



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL GRUPO
FARMACÓFORO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA
LOCOMOCIÓN DE LOS MONOCITOS (FILM)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARÍA DEL RAYO GARRIDO ORTEGA

TUTORA: DRA. MARÍA GUADALUPE RICO ROSILLO



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



*Este trabajo de tesis se llevó a cabo en la Unidad
de Investigación médica en Inmunología del
Hospital de Pediatría del Instituto Mexicano
del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra.
María Guadalupe Rico Rosillo y la colaboración
del Dr. Raúl Silva García*

Dedicatorias

A Dios

A mi madre

María Teresa Ortega por haberme llevado hasta este punto de mi vida con su ejemplo, amor y confianza.

A la memoria de mis abuelitos

Moisés y Águeda. Gracias por el apoyo y cuidado que me brindaron, siempre estarán en mi corazón.

A mis hermanos

Salvador, Juan y Rocío por estar conmigo en todo momento brindándome apoyo, amor y compañía. Gracias.

A mis Tíos

Juan, José, Fernando, María y Carmen. Gracias por caminar conmigo, por sus palabras de aliento su cariño y ejemplo.

Agradecimientos

A la Dra. Guadalupe Rico por haberme aceptado en su laboratorio, por sus conocimientos, enseñanzas y dirección de esta tesis.

Al Dr. Raúl Silva. Gracias por ser parte esencial en mi formación académica, por sus consejos y apoyo brindado.

A la Q.F.B. María de las Mercedes Zamudio Durán por su valiosa colaboración en la revisión de este trabajo.

A las Dras. María Esther Morales y Sara Rojas por el apoyo brindado en este laboratorio.

A todos los doctores, alumnos y personal de la UIMI del Hospital de Pediatría por su apoyo y compañía. Gracias

Indice.

	Página
Abreviaturas	6
Lista de figuras	7
Capítulo I	
Resumen	8
Capítulo II	
Introducción	10
Capítulo III	
Marco teórico	15
Clasificación taxonómica	15
Ciclo biológico	17
Epidemiología	18
Inflamación	19
Inmunidad humoral	21
Inmunidad celular	22
Estallido respiratorio	22
Aplicación de los péptidos	23
Capítulo IV	
Planteamiento del problema	25
Capítulo V	

Objetivos e hipótesis	26
Capítulo VI	
Diseño experimental	27
Capítulo VII	
Esquema central de trabajo	28
Capítulo VIII	
Material y métodos	29
Selección de los péptidos	31
Obtención de células mononucleares	31
Estallido respiratorio	32
Hipersensibilidad retardada cutánea	33
Capítulo IX	
Diseño estadístico	35
Capítulo X	
Resultados	36
Capítulo XI	
Discusión	39
Capítulo XII	
Conclusiones	42
Capítulo XIII	
Referencias	43

Abreviaturas.

AHA	absceso hepático amibiano
DNCB	1- cloro 2,4 dinitrobenceno
DTF	teoría de funcionales de la densidad
HF	hartree-fock
HRC	hipersensibilidad retardada cutánea
FM	fagocitos mononucleares
FILM	factor inhibidor de la locomoción de los monocitos
PBS	buffer de fosfatos salino
PMA	forbol 12-miristato acetato
PMNs	polimorfonucleares
nPMN	polimorfonucleares neutrófilos
ePMN	polimorfonucleares eosinófilos
SSF	solución salina fisiológica
URL	unidades relativas de luz
ZO	zimosán opsonizado

Lista de figuras.

Fig 1. Sobreposición geométrica de la estructura del FILM y sus derivados, pFILM (sustitución de glutamina por prolina) y kFILM (sustitución de glutamina por lisina) señalando el grupo farmacóforo.

Fig 2. Tripéptido Cys-Asn-Ser "grupo farmacóforo".

Fig 3. Imagen de un quiste y un trofozoito de *E. histolytica*.

Fig 4. Ciclo biológico de *E. histolytica*.

Fig 5. Esquema de la zona sensibilizada en los cobayos.

Fig 6. Efecto de los tripéptidos en el estallido respiratorio de FM.

Fig 7. Efecto del tripéptido con treonina y del pentapéptido con lisina en el estallido respiratorio de FM.

Lista de tablas.

Tabla 1. Hipersensibilidad retardada cutánea en cobayos.

CAPÍTULO I

Resumen.

El Factor Inhibidor de la Locomoción de los Monocitos (FILM) es un oligopéptido (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) con actividad anti-inflamatoria y un bajo peso molecular producido por la *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), el cual entre otros efectos inhibe la locomoción de los monocitos humanos, cancela el estallido respiratorio medido por quimioluminiscencia e inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea (HRC) por contacto al 1-cloro 2,4 dinitrobenceno (DNCB). Se observó que las propiedades del FILM permanecían al sustituir la glutamina por prolina (pFILM), sin embargo al mezclar los aminoácidos en otro péptido la actividad inflamatoria desaparecía. Se realizaron estudios *ab initio* a nivel hartree-fock (HF) y teoría de funcionales de la densidad (DTF), encontrándose que el FILM y pFILM presentan similitud en los últimos tres aminoácidos, proponiendo a estos como el grupo farmacóforo del FILM.

Con todos los estudios anteriores se planteó este trabajo el cual tuvo como objetivo verificar *in vivo* e *in vitro* la existencia del grupo farmacóforo en la molécula del FILM probándose los tripéptidos inicial (Met-Gln-Cys), intermedio (Gln-Cys-Asn) y final (Cys-Asn-Ser grupo farmacóforo propuesto) *in vivo* con la prueba de HRC en cobayos con DNCB e *in vitro* usando la prueba del estallido respiratorio en fagocitos mononucleares (FM).

Los resultados en la HRC indican que el tripéptido final es capaz de alterar la respuesta inflamatoria como el FILM a dosis comparables, por otro lado el estallido respiratorio prueba que el tripéptido ejerce una actividad igual a la del FILM en un modelo celular aislado, concluyendo que el tripéptido final Cys-Asn-Ser es el grupo farmacóforo del FILM.

CAPÍTULO II

Introducción.

Desde 1891 Councilman y Lafleur describieron la insuficiente reacción inflamatoria en los tejidos invadidos por *E. histolytica* (1), la intensa inflamación aguda inicial no se va transformando como se esperaría en una abundante inflamación tardía, rica en fagocitos mononucleares (FM) y como afortunada consecuencia de ello si el individuo sana, el órgano se regenera a la perfección, sin trazas de cicatrización.

En el absceso hepático amibiano (AHA) llama la atención la insuficiencia de elementos inflamatorios en las etapas avanzadas, para poder explicar este fenómeno se han propuesto dos hipótesis; la citolítica y la antimigratoria.

Según la primera la amiba destruiría los leucocitos conforme éstos fueran arribando al tejido infectado y la segunda sugiere que la *E. histolytica* podría producir y liberar factores capaces de inhibir el arribo de los leucocitos al foco de la infección (2).

Se investigó la producción de factores anti-inflamatorios por parte del parásito lográndose aislar, purificar y caracterizar un péptido de sobrenadantes de cultivos axénicos de *E. histolytica*, termoestable y de bajo peso molecular con propiedades anti-inflamatorias, capaz de inhibir *in vivo* e *in vitro* la locomoción (aleatoria, quimiocinesis y quimiotaxis) de los FM, pero no de los

polimorfonucleares (PMN), de donde se origina su nombre "factor inhibidor de la locomoción de los monocitos humanos" (FILM) (3,4).

El FILM fue purificado y caracterizado por medio de cromatografía de alta resolución (HPLC) y espectrofotometría de masas (MSMS) complementado por el método de Edman, estos estudios revelaron un pentapéptido con un peso molecular de 583 Da y se estableció la secuencia de aminoácidos Met-Gln-Cys-Asn-Ser (4).

Es muy probable que este factor sea derivado de un péptido mayor o una proteína sintetizada por la amiba y que se parte por la acción de una proteasa de tipo tripsina/serina presente en el citoplasma. También es posible que la amiba utilice este factor anti-inflamatorio en su beneficio inhibiendo la fase tardía de la inflamación en sus invasiones extraintestinales. El FILM podría contribuir a la escasa inflamación tardía que se observa en la amibiasis invasora (hígado, piel), y quizás por ello es seguida de una perfecta regeneración, sin cicatrización de los órganos afectados. Todo esto nos sugieren la posibilidad de aplicación clínica de éste pentapéptido con efectos anti-inflamatorios selectivos (5).

El FILM interactúa con los leucocitos a través de un receptor membranal que contiene manosas (6). Este pentapéptido también inhibe el estallido respiratorio de los FM y de los polimorfonucleares neutrófilos (nPMN) y aparentemente no afecta la función de los polimorfonucleares eosinófilos (ePMN), inhibe la hipersensibilidad por contacto al DNCB en cobayos y gerbos, retarda el arribo

de los FM en ventanas de Rebeck aplicadas en la piel de voluntarios humanos (7,8).

Los FM y los PMN juegan un papel muy importante en infecciones de *E. histolytica* por medio de mecanismos tanto oxidativos como no oxidativos, *in vitro* el FILM inhibe la producción de óxido nítrico inducido por interferon gamma (INF γ) el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en leucocitos humanos. Una disminución en la producción de óxido nítrico puede interferir con la muerte de las amibas por los neutrófilos en estados de invasión temprana en la amibiasis y esta disminución de óxido nítrico por los leucocitos también puede contribuir a la escasez de los componentes inflamatorios en el AHA y otras lesiones amibianas (9).

Es probable que este pequeño pentapéptido provenga de un péptido más grande o de una proteína sintetizada por la amiba y que luego son degradados por proteasas presentes en el citoplasma (5). Todas estas características que posee la molécula del FILM le confieren ciertas propiedades anti-inflamatorias.

Mediante estudio *ab initio* a nivel hartree-fock (HF) y teoría de funcionales de la densidad (DTF) detallados, como cargas atómicas, órdenes de enlace, momentos bipolar, parámetros geométricos y dureza, con los cuales se identificó la estructura química y el arreglo estructural más probable que presenta el FILM, se destacó la presencia de un grupo farmacóforo, proponiendo que en la parte ácida final de la molécula se encuentra el grupo

farmacóforo (Cys-Asn-Ser), el cual podría constituir la porción crítica funcional del FILM (Figura 1 y 2) (10).

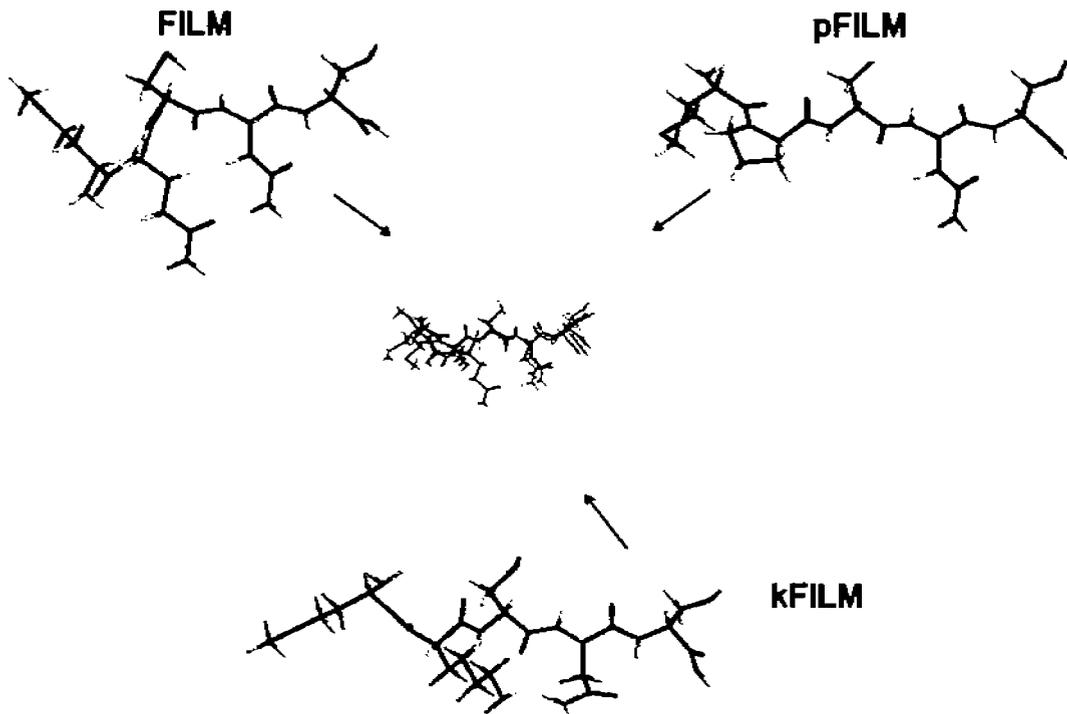


Figura 1. Sobreposición geométrica de la estructura del FILM y sus derivados, pFILM (sustitución de glutamina por prolina) y kFILM (sustitución de glutamina por lisina) señalando el grupo farmacóforo (10).

Cys - Asn - Ser

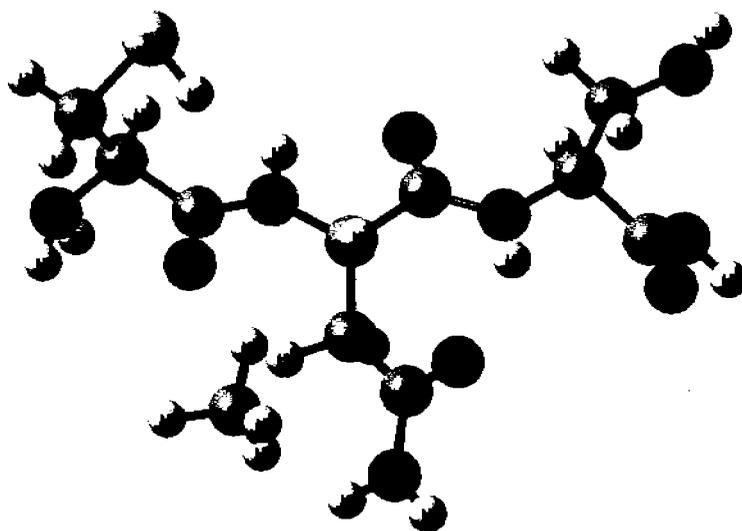


Figura 2. Tripéptido Cys-Asn-Ser "Grupo farmacóforo" (10).

CAPÍTULO III

Marco teórico.

E. histolytica es un protozooario comensal del intestino, que en ocasiones puede diseminarse por vía hemática. Fue descubierto por Lösch, en 1875, en un paciente aquejado de un cuadro diarreico crónico. Sin embargo, fue Kartulis, en 1887, quien demostró por vez primera su papel patógeno y para 1901, Councilman y Lafleur describieron la patogénesis de la disentería y el absceso hepático (1).

Clasificación taxonómica de *E. histolytica*.

E. histolytica pertenece a:

Especie: *Histolytica*

Género: *Entamoeba*

Familia: *Endamoebidae*

Orden: *Amoebida*

Subclase: *Rhizopoda*

Clase: *Lobosea*

Superclase: *Rhizopoda*

Subphylum: *Sarcodina*

Phylum: *Sarcomastigophora*

E. histolytica presenta dos fases: trofozoíto y quiste (2).

Trofozoíto.

El trofozoíto es la forma móvil y es extraordinariamente pleomórfico, puede ser redondo, irregular no alargado ya que su aspecto y movilidad están muy influidos por los cambios de pH, potencial redox y osmolaridad. Su tamaño oscila entre 10 y 40 μm de diámetro, su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son el citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias, aparato de Golgi, sistemas de lisosomas primarios y secundarios. Los trofozoítos se alimentan por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes (Figura 3).

Quiste.

El quiste es el elemento infectante de forma redonda o ligeramente ovalada de 8-20 μm de diámetro, el cual sin teñir se puede ver como cuerpos hialinos de pared refringente y sin movilidad. Cuando el quiste es inmaduro se puede encontrar con un solo núcleo de la tercera parte de su diámetro y el maduro pose 4 núcleos mas pequeños (fase infectante) (Figura 3) (1,11).

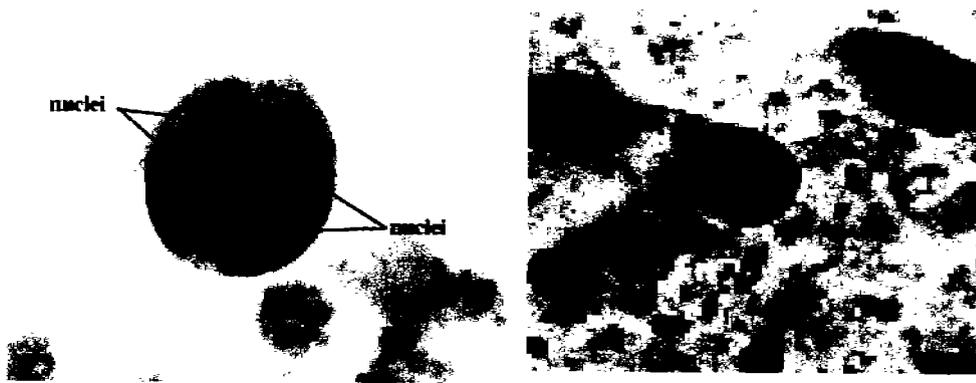


Figura 3. Imagen de un quiste y un trofozoíto de *E. histolytica* (11).

Ciclo biológico.

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente sencillo, el quiste maduro ingresa por vía digestiva a través de los alimentos o agua contaminada, resiste el pH del jugo gástrico. En el tramo final del intestino delgado se produce la ruptura de su pared (exquistación) y la liberación de una amiba metaquistica de 4 núcleos, que dará origen posteriormente a 8 amebas uninucleadas (trofozoítos). Éstas se establecen en el colon, se nutren de bacterias y partículas alimenticias, son eliminadas con las heces y destruidos en el medio ambiente; en otras ocasiones se transforman en quistes inicialmente uninucleados, que después maduran y son eliminados de igual manera por las heces (1,12). De hecho en la mayoría de los casos las amibas viven como pacíficos comensales en el colon, sin embargo, el parásito invade la mucosa intestinal adhiriéndose al epitelio a través de un ligando con carácter de lectina. Algunos trofozoítos eventualmente entran en el torrente circulatorio y pueden

originar las formas invasoras extraintestinales de la amibiasis, en primer término el AHA al que llegan por la vena porta (Figura 4).

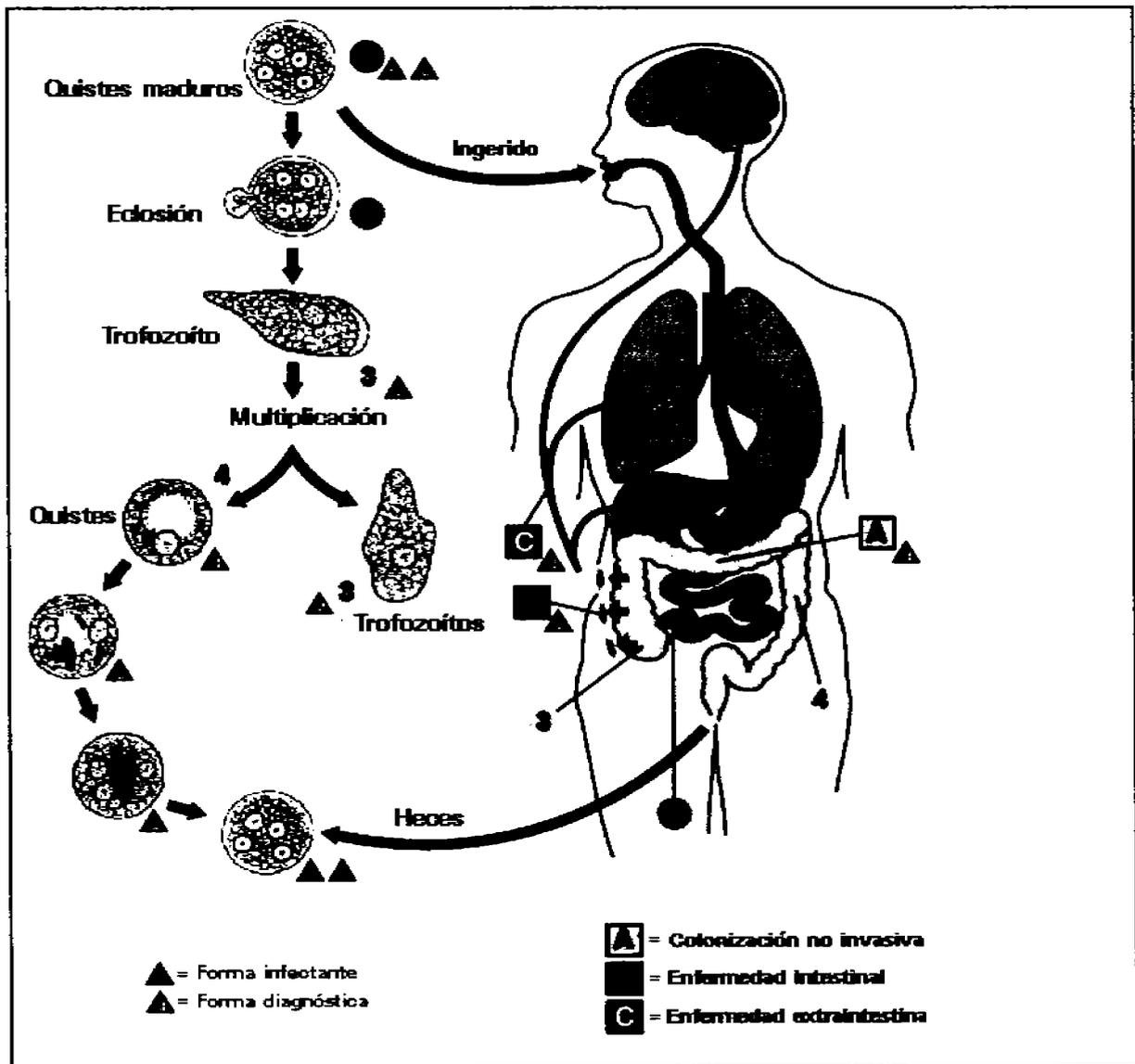


Figura 4. Ciclo biológico de *E. histolytica* (11).

Epidemiología.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la amibiasis: "como la condición de portar el parásito *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas"

Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. histolytica*, lo que resulta en aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 10 mil muertes por año. Los estudios serológicos en México indican que el 9% de la población está infectada con *E. histolytica*. La prevalencia de esta infección amibiana depende de los hábitos culturales, edad, nivel de saneamiento y condiciones socioeconómicas. La amibiasis intestinal es la forma sintomática más frecuente, su incidencia en México es del 9% de los pacientes con diarrea y es controlable con aplicación del tratamiento adecuado. Menos del 10% de los casos con amibiasis intestinal invasora resulta en infecciones severas mortales (13).

Inflamación.

La inflamación es una respuesta protectora del organismo, con la finalidad de librar al mismo del daño inicial y de las consecuencias del mismo como células y tejido necrótico. La respuesta inflamatoria ocurre en el tejido conectivo vascularizado e incluye plasma, células circulantes como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, plaquetas, vasos sanguíneos y componentes extracelulares. Las células cebadas, los fibroblastos, los macrófagos y linfocitos residentes constituyen las células del tejido conectivo.

La inflamación se divide en fase aguda y fase crónica. La primera es de duración corta (minutos, horas o pocos días) y sus características principales son exudado, proteínas plasmáticas y migración de leucocitos (principalmente neutrófilos). Por otro lado la fase crónica es de mayor duración,

histológicamente se asocia con la presencia de linfocitos, macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos y de tejido conectivo.

En la inflamación aguda existen tres efectos principales: 1) alteraciones en el calibre vascular que conduce a un incremento en el flujo sanguíneo, 2) cambios estructurales en la microvasculatura que permite a las proteínas plasmáticas y leucocitos salir de la circulación y 3) migración de los leucocitos al foco del daño. La secuencia de eventos en el tráfico de leucocitos del lumen al tejido intersticial, llamado extravasación, se divide en: 1) migración, rodamiento y adhesión, 2) trasmigración a través del endotelio (diapédesis) y 3) migración celular del tejido intersticial hacia estímulos quimiotácticos (14).

El AHA se debe a la presencia de grandes cantidades de amibas en el hígado que llegan ahí por el sistema porta a partir de ulceraciones intestinales, donde aparentemente induce una pobre respuesta inmune celular (15). Se sabe que a las pocas horas de la llegada de la amiba a los sinusoides hepáticos ocurre una reacción inflamatoria de tipo agudo, donde predominan leucocitos, PMN, entre ellos algunos ePMN y escasos FM alrededor de las amibas. Estas lesiones aumentan paulatinamente de tamaño y se van haciendo más irregulares, los PMN sufren una lisis progresiva por acción del parásito y los FM se incrementan, los hepatocitos sufren necrosis dando origen a granulomas. Finalmente después del quinto día dan origen a zonas necróticas (16,17).

Inmunidad humoral.

Se sabe que después del séptimo día de desarrollo de un AHA aparecen en el suero títulos elevados de anticuerpos anti-amibas, los cuales persisten hasta por 10 años (18). El papel protector de dichos anticuerpos se pone en entredicho debido a que el AHA sigue su curso, a pesar de que como se sabe, los anticuerpos anti-lectina son capaces de inhibir la adherencia de las amibas *in vitro*. Por otro lado el suero de individuos testigos e infectados (con altos títulos de anticuerpos anti-amiba) es capaz de lisar trofozoítos de cepas no virulentas *in vitro*, por activación del complemento en cualquiera de sus dos vías: clásica o alterna, sin embargo las cepas virulentas de *E. histolytica* son resistentes a la lisis mediada por complemento (19).

Existe una respuesta de IgA secretora contra *E. histolytica* durante la amibiasis invasora como lo prueba la presencia de anticuerpos en el calostro y la saliva. No existe evidencia de que la amibiasis intestinal ocurra con más frecuencia o sea más severa en individuos con deficiencias de IgA; pero lo que si se sabe, es que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar a la IgA secretora humana, rasgos que podrían interpretarse como un mecanismo de defensa del parásito a nivel de las mucosas (20).

Inmunidad celular.

Al parecer la inmunidad celular desempeña un papel protector importante en la amibiasis como lo sugieren las respuestas celulares obtenidas en modelos animales; la depresión de estas respuestas resultó en un incremento de la invasividad y se comprobó que la protección por vacunación antes de la infección se debía a una respuesta inmune celular (17).

Durante la fase aguda del AHA, puede ocurrir una supresión transitoria: a) respuesta inmune celular medida por hipersensibilidad de tipo tardío hacia ciertos antígenos amibianos, b) número de linfocitos T y c) producción del factor inhibidor de la migración (MIF). En reacción a los linfocitos T, se ha observado que los pacientes con AHA tienen una relación CD4/CD8 menor a los individuos sanos, pero una vez que se curan, los niveles de linfocitos T CD4 se restablecen, así como sus respuestas celulares contra *E. histolytica in vitro* (21).

Estallido respiratorio

Durante la fagocitosis ocurre un evento conocido como estallido respiratorio y actividad microbicida, donde se generan moléculas excitadas y radicales libres como aniones superóxidos (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\cdot), singlete de oxígeno (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hipoclorito (OCl^-).

La muerte dependiente de oxígeno ocurre cuando la mieloperoxidasa (MPO) y un haluro catalizan la formación de radicales oxidativos a partir de H_2O_2 . La muerte dependiente de oxígeno involucra la halogenación de la pared celular microbiana, la producción de aldehídos bactericidas, por la descarboxilación de aminoácidos y

el rompimiento oxidativo de enlaces peptídicos en las proteínas bacterianas. La MPO es llevada al fagosoma por desgranulación, mientras que los haluros penetran posiblemente por difusión (7,22).

La relajación hasta su estado basal de las moléculas excitadas y los radicales libres como el singlete de oxígeno generados durante la fagocitosis, da como resultado la emisión de energía en forma de quimioluminiscencia (QL), llamada QL "nativa", que es la energía no destructiva producida por la actividad oxidativa de los fagocitos, la cual es muy débil y no puede ser fácilmente medible, pero que puede ser amplificada adicionando un compuesto como el luminol (5- amino 2-3 dihidro 1-4 fthalazina) que interactúa con las especies oxidativas para producir cantidades más grandes de luz con una longitud de onda de 425 nm. El aumento de esta energía nos permite mostrar la actividad fagocítica de manera continua (23).

Aplicación de los péptidos.

El uso de los péptidos ha aumentado considerablemente en la investigación tanto en el área de la inmunología, como de la química, en la industria farmacéutica, para diagnóstico y elaboración de vacunas, entre otras.

Durante la década antepasada se desarrollaron nuevos métodos para la síntesis de péptidos individuales en cantidades considerables, los cuales fueron simples y decrecieron rápidamente para continuar la síntesis de los péptidos con nuevas técnicas, ya que una de las principales metas de la industria farmacéutica es

desarrollar métodos cada vez más rápidos y confiables para obtener mayor cantidad de péptidos en el menor tiempo posible y con un bajo costo.

En la actualidad la síntesis de estos péptidos es posible en laboratorios equipados, empleando una variedad de técnicas y sintetizando cientos de miles de péptidos por año. Frecuentemente los péptidos son dirigidos o propuestos por los investigadores como buenos candidatos de drogas con actividad farmacológica, pero la mayoría tienen un final pobre ya que no tienen una buena actividad oral por lo que algunas veces la investigación de este péptido se puede dar por concluida. La mayoría de los péptidos se pueden modificar para mejorar su actividad.

La mayoría de los péptidos a pesar de ser pequeñas moléculas son de gran importancia ya que poseen suficiente información química para ayudar a idear compuestos con relevante actividad farmacológica (24,25).

CAPÍTULO IV

Planteamiento del problema.

Todos los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* en el laboratorio sitúan al FILM como una molécula con propiedades anti-inflamatorias, es de interés el estudio de este pentapéptido para saber con certeza si esas propiedades se las confieren sólo tres aminoácidos (grupo farmacóforo) o los cinco aminoácidos que conforman al FILM, como lo sugieren estudios *ab initio* realizados por Soriano (10) donde proponen al tripéptido Cys-Asn-Ser como el responsable de la actividad anti-inflamatoria del FILM.

Este análisis es importante dada la necesidad de contar con fármacos anti-inflamatorios específicos y dar información para la construcción de algún otro péptido.

CAPÍTULO V

Objetivos e hipótesis.

Objetivo general. Ampliar el conocimiento en cuanto a la molécula del FILM verificando experimentalmente la existencia de un grupo farmacóforo.

Objetivo particular.

- Selección de péptidos a probar.
- Obtener células fagocitos mononucleares de adultos jóvenes.
- Realizar *in vitro* la prueba de estallido respiratorio con el FILM y los péptidos a probar.
- Realizar *in vivo* la hipersensibilidad retardada cutánea en cobayos.

Hipótesis: El FILM es una molécula con actividad anti-inflamatoria, la cual es conferida por el grupo carboxi-terminal Cys-Asn-Ser denominado grupo farmacóforo.

CAPÍTULO VI

Diseño experimental.

✓ **Criterios de Inclusión:**

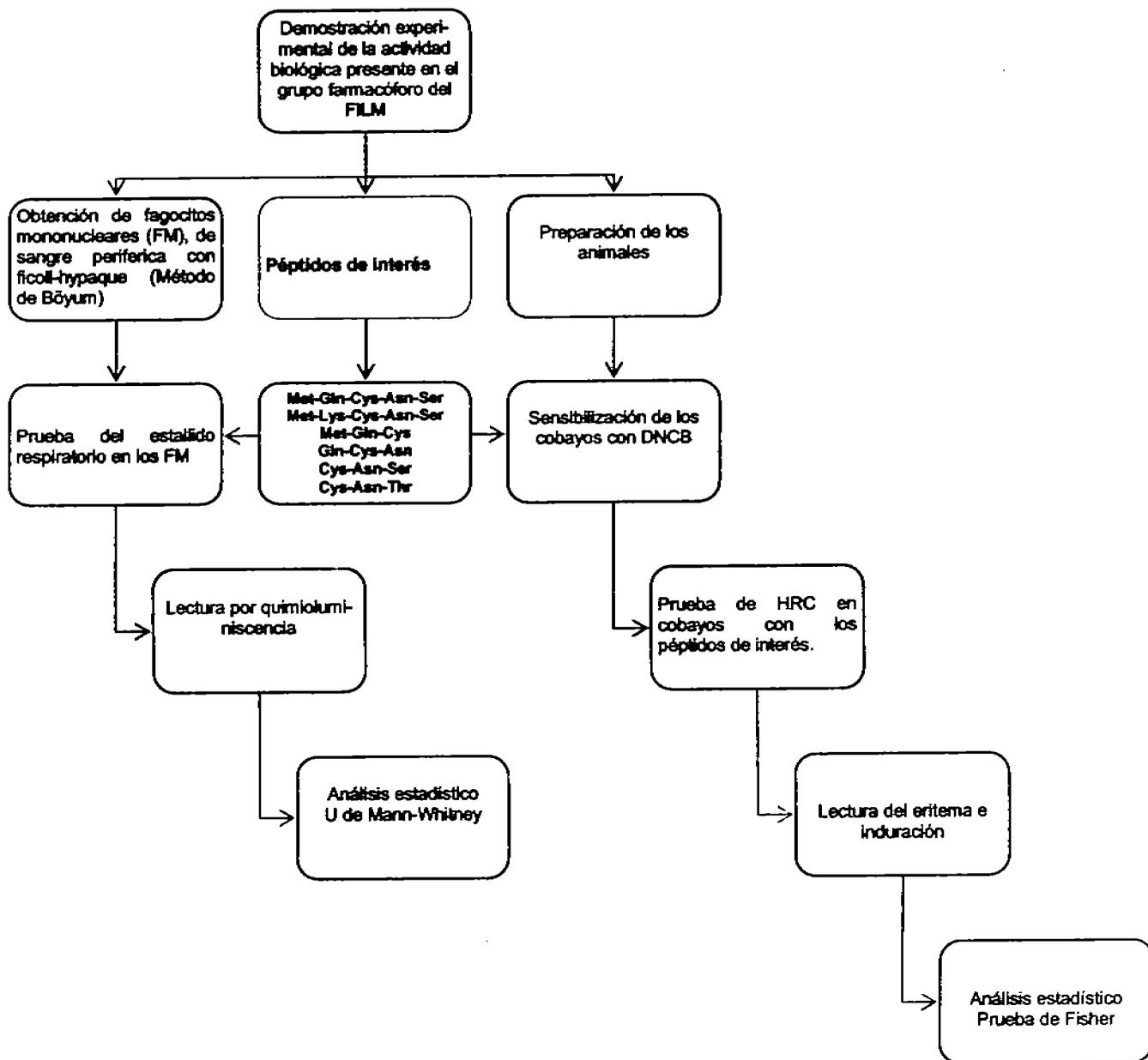
- **Para HRC:** Cobayos machos, albinos Harley (*Cavia aperea*) adultos de pelo corto de aproximadamente 300g.
- **Para estallido respiratorio:** FM de personas adultos jóvenes, sanos y no fumadores.

- ✓ **Criterios de exclusión:** Todos aquellos que no cumplan con alguno de los criterios de inclusión.

Tipo de estudio: Analítico, transversal.

CAPÍTULO VII

Esquema central de trabajo.



CAPÍTULO VIII

Material y métodos.

- **Material biológico:**
 1. Muestras de sangre
 2. Cobayos machos
 3. Zimosán opsonizado

- **Material de laboratorio:**
 1. Tubos de poliestireno
 2. Cámara de Neubauer
 3. Papel Whatman
 4. Jeringas para insulina
 5. Gasas
 6. Tela adhesiva
 7. Guantes

- **Equipo:**
 1. Centrífuga
 2. Microscopio
 3. Estufa
 4. Luminómetro
 5. Restrictores de movilidad

- **Reactivos:**

1. Ficoll Hypaque
2. Solución salina fisiológica
3. Buffer de fosfatos salino
4. Luminol
5. 1-cloro 2,4 dinitrobenceno
6. Crema para depilar

Péptidos empleados.

FILM	Met-Gln-Cys-Asn-Ser
kFILM	Met-Lys-Cys-Asn-Ser
Grupo inicial	Met-Gln-Cys
Grupo intermedio	Gln-Cys-Asn
Grupo final (farmacóforo propuesto)	Cys-Asn-Ser
Tripéptido con treonina	Cys-Asn-Thr

Métodos.

Las pruebas del estallido respiratorio y la HRC en cobayos fueron elegidas por ser los estudios más representativos, reproducibles y fiables *in vitro* e *in vivo* respectivamente, basados en estudios previos realizados con el FILM.

Selección de los péptidos.

El pentapéptido con lisina se usó para verificar la posible participación de la estructura y carga neta con la actividad. La lisina se seleccionó como un aminoácido diferente por su cadena larga y su carga básica.

Los tripéptidos inicial, intermedio y final representan a los aminoácidos 1-2-3, 2-3-4 y 3-4-5 que constituyen al FILM, de los cuales éste último parece ser el grupo farmacóforo, basándonos en resultados, análisis teóricos e información disponible.

El cuarto tripéptido con treonina terminal se seleccionó por tener una relación muy cercana químicamente con la serina, pero electrónicamente diferentes.

Obtención de células mononucleares: Se obtuvieron los FM a partir de una muestra de 40 mL de sangre con heparina (10 U de heparina de sodio /mL de sangre) de adultos jóvenes, sanos y no fumadores (donadas por el Banco de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI). Las células mononucleares se

aislaron por el método de Böyum sobre 5 mL de Ficoll Hypaque con una densidad de 1.077 g/mL (26).

Se colocaron 10 mL de sangre diluida 1:1 (v/v) en SSF en tubos de poliestireno (Falcon, Oxnard, CA). Se centrifugaron a 400 g por 40 min a 20 °C, al cabo de los cuales, las células de la interfase se colectaron y lavaron 3 veces con SSF.

Las células se contaron y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/20 μ L con amortiguador salino de fosfatos (PBS).

Estallido respiratorio: Esta prueba se valoró por quimioluminiscencia, para lo cual se colocaron 1×10^8 células en pozos de poliestireno oscuro de 300 μ L, con 20 μ L de cada uno de los péptidos propuestos: FILM, grupo inicial, grupo intermedio, grupo final a una concentración de 10 y 50 μ g/mL o solución salina fisiológica (SSF) como testigo, se incubaron a 37 °C por 15 min, a la reacción se le agregaron 210 μ L de luminol (1×10^6 M) (Eastman Kodak, Rochester NY) y 60 μ L de zimosán opsonizado (ZO) (12.5 mg/mL). La intensidad luminosa se leyó cada minuto durante 50 min en un Luminómetro Labsystem Luminoskan RS, los resultados se registraron en unidades relativas de luz y se expresaron como la intensidad luminosa en un determinado tiempo.

Por otro lado se realizó el mismo procedimiento con los péptidos Cys-Asn-Thr y Met-Lys-Cys-Asn-Ser a una concentración de 10 y 50 μ g/mL.

Hipersensibilidad retardada cutánea: Cobayos macho, albinos de aproximadamente 300 g se rasuraron y depilaron en el dorso en un área de 6x8 cm, después de 24 horas los animales se sensibilizaros con dosis vesicantes de DNCB (10 mg/mL de DNCB en acetona/aceite de oliva 4:1) impregnando un disco de papel Whatman del número 2 de 5 mm de diámetro con 20 μ L de esta solución. El disco se adhirió a un parche epicutáneo y se fijó al dorso del animal, se cubrió toda la parte depilada con gasa y tela micropore. Los animales se colocaron en restrictores de movilidad individuales por 24 horas, después de las cuales se eliminó el parche y se leyó la prueba de sensibilización por presencia de eritema e induración con un diámetro mínimo de 5 mm.

Pasados 14 días a la sensibilización, los cobayos se prepararon de nuevo, la parte depilada y rasurada se dividió en 4 cuadrantes, en cada uno se inoculó intradérmicamente 0.05 mL de una solución con alguna de las siguientes variantes:

- a) FILM.
- b) Grupo farmacóforo propuesto.
- c).Grupo inicial.
- d) Grupo intermedio.
- e) SSF libre de pirógenos como testigo positivo.

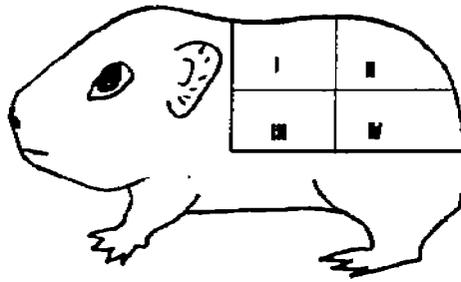


Figura 5. Esquema de la zona sensibilizada en los cobayos.

Se usaron discos idénticos a los de la sensibilización pero con 20 μ L de una dosis de reto de DNCB diluido 1:200 y se colocaron sobre las aplicaciones intradérmicas. Los animales se inmovilizarán por 24 horas y la prueba se leyó 48 horas después.

Se consideró positiva la hipersensibilidad retardada cutánea cuando hubo eritema, edema, induración con un diámetro de >5 mm.

CAPÍTULO IX

Diseño estadístico.

Los experimentos se analizaron mediante la prueba no paramétrica "U de Mann-Whitney" para el estallido respiratorio y la prueba de "Fisher" para hipersensibilidad retardada cutánea.

CAPÍTULO X

Resultados.

Las pruebas del estallido respiratorio medido por quimioluminiscencia (*in vitro*) e hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al DNCB (*in vivo*) se seleccionaron como pruebas de referencia para el estudio del FILM, con base en estudios previos (7,8).

Tabla 1: Hipersensibilidad retardada cutánea en cobayos

	Dosis (µg/ml)	Inhibición	Porcentaje
PBS^a		0/11	0
Met-Gln-Cys-Asn-Ser^b	10*	10/11*	91*
	50	NR	NR
Met-Gln-Cys^c	10	0/8	0
	50	1/8	12.5
Gln-Cys-Asn^d	10	0/8	0
	50	0/8	0
Cys-Asn-Ser^e	10 *	14/15*	80*
	50**	7/8**	87.5**

^a Buffer de fosfatos salino, ^bFILM, ^cPéptido Inicial, ^dPéptido Intermedio, ^ePéptido terminal

Análisis estadístico:

a vs b,e *p < 0.0001

b vs c, d **p < 0.0001

a vs c, d NS

b vs e NS

Estallido Respiratorio

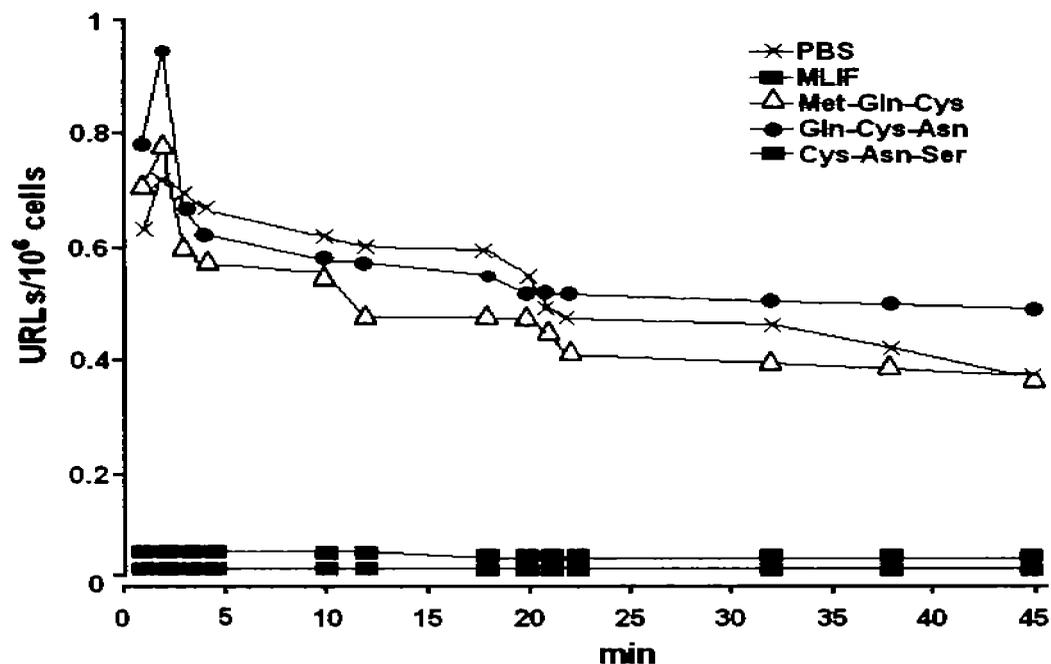


Figura 6. Efecto de los tripéptidos en el estallido respiratorio de FM. En esta gráfica se muestran los resultados de los experimentos a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, donde se observa que el FILM y el tripéptido Cys-Asn-Ser inhiben el estallido respiratorio. Los resultados obtenidos a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ fueron similares.

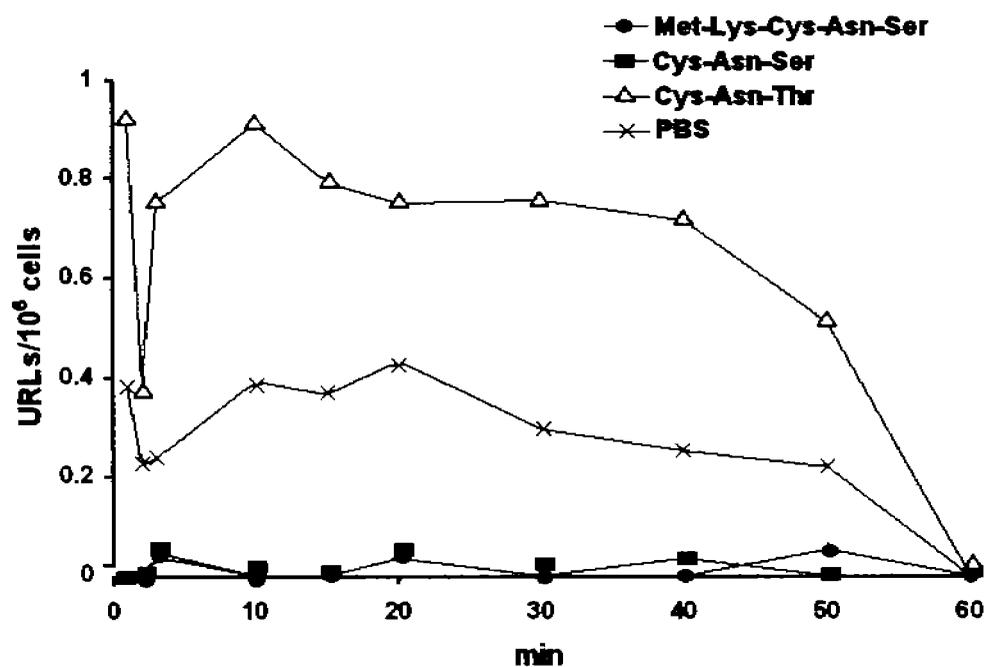


Figura 7. Efecto del tripéptido con treonina y del pentapéptido con lisina en el estallido respiratorio de FM. Esta gráfica muestra los resultados de los experimentos a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, donde se observa que el tripéptido Cys-Asn-Thr no inhibe el estallido respiratorio mientras que el pentapéptido Met-Lys-Cys-Asn-Ser si lo inhibe, mostrando que no afecta la sustitución de la Gln por la Lys.

CAPÍTULO XI

Discusión.

El estallido respiratorio medido por quimioluminiscencia es una prueba indicadora del proceso de fagocitosis en la que se emplean monocitos purificados y prueba que el tripéptido Cys-Asn-Ser ejerce una actividad igual a la del FILM en un modelo celular aislado con un 100% de inhibición, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos, mientras que los tripéptidos inicial e intermedio carecieron completamente de ella (0% de inhibición), con una diferencia estadística para el FILM ($p < 0.001$) pero no para el PBS (Figura 6).

El tripéptido Cys-Asn-Thr, donde la Ser fue sustituida por la Thr, también presentó una escases en su actividad inflamatoria ($p < 0.001$), sin embargo cuando el pentapéptido kFILM con una Lys sustituyendo a la Gln en la segunda posición fue analizada, ésta conservó la actividad inhibitoria (Figura 7).

La prueba de hipersensibilidad por contacto está en el otro extremo con respecto al estallido respiratorio ya que sus resultados son indicadores de un proceso inflamatorio inmunológico integral, con su gran número de participantes celulares y moleculares. Nuestros resultados obtenidos de ésta prueba nos indican que el péptido Cys-Asn-Ser es capaz de alterar la respuesta inflamatoria inmunológica como el FILM, a dosis comparables (10 y 50 $\mu\text{g/mL}$), dentro del

proceso biológico complejo y dinámico, que se da *in vivo*, mientras que los tripéptidos inicial e intermedio no mostraron esa capacidad.

En conjunto estos estudios señalan que el grupo farmacóforo propuesto reproduce el efecto del FILM sobre los monocitos con tal magnitud que permite una expresión biológica en la inhibición de la inflamación, al menos en los modelos experimentales empleados.

Al mismo tiempo los resultados restan importancia a los primeros aminoácidos del FILM, tanto por que el tripéptido terminal Cys-Asn-Ser, que carece de ellos, retiene la acción del FILM, como por el dato de que los tripéptidos inicial e intermedio que los contienen carecen de actividad sobre los monocitos aislados y sobre la inflamación global.

Los efectos inhibitorios del FILM y del tripéptido Cys-Asn-Ser, podrían asociarse con la porción idéntica de ambas moléculas, región a la que podría atribuirse la actividad biológica que presentan.

Los resultados experimentales confirman así, la propuesta del grupo farmacóforo (10). Los estudios teóricos del grupo farmacóforo realizados paralelamente muestran que el pentapéptido Met-Gln-Cys-Asn-Ser y el tripéptido Cys-Asn-Ser tienen una estructura tridimensional y electrónica muy semejante en donde la iso-superficie de la densidad del potencial electrostático presenta una gran distribución en los residuos N y S, y un vector del momento dipolo comparable entre ellos que no se modifica sustancialmente por la

presencia o ausencia de los dos primeros aminoácidos, o por la sustitución de la glutamina por prolina.

La relevancia del grupo farmacóforo del FILM se debe a que puede ser un agente terapéutico potencial, así como un posible modulador en la amibiasis, además, puede tener implicaciones en el desarrollo de la enfermedad, parasitología molecular, entendimiento de la amibiasis e interacción huésped-parásito. Pinilla escribió que los péptidos son pequeñas moléculas que contienen suficiente información química que nos puede ayudar a diseñar compuestos con relevancia farmacológica (27). Por otro lado pequeños péptidos han sido usados en modelos inflamatorios y de inmunomodulación (28).

Un supuesto fármaco anti-inflamatorio ideal sería una molécula pequeña que no suprima la respuesta inmune (27), éste podría ser el FILM.

Las interacciones entre el huésped, la *E. histolytica* y el sistema inmune son múltiples y complejos. El trofozoito tiene éxito invadiendo, pueden neutralizar o resistir anticuerpos, complementos, leucocitos etc. Las amibas tienen un repertorio de posibilidades para contraatacar, incluyendo el capping, fagocitosis, muerte por contacto, entre otras. El FILM producido por la amiba puede actuar como parte de ese repertorio disminuyendo el arribo de los monocitos y modificando la respuesta inflamatoria.

CAPÍTULO XII

Conclusiones.

Los resultados experimentales de los modelos tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que el tripéptido Cys-Asn-Ser es activo por él mismo y prueban que es el grupo farmacóforo del FILM.

Estos resultados también mostraron que el efecto anti-inflamatorio se inhibe cuando es substituida la Ser del tripéptido Cys-Asn-Ser por la Thr.

Con estos experimentos se confirma la hipótesis propuesta en este trabajo, que se basó en una investigación teórica de química cuántica en donde se propuso un posible grupo farmacóforo responsable de toda la actividad biológica del FILM.

CAPITULO XIII

Referencias.

- 1.-Pumarola A, Rodriguez A. Microbiología y Parasitología Médica. Barcelona: Salvat editores, 1984:97-101.
- 2.-Pérez Tamayo R, Brandt In: Amebiasis. Williams and Wilkins: Baltimore, 1971:145.
- 3.-Kretschmer R, Collado M, Pacheco M, Salinas M, López O, Lecuona M, Castro E, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. Parasite Immunol. 1985;7:537-543.
- 4.-Kretschmer R, Rico G, Giménez J. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 2001;112(2):201-209.
- 5.-Rico G, Ximénez C, Ramos F y Kretschmer R. Production of Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) by axenically grown *E. histolytica*; synthesis or degradation. Arch Med Res. 1997;28:235-236.
- 6.-Kretschmer R, Castro E, Pacheco M, Rico G, Díaz G, Arellano J. The role of mannose in the receptor of the monocytes locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res. 1991;77:374-378.

- 7.-Rico G, Diaz O, Giménez J, Kretschmer R. Effect of FILM produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. Arch Med Res. 1992;23(2):157-59.
- 8.-Giménez S, Rico G, Fernández J, Kretschmer R. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNCB in Guinea pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *E. histolytica*. Arch Med Res. 1997;28:237-238.
- 9.-Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez S, Kretschmer R. The monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *E. histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human Leukocytes. Parasitol Res. 2003;90:264-267.
- 10.-Soriano C, Sánchez R, Rico G, Giménez S, Kretschmer R. Electronic structure and Physicochemical properties of the anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. Journal of Molec Struc. 2006;769:91-5.
- 11.-Galería de fotos de *E. histolytica*. www.gefor.4t.com/parasitologia/e_histolytica.html GREFOR.
- 12.-Ravdin J. State of the clinical article. Clin infect Dis. 1995;20:1453.
- 13.-OMS. Amoebiasis - an expert consultation. Weekly Epidemiological Record No 14. Ginebra, 2003.

- 14.-Sigal H, Ron Y. Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences In: The inflammatory response. Mc Graw Hill Nueva York 1994;356-386.
- 15.-Martínez P. The pathogenesis of amoebiasis. Parasitol Today. 1987;3(4):111-118.
- 16.-Tsutsumi V, Mena López R, Anaya Velázquez F, Martínez-Palomo A. Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. Am J Pathol. 1984;117(1):81-91.
- 17.-Shibayama M, Tsutsumi V, Martínez PA. Early invasive intestinal amebiasis in Mongolian gerbils. Arch Med Res. 1992;23(2):187-190.
- 18.-Ravdin J, Jackson T, Petri W, Murphy C, Unger B, Simjee A. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Infect Disc. 1990;162:768-772.
- 19.-Braga L, Ninomiya H, McCoy J, Eacker S, Wiedmer T, Pham Ch. Inhibition of complement attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entameba histolytica*. J Clin Invest. 1992;90:1131-1137.
- 20.-Kelsall B, Ravdin J. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. Infect Disc. 1993;168:1319-1323.

- 21.-Capín R, Mendoza A, Ortiz L, Disminución de la actividad del sistema fagocito mononuclear en hámsters infectados con *E. histolytica*. Arch Invest Med. 1980;11(Suppl):235-240.
- 22.-Rojas E. Bioquímica de la fagocitosis. Bioquím. 1997;22(1):612-635.
- 23.-Helfans S, Werkmeister J, Roder J. Chemiluminescence responded of human natural killer cells. J Exp Med. 1982;156:492-505.
- 24.-Netty D, Zegers, Wim J. Boersma Immunological Recognition of peptides in medicine and biology 1995:3-20.
- 25.-Krachnak V, Vagner J, Novak J et al. A general procedure for evaluation of immunological relevance of synthetic peptides: peptides synthesized on paper in enzyme-linked immunosorbent assay. Anal Biochem. 1990;189:80.
- 26.-Böyum A, Isolation of mononuclear cell and granulocytes from human blood. Scand J Clin Invest. 1968;21(97):77-109.
- 27.-Pinilla C, Appel J, Houghten R. Synthetic peptide libraries for research and drug discovery In : Zeger D, Boersna J. Claassen E, editors. Immunological recognition of peptides in medicine and biology. Boca ratón: CRC. Press, Inc. 1995:1-14
- 28.-Carter B, Gronda M, Wang Z, et al. Small molecule XIAP inhibitors derepress downstream effector caspases and induce apoptosis of acute myeloid leukemia cells. Blood. 2005;105(10):4043-50.