

Efectos protectores del extracto de hoja de *Artemisia campestris* en el daño inducido por lipotoxicidad en podocitos

Amel Belgacem¹, Adriana Izquierdo-Lahuerta², Lotfi Bitri¹, Gema Medina-Gómez²

¹ University Of Tunis El Manar, Faculty Of Sciences Of Tunis, Tunis, Tunisia.

² University "Rey Juan Carlos", Biochemistry, and Molecular Biology, Division of the Health Basic Science, Faculty of Health Science, Madrid, Spain; Correspondencia: gema.medina@urjc.es.

Resumen:

Artemisia campestris de la familia *Asteraceae*, es una planta usada en la medicina tradicional tunecina por sus propiedades antivenenosas, antiinflamatorias, antirreumáticas, antimicrobianas y antidiabéticas. El tratamiento de podocitos con ácido palmítico (PA) produce inflamación, resistencia a la insulina y estrés de retículo endoplásmico. El objetivo de este estudio fue analizar el papel protector del extracto de *Artemisia* y sus diferentes componentes en el daño inducido por el PA en podocitos. Para ello, se trataron podocitos inmortalizados de ratón con PA, en presencia o no de extracto de hoja de *Artemisia*. Los análisis de expresión del ARNm de los podocitos tratados con PA mostraron un aumento de los niveles de marcadores de inflamación como IL-6 y Cox-2, así como de estrés de retículo como CHOP. Este aumento se revirtió cuando se adicionó al medio extracto de *Artemisia*. Además, el tratamiento de los podocitos con PA provocó una pérdida de fosforilación de Akt (pAkt) en presencia de insulina. Sin embargo, la presencia en el medio el extracto de *Artemisia*, evitó la pérdida de fosforilación de Akt en presencia de PA e insulina. Conclusión: El extracto de hoja de *A. campestris* previene el daño inducido por PA en podocitos por sus efectos anti-inflamatorios y su capacidad de recuperar la ruta de señalización de la insulina. Este estudio sugiere un papel potencialmente terapéutico de *A. campestris* en la patogénesis de las complicaciones renales asociadas a la obesidad.

Palabras clave:

- Podocitos
- Lipotoxicidad
- *Artemisia campestris*
- Polifenoles.

Protective effects of the leaf extract of *Artemisia campestris* in the damage induced by lipotoxicity in podocytes

Abstract:

Artemisia campestris of the *Asteraceae* family is a plant used in traditional Tunisian medicine for its anti-venom, anti-inflammatory, antirheumatic, antimicrobial and antidiabetic properties. Palmitic acid (PA) treatment of podocytes produces inflammation, insulin resistance, oxidative stress, and endoplasmic reticulum stress. The aim of this study was to analyze the protective role of *Artemisia* extract and their different components in podocyte injury induced by PA. Immortalized conditional mouse podocytes were treated with PA, with or without *Artemisia* total extract and different components. Analysis of the pro-inflammatory cytokine IL-6, CHOP and the inducible Cox-2 mRNA expression levels showed an increase in podocytes treated with PA that was significantly prevented by the addition of *Artemisia* extract. Each components of extract showed different protective effects. However, a lost in Akt phosphorylation signal (pAkt) was observed in PA-treated podocytes in the presence of insulin. In contrast, similar PA-treated podocytes with *Artemisia* extract showed a significant increase of pAKT in the presence of insulin. Conclusion: *A. campestris* leave extract prevented PA-induced injury in mouse podocytes by anti-inflammatory and anti-oxidative effects and recovered the insulin signaling pathway. This study suggests a potential therapeutic role of *A. campestris* in the pathogenesis of renal complications associated to obesity.

Keywords:

- Podocyte
- Lipotoxicity
- *Artemisia campestris*
- Polyphenols.

Introducción

La OMS está apoyando los estudios etnobotánicos de las investigaciones farmacéuticas acerca de hierbas medicinales de uso tradicional, con objeto optimizar su uso y llevarlos hasta los sistemas de salud. *Artemisia campestris* es una planta usada en la medicina tradicional Tunecina por sus propiedades antivenosas, antiinflamatorias, antirreumáticas, antimicrobianas y antidiabéticas debida a la presencia de diferentes componentes tales como flavonoides, cromonas, acetofenonas, cumarinas y aceites esenciales[1]. En los últimos años, se ha visto el efecto renoprotector de esta planta en diferentes patologías que afectan al riñón [2-7]. Recientemente, se ha descrito como los extractos de la hoja de otra especie del genero *Artemisia*, concretamente *Artemisia absinthium* L., son capaces de suprimir el crecimiento de las células de carcinoma hepático a través de la inducción de la apoptosis[8].

En la actualidad la obesidad está llegando a niveles epidémicos a nivel mundial. El exceso de lípidos se acumula en tejidos no adiposos favoreciendo el daño de estos órganos en un proceso denominado lipotoxicidad[9]. El riñón es uno de los órganos afectados por este proceso[10-12], que comienza a acumular gotas lipídicas, siendo los mecanismos implicados, el estrés oxidativo y de retículo endoplásmico, la inflamación y el desarrollo de resistencia a la insulina [10]. Los podocitos, células clave en el mantenimiento de la integridad de la barrera de filtración glomerular y en el desarrollo de resistencia a la insulina, se ven afectadas en gran medida por este proceso lipotóxico [10,12]. Estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el ácido palmítico (PA), es un ácido graso saturado que contribuye a la disfunción renal asociada al desarrollo del Síndrome Metabólico[11]. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto protector del extracto de hoja de *A.campestris* en el daño renal producido por PA en podocitos inmortalizados de ratón.

Material y métodos

Extracción de las hojas de la planta

Hojas frescas de *A. campestris* fueron recogidas en la región de Ksour Essef en la ciudad de Mahdia (Túnez), limpiadas y secadas al aire durante varios días en una habitación ventilada, oscura y con la temperatura controlada. A continuación, fueron machacadas. El extracto seco en polvo fue macerado en metanol puro tres veces. El macerado fue filtrado y evaporado en un evaporador rotatorio a 40°C. El residuo seco fue pesado y guardado a 4 °C hasta su uso. Este extracto fue disuelto en metanol/H₂O (10:90, v/v) y se realizó una partición líquido-líquido con solventes de polaridad creciente: hexano, para quitar pigmentos lipofílicos y grasa residual, diclorometano para separar los componentes de baja polaridad, etanol-acético para extraer

los constituyentes de polaridad media y n-Butanol para obtener los componentes polares y la mayoría de glucósidos. Las fracciones resultantes fueron concentradas, secadas en un evaporador rotatorio a presión reducida y pesadas para determinar su masa. En todos los experimentos se utilizó la fracción butanólica.

Cultivo celular

Podocitos inmortalizados de ratón obtenidos en el laboratorio del Prof. Richard Coward de la Universidad de Bristol (UK), y fueron tratados como se describió en Martínez et al., 2015[11]. Los podocitos diferenciados fueron tratados con 500 µM de PA durante 24 h, con o sin fracción n-butanólica a concentraciones de 100, 50 y 25 µg/ml.

Para el ensayo de estimulación con insulina, los podocitos se mantuvieron en medio sin suero durante 18h. Después, las células se incubaron con o sin PA durante 24h, se lavaron y se añadió insulina durante 5-10min a una concentración final de 100 nM.

La viabilidad celular frente al extracto de hoja de *A. campestris* fue analizada con yoduro de propidio mediante citometría de flujo (Cytomics FC500, Beckman Coulter).

qRT-PCR

La extracción de ARN y la RT-PCR cuantitativa (q) se realizó como se han publicado previamente [11,13]. Las secuencias específicas de oligos usados en este estudio se recogen en la Tabla 1 y 2.

Tabla 1: Listado de cebadores y sondas específicas empleadas en RT-PCR usando el reactivo Taqman.

	Primer Forward	Primer Reverse	TaqMan-Probe
β-actina	GCTCTGGCTCTAGCACCAT	GCCACCGATCCACACAGAGT	ATCAAGATCATTGCTCCTCTGAGCGC
COX-2 (Pigs2)	CCCTGAAGCGGTACACATCA	GTCACCTGTAGAGGGCTTCA ATTCT	TTGAAGAAGTACAGGAGAGAAGGAA ATGGCTG
CHOP (DDIT3)	CCACCACACCTGAAAGCAGA	AGGTGAAAGGCAGGGACTC A	CTGGTCCACGTGCAGTCATGGCA
GLUT-4	ACTCATTCTGGACGTTCTCT	CACCCCCAAGATGAGTGGG	TGGCGCTACTCAGGGCTAACATCA

Tabla 2: Listado de cebadores específicos de IDT empleadas en RT-PCR.

IDT	IDT Reference	Gen Bank ID
IL6	Mm.PT.53.17354790	NM_031168.1

Western blots

Las células fueron lavadas con PBS y levantadas en tampón RIPA con inhibidores de proteasas. La concentración proteica fue medida por el método de Bradford. Las muestras de proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad). Las membranas fueron bloqueadas e incubadas con los anticuerpos: antiphospho-AKT (Thr308) (Cell Signaling) y anti-total AKT (Santa Cruz Biotechnology, INC). Las bandas fueron densitometradas usando el programa ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). La cantidad de proteína de la condición control se le asignó un valor de 100% y el resto fue relativizado al mismo.

Análisis Estadístico

Los resultados se han expresado como media \pm SEM. Para determinar si existían diferencias significativas se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) y en los casos en los que la significación alcanzó valores de $p < 0,05$, se aplicó el test Kruskal-Wallis, mediante programa estadístico GraphPad-InstatGrafic (GraphPad Software, Inc).

Resultados

El extracto de *A. campestris* previene la inflamación y el estrés de retículo endoplásmico provocado por el palmitato.

Los podocitos mostraron una viabilidad semejante celular al ser expuestos a los componentes mayoritarios del extracto butanólico de *A.campestris* o al vehículo en el que iban disueltos estos extractos (datos no mostrados).

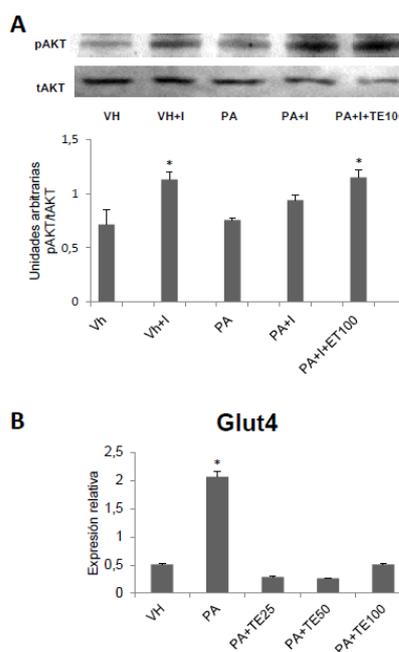
Los podocitos tratados con AP mostraron un aumento significativo de la expresión del ARNm de marcadores de inflamación como Interleuquina-6 (IL-6) y Cox-2 (Ciclooxigenasa-2 inducible) que fue disminuido significativamente por adición del extracto de *A. campestris* de forma dosis dependiente. Además, también se observó un incremento de marcadores de estrés de retículo endoplásmico como CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein) y GRP78/BiP (endoplasmic reticulum chaperone and signaling regulator) (Fig. 1).

El extracto de *A. campestris* previene la resistencia a la insulina que presentan los podocitos tratados con palmitato.

El extracto de *A. campestris* recupera la señalización de la de señalización vía de la Insulina. Los podocitos tratados con PA mostraron una pérdida de fosforilación de PI3K/PKB (o Akt) en presencia de insulina previamente descrita por nuestro laboratorio [11], que fue prevenida con la adición del extracto de Artemisia ($p \leq 0.05$) a niveles similares de los podocitos tratados con vehículo con insulina (Fig.2).

Asimismo, el análisis de la expresión de genes con el metabolismo de la glucosa, como el transportador de glucosa GLUT-4 (Fig.2).

Figura 2. El extracto de hoja de *A.campestris* previene la resistencia a la insulina que produce el ácido palmítico (PA) en podocitos. **A)** Western blot representativo y cuantificación de pAkt(Ser473) en proteínas de podocitos: con vehículo (VH); tratados con PA; tratados con PA e insulina (PA+I); tratados con PA, insulina y 100 μ g/ml del extracto de *A.campestris* (PA+I+TE); Los valores fueron normalizados con proteína Kinasa B total (tAkt), (pAkt/tAkt); * $p < 0.05$ VH vs. VH+I y VH. vs. PA+I+TE; **B)** Expresión de ARNm del transportador de glucosa GLUT4. VH: Vehículo; PA: tratados con 500m de PA; PA+TE25: Tratados con PA y extracto de *A. campestris* a 25 μ g/ml; PA+TE25: Tratados con PA y extracto de *A.campestris* a 50 μ g/ml; PA+TE100: Tratados con PA y extracto de *A.campestris* a 100 μ g/ml.*: $p < 0,05$ PA vs. VH. N=4 experimentos



Discusión

En los últimos años el desarrollo de enfermedad renal asociada a la obesidad es un concepto emergente. En este contexto el podocito, pieza clave en el desarrollo de la enfermedad renal asociada a la obesidad y el Síndrome Metabólico, es el tipo celular que se ve afectada por la lipotoxicidad provocando inflamación estrés oxidativo y de retículo endoplásmico, alteraciones del citoesqueleto y en último término muerte celular [9,6].

La administración de extracto de hoja de *A.campestris* se ha visto que tiene efectos renoprotectores [2-7] debido a la riqueza en flavonoides y polifenoles[1,10]. En nuestro estudio hemos mostrado el efecto antiinflamatorio que este extracto confiere a los podocitos, como hemos mostrado por el descenso a niveles basales de un marcador inflamatorio como es la interleuquina 6 (IL-6) y de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) de forma dosis dependiente.

El PA produce estrés de retículo, como indica el incremento de expresión de la Chaperona (GRP78) y uno de los principales factores de transcripción que media el estrés de RE (CHOP) y cuyo último efecto es la apoptosis[6]. Los resultados del presente estudio muestran que el extracto de

A.campestris previene este efecto porque los niveles de expresión tanto de GRP78, como de CHOP vuelven a niveles basales cuando se trata con el extracto de *A.campestris*.

En estudios previos de nuestro laboratorio, se ha mostrado como la lipotoxicidad está asociada al desarrollo de resistencia a la insulina en el riñón y más concretamente en podocitos [8,9]. En el presente trabajo, se pone de manifiesto la capacidad del extracto de *A.campestris* de evitar la pérdida de fosforilación de la proteína quinasa B (PKB o Akt) inducida por el tratamiento con PA, y por tanto, refleja que la ruta de señalización de la insulina no se encuentra bloqueada a ese nivel, como consecuencia de la lipotoxicidad. En este sentido, se ha visto que cuando se administra extracto de *A.campestris* a ratas diabéticas mejora significativamente los parámetros bioquímicos, desciende la proteinuria y estrés oxidativo [7,14]. Nuestro estudio también muestra que los niveles de expresión del transportador de glucosa GLUT4, elevados por efecto del tratamiento con PA, vuelven a valores basales cuando se administran incluso bajas dosis de extracto de *A.campestris*.

Conclusiones

El extracto de hoja de *Artemisia campestris* previene el daño inducido por PA en podocitos de ratón por sus efectos anti-inflamatorios y por prevenir el estrés de retículo endoplásmico. Así también, el extracto de *A.campestris* evita la pérdida de la ruta de señalización de la insulina. Este estudio sugiere un potencial papel terapéutico del extracto de *A.campestris* en la patogénesis de las complicaciones renales asociadas a la lipotoxicidad en la obesidad.

Agradecimientos

Nos gustaría agradecer al Dr. Jose Antonio Más, su asistencia técnica. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación e Investigación Científica del Gobierno de Túnez, programa de becas (Bourse d'alternance 2015-2016) y el MINECO (BFU2013-47384-R, BFU2016-78951-R) y la CAM (S2010/BMD-2423).

Bibliografía

[1] Metoui R, Bouajila J, Znati M, Cazaux S, Neffati M, Akrouf A. Bioactive flavones isolated from Tunisian *Artemisia campestris* L. Leaves. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 2017;63:86–91.

[2] Wen Y, Pan M-M, Lv L-L, Tang T-T, Zhou L-T, Wang B, et al. Artemisinin attenuates tubulointerstitial inflammation and fibrosis via the NF- κ B/NLRP3 pathway in rats with 5/6 subtotal nephrectomy. *Journal of Cellular Biochemistry* 2019;120:4291–300. doi:10.1002/jcb.27714.

[3] Kim K, Lee D, Hiep N, Song J, Lee H-J, Lee D, et al. Protective Effect of Phenolic Compounds Isolated from Mugwort (*Artemisia argyi*) against Contrast-Induced Apoptosis in Kidney Epithelium Cell Line LLC-PK1. *Molecules* 2019;24:195. doi:10.3390/molecules24010195.

[4] Bai L, Li H, Li J, Song J, Zhou Y, Liu B, et al. Immunosuppressive effect of artemisinin and hydroxychloroquine combination therapy on IgA nephropathy via regulating the differentiation of CD4+ T cell subsets in rats. *International Immunopharmacology* 2019;70:313–23. doi:10.1016/j.intimp.2019.02.056.

[5] Saoudi M, Badraoui R, Bouhajja H, Ncir M, Rahmouni F, Grati M, et al. Deltamethrin induced oxidative stress in kidney and brain of rats: Protective effect of *Artemisia campestris* essential oil. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;94:955–63. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.030.

[6] Sefi M, Troudi A, Hamida F Ben, Soudani N, Boudawara T, Zeghal Najiba. Protective effects of *Artemisia campestris* upon fenthion-induced nephrotoxicity in adult rats and their progeny. *General Physiology and Biophysics* 2013;32:577–88. doi:10.4149/gpb_2013047.

[7] Sefi M, Fetoui H, Soudani N, Chtourou Y, Makni M, Zeghal N. *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. *Pathology - Research and Practice* 2012;208:157–62. doi:10.1016/j.prp.2012.01.002.

[8] Wei X, Xia L, Ziyayiding D, Chen Q, Liu R, Xu X, et al. The Extracts of *Artemisia absinthium* L. Suppress the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells through Induction of Apoptosis via Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial-Dependent Pathway. *Molecules* 2019;24:913. doi:10.3390/molecules24050913.

[9] Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010 Mar;1801(3):338–49 n.d.

[10] Izquierdo-Lahuerta A, Martínez-García C, Medina-Gómez G. Lipotoxicity as a trigger factor of renal disease. *Journal of Nephrology* 2016;29:603–10. doi:10.1007/s40620-016-0278-5.

[11] Martínez-García C, Izquierdo-Lahuerta A, Vivas Y, Velasco I, Yeo T-K, Chen S, et al. Renal Lipotoxicity-Associated Inflammation and Insulin Resistance Affects Actin Cytoskeleton Organization in Podocytes. *PLOS ONE* 2015;10:e0142291. doi:10.1371/journal.pone.0142291.

[12] Izquierdo A, Medina-Gómez G. Role of lipotoxicity in the development of kidney damage in metabolic syndrome and aging. *Dialysis y Trasplante* 2012;33. doi:10.1016/j.dialis.2011.11.001.

[13] Martinez-Garcia C, Izquierdo A, Velagapudi V, Vivas Y, Velasco I, Campbell M, et al. Accelerated renal disease is associated with the development of metabolic syndrome in a glucolipotoxic mouse model. *Disease Models & Mechanisms* 2012;5:636–48. doi:10.1242/dmm.009266.

[14] Sefi M, Fetoui H, Makni M, Zeghal N. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on

hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats n.d. doi:10.1016/j.jfct.2010.05.005.