la NGN se mueve hasta los límites de CYHE:W. NGN en gris y última imagen en rosa

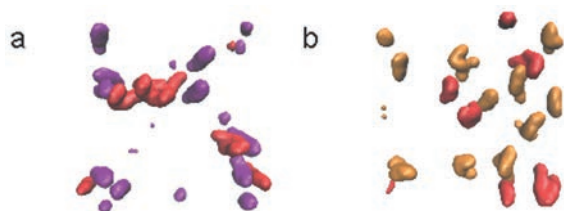


Figura 2. a) Visualización del modelo de membrana plasmática POPC:CHL:Gm1 100:10:5 mol:mol:mol. CHL (púrpura) forma grupos con la porción de ceramida de Gm1. POPC se omitió para mayor claridad. Tensión superficial 49 mN/m. b) visualización del modelo de membrana plasmática POPC:NGN: Gm1 100:10:5 mol:mol:mol. NGN (naranja) no se agrupa con la porción de ceramida de Gm1. POPC se omitió para mayor claridad. Tensión superficial 43 mN/m.

nicos y/o fisiopatológicos a menudo se denominan “fenotipos de asma” [1]. De hecho, múltiples estudios han demostrado que varios subtipos de asma pueden reflejarse en las manifestaciones externas de la enfermedad, que se denominan “fenotipos” y pueden implicar, entre otros tantos, síntomas clínicos como inflamatorios característicos [3]. Sin embargo, dado que los fenotipos del asma no implican mecanismos fisiopatológicos subyacentes, el asma también se puede clasificar en subtipos conocidos como “endotipos” [4], que se basan en mecanismos fisiopatológicos específicos tanto a nivel celular como molecular [5-7]. Se reconoce que “muchas células y elementos celulares” desempeñan un papel en la patogénesis de la enfermedad. Granulocitos como los eosinófilos y los neutrófilos tienen parte en el proceso inflamatorio en el asma y el patrón de infiltración de granulocitos se puede utilizar para identificar diferentes fenotipos inflamatorios en el asma. Esta información es útil porque se relaciona con la respuesta al tratamiento, vías mecanicistas implicadas en la patogénesis de la enfermedad y riesgo de enfermedad futura [8]. Curiosamente, el fenotipo inflamatorio no parece estar relacionado con el control de síntomas. Generalmente, el asma eosinofílico EA suele representar una enfermedad más grave con hiperreactividad de las vías respiratorias y un mayor riesgo de exacerbación [9]. En cuanto al asma no eosinofílico NEA, consiste principal-

mente en asma neutrofílica, caracterizado por obstrucción de las vías respiratorias mal controlada y peor evolución [10, 11]. Tradicionalmente, los neutrófilos, originados en células madre de la médula ósea sólo habían sido considerados como una especie de célula de inmunidad innata [12]. En este sentido, los neutrófilos juegan un papel importante en la eliminación de patógenos y de desechos celulares [13]. La migración y activación de los neutrófilos podría causar inflamación y sensibilización directa o indirecta. La inflamación causada por el propio sistema inmunológico es realmente importante para la solución de infección y la eliminación de patógenos. Pero la inflamación persistente en el sistema respiratorio frecuentemente conduce a algunas enfermedades como el asma, la EPOC y la fibrosis pulmonar. Se han probado algunos productos biológicos como tratamientos para el asma grave, pero son escasos los tratamientos farmacológicos dirigidos al asma neutrofílica, la mayoría de los estudios clínicos no se han centrado en los neutrófilos, por lo que se requiere investigación dirigida a la inflamación mediada por estas células para dilucidar el tratamiento óptimo [14]. Una contribución importante que cada vez ha ido cobrando mayor relevancia es el estudio de flavonoides con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Naringenina y su glicósido naringina se destacan particularmente por su efectividad como anti-inflamatorios en ensayos in vitro, in silico o in vivo, en sistemas experimentales de animales diabéticos, con fibrosis hepática y con artritis reumatoidea, así como acciones pro - estrogénicas en análogos de osteoporosis [15]. Si bien hay evidencia experimental en favor de vías de señalización específicas reguladas por estos flavonoides, la amplitud de sus efectos permite suponer un mecanismo más general. En estos sistemas los neutrófilos participan como desencadenantes de la inflamación. Los leucotrienos son potentes mediadores proinflamatorios producidos por células implicadas en la respuesta inflamatoria, particularmente los neutrófilos, tras la estimulación y activación de cPLA2 α posterior al incremento de calcio intracelular. La activación va acompañada de redistribución de balsas de membrana (rafts) enriquecidas en monosialogangliósido GM1

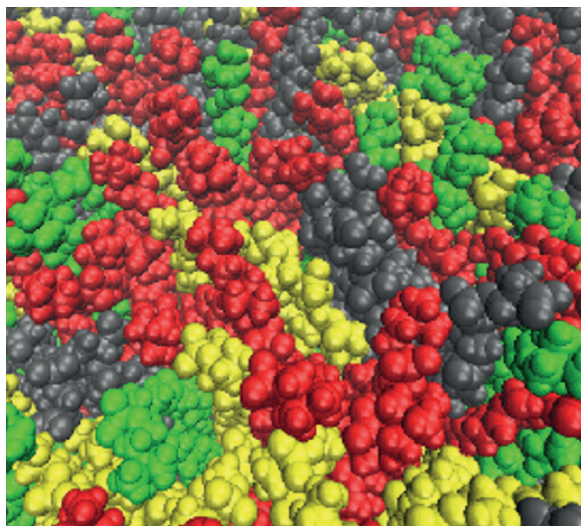


Figura 3a. Modelo de membranas POPC (verde):POPS (gris):POPE (amarillo):PSM 2:4:2:3, visualización de la superficie del plano xy. PSM (rojo) forma grupos que excluyen POPC.

y colesterol [16]. Si alguna molécula pudiese particionar a la membrana plasmática de los neutrófilos y pudiese desorganizar las balsas, sería razonable pensar que tendría un efecto inhibitor de la activación y consecuentemente sería antiinflamatoria. En este trabajo evaluamos in silico los efectos de la incorporación de naringina sobre la estructura de la membrana plasmática y la posible formación de rafts.

MÉTODOS

HARDWARE

Los diseños, así como los scripts de prueba fueron realizados y corridos en una computadora con Intel I5 4a generación, 8 GB de memoria RAM. Las corridas de minimización (para asegurar la fidelidad estructural de los modelos moleculares virtuales) equilibración (para que las moléculas tengan todas sus coordenadas sin superposición simulando la temperatura y presión deseadas) y producción (acá es cuando se da curso al desarrollo de las interacciones moleculares según las leyes de combinación química y la física newtoniana del movimiento de partículas) se corrieron en el centro de cómputo CCAD – Universidad Nacional de Córdoba (<https://ccad.unc.edu.ar/>), integrante de SNCAD – MinCyT, República Argentina. Todas las instancias se simuló un Sistema a presión de 1 atm y temperatura de 310 K para 100 ns (nanosegundos = 10^{-9} segundos).

SOFTWARE

Simulamos cajas cúbicas con mezclas de ciclohexano (CYHE), naringina (NGN) y agua, suspensiones de lípidos monoméricos y con membranas imitando la composición

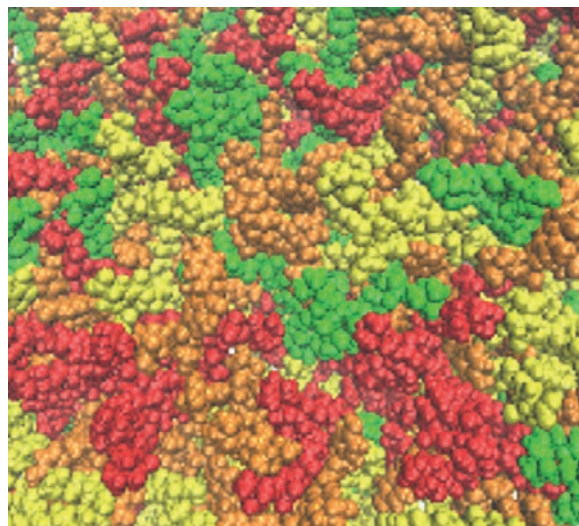


Figura 3b. PSM (rojo) forma grupos y NGN (naranja) se distribuye aleatoriamente.

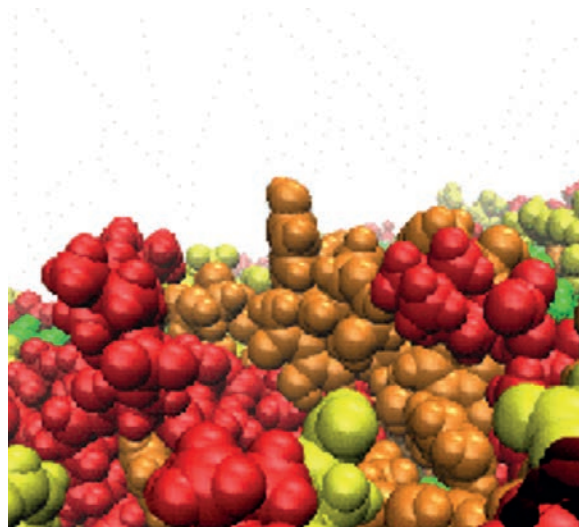


Figura 3c. NGN (naranja) y PSM (rojo) sobresalen del plano del fósforo.

lipídica de membranas plasmáticas aisladas de neutrófilos humanos, con o sin NGN. En todos los casos el medio fue solución 0,15 M de KCl. Se obtuvieron los diseños con software del servidor web CHARMM-GUI [17], y todas las simulaciones se ejecutaron con GROMACS v 2023.2 [18]. El campo de fuerza (que define la forma de nombrar cada átomo y las propiedades de los compuestos) fue Charmm 36 y las simulaciones fueron del tipo “all atom” (se resuelven las ecuaciones para movimiento e interacción de cada átomo del sistema) con el solvente modelado TIP3 (el agua se representa por 3 puntos) en todos los casos.

El primer conjunto de simulaciones se diseñó para probar el carácter anfipático de las NGN. Construimos cajas con un sistema ternario de W:CYHE:NGN en proporciones de 1:1:1 a 8:1,2:0,8 mol:mol:mol.

El segundo conjunto de experimentos virtuales se realizó para probar el comportamiento de NGN en un modelo simple de membrana plasmática con palmitoil fosfatidilcolina (POPC), gangliósido GM1 (este fue elegido porque la activación de los neutrófilos cursa con reclutamiento de parches de membrana con GM1 a la membrana plasmática) y NGN o colesterol (debido a la presencia de anillos hidrofóbicos en ambas moléculas) para probar si la NGN promovería o inhibiría la formación de balsas como lo hace el colesterol.

Finalmente, para probar la capacidad de esfingomielina de inhibir la activación de neutrófilos en presencia de naringina, ensayamos membranas POPC: palmitoil oleil fosfatidilcolina (POPE), palmitoil oleil fosfatidilserina (POPS) 2:2:4 relación mol:mol:mol (semejantes al lado interno de la membrana plasmática del neutrófilo) eventualmente enriquecidas con esfingomielina (PSM), colesterol (CHL) o NGN y gangliósido GM1 en 3:3:2 mol:mol:mol. Determinamos la asociación de lípidos (moléculas más cercanas dentro de 5 Å).

RESULTADOS

En la primera serie de simulaciones del sistema ternario W: CYHE: NGN se pudo observar que NGN se comporta como una molécula anfipática ofreciendo sus anillos apolares al entorno enriquecido en CYHE y la porción glucídica al entorno acuoso. El sistema de proporciones 8:1,2:0,8 mol:mol:mol es de particular interés por su similitud con las proporciones calculadas extrapolando las proporciones de solvente acuoso (representado por W), lípidos (representados por CYHE), y NGN que resultan en sistemas biológicos con las dosis de NGN en que se documentaron los efectos antiinflamatorios. El sistema evoluciona a través de la autoagregación de CYHE y luego la agregación parcial de NGN que finalmente se mueve a los límites entre CYHE: W (**Figura 1**).

En la segunda serie de simulaciones el modelo de membrana plasmática POPC:CHL:GM1 100:10:5 mol:mol:mol permitió observar que la presencia de colesterol favorece la agregación o formación de rafts con la porción ceramida de GM1 determinándose una tensión superficial 49 mN/m (**Figura 2a**). En el caso del modelo POPC:NGN:GM1 100:10:5 mol:mol:mol, NGN se distribuyó aleatoriamente y no se agrupó con la porción de ceramida de GM1 provocando una disminución de tensión superficial a 43 mN/m (**Figura 2b**). Cuando simulamos membranas modelo POPC:POPS:POPE:PSM 2:4:2:3, se pudo determinar y visualizar que PSM se agrega excluyendo POPC. Es decir que PSM forma rafts al margen de POPC (**Figura 3a**). Esta organización se robustece cuando se incorpora CHL a la membrana observándose rafts de esfingomielina y colesterol. Finalmente,

cuando CHL es reemplazado por NGN, la distribución de PSM y GM1 se aleatoriza y NGN hace protrusión por encima del nivel de los grupos fosfato de los fosfolípidos indicando que la membrana sufre fuertes re - arreglos estructurales (**Figuras 3b y c**).

DISCUSIÓN

Una primera observación es que los sistemas construidos fueron estables durante el período de 100 ns, lo que se traduce en resultados confiables.

Las simulaciones del sistema W:CYHE:NGN muestran que el glicósido NGN tiene carácter anfipático como las sales biliares y compuestos semejantes y cuando se lo expone a un sistema en que tiene componentes hidrofóbico e hidrofílico va a tender a ocupar la región de interfase, sin un predominio de interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas. Estas consideraciones son de importancia al considerar formas de administración en los animales de experimentación y excluyen los experimentos de administración oral dado que NGN es procesada por la flora bacteriana. En las simulaciones de POPC:CHL:GM1 100:10:5 mol:mol:mol se pudo lograr una evolución que llevó a la formación de rafts como ocurre en las membranas de células vivas, particularmente neutrófilos, los cuales pueden ser activados variando la estructura de la membrana secuestrando colesterol con el empleo de β ciclodextrina [16]. El reemplazo de CHL por NGN, POPC:NGN:GM1 100:10:5 mol:mol:mol disminuyó la tensión superficial lo que permite suponer que NGN podría ser un disruptor estructural en membranas especializadas como las del neutrófilo. De esta manera, podría resultar en una actividad antiinflamatoria al impedir el proceso normal de transducción de cualquier señal de activación del neutrófilo o de otras células del sistema inmunológico. La presencia de PSM contribuye a la estabilización estructural de las balsas o rafts formados por la asociación de PSM,GM1 y CHL. El reemplazo de CHL por NGN, NGN adopta una distribución más aleatoria que CHL y se localiza en separación de fase entre los rafts de PSM y GM1 y el resto de los fosfolípidos.

En conjunto los resultados nos permiten afirmar que NGN podría integrarse a las membranas de células eucariotas en las condiciones de simulación. Esto es relevante al considerar el posible mecanismo de ingreso al citosol, que no necesitaría de un transporte específico. Una vez incorporada podría ser un disruptor estructural de las membranas plasmáticas de las células como los neutrófilos y en consecuencia oficiar de molécula antiinflamatoria debido al entorpecimiento de los procesos de señalización inherentes a la activación de las células inmunocompetentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Updated 2021. Available online: [Ginasthma.org/wp-content/uploads/2021/05/GINA-Main-Report-2021-V2-WMS.pdf](http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2021/05/GINA-Main-Report-2021-V2-WMS.pdf).
2. Global Asthma Network. The Global Asthma Report 2018. New Zealand 2018. Available online: <http://www.globalasthma.org/>.
3. Silkoff, P.E.; Strambu, I.; Laviolette, M.; Singh, D.; FitzGerald, J.M.; Lam, S.; Kelsen, S.; Eich, A.; Ludwig-Sengpiel, A.; Hupp, G.C.; et al. Asthma characteristics and biomarkers from the Airways Disease Endotyping for Personalized Therapeutics (ADEPT) longitudinal profiling study. *Respir. Res.* **2015**, *16*, 142.
4. Anderson, G.P. Endotyping asthma: New insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* **2008**, *372*, 1107–1119.
5. Lötvall, J.; Akdis, C.A.; Bacharier, L.B.; Björner, L.; Casale, T.B.; Custovic, A.; Lemanske, R.F., Jr.; Wardlaw, A.J.; Wenzel, S.E.; Greenberger, P.A. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *127*, 355–360.
6. Chung, K.F. Precision medicine in asthma: Linking phenotypes to targeted treatments. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2018**, *24*, 4–10.
7. Kuruvilla, M.E.; Lee, F.E.; Lee, G.B. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *56*, 219–233.
8. Pavord ID, Shaw DE, Gibson PG, Taylor DR. Inflammometry to assess airway diseases. *Lancet*. 2008;372: 1017–9.
9. H. Inoue, I. Ito, A. Niimi et al., “CT-assessed large airway involvement and lung function decline in eosinophilic asthma: The association between induced sputum eosinophil differential counts and airway remodeling,” *Journal of Asthma & Allergy Educators*, vol. 53, no. 9, pp. 914–921, 2016.
10. N. C. Thomson, “Novel approaches to the management of non-eosinophilic asthma,” *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, vol. 10, no. 3, pp. 211–234, 2016.
11. J. L. Simpson, M. Carroll, I. A. Yang et al., “Reduced antiviral interferon production in poorly controlled asthma is associated with neutrophilic inflammation and high-dose inhaled corticosteroids,” *CHEST*, vol. 149, no. 3, pp. 704–713, 2016.
12. F. M. Konrad, S. Braun, K. C. Ngamsri, I. Vollmer, and J. Reutershan, “Heme oxygenase-1 attenuates acute pulmonary inflammation by decreasing the release of segmented neutrophils from the bone marrow,” *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 307, no. 9, pp. L707–L717, 2014.
13. C. Rosales, N. Demareux, C. A. Lowell, and E. Uribe-Querol, “Neutrophils: Their role in innate and adaptive immunity,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2016, Article ID1469780, 2 pages, 2016.
14. Liu, J., Pang, Z., Wang, G., Guan, X., Fang, K., Wang, Z., & Wang, F. (2017). Advanced Role of Neutrophils in Common Respiratory Diseases. *Journal of immunology research*, 2017, 6710278. <https://doi.org/10.1155/2017/6710278>.
15. Aihaiti, Y., Song Cai, Y., Tuerhong, X., Ni Yang, Y., Ma, Y., Shi Zheng, H., Xu, K., & Xu, P. (2021). Therapeutic Effects of Naringin in Rheumatoid Arthritis: Network Pharmacology and Experimental Validation. *Frontiers in pharmacology*, 12, 672054. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.672054>.
16. Solomkin, J. S., Robinson, C. T., Cave, C. M., Ehmer, B., & Lentsch, A. B. (2007). Alterations in membrane cholesterol cause mobilization of lipid rafts from specific granules and prime human neutrophils for enhanced adherence-dependent oxidant production. *Shock (Augusta, Ga.)*, 28(3), 334–338. <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e318047b893>.
17. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of computational chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
18. H. Bekker, H.J.C. Berendsen, E.J. Dijkstra, S. Achterop, R. van Drunen, D. van der Spoel, A. Sijbers, and H. Keegstra et al., “Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations”; pp. 252–256 in *Physics computing 92*. Edited by R.A. de Groot and J. Nadrchal. World Scientific, Singapore, 1993.