



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS
(FILM) PRODUCIDO POR *ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS* SOBRE LA VÍA INTRÍNSECA
DE LA APOPTOSIS EN LINFOCITOS T CD4+.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

JESSICA LILIANA VARGAS NERI



MÉXICO, D.F

2011



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ANA MARÍA VÁZQUEZ ÁLVAREZ**

VOCAL: **Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

SECRETARIO: **Profesor: SARA ROJAS DOTOR**

1er. SUPLENTE: **Profesor: ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO**

2° SUPLENTE: **Profesor: GIBRAN PEREZ MONTESINOS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

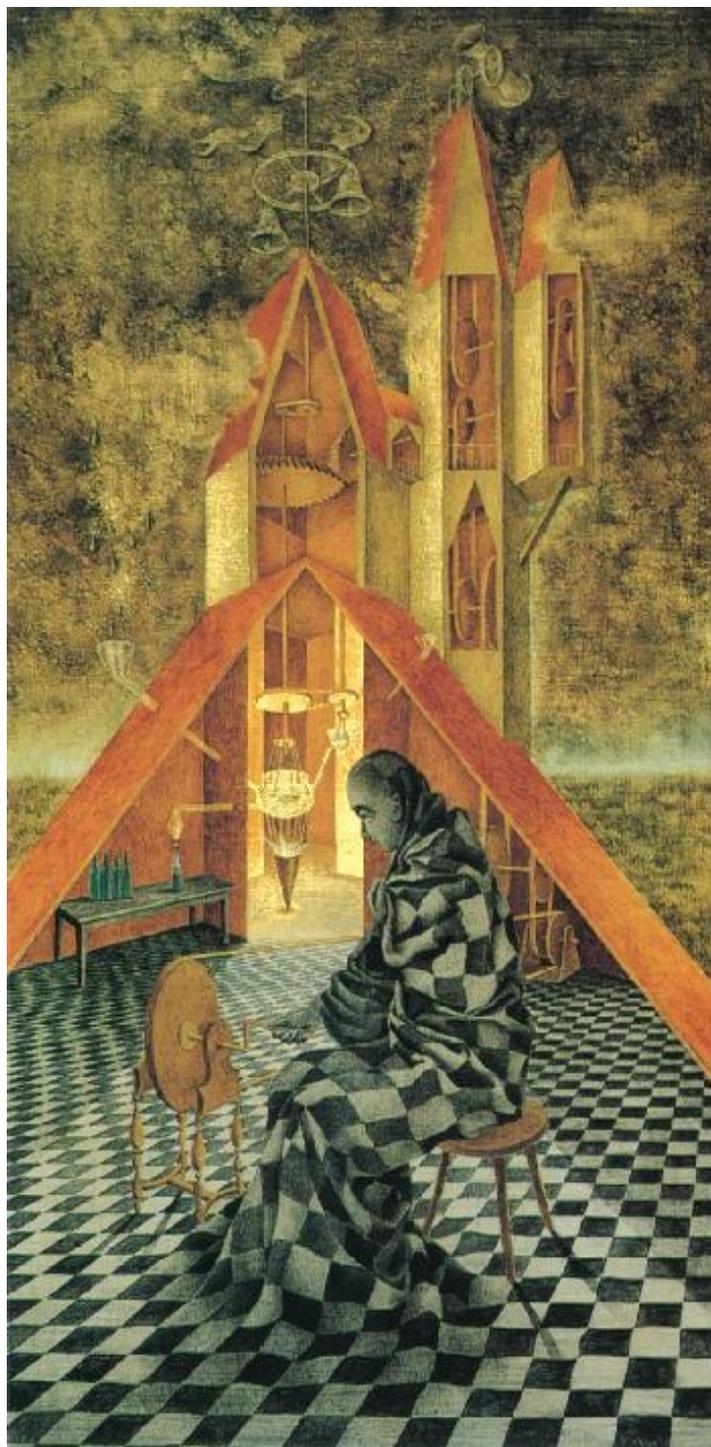
**LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA DE CENTRO MÉDICO
NACIONAL SIGLO XXI**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. SARA ROJAS DOTOR

SUSTENTANTE:

JESSICA LILIANA VARGAS NERI



El Alquimista. Remedios Varo

A LA VIDA, FAMILIA, UNIVERSIDAD, FACULTAD DE QUÍMICA, MAESTROS, AMIGOS... ¡GRACIAS!

“LAS METAS SON SUEÑOS CON FECHA DE ENTREGA”

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen | 7 |
| 1. Introducción | 8 |
| 1.1 Entamoeba histolytica | 8 |
| 1.1.1 Proceso de infección por Entamoeba histolytica | 8 |
| 1.1.2 Importancia de la infección por Entamoeba histolytica | 10 |
| 1.2 Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) | 11 |
| 1.2.1 Características del FILM | 12 |
| 1.3 Citocinas..... | 14 |
| 1.3.1Características de las citocinas..... | 14 |
| 1.3.1 Mecanismo de acción de las citocinas | 14 |
| 1.3.2 Células productoras de citocinas | 15 |
| 1.4 Quimiocinas..... | 16 |
| 1.4.1 Características de las quimiocinas | 16 |
| 1.4.2 Mecanismo de acción de las quimiocinas | 17 |
| 1.5 Inflamación..... | 18 |
| 1.5.1 Fase aguda de la inflamación | 18 |
| 1.6 Fármacos antiinflamatorios | 21 |
| 1.6.1 Anticitocínicos | 21 |
| 1.6.2 Antihistamínicos | 22 |
| 1.6.3 Corticoesteroides..... | 22 |
| 1.6.4 AINEs | 23 |
| 1.7 Citocinas y FILM..... | 24 |
| 1.8 Necrosis..... | 25 |
| 1.9 Apoptosis | 26 |
| 1.9.1 Vías involucradas en la apoptosis | 27 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.9.2 | Caspasas | 28 |
| 1.9.3 | Apoptosis vía extrínseca..... | 28 |
| 1.10 | Apoptosis vía intrínseca | 29 |
| 1.10.1 | Citocromo c | 31 |
| 1.10.2 | Familia de proteínas Bcl-2 | 32 |
| 2. | Planteamiento del problema | 34 |
| 3. | Objetivo..... | 35 |
| 3.1 | Objetivo general..... | 35 |
| 3.2 | Objetivos particulares..... | 35 |
| 4. | Material y métodos..... | 36 |
| 4.1 | Separación de linfocitos TCD4+..... | 36 |
| 4.2 | Cultivo celular..... | 38 |
| 4.2.1 | Concentración óptima de PMA y FILM..... | 39 |
| 4.3 | Citometría de Flujo | 40 |
| 4.4 | ELISA | 43 |
| 4.5 | Análisis estadístico..... | 44 |
| 5. | Resultados y discusión | 45 |
| 5.1 | Concentración óptima de PMA | 46 |
| 5.2 | Concentración óptima de FILM | 47 |
| 5.3 | Evaluación del efecto del FILM sobre la muerte celular en linfocitos TCD4+ | 48 |
| 5.3.1 | Cambios morfológicos observados con los diferentes tratamientos | 55 |
| 5.4 | Evaluación del efecto del FILM sobre la vía intrínseca de la apoptosis | 58 |
| 6. | Conclusiones | 61 |
| 7. | Perspectivas | 62 |
| 8. | Referencias..... | 63 |

| | |
|---------------|----|
| 9. Anexo..... | 68 |
|---------------|----|

Resumen

El factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) es un pentapéptido con propiedades antiinflamatorias probadas *in vitro* e *in vivo* y es producido por *Entamoeba histolytica*. Inhibe la locomoción de fagocitos mononucleares (FM) pero no de polimorfonucleares (PMN). Una sobreactivación podría matar a las células, por lo que es necesario probar el efecto del FILM sobre la apoptosis en linfocitos T y si ésta es dependiente del receptor de muerte FasL/CD95L (vía extrínseca) o dependiente de citocromo c (vía intrínseca).

Se evaluó el efecto del FILM sobre la apoptosis en linfocitos TCD4+ de sangre venosa periférica estimulados por 24 horas con PMA, FILM, PMA+FILM y actinomicina D. Las células cultivadas fueron analizadas por citometría de flujo. Se midió el porcentaje de fluorescencia con marcaje de anexina V/IP. Se cuantificó Citocromo c por ELISA utilizando el *Kit Calbiochem Cytocrome C QIA74-1EA* para detectar apoptosis vía intrínseca.

Se observó que el FILM *per se* no produce apoptosis de manera significativa. Al combinarse con PMA, se observó un aumento de fluorescencia. Esto indica que podría tratarse de un efecto aditivo entre PMA y FILM.

Se observó que el FILM produjo una mayor liberación de citocromo c en comparación con los otros grupos. Por lo tanto, la poca apoptosis que ocasiona podría depender de la vía intrínseca. No se observó el efecto aditivo de PMA.

El FILM puede ser considerado como candidato posible a ser fármaco antiinflamatorio debido a que actúa sobre el sistema inmune en blancos celulares específicos, se conoce su estructura, se está caracterizando, se conoce su mecanismo de acción y actúa de manera dosis-dependiente.

1. Introducción

1.1 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un protozooario extracelular que tiene como hábitat el intestino grueso. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (Araujo *et al.*, 2008), la amibiasis, desarrollo y reproducción de *E. histolytica* en el hombre causando enfermedad, es la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias. Cuando se habla de infección amibiana se refiere a la presencia del parásito en el huésped, y cuando el parásito provoca lesiones tisulares con repercusión clínica (amibiasis invasora) estamos ante la enfermedad amibiana.

1.1.1 *Proceso de infección por Entamoeba histolytica*

La parasitosis se adquiere al ingerir los quistes, que corresponden a la forma infectante para el humano. Estas formas son ingeridas con alimentos o bebidas contaminadas con material fecal, por lo que es una parasitosis transmitida por fecalismo (Romero, 2008).

El quiste llega a la boca de un individuo, es ingerido y va descendiendo por la parte alta del tubo digestivo. A su paso por el estómago la pared quística se empieza a reblandecer. Posteriormente, en contacto con los jugos duodenales la pared continúa reblandeciéndose con lo que el proceso de desenquistamiento evoluciona hasta que la pared se rompe y deja libre un trofozoito metacíclico con cuatro núcleos. A continuación, cada uno de los cuatro núcleos se divide y da origen a dos núcleos iguales. El trofozoito ya ubicado en la luz del intestino grueso cuenta con ocho núcleos, después se separan de la célula original quedando ocho trofozoitos libres e independientes. Los trofozoitos en la luz del intestino se multiplican por fisión binaria. El enquistamiento da lugar, nuevamente, a quistes que salen al medio con las heces. Los trofozoitos ubicados en la luz del intestino

también pueden adherirse a la superficie de la mucosa del intestino e invadir los tejidos hasta romper la integridad de la superficie mucosa produciendo lesiones ulcerosas, que poco a poco van creciendo en profundidad y en extensión.

La progresión de las lesiones permite a los trofozoitos pasar del intestino a las estructuras contiguas, pero también pueden llegar hasta los vasos sanguíneos del intestino con lo que se introducen a la circulación enterohepática mediante la cual llegan hasta el hígado donde pueden permanecer causando o no lesiones (Figura 1) (Romero, 2008; Martínez, 2002; Martínez, 1986; Leanne y Chaddee, 2010).

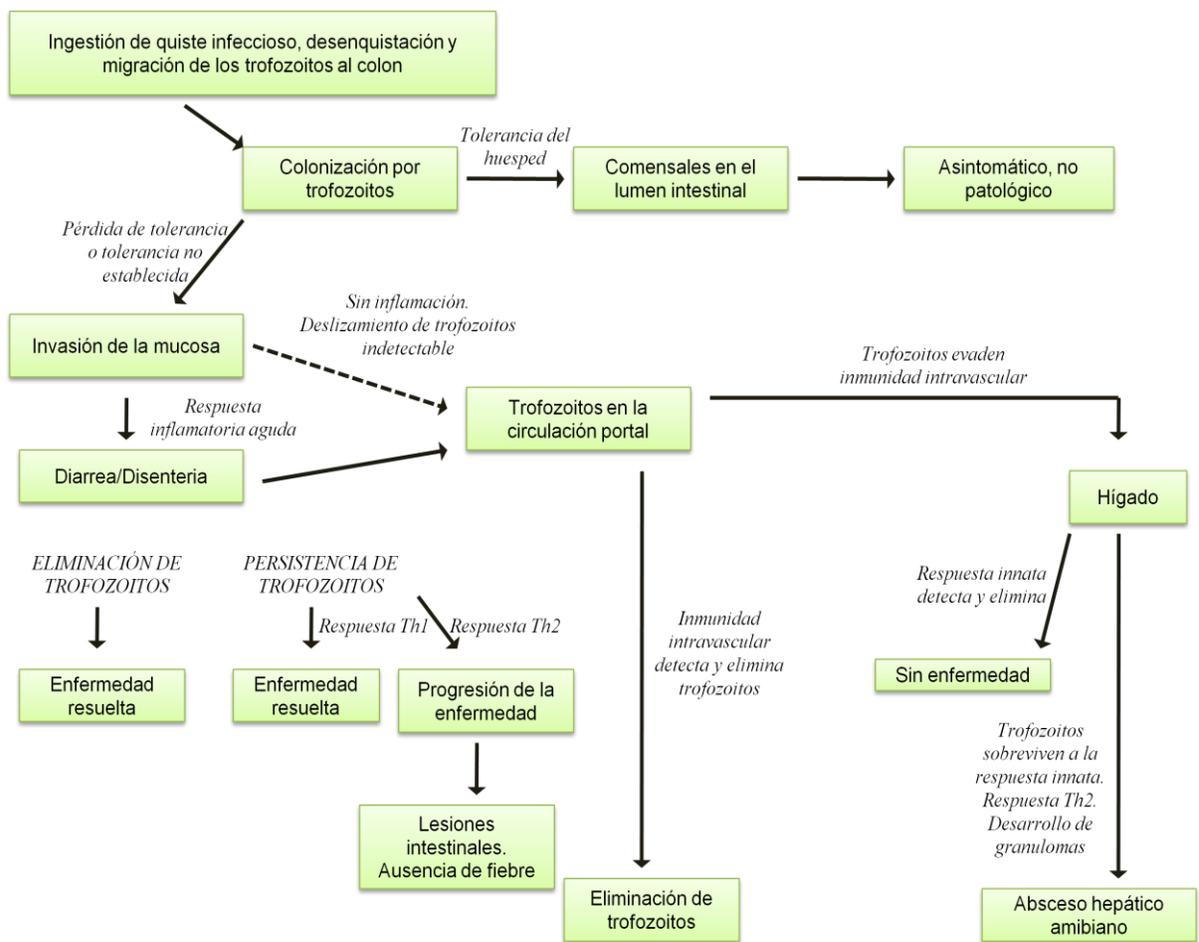


Figura 1. Esquema de la inmunidad del huésped y la patología durante una infección por *Entamoeba histolytica*.

La penetración de *E. histolytica* a la mucosa se ve favorecida por un péptido formador de canales iónicos, denominado ameboporo el cual induce la lisis celular,

a esto último contribuyen otras proteasas del parásito como elastasas y colagenasas que destruyen el tejido.

Los neutrófilos que se han acumulado en los puntos de penetración son destruidos por las lectinas de *E. histolytica* y al romperse, liberan enzimas que contribuyen a la lisis celular. Además, *E. histolytica* ingiere a las células o fragmentos de ellas, por un mecanismo de fagocitosis en donde interviene la succión del elemento a fagocitar, como sucede cuando ingiere eritrocitos.

No todos los individuos que tienen amibiasis, presentan manifestaciones clínicas y esto se debe a la patogenicidad de *E. histolytica* y a factores del huésped. Las cepas patógenas muestran alta capacidad de eritrofagocitosis, sensibilidad de aglutinar con concavalina A y en ausencia de cargas negativas de superficie a pH neutro, favorece la adhesividad a las células circundantes (Romero, 2008).

1.1.2 Importancia de la infección por Entamoeba histolytica

En el 90% de los casos de amibiasis, la infección es asintomática y autolimitante. Usualmente, los trofozoitos de *E. histolytica* permanecen en el lumen intestinal como comensales (Romero, 2008). Por razones desconocidas, *E. histolytica* es capaz de encender el fenotipo patógeno (Haque *et al.*, 2003). Los eventos que marcan la progresión de la amibiasis invasiva en el intestino y extraintestinal (absceso hepático amibiano, por ejemplo) están bien caracterizados tanto en pacientes como en modelos animales. Como sea, el entendimiento de los mecanismos inmunes en la relación huésped-parásito aun es incompleto (Leanne y Chadde, 2010).

Todos los modelos experimentales de absceso hepático por *E. histolytica* demuestran una reacción inflamatoria aguda intensa que incluye pocos eosinófilos acompañada con un establecimiento temprano de *E. histolytica* en el hígado (Tsutsumi y Martínez-Palomo, 1988). Por otro lado, la reacción de inflamación tardía de estados avanzados del absceso hepático es escasa y quizá como un resultado de una perfecta regeneración de los órganos afectados que continúa con

un exitoso tratamiento. Se ha observado ausencia de cicatrices en pacientes que se recuperan del absceso hepático y en pacientes que se recuperan de lesiones en la piel. Esto es, obviamente, un evento inusual en la relación parásito-hospedero. Este fenómeno inesperado ha sido relacionado con factores tanto del parásito como del hospedero, algunos de éstos con un posible control genético (Velázquez y Kretschmer, 2004).

Se han buscado posibles factores antiinflamatorios generados por el parásito. Esto llevó a la descripción y caracterización del pentapéptido antiinflamatorio producido por *E. histolytica* en cultivos axénicos. Este factor, claramente, inhibe la locomoción *in vitro* (aleatoria, quimiocinética y quimiotáctica) de monocitos y fagocitos mononucleares (MC, FMN) pero no de leucocitos polimorfonucleares, en especial neutrófilos. Por lo tanto, el nombre original dado para este factor es Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) (Kretschmer *et al.*, 2001; Kretschmer *et al.*, 1985).

1.2 Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM)

El Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) es un peptapéptido conformado por los aminoácidos Met-Gln-Cys-Asn-Ser (583 Da) obtenido de cultivos axénicos (también encontrado en material subcelular) de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (cepa HM1:IMSS). El FILM no es un producto de degradación del medio axénico, más bien es un oligopéptido producido *de novo*, sintetizado, probablemente, como una molécula grande que subsecuentemente es escindida por enzimas proteolíticas tipo tripsina/serina. Tanto el FILM nativo como el péptido sintético tienen las mismas propiedades antiinflamatorias. Estudios químicos sugieren que Cys-Asn-Ser terminal del FILM es el grupo farmacóforo (Figura 2) (Soriano - Corea, *et al.*, 2008).

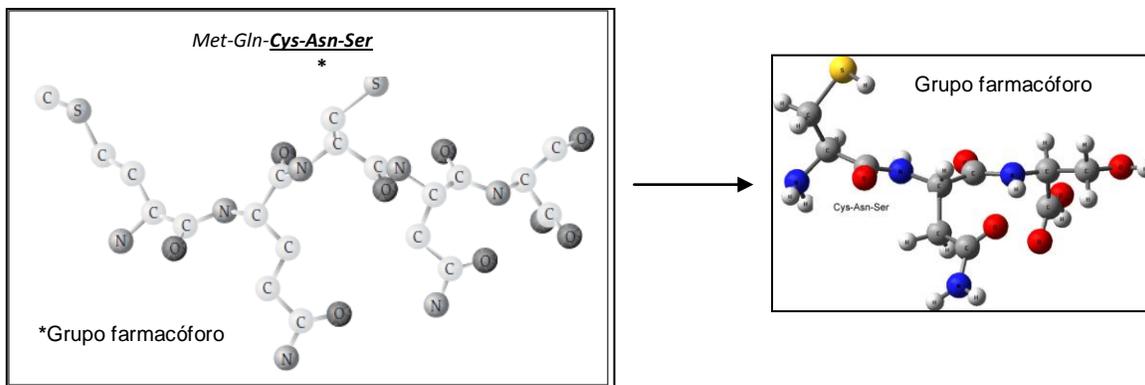


Figura 2. Estructura molecular del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) y de su grupo farmacóforo que involucra los tres últimos aminoácidos.

1.2.1 Características del FILM

El FILM actúa a través de receptores de manosa sin afectar CD43 membranar (Kretschmer *et al.*, 1991). Incrementa cAMP sin el concomitante decremento de cGMP (Rico *et al.*, 1995). El FILM también disminuye el estallido respiratorio (ERO: H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^\cdot) y la producción de óxido nítrico (ERN: ON) en monocitos humanos y también en polimorfonucleares (PMN) (Kretschmer *et al.*, 2001; Rico *et al.*, 2003; Rojas, 2001). Los eosinófilos, por otro lado, escapan a todos estos efectos (Rico *et al.*, 1998). *In vivo*, el FILM retrasa la llegada de leucocitos mononucleares en piel humana en ventana de Rebuck (Kretschmer *et al.*, 1985) e inhibe la hipersensibilidad retardada en la piel ocasionada por dinitroclorobenceno (DNCB) en cobayos y en gerbos (Kretschmer *et al.*, 2001; Giménez *et al.*, 1997), debilita la expresión de inflamación retardada relacionada con moléculas de adherencia (por ejemplo, VLA-4 y VCAM-1) en monocitos y en el endotelio (Giménez *et al.*, 2000) (Tabla 1). Actualmente, se ha creado FILM sintético y el 96% de éste tiene propiedades idénticas al material nativo (Kretschmer *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2000).

Por otro lado, se tiene como antecedente la ausencia o escasez de reacción inflamatoria tardía en las lesiones necróticas avanzadas de la amibiasis invasora causada por *E. histolytica* así como la regeneración, sin cicatrización, de los

órganos afectados que se observa en los pacientes después de un tratamiento exitoso (Rojas, 2001). Hasta el momento, se ha encontrado que el FILM inhibe procesos experimentales de cicatrización en el peritoneo irritado y pericardio de gerbos (Tabla 1) (Velazquez y Kretschmer, 2004).

El mecanismo de acción exacto del FILM aun no está claro. Sin embargo, la inhibición de la síntesis de proteínas en células blanco por cicloheximida cancela, *in vitro*, el efecto del FILM. Esto y las múltiples acciones (por ejemplo, en la adhesión endotelial y diapedesis, locomoción, microtubular y cambios en cAMP/cGMP, producción de radicales libres (ERO y ERN) y cicatrización) que el FILM lleva a cabo en una gran variedad de células (por ejemplo, células endoteliales, PMN, MC/MP y fibroblastos) sugieren que el FILM actúa de manera general en el organismo, sobre la vía de citocinas.

| Efectos del FILM <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | |
|---|--|
| <i>In vitro</i> | |
| Inhíbe la locomoción (aleatoria, quimiocinética y quimiotáctica de fagocitos mononucleares de sangre periférica pero no de PMN neutrófilos. | |
| Deprime el estallido respiratorio de monocitos y neutrófilos activados con zimosán | |
| No afecta ni la locomoción ni el estallido respiratorio de PMN eosinófilos activados con zimosán. | |
| Inhíbe la producción de óxido nítrico (ON) en fagocitos mononucleares y PMN | |
| <i>In vivo</i> | |
| Retrasa el arribo de leucocitos mononucleares en cámaras de Rebeck aplicadas a la piel de humanos sanos. | |
| Inhíbe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al 1-cloro-2-4-dinitrobenceno (DNCB) en cobayos y en gerbos. | |
| Abate la expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en monocitos y de VCAM-1 en el endotelio vascular. | |
| Inhíbe procesos experimentales de cicatrización en el peritoneo irritado y pericardio de gerbos | |

Tabla 1. Características antiinflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo* del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM).

1.3 Citocinas

El desarrollo de una respuesta inmune efectiva involucra a las células mediadoras de la inflamación y, en general, a las células hematopoyéticas. Las interacciones entre estas células son mediadas por un grupo de proteínas llamadas citocinas, nombre que indica la comunicación célula-célula que puede ser autócrina, parácrina y endócrina (Goldsby *et al.*, 2001).

1.3.1 Características de las citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que se unen a receptores específicos con una alta afinidad, éstos se encuentran en la membrana de la célula blanco e inician vías de señalización como la vía de JAK-STAT que a su vez, altera la expresión génica. Los diferentes receptores de citocinas están compuestos de cadenas que se unen a citocinas específicas y que se asocian mediante enlaces no covalentes a subunidades productoras de señales (Pease y Williams, 2006); estos receptores son:

- Receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas,
- Receptores de citocinas clase I o de la hematopoyetina,
- Receptores de citocinas clase II o de interferón,
- Receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y
- Receptores de quimiocinas

1.3.1 Mecanismo de acción de las citocinas

Las citocinas regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune mediante la estimulación e inhibición de la activación, proliferación y diferenciación de un gran número de células, regulando la secreción de anticuerpos y otras citocinas. Las citocinas presentan las características de pleiotropía (una citocina tiene diferentes efectos biológicos en diferentes células blanco), redundancia (dos o más citocinas tiene funciones similares), inducción de sinergia (el efecto combinado de dos

citocinas sobre la actividad celular es mayor que el efecto aditivo de las citocinas individuales), antagonismo (en algunos casos, el efecto de una citocina disminuye o inhibe el efecto de otra citocina) e inducción de cascadas (la acción de una citocina en la célula blanco induce que ésta produzca una o más citocinas). Con estos puntos regulan la actividad celular en una forma coordinada (Goldsby *et al.*, 2001).

1.3.2 Células productoras de citocinas

Los principales productores de citocinas son los linfocitos TCD4+ (Th1 y Th2) (Tabla 2), las células presentadoras de antígeno (CPA) y los linfocitos TCD8+, y dependiendo del balance de activación de citocinas será el tipo de respuesta inmune frente a un patógeno en particular. Muchas citocinas son llamadas interleucinas, que es un nombre que indica que son secretadas por algunos leucocitos y actúan sobre otros leucocitos (Abbas y Lichtman, 2004).

| Citocina | Th1 | Th2 |
|---|-----|-----|
| Secreción de citocinas | | |
| IL-2 | + | - |
| IFN- γ | ++ | - |
| TFN- β | ++ | - |
| IL-3 | ++ | ++ |
| IL-4 | - | ++ |
| IL-5 | - | ++ |
| IL-10 | - | ++ |
| IL-13 | - | ++ |
| Funciones | | |
| Ayuda en la producción de anticuerpos (total) | + | ++ |
| Ayuda para producción de IgE | - | ++ |
| Ayuda para producción de IgG2A | ++ | + |
| Producción de eosinófilos | - | ++ |
| Activación de macrófagos | ++ | - |

Tabla 2. Secreción de citocinas y las principales funciones de linfocitos Th1 y Th2.

Un subgrupo de las citocinas son las quimiocinas que son citocinas de bajo peso molecular que afectan la quimiotaxis y juegan un rol muy importante en la respuesta inflamatoria.

1.4 Quimiocinas

Las quimiocinas son una superfamilia de polipéptidos pequeños (90-130 aminoácidos) que controlan la adhesión, quimiotaxis y la activación de diferentes poblaciones de leucocitos. Algunas quimiocinas están involucradas en el proceso inflamatorio y otras se expresan constitutivamente ayudando a la homeostasis del organismo (Goldsby *et al.*, 2001).

1.4.1 Características de las quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas que poseen cuatro residuos conservados de cisteína y, basados en la posición de dos de los cuatro residuos invariantes de cisteína, casi todos caen en uno u otro de los dos principales subgrupos:

Subgrupo C-C.- las cisteína conservadas son contiguas.

Subgrupo C-X-C.- las cisteínas conservadas están separadas por otro aminoácido.

Las quimiocinas inflamatorias se inducen en respuesta a una infección causando la movilización de leucocitos hacia el tejido dañado induciendo la adherencia de estas células al endotelio vascular. Después de la migración hacia los tejidos, los leucocitos son atraídos hacia regiones donde se encuentra una gran concentración de quimiocinas resultando en el reclutamiento de fagocitos y poblaciones de linfocitos efectoras (Goldsby *et al.*, 2001).

1.4.2 Mecanismo de acción de las quimiocinas

La acción de las quimiocinas está mediada por receptores transmembranales acoplados a proteínas G, con lo que inician un proceso de transducción de señales que genera segundos mensajeros como cAMP, IP₃, Ca²⁺, y activan proteínas G pequeñas con lo que se generan cambios celulares importantes (Figura 3). Existen subgrupos de receptores, receptores CC que reconocen a las quimiocinas C-C, y los receptores C-X-C que reconocen a las quimiocinas CXC. La interacción entre las quimiocinas y sus receptores es altamente específica y de gran afinidad (Niederlova y Koubek, 1999; Goldsby *et al.*, 2001).

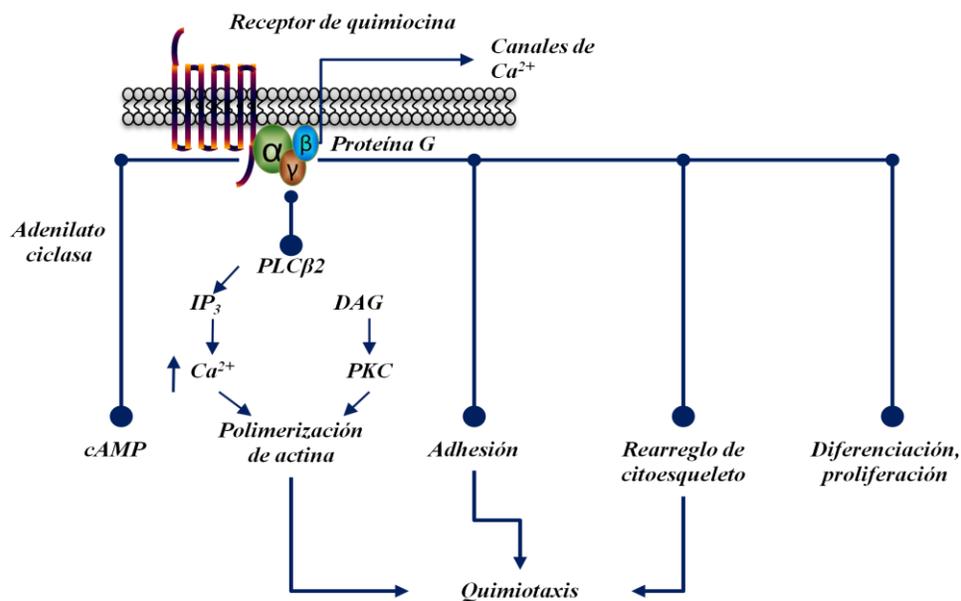


Figura 3. Señales de quimiocinas a través de receptores transmembranales acoplados a proteínas G. La unión de una quimiocina con su receptor activa diferentes vías de señalización resultando en modificaciones de la célula blanco. Basado en Goldsby *et al.*, 2001.

1.5 Inflamación

La inflamación es un proceso que incluye una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por diversos estímulos (agentes infecciosos, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo y lesiones físicas o térmicas de otra índole). Cada tipo de estímulo desencadena un patrón característico de respuesta. La inflamación está caracterizada por los signos clínicos de eritema, calor, edema y dolor.

Las respuestas inflamatorias surgen en tres fases diferentes y cada una es mediada por mecanismos distintos: 1) Una fase transitoria aguda que se caracteriza por vasodilatación local y mayor permeabilidad capilar; 2) Una fase subaguda tardía que se identifica por infiltración de leucocitos y fagocitos, y 3) Una fase proliferativa crónica en que se advierte degeneración y fibrosis tisulares (Hardman *et al.*, 1996).

1.5.1 Fase aguda de la inflamación

En los primeros estados de una respuesta inflamatoria, las células predominantes en el tejido afectado son los neutrófilos. En respuesta a los mediadores de la inflamación aguda, las células del endotelio incrementan la expresión de E- y P-selectinas. Trombina e histamina inducen la expresión de P-selectina. Citocinas como IL-1 e IFN- γ inducen la expresión de E-selectina. Los neutrófilos expresan en su membrana ligandos de selectinas como las mucinas, esta unión fija a los neutrófilos al endotelio vascular permitiendo el "rolling" en dirección del flujo sanguíneo. Una vez en los tejidos, los neutrófilos expresan niveles elevados de receptores para quimioatrayentes y consecuentemente, dan lugar a la persistencia de quimiotaxis (Figura 4) (Sigal y Ron, 1994).

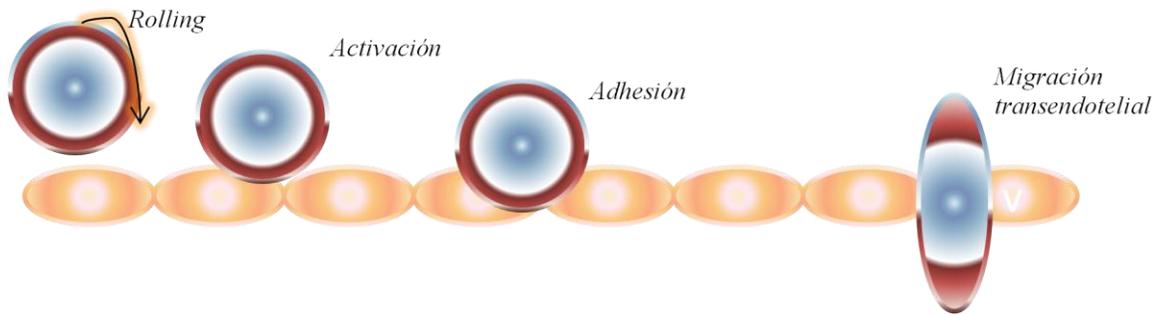


Figura 4. Proceso de la extravasación de linfocitos y PMN (neutrófilos).

Entre los mediadores de la inflamación se encuentran diversas quimiocinas, productos del complemento (C3a, C5a, entre otras), fibrinopéptidos, prostaglandinas y leucotrienos, entre las más importantes.

La respuesta inmediata del organismo ante un agente extraño es la constricción de los capilares cercanos al sitio de la infección. Segundos después, las arteriolas terminales se dilatan y los capilares muestran permeabilidad aumentada, estos cambios vasculares primeramente resultan en la liberación de serotonina a partir de células cebadas cercanas al sitio de infección.

Posteriormente, son producidos efectos similares por otros mediadores químicos como la bradicinina, los componentes del complemento (C3a y C5a), leucotrienos-B4 y prostaglandinas (PGD2, PGE2). La dilatación de las arteriolas y la permeabilidad aumentada de los capilares y vénulas postcapilares resultan en el edema característico de la inflamación y también facilita el movimiento de neutrófilos fuera de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular, las células son dirigidas a favor de gradientes de concentración de factores quimiotácticos liberados por los patógenos y otras células ya en el sitio (Figura 5) (Abul *et al.*, 1999; Goldsby *et al.*, 2001).

En el sitio de la infección los neutrófilos engloban los microorganismos invasores. Esta actividad fagocítica es aumentada por una variedad de mediadores, incluyendo el GM-CSF, IL-1 y FNT. La presencia de opsoninas en la superficie de las células blanco mejoran la unión y la fagocitosis.

Cuando se ha iniciado la fagocitosis, el neutrófilo engloba la célula blanco y forma el fagosoma, cuando los gránulos del neutrófilo se funden con su membrana y descargan su contenido, se convierte en fagolisosoma.

En el fagolisosoma se llevan a cabo los dos mecanismos de muerte celular principales. Uno de ellos es el oxidativo que resulta del estallido respiratorio, donde se producen productos tóxicos derivados del oxígeno (como el H_2O_2 y el O_2^-) en los leucocitos marcados con opsoninas. El otro mecanismo, no oxidativo, depende de una gran variedad de enzimas acidófilas oxígeno-independientes (como glucosidasas, lipasas, fosfatasas ácidas, lisozimas, nucleasas, lactoferrinasas, elastasas y colagenasas) que ejercen un mecanismo destructivo.

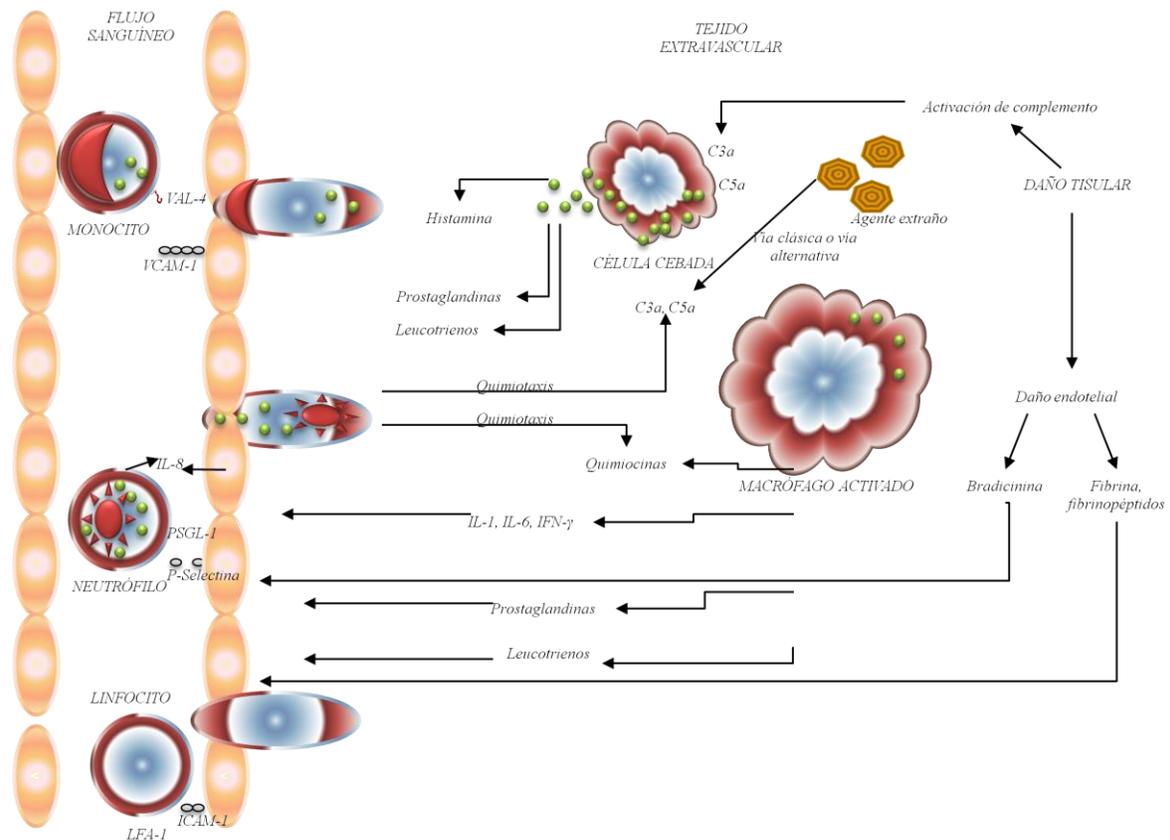


Figura 5. Células y mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria aguda de tipo local.

1.6 Fármacos antiinflamatorios

A pesar de que el desarrollo de una respuesta inflamatoria efectiva juega un papel muy importante en la defensa de un organismo, la respuesta puede ser, algunas veces, contraproducente. Alergias, enfermedades autoinmunes, infecciones microbianas y trasplantes podrían iniciar una respuesta inflamatoria crónica. Varias terapias están disponibles para reducir las respuestas inflamatorias que se prolongan, disminuyendo así las complicaciones.

Los agentes antiinflamatorios están agrupados de la siguiente manera:

- Anticitocínicos
- Antihistamínicos
- Corticoesteroides
- AINEs

1.6.1 Anticitocínicos

Una forma de reducir la extravasación de leucocitos es bloqueando la actividad de diversas moléculas de adhesión con anticuerpos. Estos compuestos son biofármacos, es decir, anticuerpos y otras proteínas recombinantes obtenidas mediante técnicas de ingeniería molecular. Como tales, su fabricación es complicada y costosa, lo que limita notablemente su utilización.

Los fármacos disponibles son infliximab y adalimumab (anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano frente a TNF- α), etanercept (un receptor de TNF unido al dominio Fc de una molécula de IgG humana) y anakinra (un antagonista de IL-1).

Las citocinas desempeñan funciones destacadas en los sistemas defensivos del huésped por lo que una terapia anticitocínica, al igual que cualquier tratamiento

que interfiera en la función inmunitaria, podría desencadenar una enfermedad latente o favorecer infecciones oportunistas (Rang *et al.*, 2008; Elenkov *et al.*, 2005).

1.6.2 Antihistamínicos

Existen tres grupos de antihistamínicos: antagonistas de los receptores H₁, H₂ y H₃. Los antagonistas de los receptores H₁ afectan a diversos mecanismos inflamatorios y alérgicos. Se utilizan principalmente para el tratamiento de las reacciones alérgicas ya que se ha demostrado que reducen la contracción de la musculatura lisa bronquial e inhibe el broncoespasmo provocado por histamina.

La histamina se encuentra en grandes cantidades en mastocitos y basófilos y es liberada durante reacciones alérgicas o inflamatorias, un ejemplo de este tipo de fármacos es la mepiramida que se utiliza en el tratamiento de la rinitis (Rang *et al.*, 2008).

1.6.3 Corticoesteroides

Los corticoesteroides incluyen fármacos como prednisona, prednisolona y metilprednisolona. Estos fármacos antiinflamatorios tienen varios efectos que resultan en la reducción las actividades de las células del sistema inmune. El tratamiento con corticoesteroides causa un decremento en el número de linfocitos circulantes como un resultado tanto de la lisis de los linfocitos inducida por los esteroides como por las alteraciones en la circulación de éstos.

Como las hormonas esteroidales, los corticoesteroides son lipofílicos y por ello, pueden atravesar la membrana plasmática y unirse a receptores que se encuentran en el citoplasma. El complejo hormona-receptor es transportado al núcleo donde se unen a secuencias reguladoras específicas de DNA, regulando así la transcripción. Los corticoesteroides han demostrado inducir el incremento de la transcripción de inhibidores de NF-κB. Mediante la unión de este inhibidor de

NF-κB en el citoplasma se previene la translocación de NF-κB en el núcleo y por ende, no hay activación de un gran número de genes de NF-κB.

También reducen la transcripción de otros genes de citocinas (incluidos los de FNT-α, IFN-γ, IL-1 e IL-2) tanto en las fases de inducción como en la fase efectora de la respuesta inmunitaria. Los corticoesteroides también contribuyen a la disminución de la fagocitosis dada por los macrófagos y neutrófilos, este efecto podría contribuir con su acción antiinflamatoria. También reducen la Quimiotaxis y la expresión de moléculas del MHC así como de IL-1 (Murphy *et al.*, 2008).

1.6.4 AINEs

Los analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los fármacos más utilizados para el tratamiento del dolor y la inflamación. El mecanismo principal mediante el cual este grupo de fármacos demuestran su actividad antiinflamatoria es la inhibición de la vía de las ciclooxygenasas que producen prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. La reducción de la producción de prostaglandinas limita el incremento en la permeabilidad vascular así como la quimiotaxis de los neutrófilos.

Los AINEs llevan a cabo tres acciones farmacológicas principales que se deben a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en las células inflamatorias a través de la inhibición de la isoforma de ciclooxygenasa (COX)-2. Las acciones son las siguientes:

Acción antiinflamatoria: la disminución de prostaglandina E2 y prostaciclina provoca una reducción de la vasodilatación y, de modo indirecto, un menor edema. La acumulación de células inflamatorias no se ve reducida.

Acción analgésica: la menor generación de prostaglandinas origina una menor sensibilización de las terminaciones nerviosas nociceptoras por los mediadores inflamatorios, como bradicinina y 5-hidroxitriptamina.

Acción antipirética: La IL-1 libera prostaglandinas en el sistema nervioso central, como consecuencia de ello se eleva el punto de ajuste hipotalámico de control de la temperatura y se produce fiebre. Los AINEs, al estar inhibiendo la producción de prostaglandinas, mediante la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2, disminuyen indirectamente la fiebre.

A pesar del gran uso de este tipo de fármacos, su uso está limitado por los efectos gastrointestinales que conlleva su consumo, ya que los AINEs inhiben tanto la COX-1 como la COX-2. La inhibición de ésta última es la causa de los efectos antiinflamatorios de los AINEs y por ello se han desarrollado nuevas generaciones de fármacos que sean específicos para la COX-2. De manera polémica, se ha propuesto que estos fármacos y en especial, los inhibidores selectivos para la COX-2, incrementarían la probabilidad de acontecimientos trombóticos como el infarto al miocardio (Rang *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2010; Hardman *et al.*, 1996).

1.7 Citocinas y FILM

El efecto del FILM (solo o con el uso de PMA) sobre la expresión de citocinas proinflamatorias (linfotactina, RANTES, IP-10, MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-1, IL-8 y I-309) y sus receptores, ha sido estudiado en monocitos humanos, usando el FILM en concentraciones similares a las que se ha demostrado que tiene efecto *in vivo* e *in vitro*. Se ha demostrado que el FILM con PMA inhibe la expresión de IL-1 β , IL-5 e IL-6 sin afectar la producción de IL-10.

Se ha demostrado que el FILM *per se* tiene la capacidad de activar inespecíficamente a las células TCD4+ e inducir un incremento en la producción de citocinas. En contraste, en células incubadas con PMA + FILM se ha documentado que la producción de IFN- γ y de IL-1 β es inhibida; por otro lado, se incrementa la producción de IL-10, la cual es la citocina antiinflamatoria prototipo (Rojas *et al.*, 2009).

Es probable que el FILM actúe mediante una cascada de señalización, la cual active a factores de transcripción como el NFκB y después de su translocación en el núcleo se una a sitios regulatorios de un gran número de genes implicados con la producción de citocinas. Se ha demostrado también que el FILM inhibe la expresión de proteínas inflamatorias como MIP-1α y MIP-1β las cuales regulan la vía de activación de NFκB.

El FILM *per se* induce un incremento en la producción de receptores CCR5 y CCR4. Sin embargo, al estar en presencia de PMA, la producción de estos receptores disminuye. Estos receptores son esenciales para el reclutamiento de los leucocitos durante la inflamación.

El efecto del FILM sobre las citocinas podría explicar la inhibición de las células Th1 (dada por la baja producción de IL-1β/CCR5, IFN-γ/CCR5) observada en el absceso hepático amibiano así como el incremento de la respuesta Th2 (dado por la producción no modificada de IL-10/CCR4).

El mecanismo preciso en que el FILM ocasiona los efectos biológicos antes mencionados es desconocido y, a pesar de los cambios en las células, la viabilidad celular es buena sin embargo, se sabe que una sobreactivación celular podría matar a las células y no se han reportado estudios del FILM sobre la apoptosis o necrosis que pudiera estar generando en las células (Utrera *et al.*, 2003; Velázquez y Kretschmer, 2004).

1.8 Necrosis

Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

Por ejemplo, el aporte insuficiente de sangre al tejido o isquemia, un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos, una infección, o el desarrollo de una enfermedad autoinmune o de otro tipo. La

necrosis es un proceso pasivo e incontrolado que afecta a un número considerable de células y que además es independiente de energía.

Los principales cambios morfológicos que ocurren con la necrosis incluyen el aumento de tamaño de la célula, formación de vacuolas citoplasmáticas, retículo endoplasmático extendido, cambios morfológicos en la mitocondria, desintegración de ribosomas, ruptura de los organelos ligados a la membrana, ruptura de lisosomas y eventualmente, ruptura de la membrana (Tabla 3) (Figura 6). Una vez que se ha producido y desarrollado, la necrosis es irreversible. La pérdida de la integridad de la membrana resulta en la liberación del contenido citoplasmático hacia el tejido circundante, enviando de esta manera, señales quimiotácticas con el eventual reclutamiento de células inflamatorias (Elmore, 2007).

| Diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis | |
|--|---|
| APOPTOSIS | NECROSIS |
| Células aisladas o un grupo pequeño de células | Frecuentemente, células contiguas |
| Encogimiento celular | Aumento de tamaño (hinchazón) celular |
| Picnosis y cariorrhexis | Cariolisis, picnosis, cariorrhexis |
| Membrana celular intacta | Membrana celular alterada |
| Formación de cuerpos apoptóticos | Liberación del contenido citoplasmático |
| Sin inflamación | Inflamación |

Tabla 3. Principales diferencias entre el proceso de necrosis y el proceso de apoptosis.

1.9 Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso normal y conservado a través de la evolución y en los organismos es crucial para el desarrollo adecuado de las células. Es importante para la terminación de las respuestas inmunes después de una infección. También tiene un rol importante en el desarrollo de los linfocitos ya que remueve los linfocitos que no pueden generar receptores de

antígeno funcionales o bien, que producen receptores potencialmente autorreactivos.

La apoptosis es un proceso inducido por señales extracelulares y comprende una serie de procesos que incluyen encogimiento de la membrana plasmática, cambios en la distribución de ésta y fragmentación enzimática del DNA cromosomal (Figura 6) (Elmore, 2007).

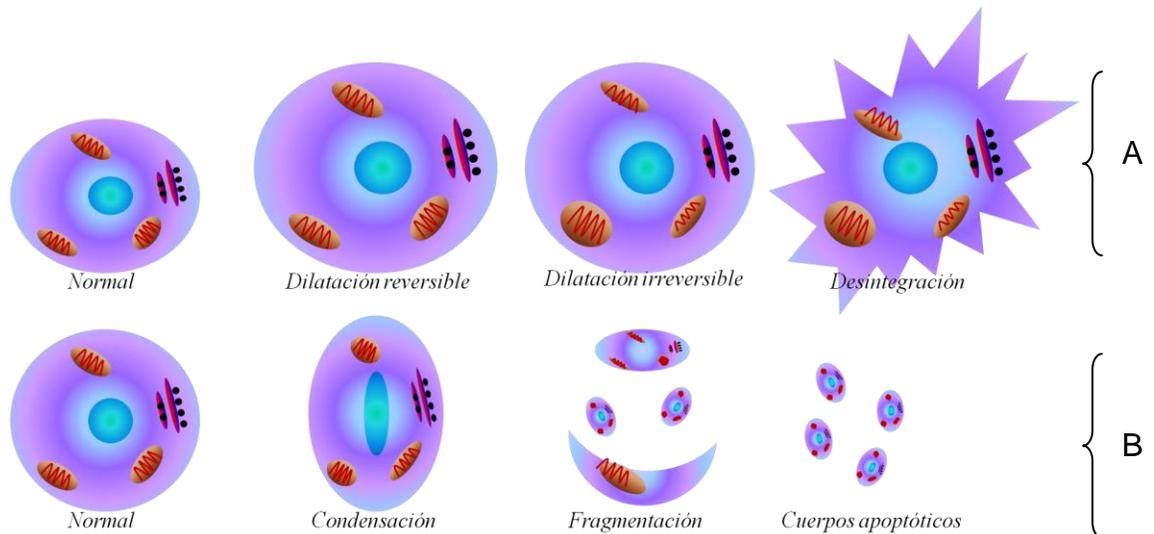


Figura 6. Principales diferencias entre necrosis (A) y apoptosis (B).

1.9.1 Vías involucradas en la apoptosis

Existen dos vías involucradas en la señalización de la muerte celular. Una es llamada la vía extrínseca de la apoptosis, que es mediada por la activación de “receptores de muerte” por ligandos extracelulares. La otra vía es conocida como vía intrínseca o vía mitocondrial de la apoptosis y está mediada por estímulos como la radiación UV, fármacos quimioterapéuticos, inanición o falta de factores de crecimiento necesarios para la sobrevivencia (Abul *et al.*, 1999; Elmore, 2007; Goldsby *et al.*, 2001).

Las dos vías tienen en común la activación de proteasas especializadas llamadas proteasas de cisteína ácido aspártico específica o caspasas.

1.9.2 Caspasas

Las caspasas son sintetizadas como pro-caspasas inactivas, en donde el dominio catalítico es inhibido por un pro-dominio adyacente. Las pro-caspasas son activadas por otras caspasas que escinden la proteína para liberar el pro-dominio inhibitorio. Hay dos clases de caspasas involucradas en las vías apoptóticas: las caspasas iniciadoras que promueven la apoptosis mediante el rompimiento y activación de otras caspasas, y las caspasas efectoras que son las que inician los cambios celulares asociados con la apoptosis. La caspasa que mejor se ha caracterizado en el contexto de la vía común es la caspasa 3 la cual tiene, entre otros sustratos, a la DNasa activada por caspasas (CAD). La CAD es una nucleasa latente que puede escindir al DNA cromosómico en fragmentos del tamaño de nucleosomas, pero que es mantenida bajo control de un inhibidor denominado ICAD. La CAD activada es responsable, en parte, de la fragmentación del DNA que caracteriza a la apoptosis (Murphy *et al.*, 2008).

1.9.3 Apoptosis vía extrínseca

La vía extrínseca de la apoptosis utiliza la caspasa iniciadora 8, mientras que la vía intrínseca utiliza la caspasa 9. Ambas vías usan las caspasas 3, 6 y 7 como caspasas efectoras. Las caspasas efectoras rompen una gran variedad de proteínas que son críticas para la integridad celular y también activan enzimas que promueven la muerte celular. Por ejemplo, las caspasas efectoras rompen y degradan las proteínas nucleares como la lámina B, que es requerida para la integridad estructural del núcleo, y además activan las endonucleasas que fragmentan el DNA cromosomal.

En la vía extrínseca, el receptor Fas se expresa en la membrana citoplasmática y se une a su ligando, lo que lleva a la oligomerización del receptor (trimerización). Los receptores de muerte poseen también un dominio intracelular denominado

dominio de muerte. El proceso de trimerización del receptor lleva a la unión de proteínas adaptadoras como FAD en la región intracelular.

El complejo Fas y FAD atrae a este sitio a una caspasa iniciadora inactiva llamada procaspasa 8 la cual es activada mediante un corte proteolítico. En la hoja interna de la membrana plasmática se tiene la formación de varios de estos complejos dentro de la célula. La proteólisis de procaspasa 8 separa el prodominio generando caspasa 8, una nueva ruptura produce un fragmento grande y otro pequeño los cuales se asocian para formar un tetrámero, la caspasa 8 activa. El proceso de activación se amplifica por el gran número de caspasa 8 que se activan. Estas moléculas conllevan a la muerte celular, producto del procesamiento directo de otras proteasas de la misma familia como caspasa 3 (Figura 7) (Elmore, 2007).

1.10 Apoptosis vía intrínseca

La apoptosis por vía intrínseca es activada cuando la célula está sometida a un periodo de estrés por la exposición a estímulos nocivos o bien, no recibe señales extracelulares que son requeridas para su sobrevivencia. En el caso de estímulos nocivos, el factor de respuesta al daño, la proteína *p53* reconoce la ruptura del DNA, se activa y une a promotores de genes que codifican para proteínas proapoptóticas (Elmore, 2007; Duncke y He, 2011).

El paso crítico es la liberación de citocromo *c* de la mitocondria, evento que libera la activación de caspasas. Una vez en el citoplasma, citocromo *c* se une a la proteína llamada Apaf-1 (factor 1 activador de proteasa apoptósica), estimulando su oligomerización dependiente de ATP. Después, el oligómero de Apaf-1 recluta un iniciador de caspasa, pro-caspasa 9. La agregación de pro-caspasa 9 permite su propia ruptura y queda como caspasa 9 activa. El complejo de citocromo *c*/ Apaf-1/ caspasa 9 se llama apoptosoma. El apoptosoma rompe de forma proteolítica a pro-caspasa 3 y genera caspasa 3 activa que inicia una cascada de

reacciones que culminan con la muerte celular (Figura 7) (Mammucari y Rizzuto, 2010).

Otras proteínas mitocondriales liberadas contribuyen a la activación de las caspasas de una forma menos directa. Las caspasas activadas en el citoplasma se asocian a una familia de inhibidores, conocidos como IAP (inhibidores de la apoptosis) que las mantienen bajo control. Dos proteínas mitocondriales liberadas durante la apoptosis, Smac/Diablo y Omi/HtrA2, se unen a los IAP y antagonizan su actividad, promoviendo de esta forma la actividad de las caspasas y la inducción de la apoptosis. La mitocondria también libera otra molécula, AIF (factor inductor de apoptosis), que participa en la inducción de muerte celular (Lindsay *et al.*, 2011).

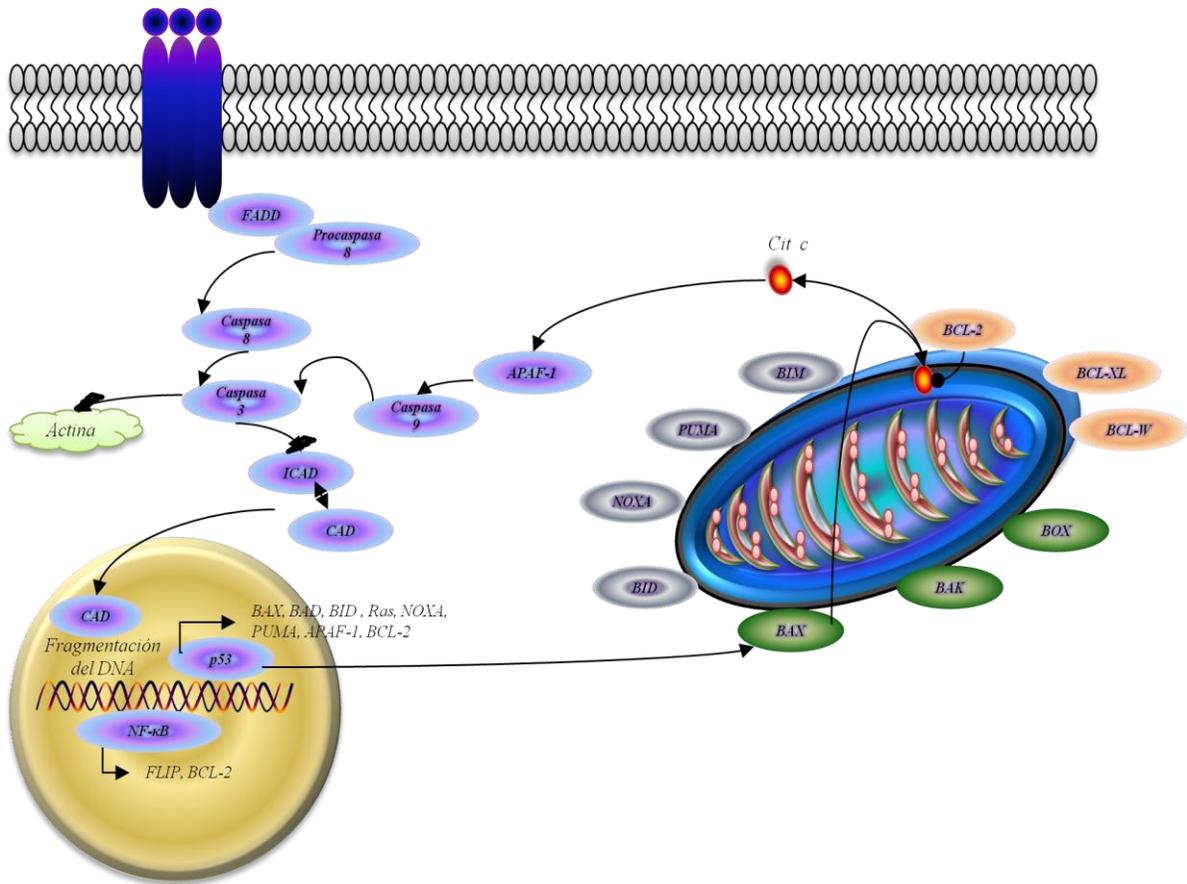


Figura 7. Aspectos fundamentales en la señalización de la apoptosis vía extrínseca (receptor de muerte) y vía intrínseca (mitocondrial que conlleva la liberación de citocromo c). Ambas vías tienen el punto de unión en la caspasa 3 activa y dan como resultado alteraciones transcripcionales que finalmente, inducen a la muerte celular.

1.10.1 Citocromo c

El citocromo c es una proteína de 104 aminoácidos (15kDa) que participa tanto en la cadena de transporte de electrones como en la apoptosis. La molécula es sintetizada en el citoplasma y subsecuentemente, es transportada a la cara externa de la membrana interna de la mitocondria, en el espacio intermembranal donde se asocia a una molécula con grupo hemo formando así, el citocromo c funcional. En el espacio mitocondrial, el citocromo c está involucrado en la cadena de transporte de electrones ya que se encarga de transportar electrones desde el complejo citocromo c reductasa hacia el complejo citocromo c oxidasa.

Alternativamente, y en respuesta a señales apoptóticas, el citocromo *c* puede ser liberado de la mitocondria y dirigirse hacia el citoplasma en donde continúa con señales apoptóticas (Skommer *et al.*, 2010).

1.10.2 Familia de proteínas Bcl-2

La liberación de citocromo *c* es controlada por interacciones entre los miembros de la familia de proteínas Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2 tienen como característica la presencia de uno o más dominios homólogos de Bcl-2 y pueden ser divididos en 2 grupos principales: los que promueven la apoptosis y los que inhiben la apoptosis. Algunos miembros de la familia proapoptótica Bcl-2 como Bak, Bax y Box, se unen a la membrana mitocondrial y pueden, directamente, causar la liberación de citocromo *c*.

Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 son inducidos por estímulos que promueven la supervivencia celular. El más conocido es el Bcl-2. El gen Bcl-2 fue el primer identificado como un oncogen en el linfoma de células B y su sobreexpresión en tumores hace que las células sean más resistentes a los estímulos apoptóticos y esto ocasiona que el cáncer sea más progresivo e invasivo y difícil de tratar. Las proteínas antiapoptóticas de Bcl-2 (que incluye a Bcl-X_L y Bcl-W) se unen a la membrana mitocondrial y no permiten la liberación de citocromo *c*.

Un tercer grupo de las proteínas Bcl-2 funciona como centinela y son activados por estímulos apoptóticos. Una vez activadas, estas proteínas (que incluye Bad, Bid y PUMA) pueden tanto actuar como bloqueadores de la actividad de las proteínas antiapoptóticas, es decir, actúan como proapoptóticos o bien, pueden actuar directamente, estimulando la actividad de las proteínas proapoptóticas (Tabla 4) (Lindsay *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2010; Danial *et al.*, 2010; Franklin, 2011; Skommer *et al.*, 2010).

| Familia Bcl-2 | | | |
|----------------------|------------------------------|--|----------------------|
| Grupo I | Antiapoptótico | Contienen típicamente 4 dominios de homología Bcl-2 (BH) | Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W |
| Grupo II | Proapoptótico | Múltiples dominios | Bax, Bak, Box |
| Grupo III | Proapoptótico/Antiapoptótico | Un dominio BH3 | Bid, Bim, PUMA, Noxa |

Tabla 4. Miembros de la familia Bcl-2 que están implicados en el control de la apoptosis, estimulándola o bien, inhibiéndola.

2. Planteamiento del problema

Se ha estudiado el efecto del FILM sobre el sistema inmunológico tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* y se ha encontrado que actúa sobre diversas células responsables de la inflamación. Sin embargo, se desconoce si el efecto sea propiamente por inhibir vías de señalización intercelular o bien, por estar actuando sobre las células para inducir apoptosis y de esta manera evitar que se lleve a cabo el proceso inflamatorio.

Dado que la vía de la apoptosis puede ser activada por diferentes señales extracelulares, es necesario delimitar si es apoptosis vía intrínseca o extrínseca. La apoptosis vía intrínseca toma una importancia relevante debido a que está indicando un daño a la célula el cual podría ser en el DNA que conlleva a la activación de genes proapoptóticos y de esta manera podría inducir la liberación de citocromo *c* del espacio intermembranal de la mitocondria.

Ante la necesidad de buscar nuevas estrategias del tratamiento de la inflamación debido a los diversos efectos adversos que presentan los fármacos antiinflamatorios que existen en la actualidad, el FILM podría ser, en dado caso que no produzca apoptosis, un candidato de estudio para poder ser un fármaco utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

3. Objetivo

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) que es producido por *Entamoeba histolytica* sobre la apoptosis y si ésta es sobre la vía intrínseca en un modelo de linfocitos TCD4+.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar la concentración óptima de PMA y FILM para inducir la activación en linfocitos TCD4+.
- Evaluar el efecto del FILM sobre la inducción de muerte celular en linfocitos TCD4+.
- Evaluar si el FILM produce o no apoptosis y de esta manera poder documentar este efecto del FILM para considerarlo como posible fármaco antiinflamatorio.
- Evaluar el efecto del FILM sobre la vía intrínseca de la apoptosis.
- Determinar el porcentaje de apoptosis y necrosis generada por el FILM.
- Evaluar los cambios morfológicos de las células al ser sometidas a diferentes tratamientos.

4. Material y métodos

4.1 Separación de linfocitos TCD4+

Los linfocitos fueron separados de sangre venosa heparinizada, aproximadamente 50 mL, obtenida de donadores no fumadores sanos, donada por el Banco de Sangre de CMN Siglo XXI. La sangre fue diluida 1:3 con Buffer de fosfato salino (PBS1x; pH=7.2).

La muestra de sangre diluida se repartió en diferentes tubos que contenían 4mL de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) con un gradiente de densidad de 1.077. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 2000rpm por 30 minutos (Böyum, 1968). Después de la centrifugación se tomaron las células mononucleares que se encontraban en la interface del plasma y el paquete eritrocitario, y se llevaron a otro tubo que contenía PBS. Se centrifugó a 1350 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y los botones se resuspendieron en un solo tubo. Se centrifugó nuevamente, a 1350 rpm por 10 min y el botón obtenido se resuspendió en 2 mL de Buffer PBS.

Se tiñeron las células con azul de tripano (Figura 8), para observar viabilidad celular. Las células vivas con la membrana celular intacta no son coloreadas debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana. En las células viables, el azul de tripano no es absorbido; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas. Debido a que las células vivas son excluidas de la tinción, este método también es llamado método de tinción por exclusión (González *et al.*, en línea). Inmediatamente después de la tinción, se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer para la cuantificación de células viables.

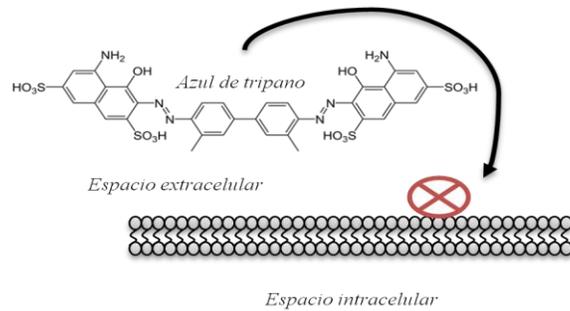


Figura 8. Fundamento de la tinción celular con azul de tripano en donde una célula con membrana intacta (viable) no permite la entrada de este colorante y por lo tanto no es coloreada.

Después del conteo, se repartió el volumen de células de tal manera que en cada tubo se tuvieran 1×10^7 células y se les agregó 1 mL de Buffer PBS-Albumina-EDTA (0.001M) para reconstituir y homogenizar para posteriormente, centrifugar a 1500 rpm durante 10 min. Se quitó todo el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 40 μ L de Buffer.

Para la separación de linfocitos TCD4+ se utilizó el kit de purificación de células T (Miltenyi Biotec, Alemania).

La purificación de células T se llevó a cabo mediante un selección negativa donde todas las células no-T, por ejemplo células B, células dendríticas, PMNs y eritrocitos, son marcadas con un cocktail de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina anti CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 y glicoforina A como primer agente marcado, y anticuerpos monoclonales conjugado con microperlas, como reactivo secundario.

Después de resuspender 1×10^7 células en 40 μ L de Buffer PBS-Albúmina-EDTA, se les adicionó 10 μ L del cocktail de anticuerpos marcados con biotina, se mezcló y se incubó por 10 minutos a 4°C. Se les adicionó 30 μ L de Buffer PBS-Albúmina-EDTA por cada 1×10^7 células. Inmediatamente después se les adicionó 20 μ L de las microperlas anti-biotina por cada 1×10^7 células, se mezcló y se dejó incubar por 15 minutos a 4°C.

Se lavaron las células con Buffer PBS-Albúmina-EDTA a un volumen de 10x del volumen inicial y se centrifugaron a 1500rpm por 10 minutos. Se quitó el sobrenadante completamente. Las células se resuspendieron en 500 µL de Buffer PBS-EDTA, y se procedió a la separación magnética.

La separación magnética se llevó a cabo con una columna empaquetada MS. Ésta se lavó previamente con 500 µL de Buffer PBS-EDTA para después aplicar la suspensión celular, en donde las células eluyentes, era la fracción enriquecida de células T.

4.2 Cultivo celular

Las células TCD4+ obtenidas de la separación negativa, se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Se resuspendieron en 2mL de medio RPMI complementado con antibióticos (penicilina, gentamicina, estreptomycin), suero fetal bovino (10%), glutamina 100u/mL y piruvato de sodio 1%. Una porción se tiñó con azul de tripano, se observó al microscopio en la cámara de Neubauer y se cuantificaron. Se colocó en cada pozo de una placa de cultivo estéril 5×10^5 células. Se incubó por 24 horas a 5% de CO₂ y a 37°C de acuerdo a las siguientes condiciones:

- **MEDIO (células + medio RPMI complementado),**
- **FILM (células + 50µg (*concentración óptima) de FILM),**
- **PMA (células + 50ng (*concentración óptima) de PMA(forbol 12-miristato-13-acetato),**
- **FILM + PMA (células + 50ng de PMA + 50µg de FILM, y**
- **ACT D (células + 1µg/mL de Actinomicina D).**

4.2.1 *Concentración óptima de PMA y FILM*

Para conocer la concentración óptima del FILM se colocaron 5×10^5 linfocitos TCD4+ en placas de 24 pozos y se incubaron por 24 h con diferentes concentraciones del FILM (10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$). Para el caso de la concentración óptima de PMA, se colocaron 5×10^5 linfocitos TCD4+ y se incubaron por 24 h con diferentes concentraciones de PMA (10, 20, 50, 100 ng/mL). Para determinar la concentración óptima se tomó la evaluación de la expresión de un marcaje doble positivo para CXCR-3/CD69. El CXCR-3 es un receptor de quimiocinas que solo se expresa en células activadas.

Por otro lado, se llevó a cabo un inmunoblot el cual consistió en detectar las interleucinas IL-10, IL-2, IL-4 e IFN- γ en diferentes concentraciones del FILM (1, 10, 50 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$). Esto se realizó ya que el Western Blot es la técnica analítica más utilizada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separaron las proteínas atendiendo al criterio de peso molecular. Luego fueron transferidas a una membrana adsorbente de nitrocelulosa y se buscaron las interleucinas con anticuerpos específicos para ellas. Finalmente, se detectó la unión antígeno-anticuerpo por actividad de fluorescencia.

El PMA es un activador de cinasas de proteína, las cuales están involucradas en el crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular. La activación de cinasas de proteína, en especial la C (PKC) es mediante la activación por el Ca^{2+} y por el diacilglicerol (DAG), en ausencia de estos segundos mensajeros, PKC tiene una afinidad muy baja por la membrana y se localiza en el citosol. La activación estimulada por agonistas de fosfolipasas tipo C, genera DAG e inosíoles fosfatos solubles que permiten la liberación de Ca^{2+} de los reservorios. La unión del DAG o de ésteres de forbol y de Ca^{2+} incrementa la unión fosfatidilserina al dominio regulatorio que resulta en la remoción del sitio catalítico y el inicio de cascadas de señalización que concluyen en alteraciones morfológicas, de expresión de receptores y diferenciación celular (Cubillos, 2007).

La actinomicina D (Figura 9) se utiliza principalmente para inhibir la transcripción, esto es mediante la unión al DNA en el complejo de iniciación de la transcripción y evitando así, la elongación por la RNA polimerasa. Como la actinomicina D se une al DNA bicatenario, interfiere con la replicación del DNA y de esta manera, es un inductor de la apoptosis (Cubillos, 2007).

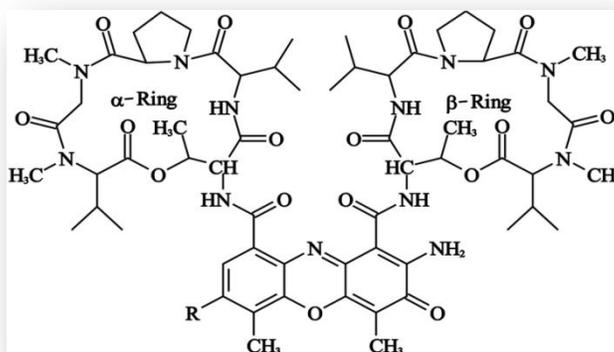


Figura 9. Estructura química de la actinomicina D que se une al DNA, interfiriendo así, con la replicación.

4.3 Citometría de Flujo

Después de la incubación con cada uno de los diferentes tratamientos, las células fueron centrifugadas y separadas. El sobrenadante se congeló para su uso posterior, y el paquete celular se utilizó para llevar a cabo la cuantificación de apoptosis por citometría de flujo y la cuantificación de citocromo c por el método de ELISA.

Las células se lavaron con PBS 1x y se marcaron con 10µL de yoduro de propidio por cada millón de células y con 5 µL de anexina V-FITC también por cada millón de células. Se incubaron en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después, para su captura y análisis se utilizó un citómetro de flujo FACSaria de Becton Dickinson®. Se realizaron cinco experimentos independientes con 6 repeticiones cada uno.

El yoduro de propidio es un fluorocromo para marcar ácidos nucleicos. El marcaje con yoduro de propidio permite la diferenciación de las células viables, de las células apoptóticas tempranas y de las células apoptóticas tardías.

La anexina-V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. En la apoptosis la integridad de la membrana se mantiene como un evento temprano, sin embargo, presenta cambios en su simetría como lo es la distribución de la fosfatidilserina; fosfolípido que se encuentra orientado hacia el interior de la célula, y cuando ésta entra en el proceso de muerte por apoptosis, cambia hacia el exterior. Para detectar este cambio se agrega anexina V, molécula que no se difunde a través de la membrana y que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, por lo que las células que se encuentran marcadas con anexina V, son las que se encuentran en apoptosis. La detección con anexina-V y yoduro de propidio nos permite diferenciar a las células en apoptosis de aquéllas en necrosis (Figura 10) (González *et al.*, en línea).

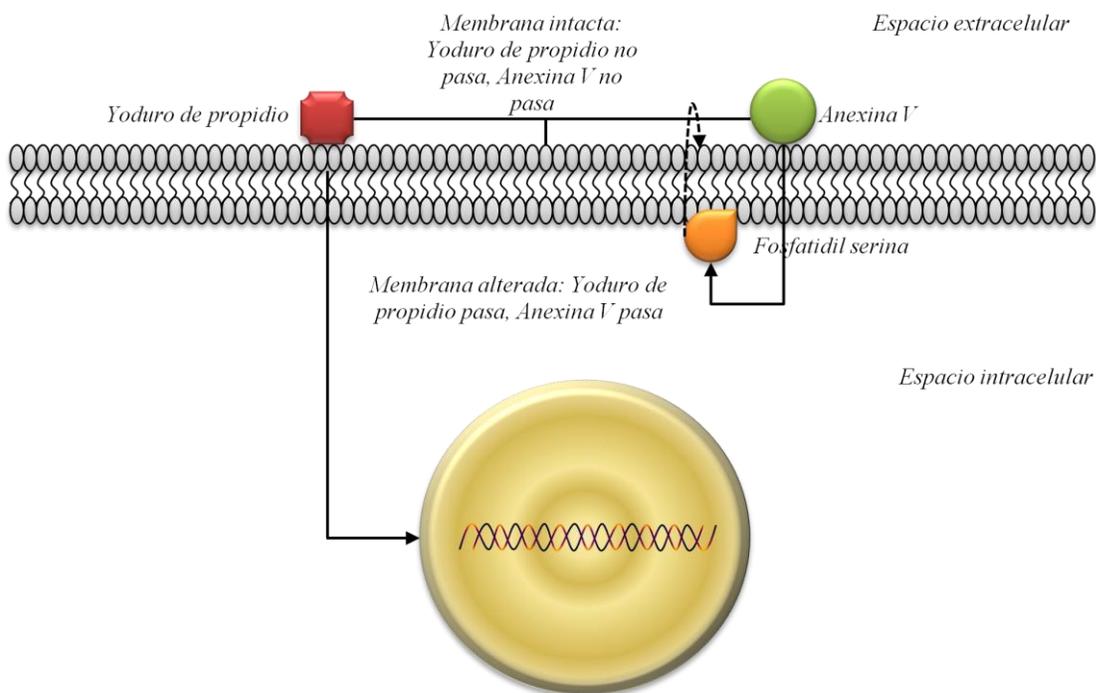


Figura 10. Fundamento del marcaje celular con yoduro de propidio-ficoeritrina (FE) y anexina V-isotiocianato de fluoresceína (ITCF).

La citometría de flujo es un proceso que permite que las células pasen (500-4000/seg) en fila a través del aparato. El FACS (separación celular activado por fluorescencia) proporciona datos tales como el tamaño relativo, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma, y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora. Si la célula va marcada con un fluoróforo, la luz fluorescente se procesa a través del fotomultiplicador. El FACS posee una unidad de separación que ofrece la posibilidad de separar subpoblaciones seleccionadas. La computadora produce un histograma o un despliegue de dos parámetros (dot plot) a partir de la luz dispersada por las células o por la fluorescencia. En nuestro caso, se obtuvieron dot plots bajo la característica de fluorescencia de las células la cual las ubicaría en los diferentes cuadrantes del dot plot (Figura 11) (Salgado, 2002).

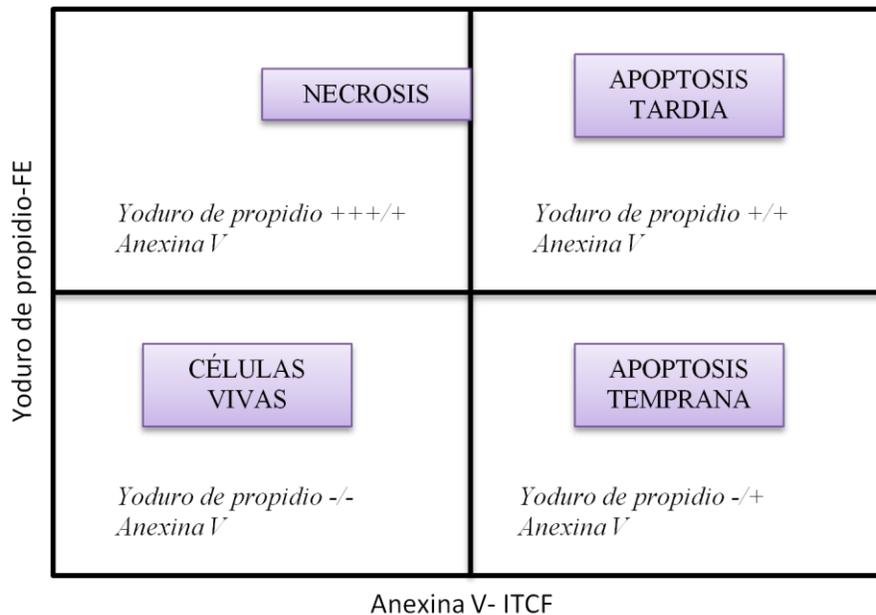


Figura 11. Figura esquemática e ilustrativa de un dot plot en donde, de acuerdo al marcaje que se lleva a cabo, las células se dividen en los cuatro diferentes cuadrantes.

4.4 ELISA

Las células obtenidas de la separación celular se utilizaron para la cuantificación de citocromo *c* mediante la técnica de ELISA tipo sándwich utilizando un kit para citocromo *c* (cytochrome *c* ELISA kit, Calbiochem®, No. cat. QIA74). Las células se lavaron 2 veces en PBS frío y se resuspendieron en el Buffer de lisis a una concentración de 1.5×10^6 células/mL. Se incubaron por 1 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos y se obtuvo el sobrenadante el cual se mantuvo en congelación (70°C) hasta su uso.

Se removieron los excesos de tiras de la placa de 96 pozos. Se agregó a cada pozo 100 µL 1X de diluyente calibrador RDP5 (Buffer concentrado de base proteica). Después se agregó a cada pozo 100 µL de muestra (el sobrenadante obtenido de la lisis celular) o de estándar (para el caso de la curva estándar). Se cubrió con cinta adhesiva y se incubó por 2 h a temperatura ambiente.

Se aspiró cada pozo y se lavó 4 veces con 400 µL de Buffer; después del último lavado, se golpeó la placa para quitar cualquier excedente de Buffer.

Se agregó 200 µL de anti-citocromo *c* conjugado (anticuerpo monoclonal murino anti-citocromo conjugado con peroxidasa de caballo de mar). Se cubrió con cinta adhesiva y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó y se quitó cualquier excedente.

Se agregó 200 µL de solución de sustrato (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina, que se mezclaron al momento del uso) en cada pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz.

Se agregó 50 µL de solución de paro (ácido sulfúrico 2N) a cada pozo y se agitó lentamente.

Se determinó la densidad óptica a 450 nm para cada pozo dentro de los primeros 30 minutos después de agregar la solución de paro.

El Kit de citocromo *c* emplea una técnica de inmunoensayo enzimático tipo sándwich. Un anticuerpo específico para citocromo *c* ha sido colocado previamente en la placa de estudio. Los estándares y las muestras son colocados en los pozos y cualquier citocromo *c* que exista en aquéllas se une al anticuerpo inmovilizado. Después de los lavados, las uniones inespecíficas o bien, las que no se unieron a anticitocromo *c*, son eliminadas y se agrega el anticuerpo monoclonal anti-citocromo *c* conjugado, se agrega la solución de sustrato de esta enzima y el color que se manifiesta es proporcional al citocromo *c* que se encuentra unido al anticuerpo que está inmovilizado en la placa. La reacción que genera el producto colorido se detiene con ácido sulfúrico y entonces puede ser cuantificado (Figura 12).

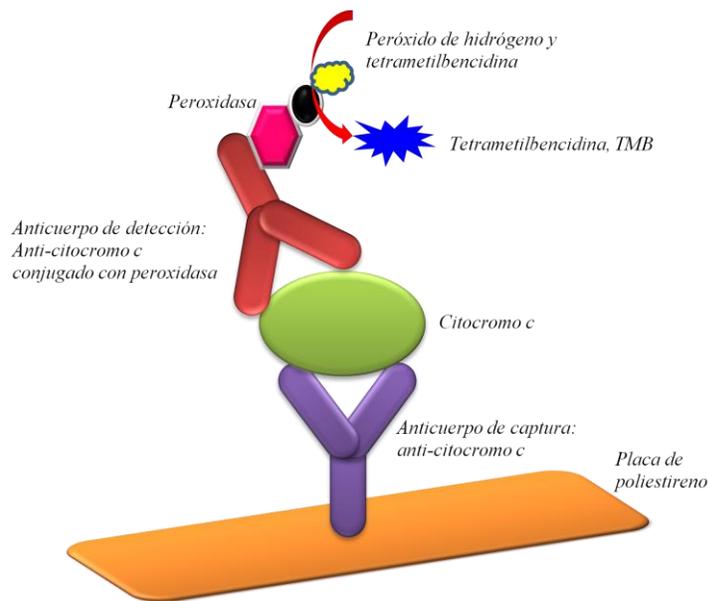


Figura 12. Fundamento del ensayo de ELISA para la detección de citocromo *c*.

4.5 Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como la media \pm desviación estándar. $n=6$. Cada barra representa el promedio de 5 experimentos independientes (interdía). La comparación estadística entre grupos se llevó a cabo usando la prueba de U de Mann-Whitney. La diferencia significativa fue considerada cuando $p \leq 0.05$.

5. Resultados y discusión

Debido a que el FILM es un péptido que actúa de manera general en la célula, fue importante saber las concentraciones óptimas para la activación de los linfocitos TCD4+ ya que de esta manera se puede trabajar bajo las diferentes técnicas de inmunodetección, en este caso correspondió a la citometría de flujo y a la ELISA.

El PMA es un activador de PKC que enciende cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} y que conllevan a cambios genéticos que se traducen en cambios morfológicos como son: mayor cantidad de receptores membranales o activación de éstos, cambios en el citoesqueleto, cambios en el proceso de interacción intercelular, cambios en el ciclo celular y principalmente, la diferenciación celular, maduración y función de las células (Figura 13). Por ello, fue importante evaluar la concentración óptima de PMA y así, en conjunto con el FILM, las células tratadas, responderían a los tratamientos de manera óptima. La concentración a la cual las células tuvieron una mejor respuesta que se tradujo en la presencia de receptores para quimiocinas como lo fue el CXCR3, fue de 50 ng/mL para PMA (Gráfico 1), y 50 $\mu\text{g/mL}$ para el FILM (Gráfico 2).

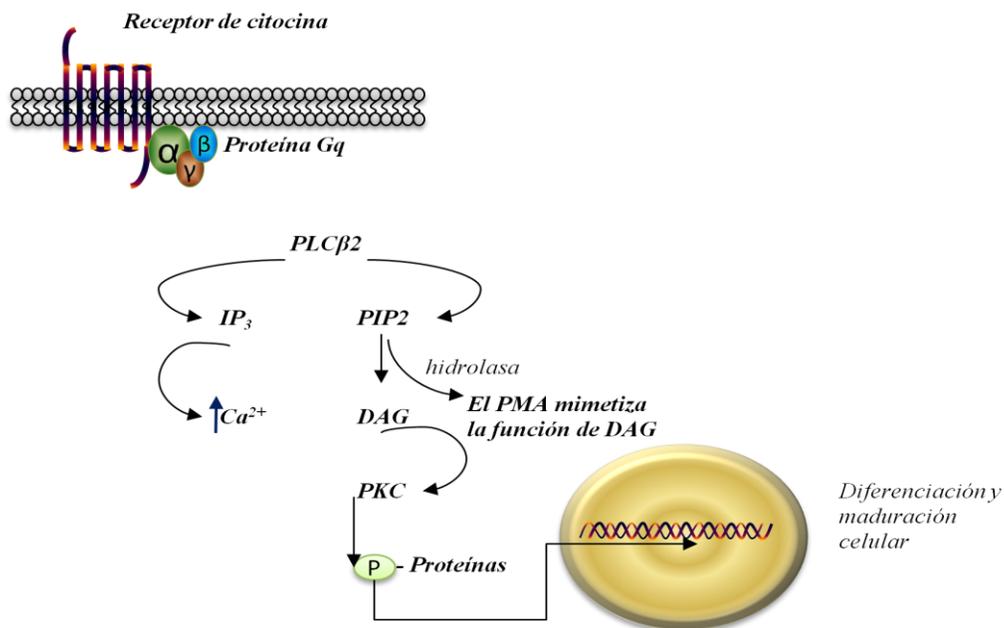


Figura 13. Vía de señalización de la activación de PKC y la función del PMA sobre esta vía.

En estudios previos (Rojas S, 2009) se encontró que el FILM actúa como un inductor inespecífico de citocinas, de forma dosis-dependiente (Figura 14). Se encontró que a concentraciones del FILM de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se induce la expresión de las interleucinas IL-10, IL-4, IL-2 e IFN- γ . Estos resultados concuerdan con que la dosis óptima de FILM es de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para poder llevar a cabo cambios celulares de manera positiva y así poder estudiar los efectos sobre la respuesta inmunitaria.

5.1 Concentración óptima de PMA

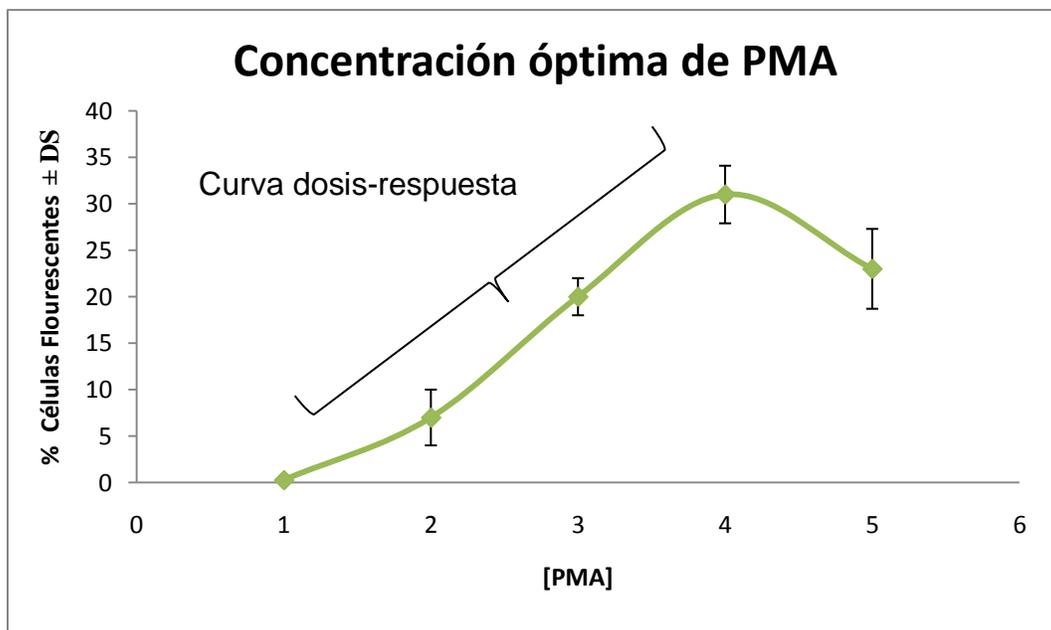


Gráfico 1. Se evaluó el porcentaje de la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 en linfocitos TCD4+ activados con diferentes concentraciones de PMA. En el medio sin estímulo, 0.28% de las células presentaron el receptor de quimiocinas CXCR3. Los linfocitos TCD4+ estimulados con PMA 10, 20, 50 y 100 ng/mL las células expresaron el receptor de quimiocinas CXCR3 en 7, 20, 31 y 23%, respectivamente. La concentración óptima para la activación de linfocitos TCD4+ fue de 50ng/mL.

5.2 Concentración óptima de FILM

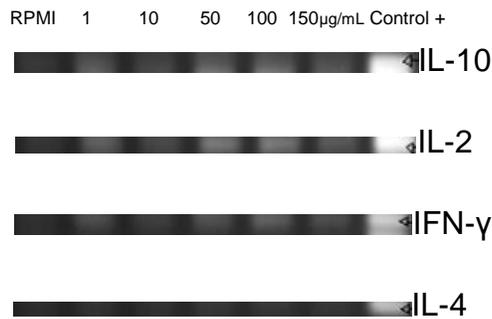


Figura 14. Efecto del FILM sobre la producción de citocinas en donde se observa que a concentraciones mayores de 100 µg/mL, la producción de citocinas es disminuida por lo que es un efecto dosis-dependiente. Imagen tomada de Rojas S, 2009.

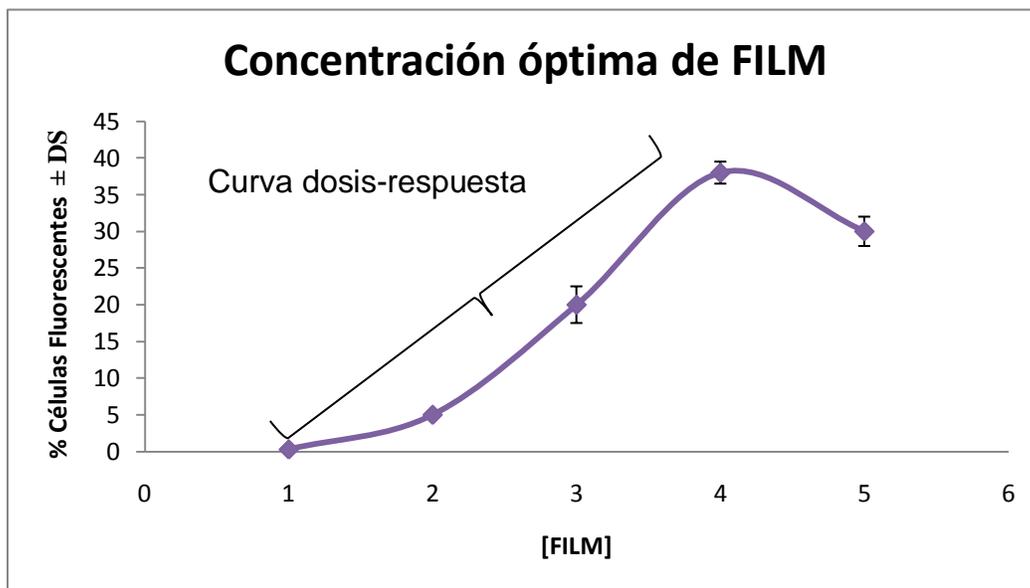


Gráfico 2. Se evaluó el porcentaje de la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 en linfocitos TCD4+ activados con diferentes concentraciones de FILM. En el medio sin estímulo, 0.28% de las células presentaron el receptor de quimiocinas CXCR3. Los linfocitos TCD4+ estimulados con FILM 10, 20, 50 y 100 µg/mL las células expresaron el receptor de quimiocinas CXCR3 en 5, 20, 38 y 30%, respectivamente. La concentración óptima para la activación de linfocitos TCD4+ fue de 50µg/mL.

5.3 Evaluación del efecto del FILM sobre la muerte celular en linfocitos TCD4+

Desde el descubrimiento del FILM por parte del equipo de trabajo del laboratorio de Inmunoquímica del Hospital de Pediatría de CMN Siglo XXI se han hecho diversos experimentos con el fin de caracterizarlo y entender el mecanismo de acción con el que provoca el efecto antiinflamatorio. La inflamación es un proceso complejo que involucra a células activadas a través de factores quimiotácticos como son las quimiocinas y citocinas. En trabajos anteriores se ha visto que el FILM con PMA inhibe la producción de citocinas. Después de someter las células a los tratamientos se tenía que identificar si esta inhibición de citocinas era porque el FILM efectivamente estuviera actuando sobre estas proteínas o bien, porque estaba ocasionando un daño a las células, impidiéndole así, cumplir con sus funciones.

En caso de que el FILM estuviera provocando daño celular podría ser visto mediante el conteo de las células viables y las células apoptóticas o necróticas en los tratamientos donde serían expuestas al FILM. Para comprobarlo se llevaron a cabo experimentos para detectar la apoptosis celular. Para los experimentos se analizaron cinco condiciones diferentes: el medio (RPMI) como control negativo, en donde se esperaba la mayor cantidad de células viables; el grupo de FILM, en donde se esperaba observar el comportamiento celular ante el FILM *per se*; el grupo de PMA, en donde se esperaba la activación y diferenciación celular; el grupo de PMA + FILM, en donde se esperaba observar el efecto del FILM sobre la activación por PMA; por último, el grupo de Actinomicina D como control positivo, en donde se esperaba la mayor muerte celular debido a los efectos que tiene este compuesto sobre el DNA.

El efecto del FILM sobre la viabilidad en linfocitos TCD4+ quedó evaluado con el porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio-FE y anexina-V-ITFC (Figura 15). Debido a que la apoptosis es una forma de muerte celular regulada genéticamente, involucra dos etapas fundamentales, la primera es la apoptosis

temprana en donde solo se muestra alteración de la membrana que es evidenciada por el cambio de ubicación de fosfatidilserina (en una célula viable, la fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana citoplasmática), empiezan cambios en el citoesqueleto y rearrreglo del DNA cromosomal. La segunda etapa es la apoptosis tardía en donde se muestran, principalmente, la condensación de cromatina y la fragmentación celular para dar lugar a cuerpos apoptóticos; en esta etapa, el DNA de la célula es susceptible a ser marcado con el yoduro de propidio-FE debido a las diferentes transformaciones membranales.

Por otro lado, la necrosis puede darse principalmente por el manejo de las células durante el experimento o bien, por un daño irreversible a las células, por ejemplo una sobreactivación o citotoxicidad del FILM.

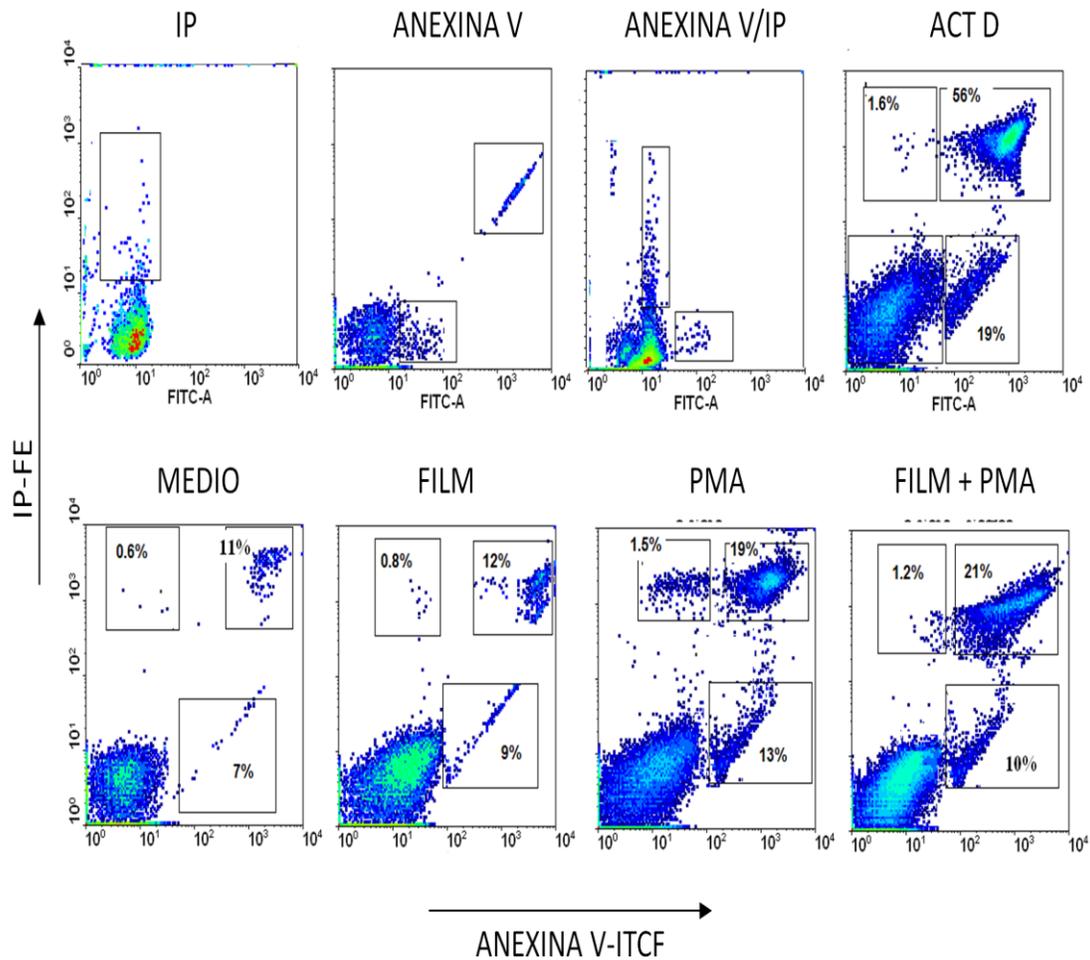


Figura 15. . Conjunto de Dot Plots representativo de seis experimentos obtenidos en los diferentes tratamientos donde se observa la separación de las poblaciones celulares de acuerdo al marcaje que presentan. El marcaje se llevó a cabo con yoduro de propio-FE (ordenadas) y anexina-V-FITC (abscisas). El cuadrante superior izquierdo representan el porcentaje de células que sufrieron necrosis, el cuadrante superior derecho representa el porcentaje celular en apoptosis tardía y el cuadrante inferior derecho las células en apoptosis temprana. En los primeros dos Dot Plots se observan los ensayos con un solo marcador . En el cuarto Dot Plot se observa el control positivo o actinomicina D. Cada punto en cada Dot Plot indica una célula marcada.

De acuerdo al Gráfico 3 y la Figura 15 se observa que el FILM *per se* no induce la etapa de apoptosis temprana. Al momento en que las células son activadas con PMA existe una diferencia significativa respecto al control con lo que está indicando que el PMA está interviniendo en el proceso de apoptosis temprana

cuando las células son activadas. Cuando las células se someten al tratamiento con el FILM (PMA + FILM) existe una diferencia significativa respecto al control con lo que está indicando que el FILM está induciendo el proceso de apoptosis temprana cuando las células son activadas con PMA, sin embargo ésta es menor que con el tratamiento de PMA solo.

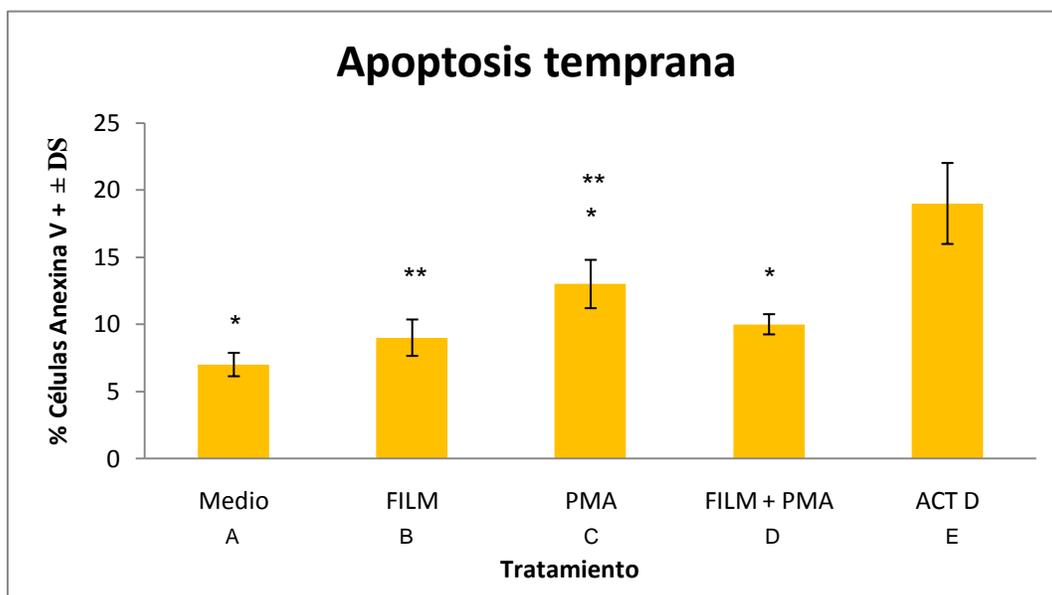


Gráfico 3. Porcentaje de células fluorescentes detectadas por citometría de flujo con marcaje (+) para Anexina V-FITC y marcaje (-) para yoduro de propidio-FE, es decir, células que se encuentran en el proceso de apoptosis temprana. Los tratamientos son (A) Medio *, (B) FILM **, (C) PMA, (D) PMA + FILM, y (E) ACT D. Se encontró diferencia significativa entre A vs D, A vs C, A vs E, B vs C, C vs D, C vs E, y D vs E. No se encontró diferencia significativa entre A vs B y B vs D. Cada barra representa el promedio de seis experimentos independientes \pm DS. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de U de Mann Whitney y la diferencia significativa fue $p \leq 0.05$.

En el Gráfico 4 se muestra que el FILM *per se* no induce la etapa de apoptosis tardía de manera significativa, sin embargo, al estar actuando sobre células activadas con PMA (PMA + FILM), se muestra que hay diferencia significativa respecto al control por lo que el FILM y/o PMA están interviniendo en el proceso de apoptosis cuando las células están activadas.

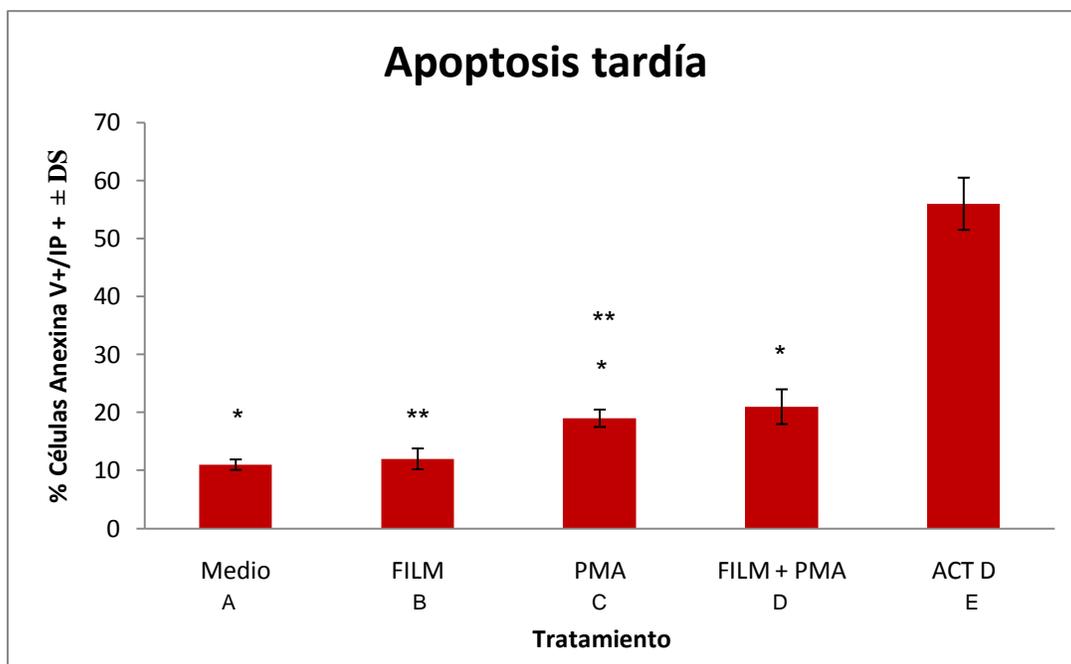


Gráfico 4. Porcentaje de células en apoptosis tardía detectadas por citometría de flujo con marcaje (+) para Anexina V-FITC y marcaje (+) para yoduro de propidio-FE. Los tratamientos son (A) Medio *, (B) FILM **, (C) PMA, (D) PMA + FILM, y (E) ACT D. Se encontró diferencia significativa entre A vs C, A vs D, A vs E, B vs C, B vs D, B vs E, C vs E, y D vs E. No se encontró diferencia significativa entre A vs B y C vs D. Cada barra representa el promedio de seis experimentos independientes \pm DS. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de U de Mann Whitney y la diferencia significativa fue $p \leq 0.05$.

Para el caso de necrosis, en el Gráfico 5 se observa que el porcentaje de células necróticas es mínimo y que el FILM *per se* no está produciendo necrosis. Sin embargo, cuando las células están activadas con PMA, hay diferencia significativa con respecto al control (medio) y al FILM. En el caso del grupo de actinomicina D (control positivo), se observa que es donde se está produciendo el mayor daño celular. La necrosis es un estado irreversible de la célula en donde se pierde la integridad de la membrana plasmática y hay desnaturalización de proteínas así como un escape de todos los elementos citoplasmáticos. Es un proceso inesperado para la célula y se puede dar por cambios en el microambiente como es la presión osmótica, temperatura, pH, o bien, por la exposición a componentes tóxicos.

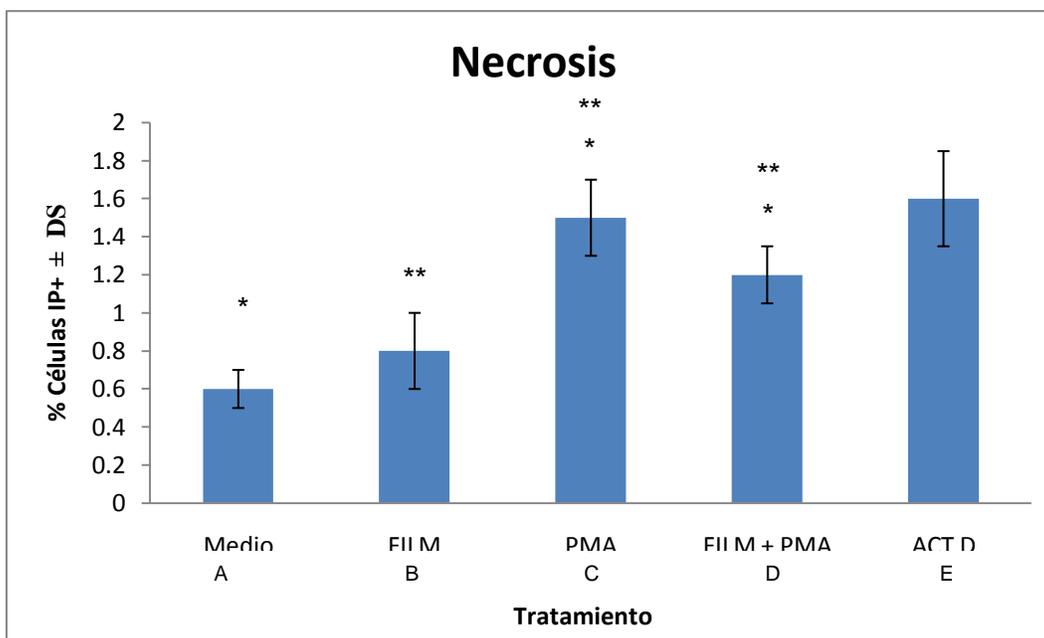


Gráfico 5. Porcentaje de células fluorescentes detectadas por citometría de flujo con marcaje (-, ±) para Anexina V-FITC y marcaje (+) para yoduro de propidio-FE, es decir, células que se encuentran en el proceso de necrosis/muertas. Los tratamientos son (A) Medio*, (B) FILM**, (C) PMA, (D) PMA + FILM, y (E) ACT D. Se encontró diferencia significativa entre A vs C, A vs D, A vs E, B vs C, B vs D, y B vs E. No se encontró diferencia significativa entre A vs B, C vs D, C vs E, y D vs E. Cada barra representa el promedio de seis experimentos independientes ± DS. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de U de Mann Whitney y la diferencia significativa fue $p \leq 0.05$.

En el Gráfico 6 se muestra el porcentaje de las células apoptóticas obtenido tanto en la etapa temprana como tardía. Se observa que no hay diferencia significativa entre el FILM y el medio. Tampoco se encontró diferencia significativa entre el FILM y FILM + PMA por lo que el porcentaje de apoptosis que está produciendo el FILM tanto en células en condiciones normales como en las células activadas no es significativo. Sin embargo, se observa que entre el medio y el FILM + PMA sí hay diferencia significativa. El tratamiento con el FILM produjo 3% más de células marcadas y el FILM + PMA produjo 13 % más, ambos respecto al medio por lo que, en el caso particular del FILM, se vuelve crucial saber de qué manera se produjo esta apoptosis ya que, formaría parte de la caracterización del FILM y ayudaría a comprender el mecanismo de acción.

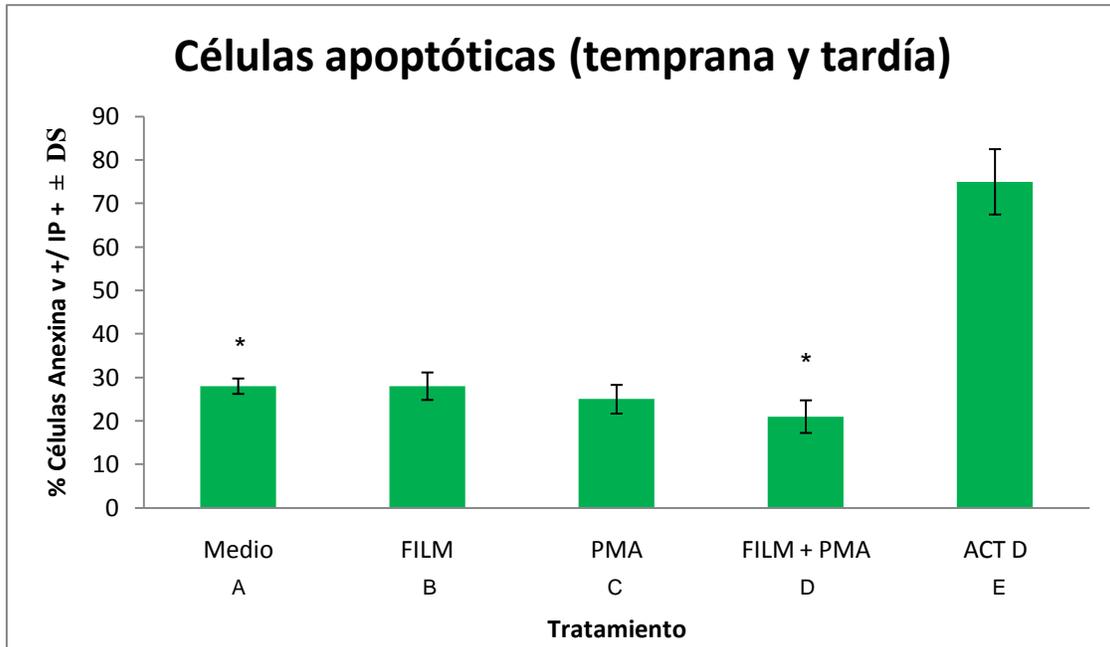


Gráfico 6. Porcentaje de células fluorescentes detectadas por citometría de flujo con marcaje (+,+) para Anexina V-FITC y marcaje (-,+) para yoduro de propidio-FE, es decir, células apoptóticas/necróticas (global). Los tratamientos son (A) Medio *, (B) FILM, (C) PMA, (D) PMA + FILM, y (E) ACT D. Se encontró diferencia significativa entre A vs D, A vs E, B vs E, C vs E, y D vs E. No se encontró diferencia significativa entre A vs B, A vs C, B vs C, B vs D, y C vs D. Cada barra representa el promedio de seis experimentos independientes \pm DS. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de U de Mann Whitney y la diferencia significativa fue $p \leq 0.05$.

5.3.1 *Cambios morfológicos observados con los diferentes tratamientos*

Las siguientes fotografías muestran los diferentes cambios morfológicos que presentaron las células después de exponerse a los diferentes tratamientos.

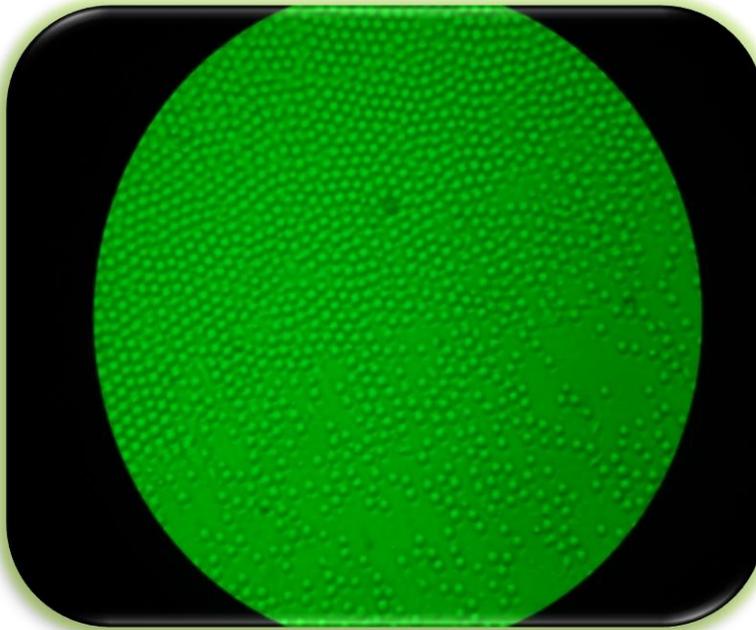


Figura 16. MEDIO

Control negativo. Se observa una gran cantidad de células con membrana intacta, redonda y bien contorneada.

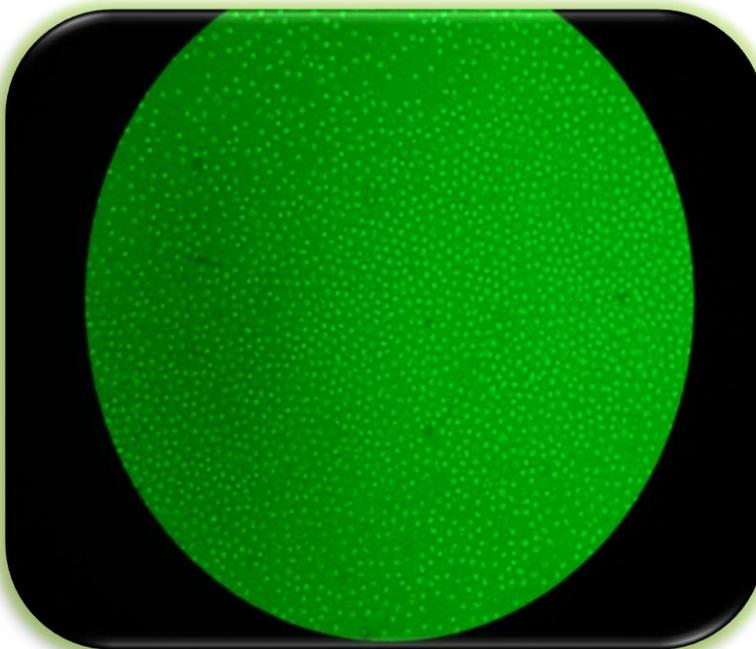


Figura 17. FILM

Se observa una gran cantidad de células con membrana intacta, redonda y bien contorneada. Muy pocas células se ven con la membrana alterada.

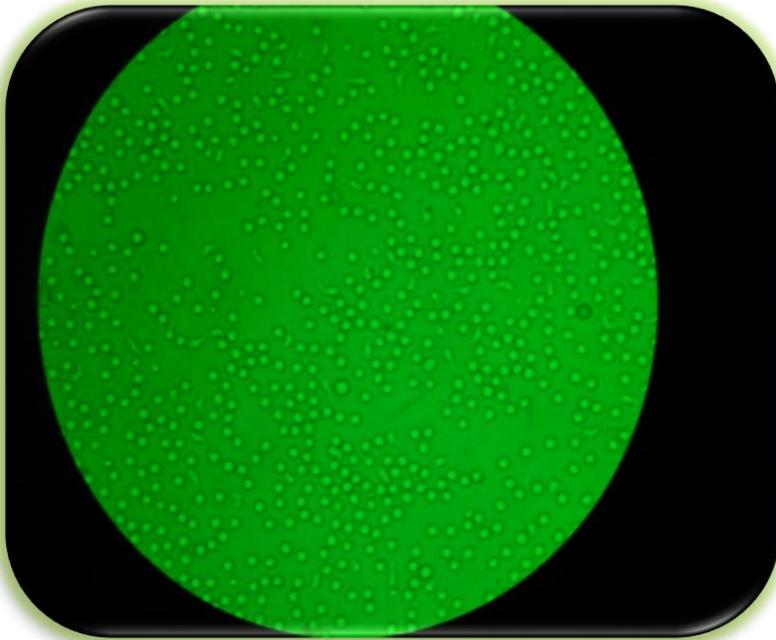


Figura 18. PMA

Se observa una gran cantidad de células con membrana intacta, redonda y bien contorneada. Las células se empiezan a agrupar formando racimos.

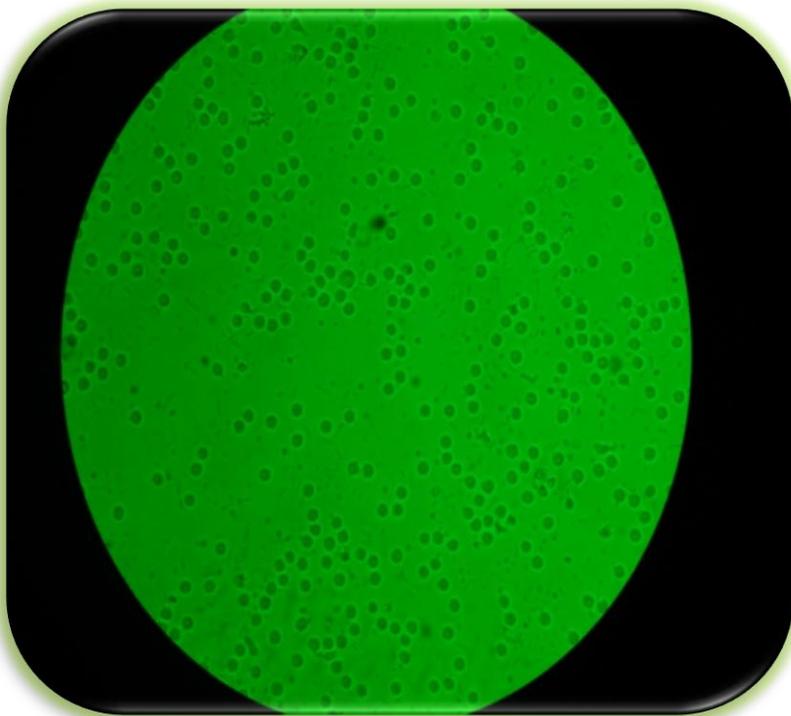


Figura 19. FILM + PMA

Se observa menor cantidad de células con respecto al medio pero la gran mayoría conserva la membrana intacta. También se observan pocas células con la membrana deforme éstas están agrupadas.

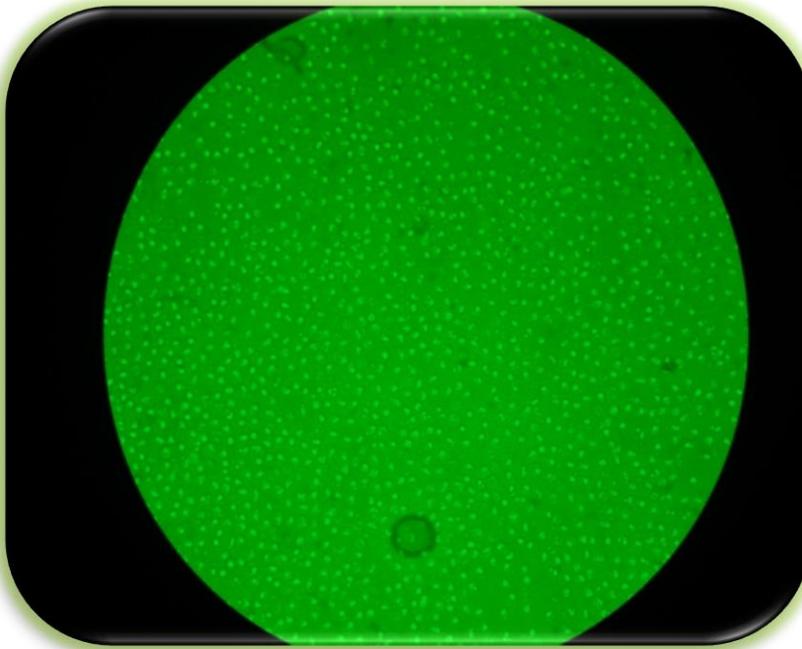


Figura 20. Actinomicina D

Control positivo. Se observa una gran cantidad de células dañadas. El daño se traduce en que las células ya no tienen forma circular, se observan más pequeñas y con la membrana deforme.

Siendo la vía intrínseca de la apoptosis un mecanismo altamente regulado donde el momento más importante e irreversible es la liberación del citocromo c de la mitocondria el cual puede ser ocasionado, principalmente, en respuesta a daño en el DNA y estrés celular se decidió estudiar el efecto que tendría el FILM y así poder dilucidar la manera en el que el FILM está actuando sobre la célula.

Se encontró que el FILM induce la liberación de citocromo c pero no es significativo al momento de comparar el resultado con el medio (control). Cuando las células están activadas con PMA, la liberación de citocromo c aumenta y es significativo con respecto al control pero no con respecto al grupo del FILM. El tratamiento del FILM + PMA está mostrando un aumento de 6 ng/mL con respecto al control por lo que se podría decir que parte de la apoptosis que produce el FILM cuando las células están activadas y cuando las células no lo están, es por la vía intrínseca sin embargo, esta producción no es estadísticamente significativo (Gráfico 7).

5.4 Evaluación del efecto del FILM sobre la vía intrínseca de la apoptosis

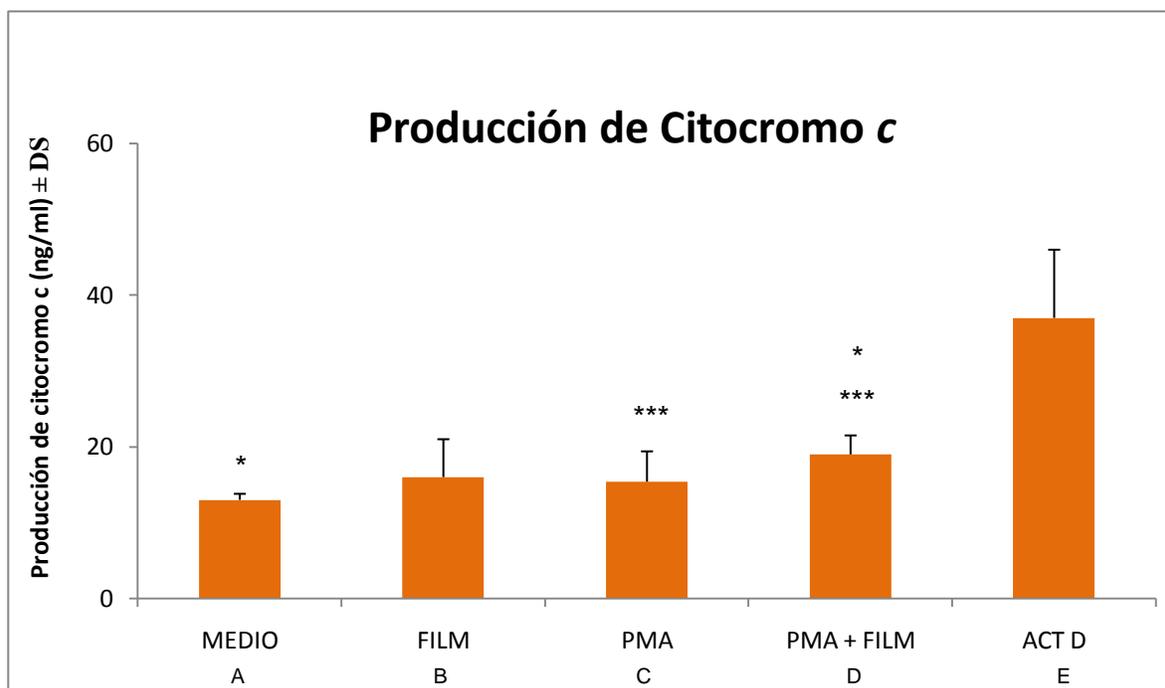


Gráfico 7. Producción de citocromo c en ng/mL detectado por medio de ELISA tipo sándwich. Los tratamientos son (A) Medio *, (B) FILM, (C) PMA ***, (D) PMA + FILM, y (E) ACT D. Se encontró diferencia significativa entre C vs D, D vs E, C vs E, A vs D, B vs E, y A vs E. No se encontró diferencia significativa entre A vs B, B vs C, A vs C, y B vs D. Cada barra representa el promedio de seis experimentos independientes \pm DS. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de U de Mann Whitney y la diferencia significativa fue $p \leq 0.05$.

En estudios recientes se ha encontrado que el FILM actúa sobre el factor nuclear de transcripción NF- κ B el cual es uno de los factores celulares transcripcionales vitales y que tiene importancia en la respuesta inflamatoria, en el proceso de proliferación y muerte celular, en las interacciones celular, entre otras.

El factor NF- κ B forma parte de la familia de proteínas NF- κ B/Rel que se fijan a las proteínas κ B del ADN. Se presenta como forma inactiva ligado a su inhibidor I kappa B (I κ B) dentro del citoplasma o como forma activa dentro del núcleo. La forma activa es un homo o/y heterodímero de 8 monómeros distintos que

pertenecen a dos clases. El heterodímero más conocido es el p50/p65 y el homodímero p50/p50 en complejo con I κ B α . Los distintos dímeros de NF- κ B presentan actividades transcripcionales y la capacidad de los dímeros de reconocer las distintas zonas κ B del ADN, explica que las subunidades de NF- κ B puedan regular la expresión de distintos genes.

NF- κ B p65/p50 es el heterodímero que dirige la transcripción de genes, mientras que el homodímero p50/p50 actúa como inhibidor. El PMA induce la translocación de p65/p50 mientras que el FILM induce la translocación de p50/p50. Cuando el PMA se agrega simultáneamente con el FILM, la translocación de p65/p50 decae (Velazquez y Kretschmer, 2004).

Dado que el FILM está actuando sobre NF- κ B, y que este factor está también implicado en la inducción de apoptosis, y que además se ha demostrado el efecto que tiene el FILM sobre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, inhibiéndolas e induciendo su expresión, respectivamente; los resultados de apoptosis por vía intrínseca amplían el panorama de mecanismo de acción del FILM sobre las células del sistema inmune y bien podría ser un candidato como posible fármaco antiinflamatorio ya que, principalmente, tiene un origen natural (producido por *E. histolytica*, no se comporta como un inmunígeno debido a su pequeño tamaño, y *per se*, no produce apoptosis celular (Figura 21).

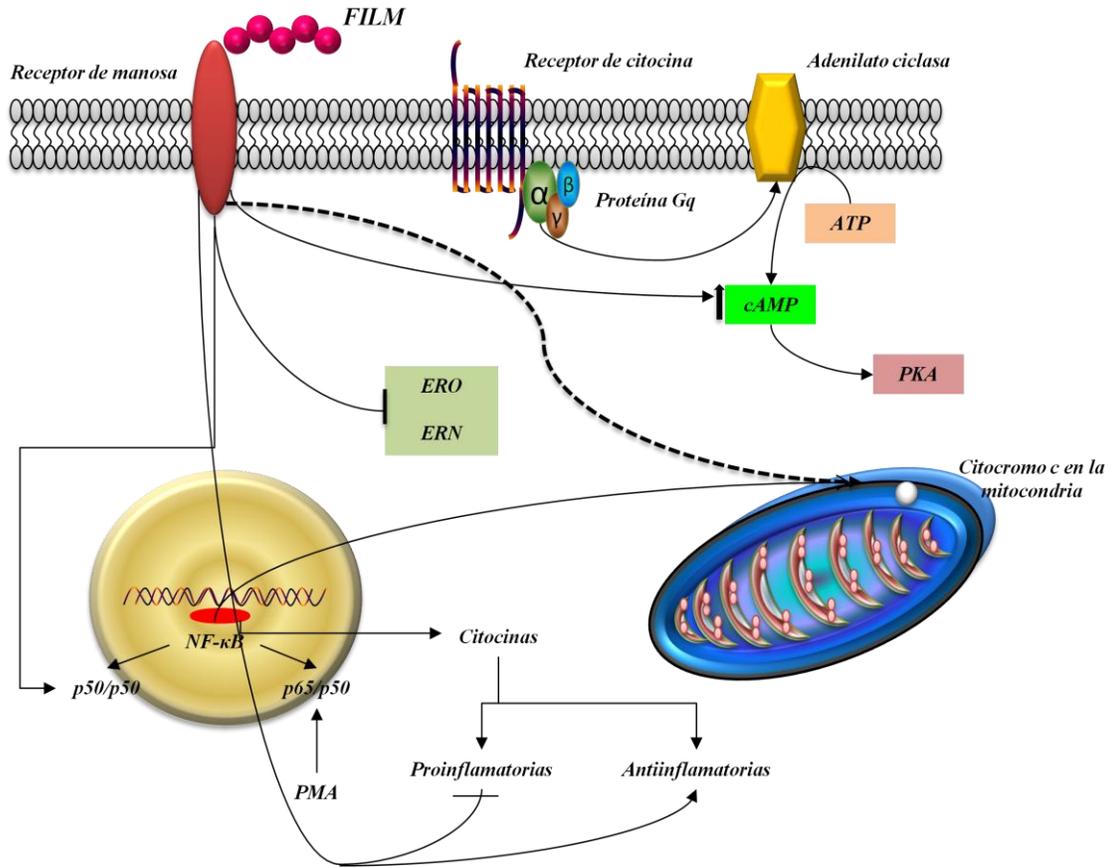


Figura 21. Posible mecanismo del FILM en donde los principales puntos son por un lado, la intervención en la vía de NF-κB que se observa en la producción/inhibición de citocinas, y por otro, el mecanismo mediante el cual está actuando en la vía intrínseca de la apoptosis. NF-κB es un factor involucrado tanto en la producción de citocinas como en la apoptosis, entre otras funciones celulares.

6. Conclusiones

Se concluye que:

- Los análisis con anexinaV/IP mostraron que el FILM *per se* no induce apoptosis temprana. Sin embargo, con la combinación PMA + FILM la muerte por apoptosis celular tiende a incrementarse.
- Con la combinación PMA + FILM se induce la apoptosis tardía y ésta es estadísticamente significativa.
- PMA vs Control también produjo apoptosis significativamente.
- El FILM *per se* no produce necrosis a diferencia del PMA, que a pesar de ser pequeño el porcentaje de células necróticas fue estadísticamente significativo.
- El FILM *per se* no induce apoptosis por vía intrínseca (liberación de citocromo c) en linfocitos TCD4+ cuando es comparado contra el control. El PMA contribuye mínimamente al proceso de apoptosis vía intrínseca cuando es puesto en presencia de FILM.
- Los principales cambios morfológicos de las células observadas al microscopio fueron: forma de la membrana, tamaño de las células, agrupamiento celular y la cantidad de células presentes. Los cambios más característicos de la muerte celular se vieron con la Actinomicina D.
- La concentración óptima de PMA y de FILM para inducir la activación de linfocitos TCD4+ fue de 50µg/mL y 50ng/mL, respectivamente.
- El FILM puede ser considerado como candidato posible a ser fármaco antiinflamatorio debido a que actúa sobre el sistema inmune en blancos celulares específicos, se conoce su estructura, se está caracterizando, se conoce su mecanismo de acción y actúa de manera dosis-dependiente.

7. Perspectivas

- Evaluar el efecto del FILM sobre la apoptosis vía extrínseca y sobre caspasas (Datos generados en el Hospital de Pediatría de CMN siglo XXI pero que aun no han sido publicados).
- Estudiar los efectos del FILM en modelos animales que nos permitan observar los efectos que podría tener a nivel sistémico.
- Considerar una forma farmacéutica inicial contemplando que es un pentapéptido y que como tal, es muy susceptible a proteólisis.
- Estudiar la potencia del FILM frente a los fármacos que existen en el mercado.
- Evaluar a fondo los efectos *in vivo* de acuerdo a diferentes modelos de inflamación.
- Evaluar el costo-beneficio del uso del FILM como candidato a estudio para proseguir en la fase preclínica.
- Determinar los aspectos económicos e industriales, del método de obtención del FILM, su obtención, purificación y transportación.

8. Referencias

- Abbas A, Lichtman A. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Saunders Elsevier, USA 2004;243-274.
- Abul K. Abbas, M.B., B.S. Andrew H. Lichtman, M.D., Ph. D. Jordan S. Pober, M.D., Ph. D. *Inmunología celular y molecular*. Mc Graw Hill-Interamericana. 3ra. Edición. España. 1999:275-307.
- Araujo J, García ME, Díaz-Suárez O, Urdaneta H. Amibiasis: importancia de su diagnóstico y tratamiento. Mini-revisión. *Investigación Clínica* 2008;49(2): 265-271.
- Biswas S, Shi Q, Matise L, Cleveland S, Dave U, Zinkel S. *A role for proapoptotic Bax and Bak in T-cell differentiation and transformation*. *Blood*. 2010;116(24):5237-5246.
- Böyum A. *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968;97:77-89.
- Cubillos Rojas Mónica Patricia. *Efecto de la inhibición de la proteína quinasa c en la diferenciación de monocito inducida por forbol 12-miristato 13-acetato*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá 2007:17-21.
- Danial NN, Gimenez-Cassina A, Tondera D. *Homeostatic functions of BCL-2 proteins beyond apoptosis*. *Adv Exp Med Biol*. 2010;687:1-32.
- Duncke A, He YW. *Apoptosis and autophagy in the regulation of T lymphocyte function*. *Immunology Research* 2011;49:70-86.
- Elenkov IJ, Lezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. *Cytokine dysregulation, inflammation and well-being*. *Neuroimmunomodulation* 2005;12(5):255-269.
- Elmore Susan. *Apoptosis: A review of programmed cell death*. *Toxicology Pathol*. 2007;35(4):495-516.

Franklin JL. *Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis*. Antioxid Redox Signal. 2011;14(8):1437-1448.

Gimenez Sherer JA, Arenas E, Díaz L, Rico G, Fernández J, Kretschmer R. *Effect of the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) produced by Entamoeba histolytica on the expression of cell adhesion molecules (CAMs) in the skin of Guinea pigs*. Archives of Medical Research. 2000;31:S92-S93.

Goldsby Richard A., Kindt Thomas J. and Osborne Barbara A. *Kuby Immunology*. 4th ed. Freeman, USA 2001;338-359.

González R, Tarazona MD, Galiani G, Espinosa M.P., Peña J. *17 métodos basados en la unión Ag-Ac*. [en línea] http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/temas_nuevos_pdf/tema17.pdf [consulta: 25 marzo 2011].

Haque, R, Huston, C.D., Hughes, Houpt, E., Petri Jr., W.A. *Current concepts: amebiasis*. The New England Journal of Medicine, 2003;348:1565-1573.

Hardman Joel G. Limbird Lee E., Molinoff Perry B, Ruddon Raymond W., Gilman Goodman Alfred. Goodman and Gilman *Las Bases Farmacológicas de la terapéutica*. 9na. Edición. Mc Graw Hill 1996:643-670.

Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, Lopez-Osuna M, Lecuona M. *Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown E. histolytica*. Parasite Immunology 1985;7:374-378.

Kretschmer RR, Castro EM, Pacheco G, Rico G, Díaz-Guerra O, Arellano J. *The role of mannose in the receptor of the monocyte locomotion inhibitory factor produced by Entamoeba histolytica*. Parasitology Research 1991;77(5):374-378.

Kretschmer RR, Rico G, Gimenez JA. *A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitology 2001;112:201-209.

Leanne Mortime, Kris Chadee. *The immunopathogenesis of Entamoeba histolytica*. Experimental Parasitology, 2010;126:366-380.

Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. *Bcl-2 proteins and mitochondria-Specificity in membrane targeting for death*. Biochim Biophys Acta. 2011;1813(4):532-539.

Mammucari C, Rizzuto R. *Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging*. Mech Ageing Dev. 2010;131(7-8):536-543.

Martínez PA: *Biología de la Entamoeba histolytica*. En Amibiasis. Editorial Panamericana SA. México, 1986:17-41.

Martínez PA: *Las Amibas, Enemigos invisibles*. En la Ciencia para todos /47, 3ra. Edición. FCE. SEP 2002:30-34.

Morales-Martinez M, Silva García R, Soriano-Correa C, Gimenez-Sherer JA, Rojas-Dotor S, Blanco-Favela F, Rico-Rosillo G. *The Cys-Asn-Ser carboxyl-terminal end group is the pharmacophore of the amebic anti-inflammatory monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF)*. Molecular and Biochemical Parasitology 2008;158:46-51.

Murphy Kenneth, Travers Paul, Walport. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science. 7ma. Edición. 2008:219-253.

Niederlova J, Koubek K. *Chemokines and chemokine receptors*. Sb Lek 1999;100(3):169-189.

Pease JE, Williams TJ. *Chemokines and their receptors in allergic disease*. Journal of Allergy Clin Immunology 2006;118:305-318.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Rang y Dale Farmacología*. Elsevier. España. 2008:216-246.

Rehman Andrew G, Booth Catherine, Potten S Christopher. *What is apoptosis, and why is it important?*. Education and debate. BMJ 2001;322:1536-1538.

Rico G, Arellano J, Kretschmer RR. *The human monocyte locomotion inhibitory factor produced by Entamoeba histolytica does not inhibit the locomotion of human eosinophils*. Parasitology Research 1998;84:522-523.

Rico G, Díaz-Guerra O, Kretschmer RR. *Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown Entamoeba histolytica that inhibits human monocyte locomotion*. Parasitology Research 1995;77:374-378.

Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez JA, Kretschmer RR. *The monocyte locomotion inhibitory factor produced by Entamoeba histolytica inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes*. Parasitology Research 2003;90:264-267.

Rojas Dotor S, Pérez Ramos J, Giménez Scherer JA, Blanco Favela F, Rico Rosillo G. *Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by E. histolytica on cytokines and chemokine receptors in T CD4+ lymphocytes*. Biology Research 2009;42:415-425.

Rojas Dotor Sara. Tesis: *Efecto del Factor Inhibidor de la Locomoción de monocitos (FILM) producido por Entamoeba histolytica sobre la producción de óxido nítrico en leucocitos humanos*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México. 2001.

Romero Cabello Raúl. *Amibiasis en el siglo XXI*. Sociedad Mexicana de Parasitología. 1ra. Edición. México, 2008:39-63.

Salgado Lynn Milena. *Citometría de Flujo: Fluorescence-Activated cell-sorting (FACS)*. Curso de Métodos en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. 2002.

Scott A. Waldman, Andre Terzic. *Farmacología y terapéutica. Principios para la práctica*. Manual Moderno. México. 2010:157-172.

Sigal HL, Ron Y. *Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences*. The inflammatory response. Ed. Mc Graw Hill. Nueva York 1994:356-386.

Silva R, Rico G, Espinosa Cantellano M, Giménez JA, Kretschmer R. *Does Entamoeba dispar produce Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) like Entamoeba histolytica?* Archives of Medical Research 2000;31:S94-S95.

Skommer J, Brittain T, Raychaudhuri S. *Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death.* Apoptosis 2010;15(10):1223-1233.

Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. *Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study.* Am J Pathology 1988;130:112-119.

Utrera Barillas D, Velazquez JR, Enciso A, Muñoz Cruz S, Rico G, Curiel Quesada E, Teran LM, Kretschmer RR. *An anti-inflammatory oligopeptide produced by Entamoeba histolytica down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines.* Parasite Immunology, 2003;25:475-482.

Velázquez J. R., Kretschmer R.R. *Entamoeba histolytica, a remarkable anti-inflammatory parasite.* Inmunología. Revisión. 2004;23:200-206.

9. Anexo



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Y
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la Presente:

CONSTANCIA

*a: Martínez Cuatpotzo Berenice, Martínez Montes de Oca Norma,
Vargas Neri Liliana, Blanco-Favela Francisco, Rojas-Dotor Sara.*

Por su participación con el trabajo:

**PAPEL DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE
MONOCITOS (FILM) PRODUCIDO POR E. HISTOLYTICA SOBRE
LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE LINFOCITOS T CD4⁺**

en el XV Simposio del Departamento de
Ciencias de la Salud.
22-24 de septiembre, 2010


Dr. Edmundo Bonilla G.
Jefe del Departamento


Dra. Norma López D.
Coordinadoras del XV simposio


Dra. Leonor Rodríguez C.
Coordinadoras del XV simposio