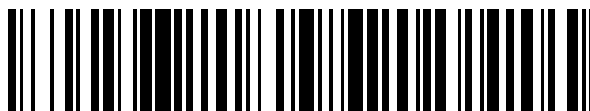


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 862**

51 Int. Cl.:

A61K 36/324 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2010** **E 15158169 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021** **EP 2926824**

54 Título: **Extracto antiinflamatorio de Boswellia frereana**

30 Prioridad:

18.07.2009 GB 0912526
02.12.2009 GB 0921086

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
05.11.2021

73 Titular/es:

COMPTON DEVELOPMENTS LIMITED (100.0%)
45-51 Wychtree Street
Morriston, Swansea SA6 8EX, GB

72 Inventor/es:

BLAIN, EMMA JANE;
DUANCE, VICTOR COLIN;
BOWEN, IFOR DELME y
ALI, AHMED YASINE

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 874 862 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto antiinflamatorio de *Boswellia frereana*

5 La invención definida en las reivindicaciones 1 a 7 se refiere al uso de *Boswellia frereana* (comúnmente conocido como incienso) como medicamento; un extracto de *Boswellia frereana* en donde el extracto es soluble en un solvente orgánico y no comprende ácido boswélico; al menos un agente de dicho extracto; y una composición derivada de *Boswellia frereana*. La invención se refiere además mediante el uso terapéutico de dicho extracto y/o dicho agente y/o dicha composición y, particularmente, pero no exclusivamente, mediante el uso de dicho extracto y/o dicho agente y/o

10 composición como un inhibidor de una afección inflamatoria tal como, por ejemplo, degradación del cartílago articular.

La *Boswellia frereana* es un producto natural de Somalia, África. El producto puede obtenerse de varios proveedores, incluidos Simply Incense [Resolve (WSS Ltd t/a), Unit 12, Southwell Business Centre, Crew Lane Industrial Estate, Southwell, Nottinghamshire, NG25 0TX]; A F Suter & Co. Ltd. [Unit 1, Beckingham Business Park, Beckingham Road, Tolleshunt Major, Essex, Reino Unido]; y Joseph Flach & Sons Ltd. [Unit 8, Maxwell Road, Woodston Industrial Estate, Peterborough, Cambridgeshire, PE2 7HU, Inglaterra].

Introducción

20 La degradación del cartílago articular es una característica clásica tanto de las artritis degenerativas e inflamatorias, por ejemplo, la osteoartritis (OA) y la artritis reumatoide (AR). La OA se caracteriza por una pérdida de proteoglicanos y colágeno en la matriz extracelular (MEC), y estos eventos catabólicos están mediados principalmente por las metaloproteinasas de la matriz (MMP1, 3, 9 y 13 (1-6)) y agreganasas (ADAMTS-4 y -5 (6-8)). La expresión diferencial de estas enzimas catabólicas está relacionada con el nivel de mediadores inflamatorios y citocinas en la articulación

25 OA. Las citocinas como la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) son mediadores clave para impulsar la destrucción de la MEC. Además de inducir la síntesis de las MMP y de las agreganasas, IL-1 y TNF- α también estimulan la producción de óxido nítrico, a través del óxido nítrico sintasa inducible, y aumentan la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂), por estimular la expresión de PGE₂ sintasa y ciclooxigenasa 2 (COX-2).

30 La incidencia de OA es prevalente en una población envejecida u obesa; hay estimaciones de 100 millones de personas con OA en la Unión Europea (9), y en los Estados Unidos, la carga de OA clínica ha aumentado a casi 27 millones de personas en 2007 (10). Aliviar el dolor y la rigidez, mejorar la función física y retrasar la progresión de la enfermedad son objetivos terapéuticos importantes para el manejo de la OA. Actualmente se prescriben analgésicos no opioides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y terapias intraarticulares; el uso continuado de AINE

35 se ha asociado con hemorragia del tracto gastrointestinal y un riesgo aumentado de otros efectos secundarios adversos (11), lo que los hace lejos de ser ideales para el tratamiento de una patología crónica. Por lo tanto, la identificación de otros agentes farmacéuticos potenciales que puedan usarse para aliviar los síntomas asociados con la OA, sin dejar de ser eficaces y no tóxicos, es una búsqueda continua.

40 Sin embargo, como será evidente para los expertos en la técnica, el medicamento descrito en la presente descripción tiene aplicación en el tratamiento de cualquier afección inflamatoria en la que la MMP9, PGE₂ y NO estén elevados o que estén mediados por interleucina-1, como la artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), sepsis, síndrome de sepsis, osteoporosis, lesión isquémica, enfermedad de injerto contra huésped, lesión por reperfusión, asma, diabetes, leucemias mielógenas y otras, psoriasis y caquexia, enfermedad de Alzheimer, trastornos

45 neurológicos desmielinizantes que incluyen esclerosis múltiple, trastornos neurológicos, retinianos y musculares.

En los últimos años, ha habido un interés creciente en el uso de compuestos derivados de hierbas para aliviar los síntomas de una variedad de enfermedades tales como OA, cáncer de mama y próstata, plasticidad neuronal/pérdida de memoria, encefalomiелitis y enfermedad inflamatoria intestinal.

50 Las preparaciones a partir de la resina oleosa del género *Boswellia* (distinta del *B. frereana*), comúnmente conocidos como incienso, se han identificado como potentes agentes antiinflamatorios, antiartríticos y antianalgésicos (revisado recientemente en (15, 16)). Tradicionalmente, las especies de *Boswellia serrata* se han usado ampliamente en el tratamiento de afecciones que son iniciadas o mantenidas por eventos inflamatorios, incluida la colitis colagenosa (17), la enfermedad de Crohn (18) y tanto, la reumatoide (19, 20) y la osteoartritis (21-23). Los estudios demostraron que *B. serrata* tuvo cierta eficacia en el tratamiento de estas afecciones inflamatorias. En dos modelos animales diferentes de artritis (inducida por carragenina e inducida por antígeno), la administración tópica de *B. serrata* al sitio de la inflamación redujo el edema de pata de rata en aproximadamente un 50 % (20). Los principales ingredientes farmacológicamente activos de *B. serrata* son los ácidos α - y β -boswélico (24), y Singh y otros insinuaron que el ácido

60 α - o β -boswélico podía actuar tanto en las fases tempranas como tardías de la inflamación (20). La *B. serrata* se cree que ejerce sus propiedades antiinflamatorias por inhibir la 5-lipoxigenasa de una manera selectiva, no redox y no competitiva ligada a enzimas (25), e por inhibir la actividad de la COX-1 (26).

Recientemente, la eficacia de 5-Loxin®, un nuevo extracto de *B. serrata* enriquecido con ácido 3-O-acetil-11-ceto- β -boswélico al 30 %, se ha probado en ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de la OA de rodilla (23). Se

observaron mejoras significativas en la puntuación del dolor y la capacidad funcional, y una reducción en la MMP3 del fluido sinovial (23).

Aparte de *B. serrata* (nativo de la India), otros miembros de la familia *Boswellia* también se han identificado incluyendo *B. sacra* (nativo de la península arábiga) y *B. carteri* (27) y *B. frereana* (nativo de África).

Nuestro trabajo ha demostrado que *B. frereana* no contiene ácido boswélico (alfa o beta), el principal ingrediente farmacológicamente activo de *B. Serrata*, por lo tanto, es sorprendente descubrir que *B. frereana* es eficaz como antiinflamatorio e interesante descubrir que este efecto antiinflamatorio opera a través de una trayectoria diferente a la usada por otros miembros del género *Boswellia* de hecho, hemos descubierto que el (los) componente (s) farmacológicamente activos de *B. frereana* operan, al menos parcialmente, a través de la supresión, desactivación o inhibición de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) Adicionalmente, también hemos descubierto que *B. frereana* inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa y, por lo tanto, lo hace útil para el tratamiento de trastornos neurológicos en los que la inhibición de la acetilcolinesterasa es beneficiosa, tal como la enfermedad de Alzheimer. Además, también hemos demostrado que *B. frereana* es efectiva para matar las células cancerosas y, por lo tanto, lo hace útil para tratar el cáncer, en particular el cáncer de mama.

Declaraciones de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un extracto en solvente orgánico, distinto del extracto de etanol de oleorresina, de *Boswellia frereana* que comprende un inhibidor de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) para el uso en el tratamiento o prevención de un trastorno o afección seleccionado del grupo que comprende: degradación del cartilago articular o artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, todas las formas de distrofia muscular, especialmente distrofia muscular de Duchenne, asma, diabetes, leucemias mielógenas y otras, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, trastornos neurológicos desmielinizantes que incluyen esclerosis múltiple y trastornos de la retina.

Se enseña en la presente descripción que el extracto puede usarse para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), sepsis, síndrome de sepsis, osteoporosis, lesión isquémica, enfermedad de injerto contra huésped, lesión por reperusión, caquexia, trastornos neurológicos y musculares.

Idealmente, el individuo que padece del trastorno inflamatorio o dicha afección es un mamífero y con la máxima preferencia un primate o un animal de pastoreo tal como un bovino, ovino, equino o porcino, alternativamente el individuo es un felino, canino o roedor. Con la máxima preferencia, el individuo es un ser humano.

También se describe el uso de *Boswellia frereana* en la preparación de un agente para el tratamiento o la prevención de los trastornos o afecciones establecidos anteriormente.

La descripción también enseña el tratamiento o la prevención de los trastornos o afecciones establecidos anteriormente, comprendiendo el método administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad efectiva de *Boswellia frereana*.

Idealmente, el paciente es un mamífero y con la máxima preferencia un primate o un animal de pastoreo tal como un bovino, ovino, equino o porcino, alternativamente el individuo es un felino, canino o roedor. Con la máxima preferencia, el individuo es un ser humano.

En la presente descripción se enseña que un extracto de *Boswellia frereana* es soluble en solución orgánica y comprende uno o más de:

- a) un inhibidor de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9),
- b) un inhibidor de la síntesis de NO,
- c) un inhibidor de la síntesis de PGE₂; y
- d) dicho extracto no afecta la trayectoria de la 5-lipoxigenasa; y
- e) dicho extracto no comprende ácido alfa o beta boswélico.

En el contexto de la presente invención, el término "extracto de *Boswellia frereana*" se refiere a una mezcla de componentes que están presentes en la oleorresina de *Boswellia frereana* y que sean solubles en un solvente orgánico adecuado distinto del etanol. El extracto puede obtenerse por mezclar la resina de goma con el solvente y dejándolo por un período de tiempo adecuado, por ejemplo, varios días, en un ambiente sin luz para que los componentes solubles de la goma se extraigan en el solvente. Para retirar cualquier resina insoluble. Luego, se puede eliminar el solvente para dejar el extracto. Para evitar dudas, "extracto" no se refiere a un solo componente, sino a la mezcla de componentes.

El solvente puede ser un solvente polar, típicamente un alcohol tal como el metanol o un solvente no polar tal como el hexano. La *B. frereana* es única porque en otras especies de *Boswellia* el hexano extrae la fracción de aceite esencial (aceite volátil) solamente y, también, en otras especies de *Boswellia*, el etanol aísla solo la fracción de resina. Sin

embargo, con la *B. frereana* tanto el hexano (no polar) como el etanol (polar) aíslan la fracción de resina que contiene un 60 % de epi-lupeol.

Sin embargo, la extracción también se puede realizar mediante el uso de otros solventes de extracción tales como acetato de etilo, éter dietílico, cloroformo, cloruro de metileno, éter de petróleo, acetona, pentano o tolueno. Para los expertos en la técnica de la extracción de componentes vegetales conocerán bien otros solventes adecuados.

Preferiblemente, dicho extracto comprende el triterpénico pentacíclico epi-lupeol o un derivado del mismo o una sal de cualquiera de estos.

El epi-lupeol es un diastereoisómero del triterpeno pentacíclico lupeol. Los diastereómeros se definen como estereoisómeros que no son enantiómeros (es decir, imágenes especulares no superponibles entre sí). Los diastereoisómeros, a veces llamados diastereoisómeros, generalmente tienen diferentes propiedades físicas y diferente reactividad con sus isómeros.

Otros componentes del extracto comprenden β -amirina, α -amirina, dímeros de α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno y sus isómeros y, cuando corresponda, sales. Se enseña en la presente descripción que el extracto tiene un cromatograma GC-MS como se muestra en la Figura 6. Con mayor preferencia, los componentes principales son epi-lupeol, β -amirina y dímero de alfa-felandreno.

Se enseña además que el extracto o un agente seleccionado de epi-lupeol, β -amirina, α -amirina, dímeros de α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno; los isómeros de estos agentes distintos del lupeol; cuando sea apropiado, sales farmacéutica o veterinariamente aceptables; y mezclas de los mismos, pueden usarse en medicina, particularmente en el tratamiento o prevención de las enfermedades y afecciones inflamatorias establecidas anteriormente.

Las sales apropiadas farmacéutica o veterinariamente aceptables incluyen sales de adición básicas tales como sodio, potasio, calcio, aluminio, zinc, magnesio y otras sales metálicas, así como también colina, dietanolamina, etanolamina, etil diamina, meglumina y otras sales de adición básicas bien conocidas como se resume en Paulekuhn y otros, (2007) J. Med. Chem. 50: 6665-6672 y/o conocido para los expertos en la técnica.

La invención también proporciona o la descripción enseña el uso del extracto en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de los trastornos o afecciones como se reivindicó o se describe en la presente descripción, respectivamente.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona una composición que comprende el extracto de la invención junto con un portador.

Generalmente, la composición será una composición farmacéutica o veterinaria y el portador será un portador farmacéutica o veterinariamente aceptable.

También se enseña en la presente descripción una composición farmacéutica que comprende un agente seleccionado entre epi-lupeol, β -amirina, α -amirina, dímeros de α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno; los isómeros de estos agentes distintos del lupeol; cuando sea apropiado, sales farmacéutica o veterinariamente aceptables; y mezclas de los mismos; junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

También pueden estar presentes otros materiales activos, según se considere apropiado o aconsejable para la enfermedad o afección que se esté tratando o previniendo. Por ejemplo, la composición para el uso como se reivindicó también puede contener un agente antibiótico o antibacteriano.

El portador, o, si está presente más de uno, cada uno de los portadores, debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración nasal, bronquial (inhalada), tópica (incluyendo gotas para los ojos, bucal y sublingual), parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa intraarticular e intradérmica) y pueden prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia.

Las composiciones preferidas se formulan para administración intraarticular, intravenosa, parenteral, oral, nasal, bronquial o tópica.

La composición para el uso como se reivindicó puede prepararse por poner en asociación el extracto de la invención y el portador. En general, las formulaciones se preparan por poner en asociación íntima y uniforme el agente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, conformar el producto. La descripción se extiende a métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende poner un extracto de la invención junto o en asociación con un portador o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como: unidades discretas, tales como cápsulas, bolsitas o tabletas que contienen una cantidad predeterminada del agente activo, como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión del agente activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como emulsión líquida de aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite, o como un bolo, etc.

Para composiciones para administración oral (por ejemplo, tabletas y cápsulas), el término "portador aceptable" incluye portadores tales como excipientes comunes, por ejemplo, agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, sodio carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; cargas y portadores, por ejemplo almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro de sodio y ácido alginico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, fluido de silicona, talco, ceras, aceites y sílice coloidal. También se pueden usar agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza y similares. Puede ser conveniente añadir un agente colorante para que la fabricación de la forma de dosificación sea fácilmente identificable. Las tabletas pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica.

Una tableta puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes complementarios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar por compresión en una máquina adecuada del agente activo en una forma que fluye libremente tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Las tabletas moldeadas pueden fabricarse por moldeo de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un líquido diluyente inerte en una máquina adecuada. Las tabletas opcionalmente pueden recubrirse o marcarse y se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del agente activo.

Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen trociscos que comprenden el agente activo en una base saborizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el agente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el agente activo en un portador líquido adecuado.

Para la aplicación tópica en la piel, los compuestos se pueden convertir en una crema, ungüento, gelatina, solución o suspensión, etc. Las formulaciones de crema o ungüento que pueden usarse para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en los libros de texto estándares de farmacia tales como la British Pharmacopoeia.

Los extractos que se describen en la presente descripción pueden usarse para el tratamiento del tracto respiratorio por la administración nasal, bronquial o bucal de, por ejemplo, aerosoles o rociadores que pueden dispersar el ingrediente activo farmacológico en forma de polvo o en forma de gotas de una solución o suspensión. Las composiciones farmacéuticas con propiedades de dispersión de polvo normalmente contienen, además del ingrediente activo, un propulsor líquido con un punto de ebullición más abajo de la temperatura ambiente y, si se desea, adyuvantes, tales como surfactantes y/o diluyentes no iónicos o aniónicos líquidos o sólidos. Las composiciones farmacéuticas en las que el ingrediente activo farmacológico está en solución contienen, además de esto, un propulsor adecuado y, además, si es necesario, un solvente y/o un estabilizador adicional. En lugar del propulsor también se puede usar aire comprimido, pudiendo producirse según se requiera por medio de un dispositivo de compresión y expansión adecuado.

Las formulaciones parenterales serán generalmente estériles.

La cantidad precisa de un extracto de la presente invención que es terapéuticamente efectivo, y la vía por la cual tal compuesto se administra mejor, la determina fácilmente un experto en la técnica comparando el nivel en sangre del agente con la concentración requerida para tener un efecto terapéutico.

En la presente descripción se enseña además el tratamiento o la prevención de un trastorno o afección como se establece anteriormente, comprendiendo el método administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad efectiva de:

- a. un extracto de la invención; o
- b. un agente seleccionado de epi-lupeol, β -amirina, α -amirina, dímeros de α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno; los isómeros de estos agentes distintos del lupeol; en su caso, sus sales; y mezclas de los mismos (no reivindicado); o
- c. una composición de acuerdo con la invención.

Se enseña además en la presente descripción un método para obtener un extracto de *Boswellia frereana* que comprende:

- a) obtención de oleorresina a partir de *Boswellia frereana*;
- b) exponer dicha resina a un líquido orgánico en un ambiente impermeable a la luz;

- c) retirar cualquier resina insoluble; y
- d) retirar el solvente para producir el extracto de *Boswellia frereana*.

La eliminación del solvente en la etapa (d) se puede lograr por evaporación.

Alternativamente, se puede obtener la precipitación de una fracción sólida de triterpeno por la adición de agua a la mezcla de extracción orgánica, idealmente, esta etapa se lleva a cabo después de retirar la resina insoluble.

Idealmente, la resina se expone a un solvente alcohólico tal como el metanol. Sin embargo, también se pueden usar otros solventes orgánicos tales como acetato de etilo, éter dietílico, cloroformo, cloruro de metileno, éter de petróleo, acetona, pentano o tolueno.

Los componentes del extracto se identificaron mediante el uso de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) mediante el uso de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N equipado con un detector selectivo de masas Agilent 5973 Network y un muestreador automático Agilent de serie 7683.

El extracto comprendía el triterpeno pentacíclico epi-lupeol. Otros componentes del extracto fueron β -amirina, α -amirina, dímeros α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno. El extracto tiene un cromatograma GC-MS como se muestra en la Figura 6 que se puede ver que los componentes principales son epi-lupeol, β -amirina y dímeros de alfa-felandreno.

Opcionalmente, una vez que se ha obtenido el extracto, se disuelve en un solvente orgánico, típicamente un solvente alcohólico tal como metanol o etanol, más normalmente etanol e, idealmente, etanol al 100 % a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml.

En la presente descripción se enseña además un extracto que se puede obtener por el método mencionado anteriormente.

Adicionalmente, se enseña en la presente descripción una nueva fuente de un triterpeno pentacíclico tal como epi-lupeol en donde dicha fuente es de *Boswellia frereana*. Además, la fuente mencionada anteriormente también es una fuente de β -amirina, α -amirina, dímeros de α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno. Además, el método anterior proporciona una manera en la que dicho triterpeno pentacíclico y β -amirina, α -amirina, dímeros de α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno pueden extraerse de la fuente.

La invención se ilustrará a manera de ejemplo con referencia a las siguientes figuras en donde:

La Figura 1. muestra que *Boswellia frereana* no inhibe la liberación de los GAG inducida por IL-1 α /OSM a partir de explantes de cartílago. La *B. frereana* (100 μ g/ml) no afectó los niveles de los GAG en A. tejido, y B. liberación acumulativa en el medio de explantes de cartílago tratados con 5 ng/ml de IL-1 α y 10 ng/ml de OSM, durante un período de 28 días (ensayo DMMB). Los datos se expresan como media de los GAG por peso en seco del tejido (μ g/mg) $\pm$ SEM (n=4) ($\blacklozenge\blacklozenge$ p <0,01, $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ p <0,001 para la comparación entre explantes tratados con IL-1 α /OSM o no tratados;

La Figura 2 muestra que *Boswellia frereana* previene la liberación de colágeno inducida por IL-1 α /OSM de los explantes de cartílago. La *B. frereana* (100 μ g/ml) no tuvo ningún efecto sobre los niveles de colágeno en A. explantes de cartílago tratados con 5 ng/ml de IL-1 α y 10 ng/ml de OSM, sin embargo B. *B. frereana* inhibió la liberación de colágeno en el medio, es decir, la degradación del colágeno después de 28 días de tratamiento con citocinas (ensayo de hidroxiprolina). Los datos se expresan como colágeno medio por peso en seco del tejido (μ g/mg) $\pm$ SEM (n=4) ($\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ p <0,001 para la comparación entre explantes tratados con IL-1 α /OSM o no tratados, *** p = 0,001 para la comparación entre explantes tratados con IL-1 α /OSM +/- 100 μ g/ml de *B. frereana*);

La Figura 3 muestra que la expresión/activación de la MMP9 inducida por IL-1 α /OSM es inhibida por *Boswellia frereana*, como se manifiesta por la reducción de la transcripción de la MMP9. La *B. frereana* (100 μ g/ml) inhibió la expresión del precursor y de la forma activa de MMP9, y redujo la activación de la MMP2 de explantes de cartílago tratados con 5 ng/ml de IL-1 α y 10 ng/ml de OSM. Los Zimogramas de gelatina representativos de A. día 7 y B. día 28 solo se analizan en esta figura para mantener la brevedad, pero las tendencias son representativas de las observadas en los días 3, 14 y 21. Los datos se expresan como promedio de la pro-MMP o la MMP activa (unidades densitométricas) liberadas por peso en seco tejido de (unidades densitométricas/mg de tejido de peso en seco) $\pm$ SEM (n=4) ($\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ p <0,001 para la comparación entre la pro-MMP9 liberada de explantes no tratados frente a explantes de IL-1 α /OSM; * p <0,05, *** p <0,001 para la comparación entre la MMP2 activa y la pro-MMP9, respectivamente, liberadas de explantes tratados con IL-1 α /OSM +/- 100 μ g/ml de *B. frereana*). C. La *B. frereana* suprimió parcialmente el ARNm de la MMP9 inducido por citocinas en explantes tratados por 3 días (qPCR). Los datos se presentan como expresión media de MMP9 (unidades arbitrarias) $\pm$ SEM (n=4) (p = 0,079);

La Figura 4 muestra que la producción de nitrito inducida por IL-1 α /OSM y la expresión del ARNm de iNOS están suprimidas por la *Boswellia frereana*. A. La *B. frereana* (100 μ g/ml) inhibió significativamente el nitrito liberado de

los explantes de cartílago tratados con 5 ng/ml de IL-1 α y 10 ng/ml de OSM durante el período de 28 días (ensayo de Griess). Los datos se expresan como nitrito medio liberado por peso en seco del tejido ($\mu\text{M}/\text{mg}$ por peso en seco del tejido) $\pm$ SEM (n=4). B. Los niveles de ARNm de iNOS fueron inhibidos por *B. frereana* en explantes estimulados con citocinas tratados por 3 días (qPCR). Los datos se presentan como expresión media de iNOS (unidades arbitrarias) $\pm$ SEM (n=4) ($\blacklozenge$ p < 0,01, $\blacklozenge\blacklozenge$ p < 0,001 para la comparación entre explantes tratados con IL-1 α /OSM o no tratados, y p < 0,05, $\blacklozenge$ p < 0,01, $\blacklozenge\blacklozenge$ p < 0,001 para la comparación entre explantes tratados con IL-1 α /OSM +/- 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *B. frereana*);

La Figura 5 muestra que *Boswellia frereana* suprime la producción de PGE₂ inducida por IL-1 α /OSM, la expresión de ARNm de PGE₂ sintasa y de COX-2. A. PGE₂ liberado de explantes de cartílago tratados con 5 ng/ml de IL-1 α y 10 ng/ml de OSM se inhibió significativamente en presencia de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *B. frereana* por un período de 28 días (ELISA PGE₂). Los datos se expresan como media de PGE₂ liberado peso en seco del tejido (pg/mg de tejido de peso en seco) $\pm$ SEM (n=4). B. Los niveles de ARNm de COX-2 y PGE₂ sintasa inducida por citocinas también fueron suprimidos por *B. frereana* en explantes tratados por 3 días (qPCR). Los datos se presentan como expresión génica media (unidades arbitrarias) $\pm$ SEM (n=4) ($\blacklozenge$ p < 0,05, $\blacklozenge$ p < 0,01, $\blacklozenge\blacklozenge$ p < 0,001 para la comparación entre explantes tratados con IL-1 α /OSM o no tratados, y * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 para la comparación entre explantes tratados con IL-1 α /OSM +/- 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *B. frereana*);

La Figura 6 muestra que el *epi-lupeol* es el constituyente predominante de *Boswellia frereana*. Identificación de los principales componentes químicos de los extractos etanólicos de *B. frereana* mediante el uso de cromatografía de gases con espectrometría de masas. A. Cromatogramas de gases generados por corriente iónica total, donde los números corresponden a los componentes identificados. El eje-y del cromatograma superior se ha ampliado para mostrar los componentes volátiles obtenidos durante los primeros 50 minutos. B. El cromatograma de la parte inferior representa los compuestos identificados durante todo el análisis de 90 minutos. El pico más grande (número 18), y que representa el constituyente principal, se identificó como *epi-lupeol* que representa casi el 60 % del extracto de *B. frereana*. También se identificaron trazas de cantidades de otros compuestos, incluidos los derivados de lupeol;

La Figura 7 muestra los cromatogramas generados por la corriente iónica total (TIC) para la identificación de: A) Extracto de aceite esencial de *B. frereana*. El pico principal identificado para el aceite esencial fue el dímero de α -felandreno (11 %) B) Extracto de hexano de *B. frereana* mediante el uso de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). El pico principal identificado fue *epi-lupeol* (60 %);

La Figura 8 muestra el espectro de masas (EI+ve) de *epi-lupeol* obtenido en un tiempo de retención de 79,99 minutos;

La Figura 9 muestra estructuras químicas de los terpenos que se encuentran comúnmente presentes en *B. frereana*;

La Figura 10 muestra extractos de etanol de tres especies de *boswellia* que ilustran diferentes contenidos de goma. Vaso de precipitado 1) *B. papyrifera*, Vasos de precipitados 2-5) *B. frereana*, Vasos de precipitados 6-7) *B. carteri*. *B. frereana* es la única especie con poca cantidad de goma de polisacárido presente;

La Figura 11 muestra la actividad anti-acetilcolinesterasa de *B. frereana* extracto A) Placa de control de TLC sin aplicar ninguna muestra para investigar falsos positivos. B) La placa de TLC se manchó con 20 μL de extractos de *B. frereana* a diversas concentraciones y 20 μL de bromhidrato de galantamina. Se aplicaron las siguientes muestras: 1) 101,6, 2) 50,8, 3) 25,4, 4) 12,7, 5) 6,35, 6) 3,17 mg/ml, 7) hidrobromuro de galantamina (1 mM). Ambas placas se desarrollaron con una fase móvil de tolueno: acetato de etilo (90:10) y se pulverizaron con DTNB 2,5 mM/ATCL 2,5 mM en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) seguido de pulverización con solución de enzima acetilcolinesterasa (4 U/ml). La actividad de AChE se observó como manchas blancas brillantes sobre un fondo amarillo. C) Detección de compuestos presentes en los extractos de etanol de *B. frereana*. La placa de TLC se manchó con 20 μL de extractos de *B. frereana* en varias concentraciones: 1) 101,6, 2) 50,8, 3) 25,4, 4) 12,7, 5) 6,35, 6) 3,17 mg/ml. La placa se desarrolló con una fase móvil de tolueno: acetato de etilo (90:10) y se pulverizó con reactivo de detección de anisaldehído.

La Figura 12 muestra las propiedades antitumorales de los extractos de *B. frereana* de células cancerosas humanas, particularmente células de cáncer de mama de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, los dos gráficos muestran el efecto etanólico del extracto de *B. frereana* en células MCF-7 en un intervalo de 0-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La respuesta se midió después de 24, 48 y 72 horas por la absorbancia del producto de formazán mediante el uso del ensayo MTS. Los valores se expresan como la absorbancia corregida media de 8 pocillos. Las células se sembraron a 5×10^4 células/cm² con 0,1 ml de medio de cultivo por pocillo. El extracto de *B. frereana* se añadió 24 horas después de la siembra. La concentración de etanol se ajustó en todos los pocillos para contener 0,77 %. Después de otras 24, 48 y 72 horas, se realizó un ensayo MTS. La absorbancia se leyó mediante el uso del FLUOstar OPTIMA.

Tabla 1 muestra los cebadores usados en los ensayos de PCR cuantitativos mediante el uso de la detección por SYBR Green®. Los cebadores se diseñaron para secuencias GenBank mediante el uso del software de diseño de cebadores Primer 3 (<http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>);

Tabla 2. Contenido de resina de oleorresina de *B. frereana* después de la extracción con hexano (solvente no polar) y etanol (solvente polar);

Tabla 3 muestra una comparación del contenido de goma de *Boswellia frereana* con especies relacionadas;

Tabla 4 muestra un resumen de los componentes de oleorresina de *B. frereana*;

Tabla 5 muestra el contenido de aceite esencial de oleorresina de *B. frereana* extraída por hidrodestilación; y

Tabla 6 muestra los componentes químicos identificados en varios extractos de oleorresina de *B. frereana* (aceite esencial, hexano y etanol); y

Tabla 7 muestra los valores de LD50 de las células MCF-7 a las 24, 48 y 72 h de incubación.

Materiales y Métodos

Todos los reactivos se adquirieron de Sigma (Poole, Reino Unido) a menos que se especifique de cualquier otra manera. El medio de cultivo consistió en medio de Eagle modificado de Dulbecco (medio DMEM glutamax 1™/HAMS F12 (1:1), Invitrogen, Reino Unido) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de L-ascorbato-2-fosfato y 1X selenito de Insulina-Transferrina-Sodio (ITS).

Las Oleorresinas de incienso somalí, *Boswellia frereana* (Nombre somalí *Maidi*) y *Boswellia carteri* (Nombre somalí *Beyo*) se adquirieron de Hargeysa en Somalilandia (norte de Somalia). El incienso etíope de *Boswellia papyrifera* fue amablemente facilitado por el Sr. Abdi Farah (Somaliland Frankincense Company, Cardiff). Los solventes etanol absoluto y hexano (grado analar) se adquirieron de Fischer Scientific (Loughborough).

Extracción de *Boswellia frereana* (Para bioensayo)

La resina de goma de *Boswellia frereana* se recogió y se prepararon los componentes activos extrayendo la resina de goma (20 g) sucesivamente con etanol (100 %) por 7 días en un recipiente impermeable a la luz. La resina de goma insoluble se eliminó por filtración y el solvente se evaporó a 60 °C. Más específicamente, una cantidad conocida de oleorresina de *B. frereana* se pesó con precisión (20 g), se colocó en un vaso de precipitados de vidrio de 500 ml y se añadieron 100 ml de etanol. La mezcla se agitó con una espátula, se recubrió con hoja de aluminio y parafilm y luego se dejó reposar por siete días. El extracto de etanol se filtró mediante el uso de un filtro Express™ Millipore de 150 ml. El solvente se evaporó bajo una suave corriente de nitrógeno a una temperatura de 60 °C. El extracto de *B. frereana* se disolvió en etanol a una concentración de 10 mg/ml para dar el material de trabajo y se almacenó a -20 °C.

Los componentes que constituyen a los extractos químicos de *B. frereana* se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) mediante el uso de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N equipado con un detector selectivo de masas Agilent 5973 Network y un muestreador automático Agilent de serie 7683. (ver la Figura 6). Se usó un intervalo de exploración de 35 a 450 unidades de masa para adquirir los datos de los espectros de masas con un tiempo de muestreo de 2 que corresponde a 3,5 exploraciones por segundo. La adquisición de datos se realizó mediante el uso del software informático MSD Chemstation™. La identificación de los picos individuales se realizó por comparación de los espectros de masas de la muestra con los almacenados en la base de datos de la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) que contiene más de 54 000 espectros y por comparación de los espectros de masas de la muestra con los valores de la literatura publicada.

El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología es un laboratorio de investigación de ciencias físicas y una agencia del Departamento de Comercio de EE. UU. (sitio web - www.nist.gov). Una biblioteca alternativa de espectrometría de masa está disponible comercialmente en Wiley (sitio web - www.sisweb.com/software/ms/wilev.htm#wilev8).

Caracterización química: Comparación del contenido de resina y goma de oleorresinas de *B. frereana*, *B. carteri* y *B. papyrifera*

Los gránulos de oleorresina de *Boswellia* de *B. carteri*, *B. frereana* y *B. papyrifera*, se molieron por separado hasta obtener un polvo con un mortero y maja. Se colocaron 40 g de cada polvo de oleorresina en vasos de precipitados de vidrio separados de 500 ml y se añadieron 100 ml de etanol absoluto a cada vaso de precipitado. Las mezclas se agitaron con una espátula, se recubrieron con hoja de aluminio y parafilm y luego se dejaron reposar por tres días. Después de este período de tiempo, los extractos de etanol se agitaron y luego se filtraron al vacío, mediante el uso de un filtro Express™ Millipore de 150 ml. Se registró el peso de la goma insoluble en etanol (polisacárido) que queda en cada filtro y los extractos de etanol filtrados se almacenaron a -20 °C.

Caracterización química: Extracción del hexano de *B. frereana*

La resina de goma de *Boswellia frereana* (20 g) se extrajo mediante el uso de hexano como solvente por 3 días en un recipiente impermeable a la luz. Se eliminó la resina de goma insoluble centrifugando a 2000 rpm por 30 minutos y se

eliminó la capa sobrenadante transparente. El solvente de hexano se evaporó bajo una suave corriente de nitrógeno a una temperatura de 40 °C y se almacenó a -20 °C.

Caracterización química: Extracción de aceite esencial de Oleorresinas de *B. freireana*

Se colocó agua desionizada (1 litro) en un aparato de destilación de vapor, a través del recipiente de vidrio de la parte inferior, y 50,6 g de oleorresina de *B. freireana* colocada en el recipiente de vidrio superior. Los dos recipientes de vidrio estaban separados físicamente solo por una gasa de metal perforada. La manta calefactora se puso a máxima energía y el agua se calentó hasta ebullición. El destilado (300 ml) se recogió en un contenedor de vidrio de 500 ml, se añadieron 100 ml de hexano y la mezcla se agitó. La capa de hexano (capa superior) se eliminó, se transfirió a un contenedor limpio y el solvente se evaporó bajo una suave corriente de nitrógeno para producir un aceite aromático amarillo (0,44 g).

Modelo *in vitro* de degeneración del cartilago

Se colectó el cartilago articular de profundidad completa (explantes de 6 mm de diámetro) de la articulación *metacarpofalangeo* de terneros bovinos de 7 días mediante el uso del perforador de biopsia. Los explantes de cartilago se estabilizaron por 3 días en medio de cultivo antes del tratamiento. Un modelo *in vitro* de degradación del cartilago, caracterizado por la pérdida de agregano y la proteólisis del colágeno tipo II (29, 30), se estableció por el tratamiento de explantes de cartilago con 5 ng/ml de IL-1 α humana recombinante (Peprotech, Reino Unido) y 10 ng/ml de oncostatina M humana recombinante (OSM); Peprotech, Reino Unido), en presencia o ausencia de 100 μ g/ml de extracto de *B. freireana*; los explantes no tratados sirvieron como control. Los cultivos se mantuvieron durante un período de 28 días, con reposición de medios y/o tratamientos cada 3 días. El tejido y el medio se colectaron después de 3, 7, 14, 21 y 28 días de cultivo. Los explantes de cartilago se liofilizaron durante un periodo de 48 horas y todos los datos bioquímicos se normalizaron al peso en seco del tejido (mg). Para el análisis del ARNm, los explantes se cultivaron con los tratamientos indicados anteriormente por 3 días para permitir la investigación de cambios genéticos tempranos. Los explantes se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido antes de la extracción del ARN.

Ensayo de Citotoxicidad: Cytotox 96®

La viabilidad celular se evaluó mediante el uso del ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega) (31). El ensayo enzimático mide cuantitativamente los niveles de la lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo como consecuencia de la lisis celular, es decir, a través de la muerte celular. Se pipeteó medio de cultivo (50 μ l) en una placa de 96 pocillos y se mezcló con 50 μ l de mezcla de sustrato reconstituido (componente del kit). Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente evitando la luz, se determinaron los valores de absorbancia a 492 nm mediante el uso de un lector de placas.

Análisis de glicosaminoglicanos sulfatados: Ensayo de azul de dimetilmetileno (DMMB)

Los niveles de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) en los explantes de tejido y liberados en el medio se determinaron mediante el uso del ensayo DMMB (32). Se colocaron explantes de tejido (50 mg de tejido: 1 ml de tampón) en tampón de digestión (fosfato de sodio 20 mM (pH 6,8), EDTA 1 mM, DTT 2 mM) que contenía 300 μ g de papaína (proteínasa de matriz no específica). Las muestras se incubaron a 60 °C por 1 hora o hasta que el tejido se disolvió por completo. Se añadió yodoacetamida 10 mM a las muestras para alquilar los grupos sulfhidrilo reactivos (generados por tratamiento con DTT) y las muestras se prepararon hasta un volumen final de 5 ml (Tris 50 mM (pH 8,0)). Se preparó una dilución en serie mediante el uso de condroitin-4-sulfato de ballena (sulfato C) con estándares que variaban de 0 a 50 μ g/ml. Los estándares se prepararon en el mismo tampón que las muestras bajo análisis, es decir, para medio - DMEM-glutamax I TM, y para extractos de tejido - tampón de extracción (Tris 50 mM (pH 8,0)). Se pipetearon 40 μ l de estándares y muestras por triplicado en una placa de 96 pocillos seguido de la adición de 200 μ l de reactivo DMMB (azul de 1,9-dimetilmetileno al 1,6 % (p/v), hidróxido de sodio al 3 % (v/v), etanol al 1 % (v/v), ácido fórmico al 0,35 % (v/v)). La placa se leyó inmediatamente a una longitud de onda de 525 nm y se determinaron las concentraciones de los GAG a partir de la lectura directamente de la curva estándar. Cualquier muestra con una lectura fuera de los límites de la curva estándar se diluyó en su tampón respectivo, los estándares se pipetearon en pocillos nuevos y las muestras se volvieron a analizar.

Análisis de colágeno: Ensayo de hidroxiprolina

La cantidad de colágeno en y liberado del cartilago se determinó mediante el uso del ensayo de hidroxiprolina mediante el uso de una adaptación del método de Woessner (31). Brevemente, los explantes de tejido y las muestras de medios se hidrolizaron en HCl 12 N o 6 N, respectivamente, a 110 °C por 24 horas y las muestras se liofilizaron. Se preparó una curva estándar disolviendo 4-hidroxiprolina en DMEM-glutamax I TM para dar un intervalo de 1 - 10 μ g/ml. Los hidrolizados (30 μ l) y los estándares se agregaron por triplicado a una placa de 96 pocillos seguido de 70 μ l de diluyente (66 % (v/v) de isopropanol) y 50 μ l de oxidante (cloramina T 18 mM, 50 % (v/v) de tampón de reserva) antes de la incubación a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadió (125 μ l) de reactivo de color (dimetilamino benzaldehído 3,7 mM, ácido perclórico al 15 % (v/v), isopropanol al 85 % (v/v)) y se incubó a 70 °C por 40 minutos. Se detectó la absorbancia (540 nm) y se calculó el contenido de hidroxiprolina a partir de la curva estándar. Cualquier muestra con

una lectura fuera de los límites de la curva estándar se diluyó en su respectivo tampón, los estándares se pipetearon en pocillos nuevos y las muestras se volvieron a analizar. El colágeno total se calculó multiplicando los valores de hidroxiprolina por un factor de 7,14 (33).

5 Zimografía de gelatina: Análisis de la expresión/activación de las MMP 2 y 9

La expresión y activación de las MMP 2 y 9 se evaluaron en muestras de medios experimentales por zimografía de gelatina (34). Las muestras de medios se desnaturalizaron en un tampón de muestra de dilución doble (Tris 60 mM (pH 6,8), SDS al 2 % (p/v), glicerol al 10 % (p/v), azul de bromofenol al 0,01 % (p/v)) a 60 °C por 30 minutos. Brevemente, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS al 7,5 % (p/v) que contenía gelatina porcina 0,5 mg/ml (BDH, Poole, Reino Unido) y se procesaron en tampón Laemmli 1X (Tris 25 mM, glicina 0,192 M, SDS al 0,1 %) a 150 V por aproximadamente 60 minutos o hasta que el frente del colorante se acerque al final del gel. Las muestras se cargaron en un valor de peso en seco equivalente teniendo en cuenta las diferencias en el volumen de medio acumulado durante el cultivo de 28 días. Los geles se lavaron 3 veces en Triton X-100 al 2,5 % para eliminar el SDS y permitir la renaturalización de la enzima. Los geles se incubaron durante la noche en tampón de proteólisis MMP (Tris 50 mM (pH 7,8), CaCl_2 50 mM, NaCl 0,5 M) a 37 °C para activar las enzimas latentes. Los geles se tiñeron subsecuentemente (0,25 % (p/v) azul brillante de Coomassie R-250, ácido acético glacial al 10 % (v/v), metanol al 45 % (v/v)) por 1 hora. Se observaron zonas depuradas de actividad gelatinolítica tras la decoloración (ácido acético glacial al 7,5 % (v/v), metanol al 10 % (v/v)) por al menos una hora o hasta que fueron evidentes las zonas de gelatinólisis. Sus cantidades relativas se analizaron por densitometría de barrido (UMAX magic scan) y el software de imagen NIH (NIH, Bethesda, MD).

Ensayo de Griess: medición de los niveles de nitrito

Las concentraciones absolutas de nitrito, un producto final estable de NO, se determinaron en el medio de cultivo mediante el uso del ensayo de Griess (Promega). Se generó una curva estándar de nitrito mediante el uso de una solución madre de nitrito de sodio 0,1 M (componente del kit). La solución se diluyó a una concentración de 100 μM (mediante el uso de dH_2O), y se realizó una dilución en serie doble (estándares que van de 1,56 μM a 100 μM). Se pipetearon muestras de medio (50 μl) por triplicado en una placa de 96 pocillos, se añadieron 50 μl de solución de sulfanilamida y la placa se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se añadió solución de NED (50 μl) a cada pocillo y se detectó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. El nitrito (μM) se determinó por comparación con la curva estándar de nitrito. Cualquier muestra con una lectura fuera de los límites de la curva estándar se diluyó en su tampón respectivo, los estándares se pipetearon en pocillos nuevos y las muestras se volvieron a analizar.

35 ELISA PGE₂: medición de los niveles de prostaglandina E₂

La producción de PGE₂ se midió en los medios de cultivo mediante el uso de un ELISA de alta sensibilidad (PGE₂HS-EIA; Cambridge Biosciences). Los estándares de PGE₂ se prepararon a partir de una solución madre de 50 ng/ml (componente del kit) para dar una curva estándar que variaba de 20 pg/ml a 640 pg/ml. Los estándares, controles negativos y muestras de medios (100 μl) se pipetearon por triplicado en una placa de 96 pocillos seguido de la adición de 50 μl del conjugado de PGE₂ HS-EIA peroxidasa. Se añadió anticuerpo de PGE₂HS-EIA (50 μl) a cada pocillo y la placa se incubó durante la noche a 4 °C. Se eliminó el contenido de la placa y se lavaron los pocillos tres veces con 400 μl de tampón de lavado (componente del kit). Después de eliminar el tampón de lavado, se añadieron 200 μl de sustrato pNpp a cada pocillo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm mediante el uso de un lector de placas. Las absorbancias se estandarizaron restando la absorbancia del control negativo. Se realizó una gráfica logarítmica de los estándares de PGE₂ versus absorbancia, y la concentración de PGE₂ en las muestras calculadas. Cualquier muestra con una lectura fuera de los límites de la curva estándar se diluyó en su tampón respectivo, los estándares se pipetearon en pocillos nuevos y las muestras se volvieron a analizar.

50 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de PCR cuantitativo

Los explantes de cartílago se homogeneizaron en 1 ml del reactivo Trizol™ (Invitrogen) en líquido N₂ (2000 rpm, 1,5 minutos) mediante el uso de un desmembrador (B. Braun Biotech Int., Alemania), se extrajo el ARN total y se generó el ADNc como se describió previamente (35, 36). Brevemente, se añadieron 175 μl de cloroformo al Trizol™ que contenía el cartílago homogeneizado, se mezcló por inversión varias veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. La fase que contenía ARN se recogió centrifugando las muestras (14 000 rpm, 15 minutos, 4 °C) y retirando el componente acuoso superior a un eppendorf estéril. Se añadió un volumen igual de isopropanol a la fase acuosa que contenía ARN, se invirtió el tubo varias veces para mezclar y el ARN se precipitó durante la noche a -20 °C. El ARN se sedimentó centrifugando las muestras (14 000 rpm, 15 minutos, 4 °C); se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 75 %. Se sedimentó el ARN por centrifugación (14 000 rpm, 5 minutos, 4 °C), se descartó el sobrenadante y se secó al aire el sedimento que contenía ARN a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos o hasta que el etanol se hubo evaporado por completo. Las muestras se trataron con ADNasa (1 U de ADNasa, tampón de ADNasa al 10 % (v/v)) a 37 °C por 30 minutos.

Los componentes residuales de ADNasa se eliminaron añadiendo 10 % (v/v) de ADN posterior (Ambion) seguido de centrifugación (10 000 rpm, 2 minutos) para sedimentar los contaminantes; el ARN permanece en el sobrenadante.

Se sintetizó el ADNc de la primera hebra (volumen de reacción de 20 µl) mediante el uso de transcriptasa inversa Superscript™ III (Invitrogen). Brevemente, se añadieron 1 µg de cebadores aleatorios y dNTP 500 µM a 10 µl de ARN y se incubaron a 65 °C por 5 minutos. Después de añadir tampón 5x a la primera hebra, DTT 200 mM e inhibidor de ARNasa recombinante 10 U (Promega), la muestra se incubó a 42 °C por 2 minutos. Se añadió 200 U de transcriptasa inversa Superscript™ III (Invitrogen) a la muestra y se incubó por 50 minutos a 42 °C; la reacción se terminó calentando la muestra a 70 °C por 15 minutos. La PCR en tiempo real se llevó a cabo mediante el uso de un sistema Mx3000® QPCR (Stratagene). Se diseñó un ensayo de qPCR en tiempo real, basado en la detección por SYBR Green®, para el perfil transcripcional de iNOS, PGE₂ sintasa, COX-2 (37) y MMP9 en las muestras de ADNc, después de la normalización al gen de mantenimiento 18S (38). Los cebadores se diseñaron para el marco de lectura abierto de iNOS, PGE₂ sintasa y MMP9 mediante el uso del software de diseño de cebadores Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi>) (Tabla 1). En resumen, se añadieron 12,5 µl de tampón Sybr® Green Jumpstart™ Taq ReadyMix a 100 nM de cada cebador y 1 µl de ADNc y la reacción se completó hasta un volumen final de 25 µl con dH₂O. Las muestras y los controles negativos (omitiendo la plantilla de ADNc) se cargaron en una microplaca de 96 pocillos (Stratagene) y la reacción de PCR se controló por el software MxPro™ qPCR. Todas las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de hibridación de 60 °C. La cuantificación relativa se calculó mediante el uso del 2^{-ΔΔC_T} método como se describió anteriormente (39, 40), mediante el uso de los controles no tratados como un grupo de referencia para cuantificar los cambios relativos en la expresión del gen diana. Los datos se presentan como un cambio de veces en la expresión génica normalizada a un gen 18S de referencia endógeno con relación a las muestras de ADNc control no tratadas. Cuando no hubo amplificación de un producto génico en las muestras de ADNc de cartílago no tratados, el cambio de veces en la expresión génica fue con relación a las muestras de ADNc tratadas con IL-1α/OSM.

Análisis estadístico

Los datos se normalizaron al peso en seco de los explantes de cartílago y se presentaron como media + media del error estándar (n = 4 explantes por tratamiento). Cada experimento se repitió tres veces y se muestran datos representativos. Los datos se probaron para determinar la normalidad (Anderson-Darling) y las varianzas iguales antes de los análisis paramétricos (Minitab). El análisis estadístico se realizó mediante el uso de un modelo lineal generalizado de 2 factores ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey, o donde se indique en el texto mediante el uso de una prueba t de 2 muestras (análisis qPCR). Las diferencias se consideraron significativas para valores P menores que 0,05.

Extractos de *Boswellia Frereana*: Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE)

Este método de TLC para el cribado de la actividad de AChE se basa en el informado por Rhee y otros (56) y es una versión modificada del método UV original de Ellman para determinar la actividad de AChE (Ellman y otros, 57).

Químicos y Reactivos

La acetilcolinesterasa (AChE, 1000 U) de la anguila eléctrica, la base de Trizma, el yoduro de acetiltiocolina (ATCI), el ácido 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman) y el bromhidrato de galantamina se adquirieron en Sigma-Aldrich (Poole, Dorset). El tolueno y el acetato de etilo se adquirieron de Fisher Scientific (Loughborough, Leicestershire)

Preparación de la solución tampón (Tris-HCl 50 mM a pH 8)

Se pesaron con precisión 6,057 g de Tris base (peso molecular 121,14 g) en un matraz aforado de 1 litro. Se agregaron 800 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a pH 8 con HCl concentrado y luego se diluyó a volumen con agua desionizada. El tampón se almacenó a 4 °C.

Preparación de la mezcla de pulverización de yoduro de acetiltiocolina (2,5 mM) /ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) (2,5 mM)

Se pesaron con precisión 72,2 mg de ATCI y 100,8 mg de DTNB en el mismo matraz aforado de 100 ml y se diluyeron a volumen con tampón y se almacenaron a 4 °C.

Preparación de solución de enzima acetilcolinesterasa (4 U/ml)

El contenido del vial de AChE (1000 U) se transfirió a un matraz aforado de 250 ml y se diluyó a volumen con tampón. La solución se almacenó a -20 °C hasta que se requirió.

Preparación de Muestras

Una solución madre de extracto de etanol de *Boswellia frereana* (101,6 mg/ml) se diluyeron en etanol produciendo concentraciones finales de *B. frereana* de 101,6, 50,8, 25,4, 12,7, 6,35 y 3,17 mg/ml.

Preparación estándar de referencia (1 mM)

El bromhidrato de galantamina (10 mg) se diluyó con precisión con 27 ml de metanol.

5 Placa TLC

Un gel de sílice 60 F₂₅₄ con las dimensiones 200 mm x 200 mm y un grosor de 0,2 mm se adquirió de VWR International (West Sussex).

10 Solvente de revelado TLC

Se añadieron juntos 90 ml de tolueno y 10 ml de acetato de etilo y se mezclaron.

Reactivo de detección

15 Se transfirieron 0,5 ml de anisaldehído a un matraz aforado de 100 ml y se añadieron 10 ml de ácido acético glacial. A esto se le añadieron 85 ml de metanol seguidos de 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y luego se agitó para mezclar.

Procedimiento

20 Se aplicaron 100 µl de los extractos de *Boswellia* a las placas de Tic, así como también 100 µl de bromhidrato de galantamina (1 mM) como solución de referencia. La placa de Tic se desarrolló mediante el uso de tolueno y acetato de etilo (90:10) como solvente. Después de secar por 30 minutos, la placa se pulverizó con 20 ml de la mezcla de sustrato/colorante (ATCI/DTNB) hasta que se saturó. Se dejó secar la placa por 5 minutos antes de pulverizar con 20 ml de la solución de enzima y luego se dejó secar. La placa se fotografió dentro de 10-20 minutos, aunque las manchas blancas permanecieron por 1 hora. Se obtuvo una mancha positiva si se observaba una mancha blanca sobre un fondo amarillo. Se desarrolló una placa de TLC de control (sin muestras) para investigar los falsos positivos y se trató como se describe para las placas de TLC tratadas. Los componentes de TLC también se detectaron pulverizando placas de TLC reveladas con solución de anisaldehído.

30 Propiedades antitumorales de los extractos de *Boswellia frereana* en líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7)

35 La investigación se llevó a cabo mediante el uso de la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (donada por el Dr. Richard Clarkson, Universidad de Cardiff, originalmente de ECACC). La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 se estableció en 1970 a partir del derrame pleural de una mujer caucásica de 69 años que padecía un adenocarcinoma de mama (58). Esta línea celular se ha usado ampliamente como modelo de tumor experimental.

Mantenimiento de los cultivos celulares MCF-7

40 Las células MCF-7 se cultivaron en el medio mínimo esencial Eagle (EMEM) con solución saturada equilibrada de Earle sin L-glutamina (Lonza) que se complementó con glutamina al 1 % (Invitrogen), insulina al 0,1 % (Sigma), penicilina y estreptomina al 1 % (Invitrogen), suero fetal bovino al 10 % de (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1 % (Lonza) y piruvato de sodio al 1 % (Ambrex). Se cultivaron en cultivo adherente mediante el uso de matraces de 75 cm² (Costar) a 37 °C y en atmósfera de 5 % CO₂ en aire.

50 Las células se subcultivaron cada 7 días y se sembraron a 2×10^4 células por cm². Para coleccionar las células, primero se eliminó el medio de cultivo. A continuación, la capa de células se enjuagó suavemente con aproximadamente 7 ml de tripsina al 0,25 % con EDTA (Gibco) para eliminar cualquier medio de crecimiento restante. Luego se añadieron 5 ml más de tripsina/EDTA y el matraz se incubó por 3 minutos para separar las células y despegar de la superficie del matraz. Se usó un microscopio invertido (Nikon Diaphot) para comprobar que las células se habían desprendido. Luego, se añadieron al matraz 10 ml de medio y se pipeteó suavemente hacia arriba y hacia abajo para separar los grupos de células. Las células se contaron mediante el uso de una cámara de recuento de células con hemocitómetro Bright Line y se sembraron en matraces que contenían un total de 20 ml de medio cada uno. Luego se colocaron matraces en la incubadora para permitir que las células se adhirieran. El medio se cambió una vez a la semana.

Medición de la respuesta celular mediante el uso del ensayo MTS

60 El kit de ensayo de proliferación de células no radiactivas acuosas CellTiter 96 (Promega) se usó para realizar los ensayos MTS. El kit contiene 20 ml de solución MTS y 1 ml de solución PMS.

65 Todos los ensayos de MTS se realizaron en placas de 96 pocillos (Costar). Las células se sembraron a $1,2 \times 10^3$ - $1,5 \times 10^5$ células/cm² con 0,1 - 0,2 ml de medio de cultivo apropiado. Los pocillos control en todos los casos contenían el mismo volumen de medio, el mismo volumen de reactivo de prueba y el mismo volumen de solución de MTS, pero no contenían células. Luego, se incubaron las placas. La suspensión celular y la solución de MTS se agregaron a los pocillos mediante el uso de una pipeta repetitiva (HandyStep) o una pipeta multicanal y un canal (Transferrpette). La

suspensión de células en la cubeta se agitó regularmente con una espátula estéril para evitar que las células se depositaran en la superficie. 24 - 48 después horas de la siembra, se añadieron 50 µl de reactivo de prueba según fuera apropiado. 24 - 168 horas después de la siembra, se añadió solución de MTS a 20 µl de solución de MTS por 100 µl de medio a los pocillos con y sin células. Luego, las placas se devolvieron a la incubadora por dos horas. A continuación, las placas se retiraron de la incubadora y se agitaron mediante el uso de un agitador de placas orbital (MS1 Minishaker IKA) durante diez segundos para garantizar que el producto de reacción se distribuyera uniformemente en el pocillo. Luego, se leyó la absorbancia a 492 nm mediante el uso de un lector de placas Anthos reader 2001 (Labtech) o un lector de placas FLUOstar OPTIMA (Labtech). En el caso de las curvas de crecimiento, el medio se cambió a las 72 horas y cada 24 horas después de esto para que el agotamiento del medio no actuara como una variable de confusión. Para eliminar el medio de los pocillos se colocó un hisopo estéril en la parte superior de la placa que luego fueron ambos invertidos. El medio fue absorbido por el hisopo estéril y cualquier medio restante se eliminó frotando con otro hisopo estéril. Luego, se pipeteó medio fresco (0,2 ml) en todos los pocillos de prueba y de control.

Preparación del extracto de etanol de *B. frereana* (*Boswellia frereana*)

Un extracto de etanol de *B. frereana* (3,01778 g) se disolvió en 10 ml de etanol absoluto (Fisher Scientific) para dar una solución madre de 266,7 mg/ml. Luego, se filtró mediante el uso de una membrana de PTFE Sartorius (Fisher Scientific Reino Unido) para garantizar la esterilidad. La solución madre se diluyó en medio para dar 3 veces la concentración final necesaria y se añadieron 50 µl de este concentrado a pocillos que contenían 0,1 ml de medio para dar una concentración final de 88 - 2000 µg/ml en el pocillo. Luego, las muestras se agitaron en vórtex para dispersar el extracto en el medio. La concentración de etanol se ajustó para que fuera constante en todos los pocillos. La concentración se ajustó para contener la misma concentración que el pocillo que contiene la concentración más alta del extracto de *B. frereana*. Esto osciló entre 0,17-0,77 %.

Puede producirse una absorbancia de fondo no específica en un medio de cultivo incubado con una solución de MTS. Esto se corrigió mediante el uso de pocillos control que eran idénticos a los pocillos de prueba pero que no contenían células. La absorbancia promedio de estos pocillos control se restó de todos los demás valores de absorbancia de los pocillos de prueba para producir una absorbancia corregida. Estos valores de absorbancia corregidos se usaron para representar la absorbancia del formazán en los gráficos. Las barras de error expresan el error estándar de la diferencia (ee(d)) entre los pocillos de prueba y los pozos control y se calcularon mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$se(d) = \sqrt{se_t^2 + se_c^2}$$

se(d) = error estándar de la diferencia;
sqrt = raíz cuadrada;
se_t = error estándar de los pocillos de prueba;
se_c = error estándar de los pocillos control.

Calculando los valores LD₅₀

Los valores LD₅₀ se calcularon como la concentración del extracto de *B. frereana* en el que hubo una reducción del 50 % en la absorbancia de formazán. Los gráficos se trazaron mediante el uso de la absorbancia media de formazán y se presentaron como un porcentaje de la absorbancia a 0 µg/ml. El LD₅₀ se tomó al 50 % de absorbancia de formazán en cada tiempo de muestreo (24, 48 y 72 horas después de la incubación con el extracto de *B. frereana*) en las curvas. Esto se hizo para cada experimento y el promedio en cada tiempo de incubación se registró en los resultados.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en Minitab 15.

El ANOVA de dos vías y el ANOVA de tres vías se realizaron por medio del modelo lineal general. Se usó la comparación por pares simultánea de Tukey para comparar las medias. Si las varianzas no eran homogéneas (como se verificó mediante el uso de la prueba de Bartlett), se usó una regresión ponderada. Los pesos usados fueron el recíproco de la varianza (59).

Resultados

Sorprendentemente se encontró que la oleorresina de *B. frereana* es casi completamente soluble tanto en hexano como en etanol, lo que da como resultado producciones de extracción muy altos para la resina (99 %), como se indica en la tabla 2.

Las tablas 2 y 3 indican que las oleorresinas de *B. frereana* contienen muy poca goma insoluble en etanol (polisacárido). Por el contrario, con otras especies de *Boswellia* como *B. carterii* y *B. papyrifera*, donde la fracción de goma insoluble en etanol comprendía el 48 % y el 51 %, respectivamente, como se muestra en la tabla 2. Las

oleorresinas de *Boswellia* de la India (*B. serrata*) también se ha informado que contiene una cantidad sustancial de fracción de goma insoluble en alcohol, en la región del 24 % (55).

A diferencia de las oleorresinas de *B. carteri*, *B. serrata* y *B. papyrifera* esta especie particular de *Boswellia* (*B. frereana*) se encontró que no era apta para la destilación al vapor debido a su bajo contenido de goma. Al entrar en contacto con el vapor, la resina se ablandó y pasó completamente a través de la gasa perforada hacia el agua caliente.

Por lo tanto, el método para el aislamiento de aceite esencial fue en realidad uno de hidrodestilación en lugar de una destilación al vapor.

El contenido de aceite esencial de *B. frereana*, mediante el uso de hidrodestilación fue bastante bajo (0,87 %) como se indica en la tabla 5.

Los solventes no polares como el hexano se usan comúnmente, en fitoquímica, para extraer el componente de aceite volátil de las oleorresinas, mientras que el etanol se usa comúnmente para extraer la fracción de resina más polar de las oleorresinas. Anteriormente hemos usado el hexano para aislar el componente de aceite volátil de las oleorresinas aromáticas relacionadas tal como el incienso (*B. carteri*, *B. papyrifera*), Opoponax (*Commiphora guidotti*) y myrrha (*Commiphora molmol*) dejando intacto el contenido de resina y goma de las oleorresinas. Inesperadamente, en este caso, el hexano no es adecuado para la extracción del componente de aceite volátil de *B. frereana* como solvente también se extrae el componente de resina. Ver la Figura 7.

B. frereana no afecta la viabilidad de los condrocitos del cartílago.

Los tratamientos de explantes de cartílago con 5 ng/ml de IL-1 α y 10 ng/ml de OSM o 100 μ g/ml de *B. frereana*, por separado o en combinación no afectó significativamente la viabilidad celular durante el período de cultivo de 28 días (datos no mostrados).

B. frereana no afecta los niveles de los GAG en un modelo *in vitro* de degradación del cartílago.

El tratamiento de explantes con 5 ng/ml de IL-1 α y 10 ng/ml de OSM, por separado o en combinación con 100 μ g/ml de *B. frereana* no tuvo ningún efecto sobre los niveles de los GAG en el tejido (Figura 1A). Por el contrario, hubo un aumento significativo en la cantidad de los GAG detectados en los medios de explantes tratados con IL-1 α /OSM con relación a los no tratados o tratados con *B. frereana* solo ($p < 0,01$; transformación logarítmica necesaria para el análisis de los datos de los días 3 y 7). La *B. frereana* no rescató la pérdida de los GAG inducida por citocinas de los explantes de cartílago durante el período de cultivo (Figura 1B).

B. frereana reduce la liberación de colágeno en un modelo *in vitro* de degradación del cartílago.

No hubo diferencias apreciables en la cantidad de colágeno medida en los explantes entre tratamientos (Figura 2A). Se liberó significativamente más colágeno en el medio de explantes de cartílago tratados con IL-1 α /OSM después de 28 días en cultivo en comparación con los no tratados o explantes tratados de *B. frereana* ($p = 0,001$; transformación logarítmica). Sin embargo, hubo una reducción significativa en el colágeno liberado de los explantes de cartílago tratados con IL-1 α /OSM en combinación con los de *B. frereana* ($p = 0,012$; transformación logarítmica) volviendo los niveles a cantidades basales (Figura 2B).

La *B. frereana* inhibe la expresión y la activación de la MMP9 inducida por citocinas, debido a una reducción en la transcripción de la MMP9, en un modelo *in vitro* de degradación del cartílago.

En los explantes no tratados, hubo una expresión mínima de la pro-MMP9 después de 7 días, pero se observaron el precursor y la forma activa de MMP2 tanto en los explantes no tratados como en los tratados con *B. frereana* (Figura 3A). El cartílago estimulado con IL-1 α /OSM sintetizó niveles significativamente más altos de la pro-MMP9 después de 7 días ($p < 0,0001$; transformación logarítmica). No se observó a la MMP9 activa en este momento. Los niveles del precursor y de la forma activa de MMP2 no se alteraron apreciablemente después de la estimulación con IL-1 α /OSM. Curiosamente, la *B. frereana* inhibió la síntesis de la pro-MMP9 inducida por citocinas ($p < 0,0001$; transformación logarítmica), pero no tuvo ningún efecto sobre la expresión o activación de la pro-MMP2. Después de 28 días en cultivo, ya no se observó a la pro-MMP9 en los explantes de cartílago no tratados, pero estaban presentes tanto el precursor como la forma activa de MMP2 (Figura 3B). Estas observaciones también fueron evidentes en el cartílago tratado con *B. frereana*. En conjunto, la *B. frereana* abolió la expresión y activación de la MMP9 inducida por citocinas. Hubo una reducción dramática en la cantidad de la pro-MMP9 expresada por los explantes tratados con IL-1 α /OSM en combinación con *B. frereana* lo cual fue muy significativo desde el día 7 en adelante. Como consecuencia de la síntesis reducida de la MMP9, se abolieron los niveles de la MMP9 activa, lo que devolvió los niveles de expresión a los de los explantes no tratados. También pareció reducir la expresión de la pro-MMP2 mediada por IL-1 α /OSM, pero esto no alcanzó significación ($p = 0,06$; transformación logarítmica). Sin embargo, la *B. frereana* contrarrestó significativamente la activación de la pro-MMP2 por IL-1 α /OSM ($p = 0,04$; transformación logarítmica clasificada). Solo se han incluido en el manuscrito los medios extraídos de los explantes después de 7 y 28 días para mantener la brevedad, pero son representativos de las tendencias observadas en todos los puntos de tiempo. Como la expresión

de la proteína MMP9 era sensible al tratamiento, se cuantificaron los niveles de ARNm de la MMP9 en tejido que había sido tratado durante 3 días (Figura 3C). El ARNm de la MMP9 estaba más abajo del límite de detección tanto en los explantes de cartilago tratados y no tratados de *B. frereana*. Sin embargo, la *B. frereana* redujo la transcripción de la MMP9 inducida por IL-1 α /OSM en casi un 50 %, aunque esto no alcanzó significación ($p = 0,079$; prueba t de 2 muestras).

B. frereana reduce la producción de nitrito inducida por citocinas y suprime la expresión de ARNm de iNOS en un modelo *in vitro* de degradación del cartilago.

La cantidad de nitrito producida por los explantes no tratados y los explantes tratados con la *B. frereana* fue bajo ($<5 \mu\text{M/mg}$ por peso en seco del tejido) y no cambió apreciablemente durante el período de cultivo de 28 días (Figura 4A). Como se esperaba, el tratamiento con citocinas aumentó significativamente la producción de nitrito después de 3 ($p < 0,0033$), 7 ($p = 0,0009$), 14 ($p < 0,0029$), 21 ($p < 0,0001$) y 28 días ($p < 0,0001$) con relación a los explantes no tratados (transformación logarítmica de datos), pero la *B. frereana*, inhibió significativamente la producción de nitrito inducida por IL-1 α /OSM después de 14 ($p = 0,003$), 21 ($p = 0,0007$) y 28 días ($p = 0,001$) (transformación logarítmica de los datos). Los niveles de expresión de ARNm de iNOS se cuantificaron para determinar si la reducción de nitrito en los puntos de tiempo posteriores podría atribuirse a la inhibición de la transcripción al principio del período de cultivo (Figura 4B). Había cantidades variables pero mínimas de ARNm de iNOS en explantes de cartilago no tratados después de 3 días en cultivo. El ARNm de iNOS no se detectó en el cartilago tratado con la *B. frereana*. Como se esperaba, hubo un aumento aproximado de 50 veces en los niveles de ARNm de iNOS en explantes estimulados con IL-1 α /OSM con relación a los controles no tratados ($p < 0,0001$; transformación logarítmica), que se redujo aproximadamente en un 75 % en presencia de *B. frereana* ($p = 0,02$; transformación logarítmica), consistente con los niveles de nitrito observados en los medios de cultivo.

B. frereana reduce la producción de PGE₂ inducida por citocinas y suprime tanto PGE₂ sintasa y expresión de ARNm de COX-2 en un modelo *in vitro* de degradación del cartilago.

La cantidad de PGE₂ producida por los explantes no tratados y explantes tratados con *B. frereana* no cambió apreciablemente durante el período de cultivo de 28 días ($<25 \text{ pg/mg}$ por peso en seco del tejido) (Figura 5A). Como era de esperar, el tratamiento con citocinas aumentó significativamente la producción de PGE₂ después de 3 ($p = 0,012$; transformación logarítmica), 7 ($p = 0,0002$), 14 ($p = 0,006$; transformación logarítmica), 21 ($p < 0,0001$; transformación logarítmica) y 28 días ($p < 0,0001$; transformación logarítmica) con relación a explantes no tratados, que van desde 100 - 1000 pg/mg por peso en seco del tejido. En la presencia de *B. frereana*, hubo una inhibición significativa de la producción de PGE₂ inducida por IL-1 α /OSM en explantes después de 7 ($p = 0,03$), 21 ($p = 0,005$; transformación logarítmica) y 28 días de tratamiento ($p = 0,0005$; transformación logarítmica); sin embargo, esto no volvió a los niveles basales. Los niveles de expresión de ARNm de la PGE₂ sintasa también se cuantificaron para determinar si la reducción en PGE₂ observado durante el período de cultivo podría atribuirse a la inhibición de la transcripción de PGE₂ sintasa (Figura 5B). El ARNm de la PGE₂ sintasa no fue detectable ni en el cartilago no tratado ni en el tejido tratado con la *B. frereana* después de 3 días de cultivo. La IL-1 α /OSM estimuló la expresión del ARNm de la PGE₂ sintasa en el cartilago, y esto se redujo en casi un 60 % cuando los explantes estimulados por citocinas se trataron conjuntamente con la *B. frereana* ($p = 0,007$; prueba t de 2 muestras). En conjunto, también se cuantificó la síntesis los niveles de ARNm de COX-2, la enzima limitante de la velocidad en PGE₂. Se observaron cantidades mínimas de ARNm de COX-2 en el cartilago no tratado y los niveles fueron indetectables en el cartilago tratado con la *B. frereana* (Figura 5B). Hubo un aumento significativo de 12 veces en los niveles de ARNm de COX-2 en explantes estimulados con IL-1 α /OSM con relación al cartilago no tratado ($p < 0,0001$), que se redujo en aproximadamente un 75 % cuando se cotrató con la *B. frereana* ($p = 0,0001$).

Epi-lupeol es el componente principal de la *B. frereana*.

Aproximadamente el 81 % de los componentes presentes en el extracto de etanol de *B. frereana* se identificaron mediante el uso de GC-MS como se indica (Figura 6). El componente principal identificado y que representa el 59,3 % del extracto de *B. frereana* fue *epi*-lupeol (Figura 6B). Otros componentes menores identificados en los extractos de etanol de *B. frereana* fueron β -amirina (6,35 %), acetato de lupeol (3,10 %), α -amirina (2,38 %), dímero de α -felandreno 3 (1,10 %), dímero de α -felandreno 5 (0,24 %), α -tujeno (0,34 %) y α -felandreno (0,24%).

B. frereana inhibe la acetilcolinesterasa

Se encontró que los extractos de *B. frereana* después de pulverizar con la enzima, el sustrato y el reactivo de detección producían manchas blancas brillantes en las placas de TLC un fondo amarillo. Estas fueron capaces de inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa en todas las concentraciones probadas (101 6 - 3 17 mg/ml). El estándar de referencia hidrobromuro de galantamina (1 mM), un inhibidor conocido de AChE, también dio una mancha blanca brillante en la línea de base de la placa de TLC. No se observaron manchas blancas, correspondientes a falsos positivos, para la placa de TLC de control.

B. frereana mata las células cancerosas (no forma parte de la invención)

Uso ilustrativo: Las concentraciones del extracto de la *B. frereana* a 800 µg/ml o más resultó en una disminución en la absorbancia de formazán, lo que indica una reducción en la actividad mitocondrial y una reducción en el número de células. Esta disminución en el número de células podría haber ocurrido si los componentes activos del extracto de *Boswellia* podrían causar la detención del ciclo celular (citostasis). La detención prolongada del ciclo celular en una fase distinta de G0 es intolerable para la célula y, en última instancia, dará como resultado un daño celular indirecto y la muerte celular. Los componentes citotóxicos del extracto de *B. frereana* pueden, por lo tanto, comportarse como un inductor apoptótico y un potenciador de la muerte celular hacia las células cancerosas humanas MCF-7.

Discusión

En el presente estudio, usamos un modelo *in vitro* de degeneración del cartílago (29, 30) para determinar si la especie poco conocida de *Boswellia* - *B. frereana* tenía alguna eficacia antiinflamatoria y, por lo tanto, podría usarse como terapia alternativa para tratar una variedad de trastornos inflamatorios. Los explantes de cartílago se trataron con 5 ng/ml de IL-1α y 10 ng/ml de OSM durante un período de 28 días, en presencia o ausencia de 100 µg/ml de *B. frereana*. No hubo evidencia de la citotoxicidad inducida de IL-1/OSM o de *B. frereana* durante el período de cultivo de 28 días. En este modelo *in vitro*, ni las citocinas ni la *B. frereana* tuvieron ningún efecto discernible sobre la cantidad de los GAG o colágeno retenido en los explantes. Sin embargo, hubo un aumento significativo en la cantidad tanto de los GAG como de colágeno liberado de los explantes después de la estimulación con IL-1α/OSM durante 3 y 21-28 días, respectivamente, lo que está de acuerdo con informes anteriores (41, 42). En presencia de IL-1α/OSM, aproximadamente el 50 % del contenido de los GAG se liberó al medio durante el período de 28 días, por lo que es ligeramente sorprendente que la cantidad de los GAG en el tejido no refleje esto. Suponemos que, en presencia de las citocinas, el tejido sintetiza continuamente a los nuevos GAG para reemplazar a los que se pierden (43). La detección de los GAG y colágeno en los medios representa principalmente la degradación y liberación de componentes de la MEC del tejido. Curiosamente, la *B. frereana* solo pudo rescatar la degradación del colágeno mediada por IL-1/OSM. Durante el período de 28 días, la *B. frereana* no tuvo ningún efecto sobre la cantidad de los GAG liberada en el medio después de la estimulación con citocinas; esto sugeriría que debe existir un mecanismo de acción diferente entre el colágeno y los GAG para explicar la inhibición diferencial observada.

Los mediadores clave de la degradación del colágeno incluyen a las MMP9 y 13 (44). Se han observado niveles elevados de MMP9 activa en cartílago articular patológico (1, 3-6). Para determinar si el aumento observado en la liberación de colágeno por IL-1α/OSM y la modulación posterior por la *B. frereana*, representaba un fenotipo catabólico, se analizó la expresión y el estado de activación de la pro-MMP9. Durante los 28 días, tanto la síntesis de la pro-MMP9 como su activación aumentaron sustancialmente en los explantes estimulados por citocinas, lo que puede haber contribuido a la liberación significativa de colágeno en los días 21-28, como se informó anteriormente (44). La *B. frereana* inhibió la síntesis mediada por IL-1α/OSM y la activación de la pro-MMP9 volviendo la expresión a niveles basales. [IL-1α/OSM no tuvo un efecto significativo sobre la expresión de la pro-MMP2, aunque los niveles de MMP2 activa parecieron aumentar. Después de 28 días, la *B. frereana* también inhibió la activación de la pro-MMP2]. Nuestros datos sugieren que la reducción en la expresión inducida por IL-1/ OSM de la pro-MMP 9 en explantes tratados con la *B. frereana* puede surgir de la inhibición transcripcional de la MMP9 que observamos.

La síntesis de la MMP9 está modulada por una variedad de moléculas proinflamatorias que incluyen NO y COX-2 (45), y está bien establecido que tanto el NO como la COX-2 están involucrados en la degradación del cartílago (43, 46). El nitrito, el producto final estable del NO, se elevó significativamente en los explantes de cartílago estimulados con IL-1α/OSM durante todo el período de cultivo, mientras que en presencia de la *B. frereana*, la producción de NO inducida por citocinas se inhibió significativamente. Nuestra hipótesis es que el gran aumento en la síntesis y activación de la pro-MMP9 puede atribuirse, en parte, a los niveles de NO, y que la acción de la *B. frereana* en la inhibición de la producción de NO impidió la síntesis aguas abajo y/o la activación de la MMP9. La inflamación de las articulaciones en la OA también aumenta los niveles circulantes de COX-2, la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de la PGE₂, que provoca un aumento de la síntesis de PGE₂. Un estudio anterior indicó un vínculo entre la expresión de NO y COX-2 en un modelo canino de OA experimental (45). La combinación de IL-1α con OSM elevó significativamente la síntesis de la PGE₂ a aproximadamente 80 veces la observada en los explantes de cartílago no tratados, de acuerdo con estudios previos (37, 47). Mediante el uso de la combinación IL-1α/OSM, la *B. frereana* redujo los niveles de PGE₂, aunque esto no volvió a los niveles basales.

Para comprender mejor el mecanismo de acción de *B. frereana* en este modelo inflamatorio *in vitro* de la degradación del cartílago, cuantificamos la cantidad de transcritos de genes para iNOS, PGE₂ sintasa y COX-2 mediante el uso de qPCR. Se observó que todos aumentaron significativamente en los explantes tratados con IL-1α/OSM, y en la presencia combinada de *B. frereana*, los niveles de transcritos de genes se redujeron significativamente; sin embargo, no volvieron a los niveles basales observados en explantes no tratados. Nuestros datos sugerirían que la acción inhibidora de *B. frereana* en la síntesis de NO y de PGE₂ se controla a nivel transcripcional.

Aunque se han realizado varios estudios sobre la *B. serrata*, y sus componentes farmacológicamente activos han sido identificados como ácidos predominantemente α y β-boswéllicos (24), se sabe poco sobre los ingredientes bioactivos de la *B. frereana* excepto que se informa que difiere de las otras especies (48). Mediante el uso de la cromatografía de gases junto con la espectrometría de masas, hemos identificado los constituyentes primarios de *B. frereana*, de los cuales el *epi*-lupeol representa casi el 60 % del extracto. Aunque la *B. frereana* tiene la genealogía de la especie

Boswellia, carece de los componentes activos como el ácido boswélico, característicos de los demás miembros de la familia, como se ha aludido anteriormente (48). El *Epi*-lupeol es un triterpeno pentacíclico; su isómero lupeol es un triterpeno natural que se encuentra en varias frutas y verduras, incluidas las aceitunas, las fresas y las higueras (49). Curiosamente, y de importancia potencial para comprender los mecanismos de acción de *B. frereana* en nuestro estudio, son las propiedades bioquímicas del lupeol. Se ha demostrado que el lupeol tiene una amplia variedad de propiedades farmacológicas, incluida la actividad antiinflamatoria y antiartrítica *in vitro* y *en vivo* (50, 51). La administración oral del lupeol a un modelo de rata de artritis inducida por antígenos condujo a una reducción del 39 % en la inflamación de las patas y una reducción en la cantidad de hidroxiprolina y de los GAG en la orina, lo que indica que el lupeol podría mejorar los síntomas de la inflamación (51). El lupeol administrado por vía tópica a un modelo murino de inflamación inducida por el éster de 12-O-tetradecanoil-forbol suprimió el edema del oído, debido a una reducción significativa de la PGE₂ y una inhibición más débil de la liberación de nitrito (50). Nuestras observaciones soportan estos datos *in vivo*, aunque vimos una mayor eficacia contra la producción de nitrito con respecto a los niveles de la PGE₂, sin embargo, esto puede reflejar el hecho de que el componente activo de la *B. frereana* es el *epi*-lupeol y no el lupeol. La administración tópica del lupeol a un modelo de tumorigénesis de piel de ratón inhibió significativamente el edema e hiperplasia de la piel junto con la expresión disminuida de COX-2 y NO sintasa (52), lo que coincide con la eficacia del *epi*-lupeol en nuestro estudio *in vitro*. La reducción de COX-2 y NO sintasa se atribuyó a una inhibición de la activación de NF-κB. El factor de transcripción nuclear NF-κB es un actor clave en el desarrollo y progresión de enfermedades inflamatorias crónicas, incluida la artritis reumatoide (53). Las propiedades antiinflamatorias de *B. serrata* implican la regulación de la activación de NF-κB, como se demostró en un estudio reciente mediante el uso de un modelo de aterosclerosis en ratón (54). Sin embargo, aunque la *B. serrata* se sabe que inhibe la función de la 5-lipoxigenasa (25), se demostró que el lupeol no tiene efecto sobre los productos de la lipoxigenasa (50), por lo tanto, no es probable que el lupeol afecte la trayectoria de la 5-lipoxigenasa.

Adicionalmente el extracto de *B. frereana* fue capaz de inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa y destruir un modelo de cáncer bien conocido, es decir, la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Para concluir, este es el primer informe que detalla la eficacia antiinflamatoria, anti-acetilcolinesterasa y citotóxica de *B. frereana*. Nuestros nuevos datos demuestran que el tratamiento de explantes de cartílago estimulados por IL-1α/OSM con la *B. frereana* confiere cierta protección contra la degeneración del tejido al inhibir la descomposición de la matriz de colágeno, mediante la inhibición de la expresión y activación de la MMP9, y una reducción significativa en la expresión de mediadores inflamatorios, incluidos NO, PGE₂ y COX-2. Resulta que *B. frereana*, por lo tanto, se puede explotar como medicamento para tratar trastornos o afecciones mediados por MMP9 en los que existe la necesidad de una reducción significativa en la expresión de mediadores inflamatorios, incluidos NO, PGE₂ y COX-2. La *B. frereana*, que no es tóxica y es particularmente eficaz para la regulación de la PGE₂ puede ofrecer una perspectiva adicional para la acción terapéutica de este compuesto natural. Además, *B. frereana* puede conferir cierta protección contra los trastornos neurológicos caracterizados por un aumento de la actividad de la acetilcolinesterasa o cuando es conveniente bloquear esta actividad. Además, *B. frereana* tiene aplicación en la destrucción de células cancerosas.

Referencias

- Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, y otros. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R124.
- Bayliss MT, Hutton S, Hayward J, Maciewicz RA. Distribution of aggrecanase (ADAMs 4/5) cleavage products in normal and osteoarthritic human articular cartilage: the influence of age, topography and zone of tissue. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001 ago;9(6):553-60.
- Cawston TE, Wilson AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006 oct;20(5):9B3-1002.
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1989 ago;84(2):678-85.
- Mohtai M, Smith RL, Schurman DJ, Tsuji Y, Torti FM, Hutchinson NI, y otros. Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *J Clin Invest*. 1993 jul;92(1):179-85.
- Soder S, Roach HI, Oehler S, Bau B, Haag J, Aigner T. MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol*. 2006 may-jun;24(3):302-4.
- Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 feb; 14(2): 101-13.
- Plaas A, Osborn B, Yoshihara Y, Bai Y, Bloom T, Nelson F, y otros. Aggrecanolysis in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 jul;15(7):719-34.
- Le Pen C, Reygrobellet C, Gerentes I. Financial cost of osteoarthritis in France. The "COART" France study. *Joint Bone Spine*. 2005 dic;72(6):567-70.
- Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, y otros. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum*. 2008 ene;58(1):26-35.
- Berenbaum F. New horizons and perspectives in the treatment of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10 Supl. 2:S1.

12. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Sendzik J, John T, Shakibaei M. Effects of curcumin (diferuloylmethane) on nuclear factor kappaB signaling in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 dic;1030:578-86.
13. Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A. Resveratrol suppresses interleukin-1beta-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2008 dic 1;76(11): 1426-39.
14. Adcocks C, Collin P, Buttle DJ. Catechins from green tea (*Camellia sinensis*) inhibit bovine and human cartilage proteoglycan and type II collagen degradation in vitro. *J Nutr.* 2002 mar;132(3):341-6.
15. Ernst E. Frankincense: systematic review. *Bmj.* 2008; 337:a2813.
16. Ammon HP. Boswellic acids in chronic inflammatory diseases. *Planta Med.* 2006 oct;72(12):1100-16.
17. Madisch A, Miehlke S, Eichele O, Mrwa J, Bethke B, Kuhlisch E, y otros *Boswellia serrata* extract for the treatment of collagenous colitis. A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Int J Colorrectal Dis.* 2007 dic;22(12):1445-51.
18. Gerhardt H, Seifert F, Buvari P, Vogelsang H, Repges R. [Therapy of active Crohn disease with *Boswellia serrata* extract H 15]. *Z Gastroenterol.* 2001 ene;39(1):11-7.
19. Sander O, Herborn G, Rau R. [Is H15 (resin extract of *Boswellia serrata*, "incense") a useful supplement to established drug therapy of chronic polyarthritis? Results of a double-blind pilot study]. *Z Rheumatol.* 1998 feb;57(1):11-6.
20. Singh S, Khajuria A, Taneja SC, Johri RK, Singh J, Qazi GN. Boswellic acids: A leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders. *Phytomedicine.* 2008 jun;15(6-7):400-7.
21. Kimmatkar N, Thawani V, Hingorani L, Khiyani R. Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee--a randomized double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine.* 2003 ene;10(1):3-7.
22. Sontakke S, Thawani V, Pimpalkhute P, Kabra P, Babhulkar S, Hingorani H. Open, randomised, controlled clinical trial of *Boswellia serrata* extract as compared to valdecoxib in osteoarthritis of knee. *Indian Journal of Pharmacology.* 2007;39:27-9.
23. Sengupta K, Alluri KV, Satish AR, Mishra S, Golakoti T, Sarma KV, y otros A double blind, randomized, placebo controlled study of the efficacy and safety of 5-Loxin for treatment of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R85.
24. Pardhy RS, Bhattacharya SC. Boswellic acid, acetyl-boswellic acid and 11-keto-boswellic acid, four pentacyclic triterpenic acids from the resin of *Boswellia serrata*. *Indian Journal of Chemistry.* 1978; 16B:176-8.
25. Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo MI, Subramanian LR, Ammon HP. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 jun;261(3):1143-6.
26. Siemoneit U, Hofmann B, Kather N, Lamkemeyer T, Madlung J, Franke L, y otros Identification and functional analysis of cyclooxygenase-1 as a molecular target of boswellic acids. *Biochem Pharmacol.* 2008 ene 15;75(2):503-13.
27. Zhao W, Entschladen F, Liu H, Niggemann B, Fang Q, Zaenker KS, y otros Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells. *Cancer Detect Prev.* 2003;27(1):67-75.
28. Frank A, Unger M. Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. *J Chromatogr A.* 2006 abr 21;1112(1-2):255-62.
29. Rowan AD, Koshy PJ, Shingleton WD, Degnan BA, Heath JK, Vernallis AB, y otros Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis Rheum.* 2001 jul;44(7): 1620-32.
30. Barksby HE, Hui W, Wappler I, Peters HH, Milner JM, Richards CD, y otros Interleukin-1 in combination with oncostatin M up-regulates multiple genes in chondrocytes: implications for cartilage destruction and repair. *Arthritis Rheum.* 2006 feb;54(2):540-50.
31. Blain EJ, Gilbert SJ, Hayes AJ, Duance VC. Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis. *Matrix Biol.* 2006 sep;25(7):398-408.
32. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C, y otros Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J.* 1999 nov 15;344 Pt 1:61-8.
33. Neuman RE, Logan MA. The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem.* 1950 may;184(1):299-306.
34. Blain EJ, Gilbert SJ, Wardale RJ, Capper SJ, Mason DJ, Duance VC. Up-regulation of matrix metalloproteinase expression and activation following cyclical compressive loading of articular cartilage in vitro. *Arch Biochem Biophys.* 2001 dic 1;396(1):49-55.
35. Blain EJ, Mason DJ, Duance VC. The effect of cyclical compressive loading on gene expression in articular cartilage. *Biorheology.* 2003;40(1-3):111-7.
36. Gilbert SJ, Blain EJ, Duance VC, Mason DJ. Sphingomyelinase decreases type II collagen expression in bovine articular cartilage chondrocytes via the ERK signaling pathway. *Arthritis Rheum.* 2008 ene;58(1):209-20.
37. Chowdhury TT, Arghandawi S, Brand J, Akanji OO, Bader DL, Salter DM, y otros Dynamic compression counteracts IL-1beta induced inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in chondrocyte/agarose constructs. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R35.
38. Frye SR, Yee A, Eskin SG, Guerra R, Cong X, McIntire LV. cDNA microarray analysis of endothelial cells subjected to cyclic mechanical strain: importance of motion control. *Physiol Genomics.* 2005 mar 21;21(1):124-30.

39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 dic;25(4):402-8.
40. Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, Caterson B, Duance VC. The Potential of IGF-1 and TGFbeta1 for Promoting "Adult" Articular Cartilage Repair: An In Vitro Study. *Tissue Eng Part A*. 2008 abr 9.
41. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Goodship A, Caterson B. Cytokine induced metalloproteinase expression and activity does not correlate with focal susceptibility of articular cartilage to degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 feb;13(2):162-70.
42. Morgan TG, Rowan AD, Dickinson SC, Jones D, Hollander AP, Deehan D, y otros Human nasal cartilage responds to oncostatin M in combination with interleukin 1 or tumour necrosis factor alpha by the release of collagen fragments via collagenases. *Ann Rheum Dis*. 2006 feb;65(2):184-90.
43. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2007 Dic;213(3):626-34.
44. Milner JM, Rowan AD, Cawston TE, Young DA. Metalloproteinase and inhibitor expression profiling of resorbing cartilage reveals pro-collagenase activation as a critical step for collagenolysis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(5):R142.
45. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, y otros Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol*. 1999 sep;26(9):2002-14.
46. Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am*. 1999 may;25(2):269-82.
47. Morisset S, Patry C, Lora M, de Brum-Fernandes AJ. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1alpha, tumor necrosis factor-alpha, glucocorticoids, and 17beta-estradiol. *J Rheumatol*. 1998 Jun;25(6): 1146-53.
48. Mathe C, Culioli G, Archier P, Vieillescazes C. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004 ene 16;1023(2):277-85.
49. Chaturvedi PK, Bhui K, Shukla Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. *Cancer Lett*. 2008 May 8;263(1):1-13.
50. Fernandez MA, de las Heras B, Garcia MD, Saenz MT, Villar A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001;53:1533-9.
51. Geetha T, Varalakshmi P. Effect of lupeol and lupeol linoleate on lysosomal enzymes and collagen in adjuvant-induced arthritis in rats. *Mol Cell Biochem*. 1999 Nov;201(1-2):83-7.
52. Saleem M, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*. 2004 jul 1;23(30):5203-14.
53. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 ene; 107(1):7-11.
54. Cuaz-Perolin C, Billiet L, Bauge E, Copin C, Scott-Algara D, Genze F, y otros Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Feb;28(2):272-7.
55. Sen, K. A., Das, I. L.A., Banerji, N. and Vignon, R.M. (1992). Isolation and structure of a 4-O-methyl-glucuronarabinogalactan from *Boswellia serrata*. *Carbohydrate Research*, 223, 321-327.
56. Rhee, I. K., van de Meent, M., Ingkaninan, K. y Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of chromatography A*, 915, 217-223.
57. Ellman, L., Courtney, V., Andresjr, V. y Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid Colormetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
58. Levenson AS y Jordan CV. (1997). The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Perspectives in Cancer Research*. 57, 3071-3078.
59. Ryan BF y Joiner BL. (1994). *Minitab handbook* (third edition). Duxbury Press.

Tabla 1

Gen de interés	Secuencia del cebador	Tamaño del producto (pb)
iNOS	F 5'- TGTTTCAGCTGTGCCTTCAAC - 3' R 5'- AAAGCGCAGAACTGAGGGTA - 3'	232
PGE₂ sintasa	F 5'- GGACGCTCAGAGACATGGAG - 3' R 5' - TATGCCACGGTGTGTACCATA - 3'	206
MMP9	F 5'- TAGCACGCACGACATCTTTC - 3' R 5'- GAAGGTCACGTAGCCCACAT - 3'	121

Tabla 2. Contenido de resina de oleorresina de *B. frereana* después de la extracción con hexano (solvente apolar)

y etanol (solvente polar).				
Solvente de extracción	Peso de oleorresina original (g)	Peso de resina extraída (g)	% de resina ¹ (fracción soluble en etanol)	% de residuos de goma ²
Hexano	20,0	19,8	98,8	1,3
Etanol	20,0	19,9	99,3	0,7

¹ La resina también contiene una pequeña cantidad de aceite esencial; consulte la tabla 4 para conocer el contenido de aceite esencial de *B. frereana*. ²Calculado restando el % del contenido de resina de 100.

Tabla 3. Comparación del contenido de goma de *Boswellia frereana* con especies relacionadas.

Especie de <i>Boswellia</i>	País de origen	Peso de oleorresina original (g)	Peso de la goma (g) (fracción insoluble en etanol)	% de goma (fracción insoluble en etanol)	% de resina (fracción soluble en etanol)
<i>B. serrata</i> ^a	India	10,0	2,4	24,0	-
<i>B. serrata</i> ^b	India	-	-	-	25 - 40
<i>B. pap yrifera</i> ^c	Etiopía	40,2	20,7	51,4	48,6
<i>B. carterii</i> ^c	Somalilandia	40,1	22,1	55,0	45,0
<i>B. carterii</i> ^c	Somalilandia	40,2	19,3	48,0	51,9
<i>B. frereana</i> ^c	Somalilandia	40,1	0,7	1,7	98,3
<i>B. frereana</i> ^c	Somalilandia	40,3	0,6	1,4	98,6
<i>B. frereana</i> ^c	Somalilandia	40,0	0,7	1,7	98,3
<i>B. frereana</i> ^c	Somalilandia	40,0	0,5	1,2	98,8

^a % de goma informado por Sen y otros, 1992.
^b% de Resina informado por Natural Remedies PVT Limited
^c % de resina calculado restando el % del contenido de la goma de 100.

Tabla 4. Resumen de los componentes de Oleorresina de *B. frereana*

Constituyentes químicos de Oleorresina de <i>B. frereana</i>	% p/p
Fracción volátil (Aceite Esencial))	0,9
Fracción soluble en alcohol (Resina)	98,3 – 99,3
Fracción insoluble en alcohol (goma de polisacárido)	0,6-1,6

Tabla 5. Contenido de aceite esencial de oleorresina de *B. frereana* extraído por hidrodestilación

Solvente de extracción	Peso de oleorresina original (g)	Peso de aceite esencial extraído (g)	% De aceite esencial
Vapor	50,4	0,4	0,9

Tabla 6. Componentes químicos identificados en varios extractos de Oleorresina de *B. frereana* (aceite esencial, hexano y etanol)

Componentes químicos	Fracción aislada (Método de Extracción)		
	Aceite esencial (Destilación al Vapor)	Resina (Hexano)	Resina (Etanol)
	% Del Área del Pico	% Del Área del Pico	% Del Área del Pico
α -Tujeno	$\left. \begin{array}{c} \} \\ \} \\ \} \end{array} \right\} 9,85$	0,76	0,34
α -Pino		0,011	N.D
Sabineno	2,62	N.D	N.D
β -Pino		N.D	N.D
α -felandreno	Traza	0,118	0,074
<i>m</i> -Cimeno	1,62	N.D	traza
<i>p</i> -Cimeno	5,49	0,21	0,136
Tuyol	5,22	0,18	0,135
Eucaliptol	0,91	0,065	0,058
Tuyol	2,87	0,047	0,042
<i>trans</i> -2-Caren-4-ol	1,92	N.D	N.D
Desconocido	3,89	N.D	N.D
<i>trans</i> -pinocarveol	2,51	N.D	N.D
(S)- <i>cis</i> -Verbenol	0,62	N.D	N.D
Tuyen-2-eno/Sabinol Tuyona	3,19	0,056	0,050
	3,62	0,047	traza
Terpinen-4-ol	6,59	N.D	N.D
<i>p</i> -Cymen-8-ol	2,67	N.D	N.D
α -Terpineol	1,55	N.D	N.D
Verbenona	0,94	N.D	N.D
Cuminaldehído	0,87	N.D	N.D
Desconocido	3,07	N.D	N.D
Acetato de bornilo	0,54	N.D	N.D
Cuminol	1,52	N.D	N.D
Carvacrol	1,53	N.D	N.D
ourboneno	2,89	0,100	0,095
t-Cadinol	0,37	N.D	traza
Dímero 1 de α -felandreno	0,14	N.D	traza
Dímero 2 de α -felandreno	0,56	0,044	traza
Dímero 3 de α -felandreno	11,45	1,34	1,103
Dímero 4 de α -felandreno	0,42	0,057	0,042
Dímero 5 de α -felandreno	2,35	0,299	0,243
Lupeol	N.D	0,094	0,087

(continuación)

Componentes químicos	Fracción aislada (Método de Extracción)		
	Aceite esencial (Destilación al Vapor)	Resina (Hexano)	Resina (Etanol)
	% Del Área del Pico	% Del Área del Pico	% Del Área del Pico
β-amirina	N.D	6,502	6,357
α-amirina	N.D	2,39	2,384
epi-Lupeol	N.D	60,32	59,32
Desconocido	N.D	7,28	7,266
Acetato de lupeol	N.D	2,96	3,105
% De Compuestos Identificados	81,79	82,88	80,85

Comparación del perfil cromatográfico GC-MS de aceite esencial y el extracto de hexano de *B. frereana*

Tabla 7: Valores de LD50 de las células MCF-7 a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

MCF-7	DosisLD ₅₀ (µg/ml)
24 horas	1630
48 horas	1450
72 horas	1310

Listado de Secuencias

<110> Compton Developments Ltd

<120> Inhibidor de afecciones inflamatorias

<130> 0034P/EP

<150> GB0912526.1

<151> 2009-07-18

<150> GB0921086.5

<151> 2009-12-02

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 1

tggtcagctg tgcctcaac 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 2

aaagcgcaga actgagggtg 20

<210> 3

<211> 20
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<400> 3
ggacgctcag agacatggag 20

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<400> 4
tatgccacgg tgtgtacat a 21

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<400> 5
tagcacgcac gacatcttc 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<400> 6
gaaggtcacg tagcccacat 20

REIVINDICACIONES

1. Un extracto en solvente orgánico, distinto del extracto de etanol, de oleorresina de *Boswellia frereana* que comprende
5 un inhibidor de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9);
para el uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno o afección seleccionado del grupo que comprende:
10 degradación del cartílago articular o artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, todas las formas de distrofia muscular, especialmente distrofia muscular de Duchenne, asma, diabetes, leucemias mielógenas y otras, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, trastornos neurológicos desmielinizantes que incluyen esclerosis múltiple y trastornos retinianos.
2. El extracto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende cualquiera de uno o más de los
15 siguientes epi-lupeol, β -amirina, α -amirina, dímeros de α -felandreno, α -tujeno y α -felandreno y sus isómeros, distintos del lupeol, o sales.
3. El extracto para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende epi-lupeol, β -amirina y dímero de alfa-felandreno y sus isómeros, distintos del lupeol, o sales.
- 20 4. El extracto para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde dicho extracto comprende un portador.
5. El extracto para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el portador es un portador farmacéutico o veterinario
- 25 6. El extracto para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5 en combinación con un agente terapéutico adicional.
7. El extracto para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho agente terapéutico adicional es un
30 agente antibiótico o antibacteriano.

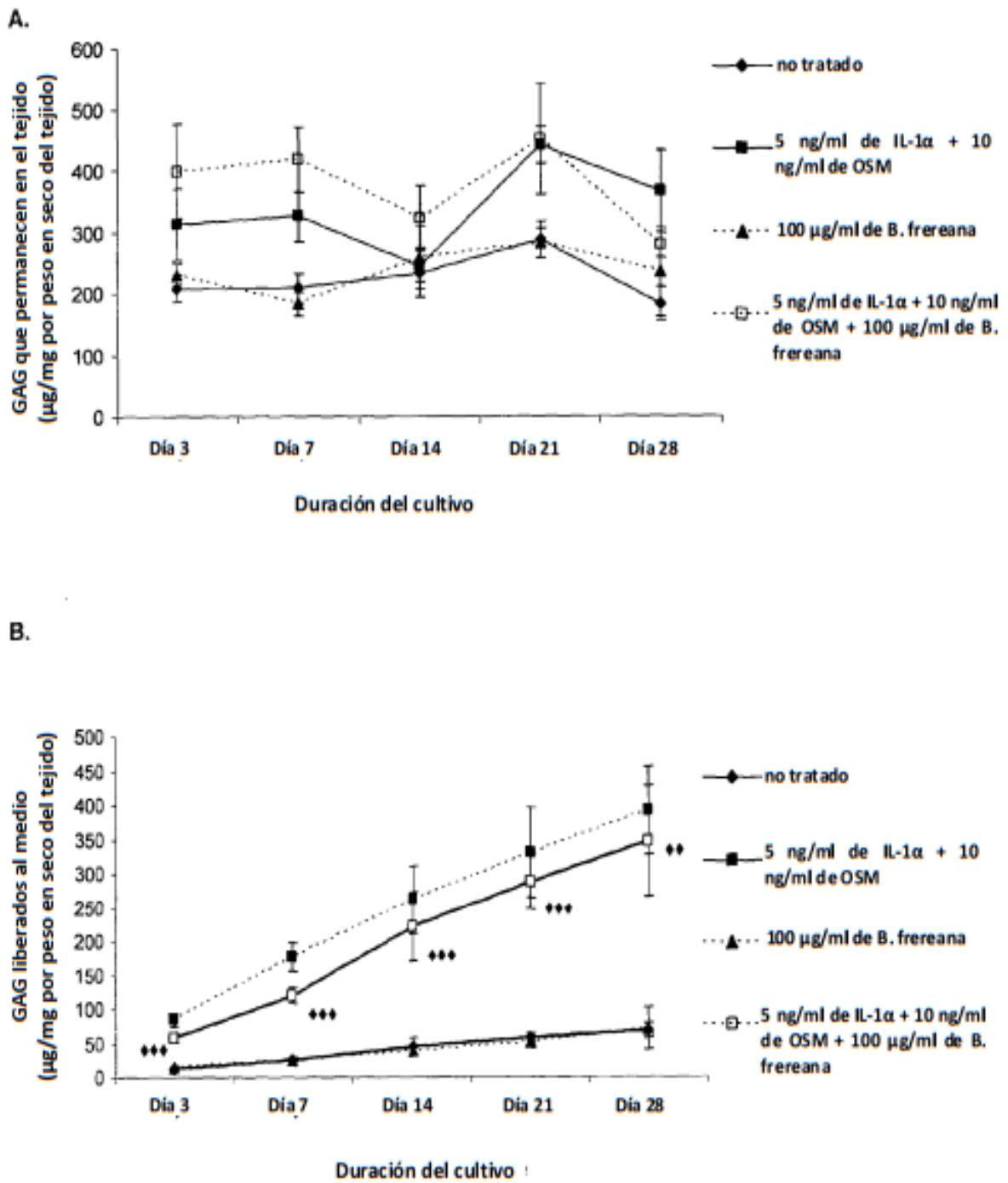
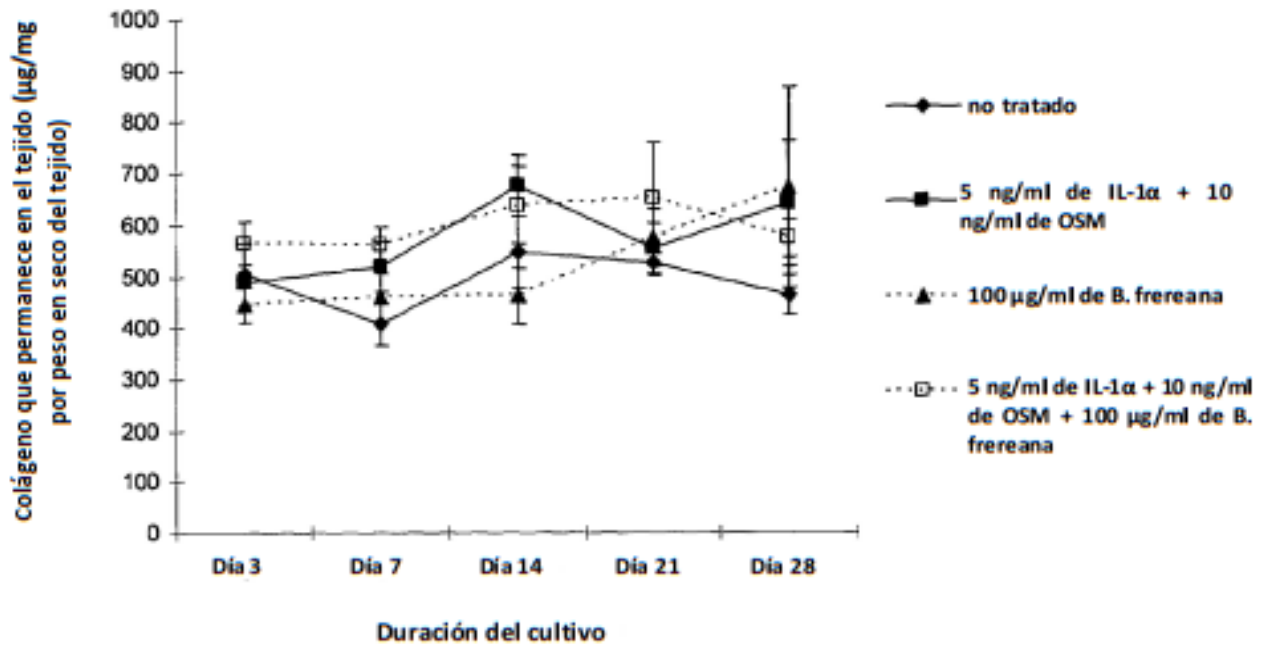


Figura 1

A.



B.

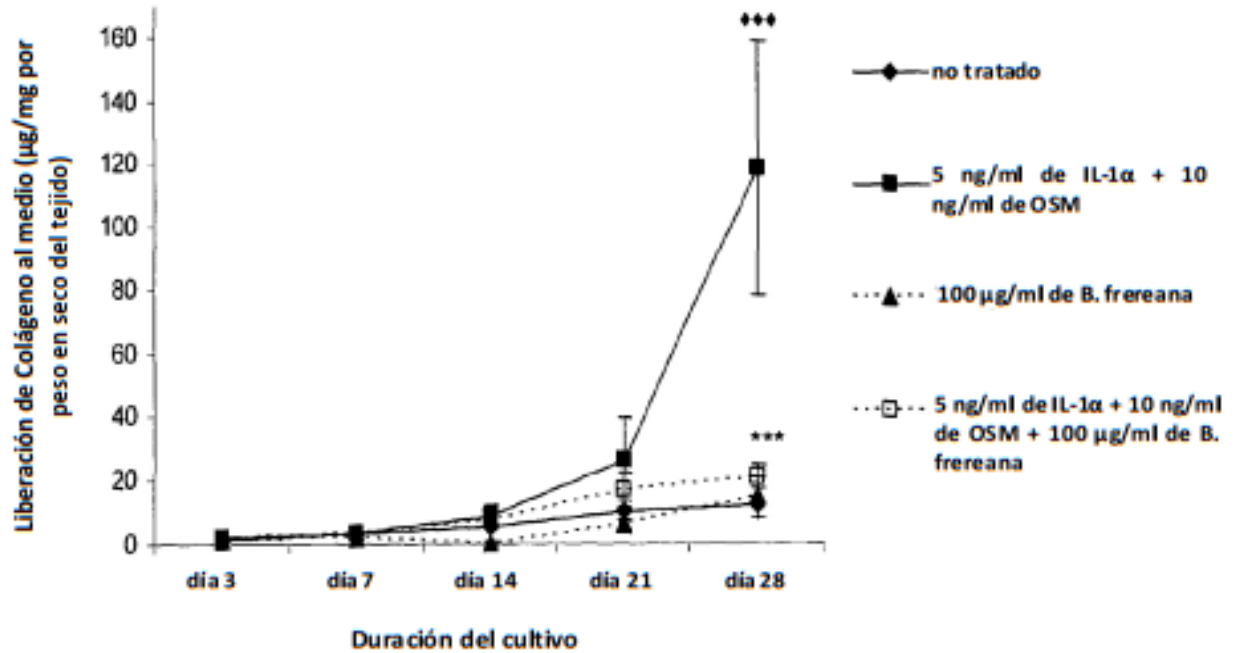


Figura 2



5 ng/ml de IL-1 α & 10 ng/ml de OSM
100 μ g/ml de *B. frereana*

	-	+	-	+
	-	-	+	+
Pro-MMP9	0,06 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,03 ***	0	0,09 $\pm$ 0,01 ***
Pro-MMP2	0,67 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,05
MMP2 activa	0,17 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01



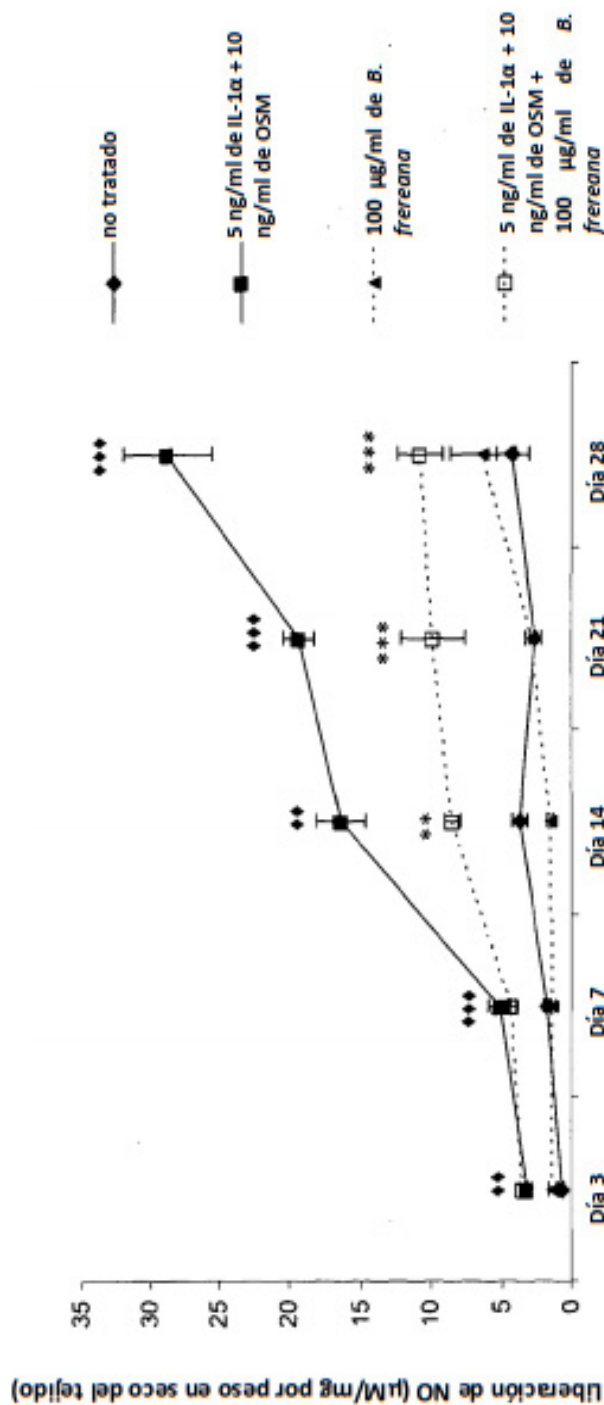
5 ng/ml de IL-1 α & 10 ng/ml de OSM
100 μ g/ml de *B. frereana*

	-	+	-	+
	-	-	+	+
Pro-MMP9	0	0,58 $\pm$ 0,04	0	0
MMP9 activa	0	0,98 $\pm$ 0,28	0	0
Pro-MMP2	0,49 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,13	0,27 $\pm$ 0,04
MMP2 activa	0,21 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,15	0,14 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,01

C.

expresión de ARNm	no tratado	5 ng/ml de IL-1 α + 10 ng/ml de OSM	100 μ g/ml de <i>B. frereana</i>	5 ng/ml de IL-1 α + 10 ng/ml de OSM + 100 μ g/ml de <i>B. frereana</i>
MMP9	N.D.	1,05 $\pm$ 0,18	N.D.	0,58 $\pm$ 0,13

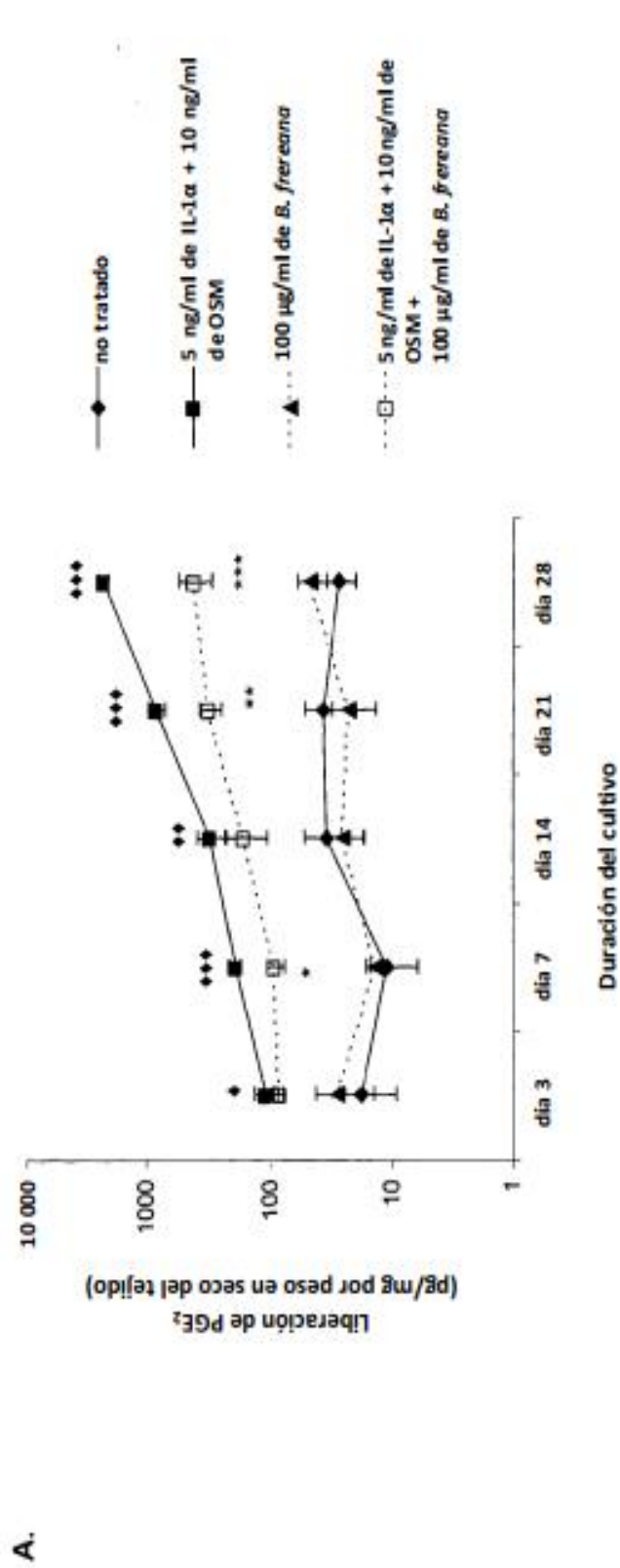
Figura 3



Duración del cultivo

expresión de ARNm	no tratado	5 ng/ml de IL-1α + 10 ng/ml de OSM	100 µg/ml de <i>B. frereana</i>	5 ng/ml de IL-1α + 10 ng/ml de OSM + 100 µg/ml de <i>B. frereana</i>
iNOS	1,62 ± 0,86	81,1 ± 22,4 ***	N.D.	18,1 ± 6,3 *

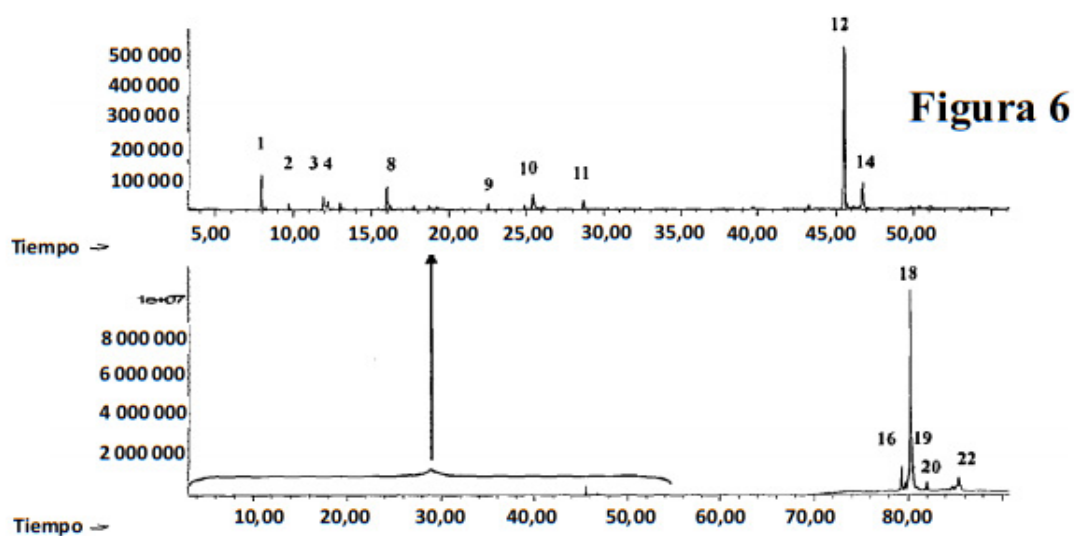
Figura 4



B.

expresión de ARNm	no tratado	5 ng/ml de IL-1α + 10 ng/ml de OSM	100 μg/ml de <i>B. freireana</i>	5 ng/ml de IL-1α + 10 ng/ml de OSM + 100 μg/ml de <i>B. freireana</i>
PGE ₂ Sintasa	N.D.	1,02 ± 0,13	N.D.	0,42 ± 0,07 **
COX-2	1,45 ± 0,59	17,11 ± 2,64 ***	N.D.	4,01 ± 0,78 ***

Figura 5



I.D.	Compuesto	% Del Área del Pico
1	α -Tujeno	0,34
2	α -Felandreno	0,074 ₁
	<i>m</i> -Cimeno	traza
3	<i>p</i> -Cimeno	0,136 ₁
4	Tuyol	0,135
5	Eucaliptol	0,058
6	Tuyol	0,042
7	Desconocido	0,05
8	Tuyona	0,05
	Sabinol	traza
9	Desconocido	0,047
10	Desconocido	0,135
11	β -Bourboneno	0,095
	<i>t</i> -Cadinol	traza
	Dímero 1 de α -felandreno	traza
	Dímero 2 de α -felandreno	traza
12	Dímero 3 de α -felandreno	1,103
13	Dímero 4 de α -felandreno	0,042
14	Dímero 5 de α -felandreno	0,243
15	Lupeol	0,087
16	β -Amirina	6,357
17	α -Amirina	2,384
18	<i>epi</i> -Lupeol	59,32
19	Análogo de lupeol	7,266
20	Acetato de lupeol	3,105
21	Desconocido	2,093
22	Desconocido	6,676
	% De Compuestos identificados	80,85

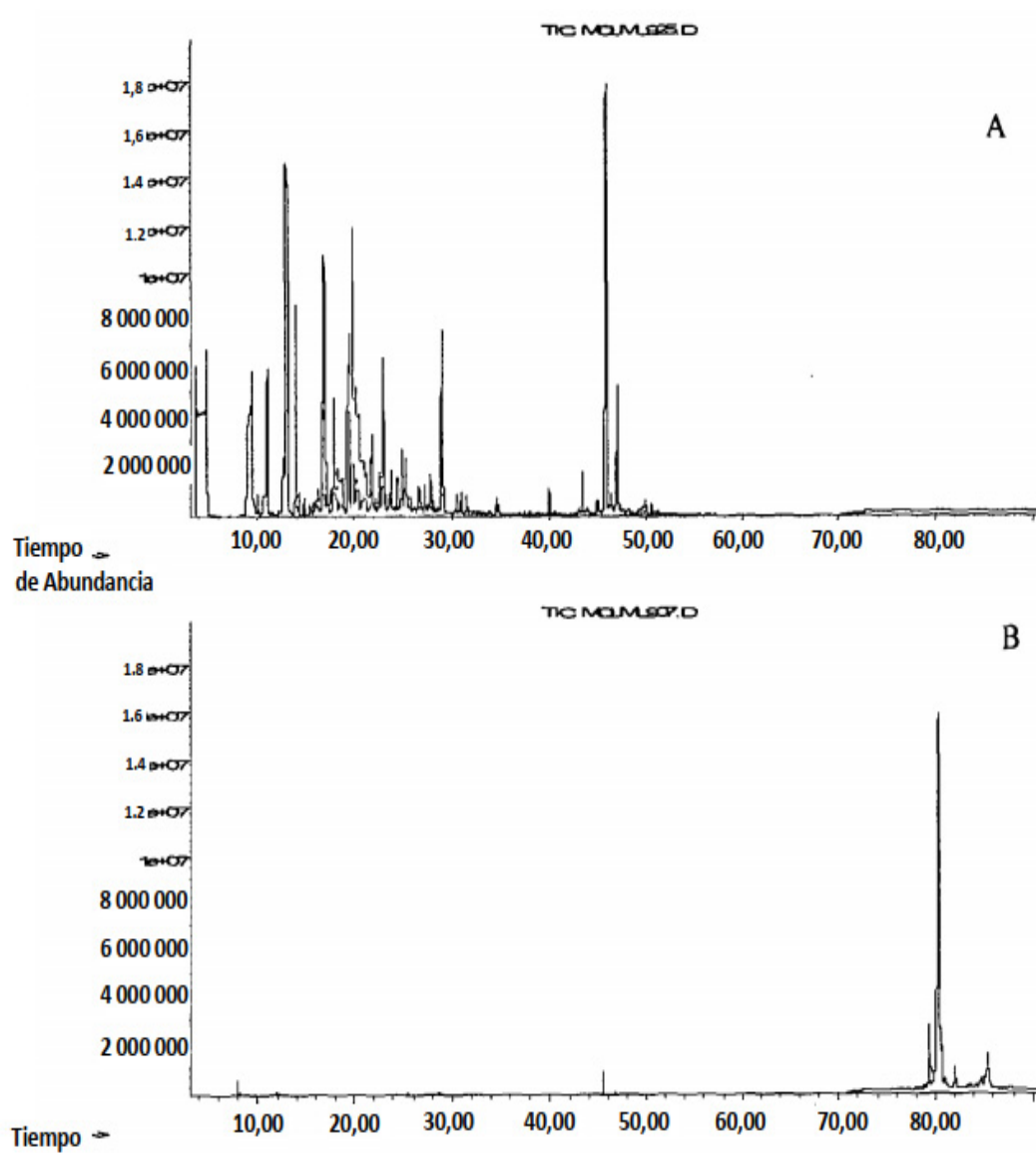


Figura 7

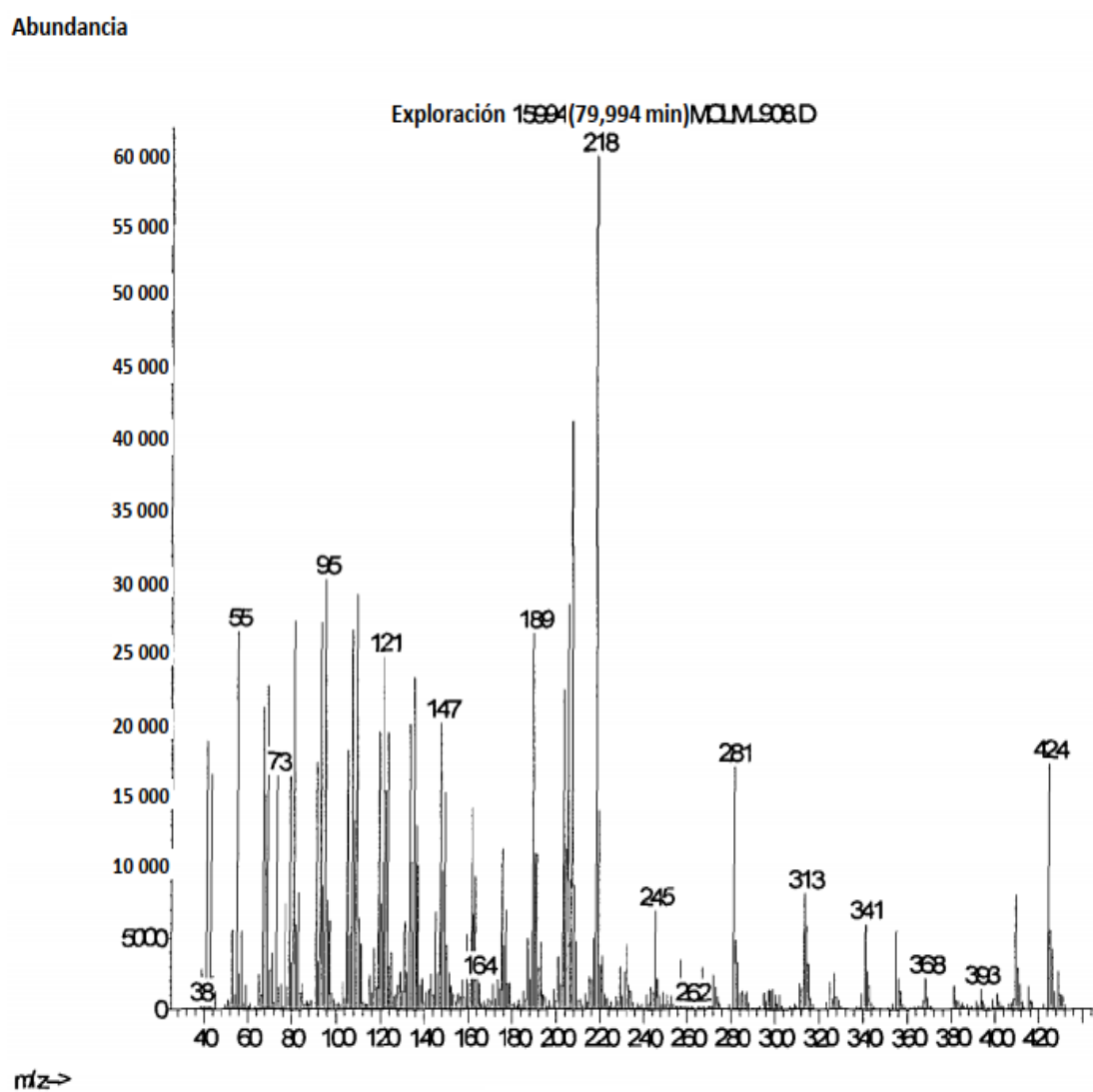
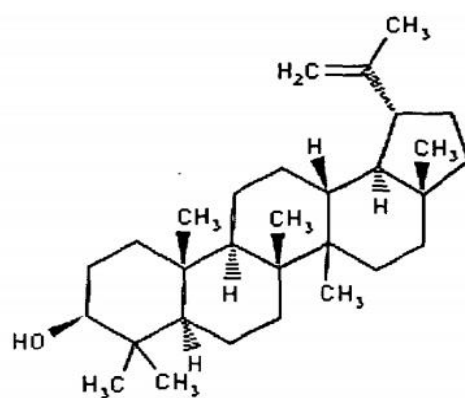
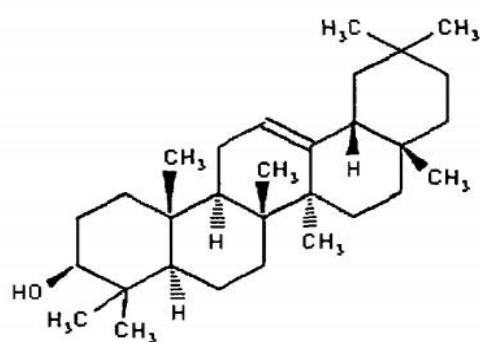


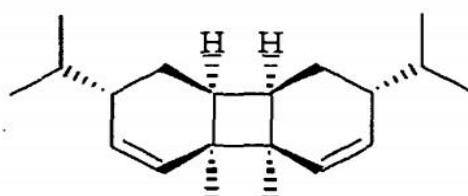
Figura 8



epi-Lupeol



β -Amirina



Dímero de α -felandreno

Figura 9

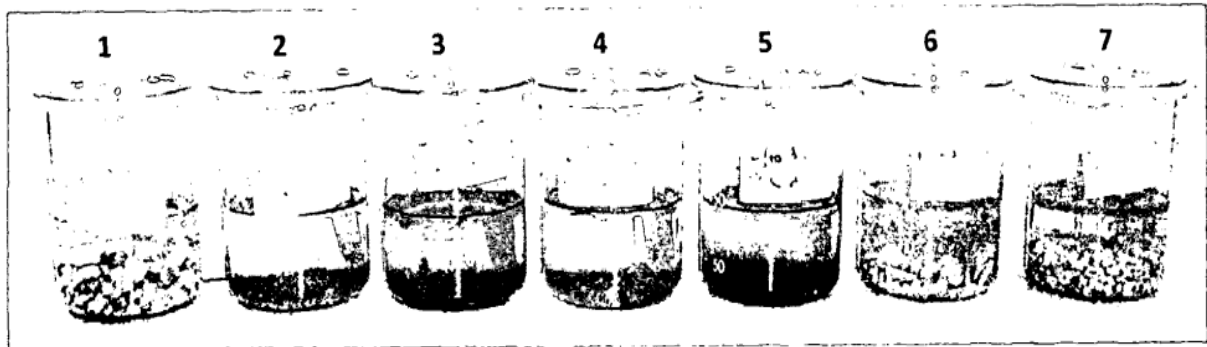


Figura 10

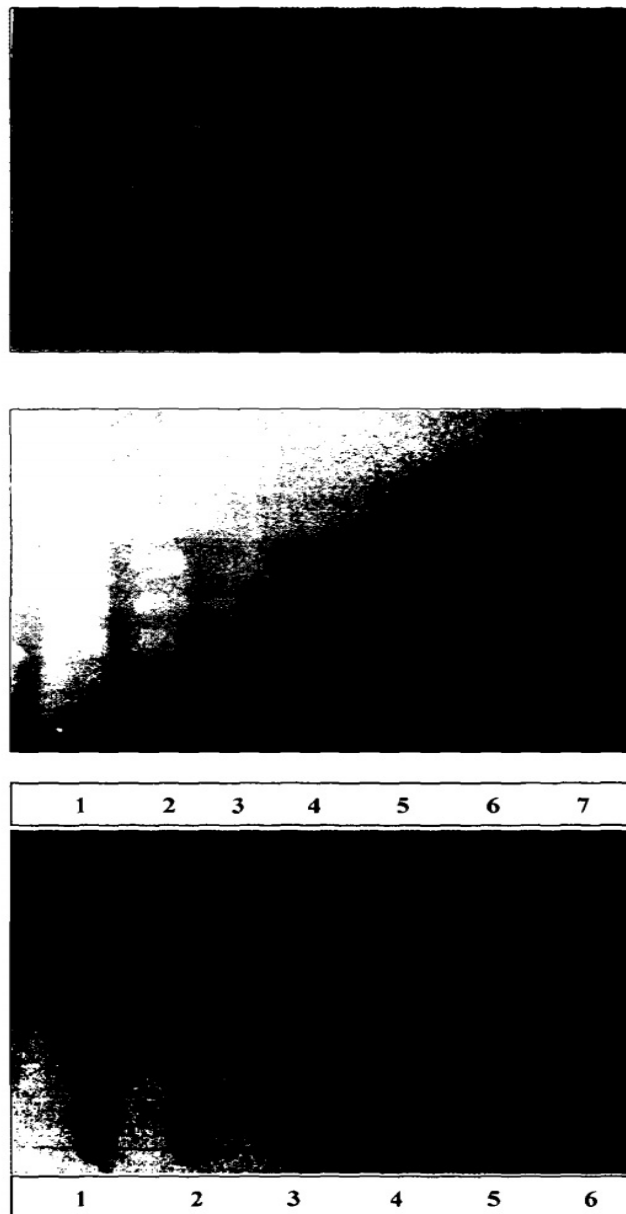


Figura 11

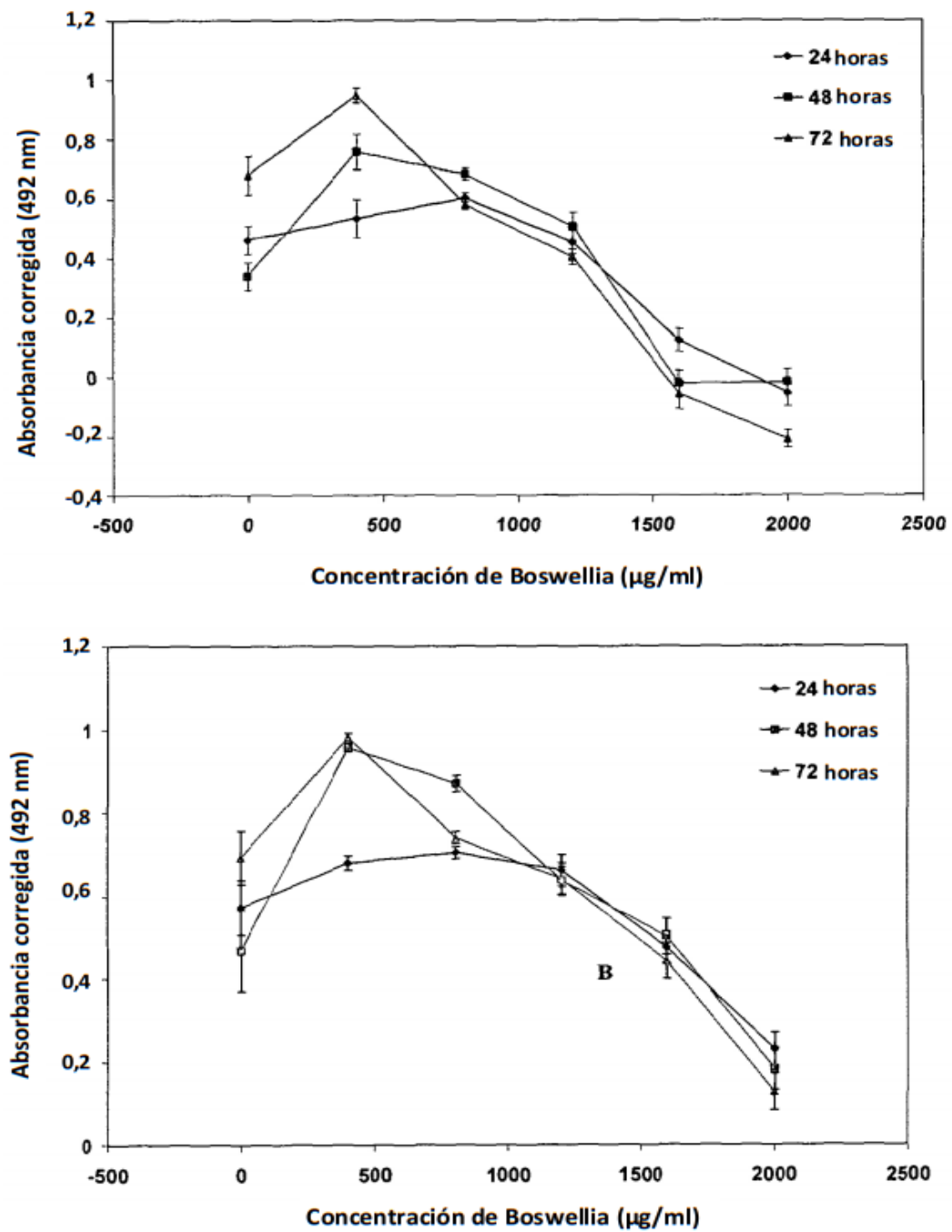


Figura 12