



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE
UN PÉPTIDO SINTÉTICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DIANA PATRICIA SÁNCHEZ DELGADO

Número de cuenta: 314045696

Directora: Dra. Martha Legorreta Herrera

Asesora: Dra. Catalina Soriano Correa

Asesor: Dr. Luis Antonio Cervantes Candelas



CD. MX., Agosto 2023



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.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El fruto de este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de esta gran universidad. Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las herramientas y recursos, tanto económicos como humanos que me brindaron al pertenecer a la máxima casa de estudios.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por financiar el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IN228620, por otorgarme la beca de titulación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco infinitamente a la Dra. Martha Legorreta Herrera por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar este proyecto, por confiar en mí, por su paciencia y por todas sus observaciones con el fin de que este trabajo fuese mejor.

A la Dra. Catalina Soriano Correa por encontrar las oportunidades de mejora en este trabajo escrito y por compartírnos el péptido a estudiar.

Al Dr. Luis Antonio Cervantes Candelas, por siempre guiarme y apoyarme no solo en lo educativo, sé que cuento con una gran persona en la vida. Le agradezco sus observaciones para mejorar mi trabajo en el laboratorio, así como mi trabajo escrito.

A la Dra. María Isabel Soto Cruz por sus valiosas correcciones respecto a este trabajo.

Al Mtro. Jesús Aguilar Castro, su paciencia y especial manera de explicar los temas para comprenderlos mejor.

Al personal del bioterio de la FES Zaragoza que nos apoyaron con los animales de experimentación, especialmente a la Dra. Adriana Altamirano, al Dr. Román Hernández y a la Dra. Dolores Elizabeth Guzmán.

A todos los demás integrantes del Laboratorio de Inmunología Molecular: Dr. Víctor Salazar, Mtro. Fidel Buendía, Mtro. Omar Fernández, Mtra. Teresita Nolasco y a mis compañeros en su momento, Gamaliel, Raquel, Karen y Verónica sin su apoyo esto no hubiese sido posible.

A mis compañeros de la universidad, Luz Elena y Gustavo, fueron mi gran sostén durante la carrera. Gracias por siempre estar.

Con especial cariño a Jhostin Gamaliel, quien me alentó a iniciar este proceso y me acompañó en todo momento. Gracias por apoyarme con mis sueños y metas, por animarme en los malos ratos. Eres una gran persona.

A mi familia por siempre apoyarme y darme el privilegio de solo dedicarme a estudiar, todo es por y gracias a ustedes. Y por acompañarme en toda esta travesía educativa.

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	5
3.1. Proceso inflamatorio	5
3.2. Componentes del proceso inflamatorio	6
3.2.1. Inductores inflamatorios	6
3.2.2. Sensores	6
3.2.3. Mediadores	8
3.2.3.1. Citocinas	8
3.2.4. Células de la respuesta inmune	9
3.3. Estrés oxidativo	11
3.4. Tipos de inflamación	13
3.5. AINES	14
3.5.1. Naproxeno	15
3.5.2. Paracetamol	15
3.6. Corticosteroides	17
3.6.1. Dexametasona	18
3.7. Péptidos	19
4. Planteamiento del problema	21
5. Hipótesis	22
6. Objetivo	23
6.1. Objetivo general	23
6.2. Objetivos específicos	23
7. Diseño experimental	24
7.1. Diseño de estudio	24
7.2. Población o muestra	24
7.3. Variables	24
7.3.1. Variable independiente	24
7.3.2. Variable dependiente	24
7.4. Material	24
7.5. Equipo e instrumentos	24
7.6. Reactivos	25
7.7. Metodología	25

7.7.1.	Administración de tratamientos	25
7.7.2.	Obtención de muestras	26
7.7.3.	Determinación del índice esplénico	26
7.7.4.	Evaluación de las poblaciones celulares en bazo de ratones CBA/Ca mediante citometría de flujo	26
7.7.5.	Determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 mediante citometría de flujo	27
7.7.6.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de SOD	28
7.7.7.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de catalasa	28
7.7.8.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de GPx	29
7.7.9.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de la concentración de MDA	29
7.7.10.	Análisis estadístico	30
8.	Resultados	31
8.1.	Efecto del péptido CNS sobre el índice esplénico de ratones CBA/Ca con inflamación inducida por LPS	31
8.2.	Efecto del péptido CNS en las poblaciones celulares CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , B220 ⁺ , Mac-3 ⁺ y CD16 ⁺ /32 ⁺ en el bazo de ratones CBA/Ca	32
8.3.	Efecto del péptido CNS en la determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 en el plasma de ratones CBA/Ca	35
8.4.	Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx y catalasa, y sobre la concentración de MDA en sangre de ratones CBA/Ca	37
8.5.	Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx, catalasa y sobre la concentración de MDA, en el bazo de ratones CBA/Ca	38
8.6.	Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx, catalasa y sobre la concentración de MDA, en el cerebro de ratones CBA/Ca	39
9.	Discusión	40
10.	Conclusiones	43
11.	Perspectivas	43
12.	Referencias	44

1. Resumen

La inflamación es una respuesta del sistema inmune dirigida a mantener la homeostasis al eliminar agentes patógenos, o promover la eliminación de células dañadas para descartar el peligro. Sin embargo, cuando no se elimina el agente o las células dañadas y la resolución de la inflamación no ocurre, es probable que este proceso se torne dañino por la acumulación de células del sistema inmune y de las moléculas que promueven la inflamación, ya que pueden exacerbar el daño tisular y contribuir a la progresión de enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares y cáncer. El tratamiento clínico de la inflamación se limita al uso de antiinflamatorios no esteroideos y de corticoesteroides, que, a largo plazo, provocan efectos adversos graves; que implican daños gastrointestinales, cardiovasculares y renales; que promueven que el paciente suspenda el tratamiento. Por lo anterior, surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas que disminuyan los efectos adversos y que aumenten su potencia y selectividad. Actualmente, el estudio de los péptidos antiinflamatorios es una herramienta alternativa a los tratamientos antiinflamatorios tradicionales. En estudios previos se encontró que presentan menor toxicidad y mayor selectividad. El objetivo de este trabajo de tesis es evaluar la actividad antiinflamatoria del péptido CNS, que se analizó previamente en modelos computacionales, mediante un modelo murino de inflamación aguda inducida por lipopolisacárido (LPS). Se determinó el índice esplénico, las citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 séricas; las poblaciones celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, Mac-3⁺ y CD16⁺/32⁺ en el bazo de los ratones; la actividad de las enzimas SOD, GPx y catalasa; y la concentración de MDA. Como controles se usaron los fármacos antiinflamatorios dexametasona, paracetamol y naproxeno. Los resultados sugieren que el péptido disminuye el número de células T y células NK, por lo que es de interés continuar con su evaluación.

2. Introducción

La inflamación es una respuesta inmunitaria inmediata que se presenta ante estímulos nocivos para preservar la homeostasis en el organismo (1). La inflamación se caracteriza por el aumento de la permeabilidad vascular y del flujo sanguíneo, y edema, que favorecen la migración de leucocitos y moléculas inflamatorias en el sitio de la lesión o estímulo (2). Estos fenómenos dependen de la activación de la respuesta inmune. El proceso inflamatorio se compone de cuatro elementos: a) inductores inflamatorios, endógenos o exógenos, que son los estímulos que activan a la respuesta inflamatoria; b) sensores, que son los receptores celulares que reconocen a los patrones moleculares (PRR), se localizan en la membrana, las vesículas o el citoplasma de los macrófagos, las células dendríticas, las células endoteliales y las células epiteliales de la mucosa; c) mediadores, son aquellas sustancias que inician y regulan las reacciones inflamatorias que incluyen a: las citocinas, las quimiocinas, las alarminas, etc.; y d) efectores, que son los tejidos y células blanco donde los mediadores actúan, activan y modifican sus funciones con el fin de promover la inmunidad protectora, por ejemplo, el endotelio de los vasos sanguíneos en el sitio de la lesión, se activa y provoca la vasodilatación para aumentar el flujo sanguíneo como vía de entrada para las proteínas plasmáticas que atraen a los leucocitos que buscan y eliminan los agentes patógenos (1, 3).

Durante la inflamación es crucial la activación de las células del sistema inmune dado que, junto con los mediadores, facilitan la eliminación de los agentes dañinos o de las células dañadas, y modulan la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria (4). La activación de las células inmunitarias puede inferirse al identificar sus receptores de superficie o Cluster of Differentiation (CD), los CD son moléculas que se expresan en la superficie celular y se detectan con anticuerpos monoclonales (5). El CD45 es una proteína que se expresa en todas las células hematopoyéticas nucleadas, como linfocitos, monocitos y neutrófilos; presenta varias isoformas según el estado de desarrollo o activación celular (6). La expresión de CD45 se estudia mediante citometría de flujo para distinguir el linaje celular y estimar el estadio de maduración de la mayoría de las células sanguíneas (7).

Al inicio del proceso inflamatorio, las primeras células en activarse son los macrófagos y los neutrófilos, que además de desempeñar su función fagocítica, producen enzimas y especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS), para eliminar al patógeno (2). Sin embargo, el incremento en la concentración de especies reactivas puede ocasionar estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre las especies oxidantes y los antioxidantes del organismo, a favor de los primeros, lo que dificulta el control redox, que si no se resuelve, la difusión de especies reactivas fuera de las células produce daño tisular y activación del proceso inflamatorio (8).

El LPS es un inductor exógeno de la inflamación, constituye el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por lo que en los humanos puede inducir efectos cardiovasculares negativos y choque séptico (9). Sin embargo, en los diseños experimentales, la inflamación mediada por LPS se emplea como un modelo de inflamación aguda (10).

La inflamación aguda evoluciona en un periodo corto, con exudación de líquido y proteínas plasmáticas, y la migración de leucocitos (4). La respuesta inflamatoria aguda termina cuando se elimina el agente nocivo y se repara el tejido dañado, pero si esto no ocurre y el desencadenante inflamatorio persiste, la respuesta inflamatoria continuará hasta volverse un proceso crónico que puede lesionar órganos, generar dolor e interferir con las funciones normales del cuerpo (1). Para contrarrestar los daños relacionados a la inflamación no regulada o exacerbada, se utilizan fármacos antiinflamatorios que se clasifican en dos grandes grupos: esteroideos y no esteroideos. Los fármacos esteroideos, también conocidos como corticoesteroides, son derivados del colesterol, producen su efecto antiinflamatorio al inhibir la expresión de genes proinflamatorios que originan los mediadores, de manera que las células efectoras no se activan (11). Su uso a largo plazo provoca hipertensión, hiperglucemia, entre otros padecimientos (12). La dexametasona es un ejemplo de los corticosteroides más utilizados. Los antiinflamatorios no esteroideos o AINES, al inhibir a la enzima COX impiden la síntesis de prostaglandinas, mediadores inflamatorios que provocan los signos clásicos de la inflamación (enrojecimiento, edema, calor y dolor). Si los AINES se usan frecuentemente generan daños gastrointestinales,

cardiovasculares y renales (13). El paracetamol y el naproxeno son algunos ejemplos de fármacos que se clasifican en el grupo de los AINES (14).

En el desarrollo de nuevas alternativas antiinflamatorias, se estudian biomoléculas importantes que normalmente desempeñan diversas funciones en el organismo, como los péptidos. En comparación con los fármacos tradicionales, los péptidos presentan menor toxicidad, mayor potencia y selectividad (15, 16).

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antiinflamatoria aguda *in vivo* del péptido CNS para corroborar las predicciones teóricas que se determinaron mediante simuladores de programas de computadora.

Este trabajo pretende contribuir a la búsqueda de nuevas alternativas más efectivas y menos tóxicas para el tratamiento antiinflamatorio, que aseguren la resolución completa del proceso inflamatorio y evitar que se desencadene la inflamación crónica que conduce al desarrollo de enfermedades crónicas de interés mundial como la artritis, la diabetes y el cáncer (17).

3. Marco teórico

3.1. Proceso inflamatorio

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico hacia cualquier estímulo dañino (1, 18) para eliminar el peligro, resolver o reparar el daño y alcanzar la homeostasis (1). El estímulo que desencadena la inflamación puede ser endógeno, por ejemplo, células y tejidos estresados o dañados, que de no repararse conducirían a un mal funcionamiento y a la pérdida de la homeostasis. Además, el daño puede ser exógeno, que de acuerdo a su origen se clasifica en microbiano y no microbiano, como lesiones de agentes mecánicos, físicos, químicos e inmunológicos (alérgenos, compuestos tóxicos o cuerpos extraños) (19).

El proceso inflamatorio involucra cambios tisulares derivados de una lesión tisular y se caracteriza por:

- Vasodilatación de los vasos sanguíneos locales, lo que provoca un exceso de flujo sanguíneo local.
- Aumento de la permeabilidad de los capilares, lo que permite la fuga de grandes cantidades de líquido a espacios intersticiales.
- Migración de granulocitos y monocitos al tejido, su acumulación en el foco de la lesión y su activación para eliminar el agente causal.
- Hinchazón de las células tisulares (2).

En todos estos procesos, la respuesta inmune participa al activar células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y en algunos casos a las células epiteliales (4), las cuales liberan intermediarios como las citocinas, quimiocinas y sustancias vasoactivas, que atraerán a más células defensoras con la finalidad de eliminar el agente causal, limitar el daño a los tejidos y reparar el tejido afectado (20).

3.2. Componentes del proceso inflamatorio

3.2.1. Inductores inflamatorios

Los inductores o estímulos, son las señales que inician la respuesta inflamatoria cuando los sensores los detectan (1) y luego provocan la liberación de mediadores. Pueden ser endógenos, como los patrones moleculares asociados a daño (DAMP, por sus siglas en inglés), o exógenos, ya sea de origen microbiano, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés), o no microbiano, que incluyen a alérgenos y compuestos tóxicos (19).

El LPS es un inductor exógeno, es el principal constituyente de la pared de las bacterias Gram-negativas (9), genera un aumento en la concentración de las citocinas TNF- α , INF- γ e IL-6 (Figura 1), por lo que sus efectos inmunoestimuladores se pueden utilizar en un modelo de inflamación aguda, por ser fácilmente identificables y medibles (10).

3.2.2. Sensores

Los sensores son receptores de las células que reconocen a los patrones moleculares, se conocen como receptores de reconocimiento de patrones o PRR, por sus siglas en inglés (3), se localizan en la membrana, vesículas o citoplasma de macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y células epiteliales de la mucosa (21). Entre los PRR mejor descritos en la respuesta a infecciones bacterianas, como la que desencadena el LPS, se encuentran los receptores tipo Toll, TLR por sus siglas en inglés; y los receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), NLR por sus siglas en inglés.

Los receptores TLR presentes en las células del sistema inmune innato detectan a los microorganismos, al interactuar con su ligando se activan e inducen la síntesis de moléculas con actividad inflamatoria. Particularmente, los receptores TLR4 que se expresan en los macrófagos, células dendríticas y mastocitos reconocen al inductor LPS, lo que desencadena las vías de señalización que conducen a la síntesis de genes proinflamatorios. La estimulación de TLR4 puede activar dos vías, una dependiente de la proteína TRIF y la otra dependiente de la proteína MyD88, esta última se asocia con

TLR4 y recluta a la cinasa IRAK, la cual se fosforila y permite la asociación de TRAF6 al complejo del receptor. El complejo se transloca al citosol y se asocia al complejo IKK. El complejo IKK fosforila a I κ B, lo que permite que el factor nuclear NF- κ B se transloque al núcleo e induzca la expresión de genes correspondientes a citocinas proinflamatorias (22). La vía dependiente de TRIF promueve la transcripción de interferones tipo I; TRIF se une a la molécula adaptadora TRAM que a su vez forma un complejo con la cinasa TBK1 e IKKi, los cuales dimerizan y translocan a IRF3 (23), tal como se representa en la Figura 1. Cada vía sigue reacciones diferentes, sin embargo ambas activan el factor de transcripción nuclear NF- κ B (24), tal como se representa en la Figura 1.

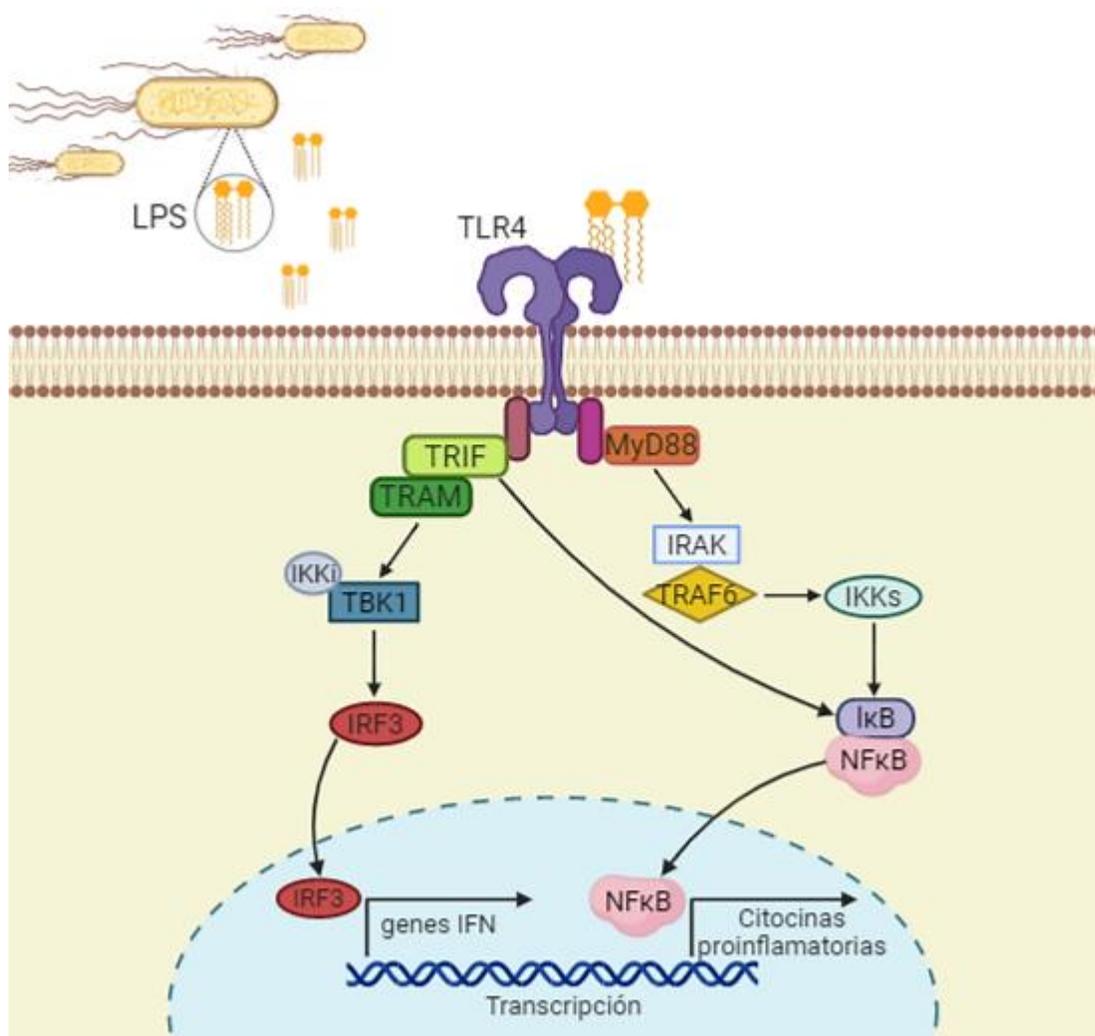


Figura 1. Activación de NF- κ B por estimulación de LPS en TLR-4. El reconocimiento de LPS por el receptor TLR4 conduce a la transcripción de genes proinflamatorios, a través de una vía dependiente

de la proteína MyD88 que involucra la fase temprana de la activación del factor nuclear NF- κ B, o de una vía independiente de MyD88, que activa el factor regulador de interferón (IRF3) y conduce a la expresión de genes inducibles por IFN (interferón). LPS: lipopolisacárido, TLR4: receptor 4 tipo Toll, MyD88: proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88, IRAK: cinasa asociada a IL-1R, TRAF6: proteína adaptadora del factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, IKK: inhibidor del complejo cinasa NF- κ B (I κ B). TRIF: adaptador que contiene el dominio del receptor toll-interleucina-1 que induce IFN, NF- κ B: factor nuclear- κ B, I κ B: inhibidor del factor NF- κ B. TRIF: proteína adaptadora que contiene el dominio TIR, TRAM: molécula adaptadora relacionada con TRIF, TBK1: cinasa 1 de unión asociada a miembros de la familia TRAF, IRF3: factor 3 regulador de interferón. Tomada y modificada de Akira y Takeda, 2004 (22). Figura creada con BioRender.com

3.2.3. Mediadores

Los mediadores son moléculas de señalización que inician y regulan las reacciones inflamatorias, su síntesis se activa por los inductores y pueden derivarse de proteínas plasmáticas o secretarse por las células. Los mediadores alteran la funcionalidad de los tejidos y de los órganos para adaptarlos a las condiciones dadas por el inductor particular (19).

3.2.3.1. Citocinas

Las citocinas son un grupo de glucoproteínas de bajo peso molecular (15 a 25 kDa), que producen y secretan varias células. Son mediadores solubles de la respuesta inmune, se unen a receptores específicos de la membrana de las células diana y protagonizan la comunicación intercelular en la respuesta inmunitaria (25).

Existen citocinas proinflamatorias y citocinas antiinflamatorias. Las citocinas que estimulan la respuesta inflamatoria se denominan proinflamatorias, entre las que destacan: TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-17 (26). Una vez que se eliminó al estímulo inflamatorio, los macrófagos y los linfocitos comienzan a sintetizar las citocinas antiinflamatorias IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y TGF- β , para suprimir la actividad de las proinflamatorias, limitar el daño tisular producido y contribuir a la reparación (26, 27). En particular, la IL-6 y el TGF- β , se clasifican como citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias en diversas circunstancias (28). El equilibrio entre las citocinas que favorecen o inhiben la inflamación es lo que define el proceso inflamatorio.

Las citocinas se producen por diferentes poblaciones celulares, pero predominantemente se encuentran los macrófagos y los linfocitos T cooperadores. Es común que distintas clases de células liberen la misma citocina y que una sola citocina presente efecto en varios tipos de células diferentes (28).

3.2.4. Células de la respuesta inmune

La inflamación implica una red coordinada de muchos tipos de células que pertenecen al sistema inmune. A continuación, se abordan las principales células de la respuesta inmune:

Neutrófilos. Son de las primeras células en llegar a los sitios de inflamación aguda debido a que circulan en el torrente sanguíneo. Actúan como la primera línea de defensa e inician la respuesta inflamatoria aguda, donde por medio de la fagocitosis o por la liberación de factores tóxicos de sus gránulos citoplasmáticos eliminan el agente dañino. Además, liberan factores localizados para atraer monocitos y células dendríticas, y programan las células presentadoras de antígenos para estimular las células T. Sin embargo, su infiltración en exceso o su eliminación retardada exacerba la lesión tisular debido a los mediadores inflamatorios que producen (29).

Monocito/Macrófago. El monocito circula en la sangre, pero puede abandonar el torrente sanguíneo y migrar a los tejidos, donde se diferencia en macrófago. Es una célula fagocítica y presenta el antígeno a las células T y B. Los macrófagos poseen receptores de reconocimiento de patrones en su superficie, por lo que son clave para reconocer estímulos inflamatorios (30). Los macrófagos inician la respuesta inflamatoria al secretar especies reactivas de oxígeno para neutralizar los agentes patógenos, y las citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-6, que producen fiebre, reclutan a los neutrófilos y a las células NK; además promueven la proliferación y diferenciación de células T y B (31).

Linfocitos T. Estas células no inician directamente la respuesta inflamatoria, sino que dirigen el nivel de la respuesta (32). Existen diferentes subtipos que se clasifican de acuerdo con su función y estado de activación mediante la expresión de sus proteínas

de superficie denominadas Clusters of differentiation (CD), que incluyen a CD3, CD4, CD8 y CD45, y las citocinas que sintetizan son: IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-17 (33). La proteína CD3 es el marcador de linaje de los linfocitos. Se clasifican principalmente en dos subtipos, los linfocitos T CD8⁺, células efectoras que participan en la citotoxicidad y los linfocitos T CD4⁺, que según la expresión de factores de transcripción y del ambiente de citocinas se subdividen en linfocitos Th1, Th2 y Th17, que producen citocinas inductoras de la proliferación y diferenciación de las células de la respuesta inmune (34). Los linfocitos T CD4⁺ colaboran con los linfocitos B para la síntesis de anticuerpos y regulan las funciones de los linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos CD4⁺ Th1 producen IFN- γ que activa a los macrófagos, mientras que los linfocitos CD4⁺ Th2 se asocian con IL-4 que promueve la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas. Los linfocitos Th17 al producir IL-17A e IL-17F se caracterizan por intervenir en el desarrollo de la inflamación, autoinmunidad y tumores (35).

La expresión del marcador CD45 no solo aplica para los linfocitos, sino para los leucocitos en general. La proteína CD45 modula la activación y la proliferación celular (36). La isoforma CD45RO se expresa en los linfocitos T posterior a la activación y se asocia con la adquisición de la memoria inmunológica (37).

Las células B. Estas células residen y recirculan en el bazo y los ganglios linfáticos, al encontrar a su antígeno específico, en presencia de IL-2, IL-4 e IL-6, se activan y maduran a las células plasmáticas para que sintetice anticuerpos (38). Las células B también actúan como células presentadoras de antígeno, por lo que influyen en la actividad de linfocitos T CD4⁺ y en la síntesis de citocinas (39).

Células NK (natural killer). Son células del linaje linfoide, pero son distintas a los linfocitos T y linfocitos B. Su función principal durante la inflamación es producir respuestas rápidas contra los patógenos, células infectadas o dañadas (40) debido a que una vez que maduran están listas para actuar, sin requerir una mayor diferenciación. Cuando se activan, liberan perforinas y granzimas de sus gránulos, lo que provoca la muerte celular. Producen IFN- γ y TNF- α que potencian la función fagocítica de los macrófagos (41). Durante la respuesta inmunitaria se activan gracias a las citocinas IL-2 e IL-12 (42).

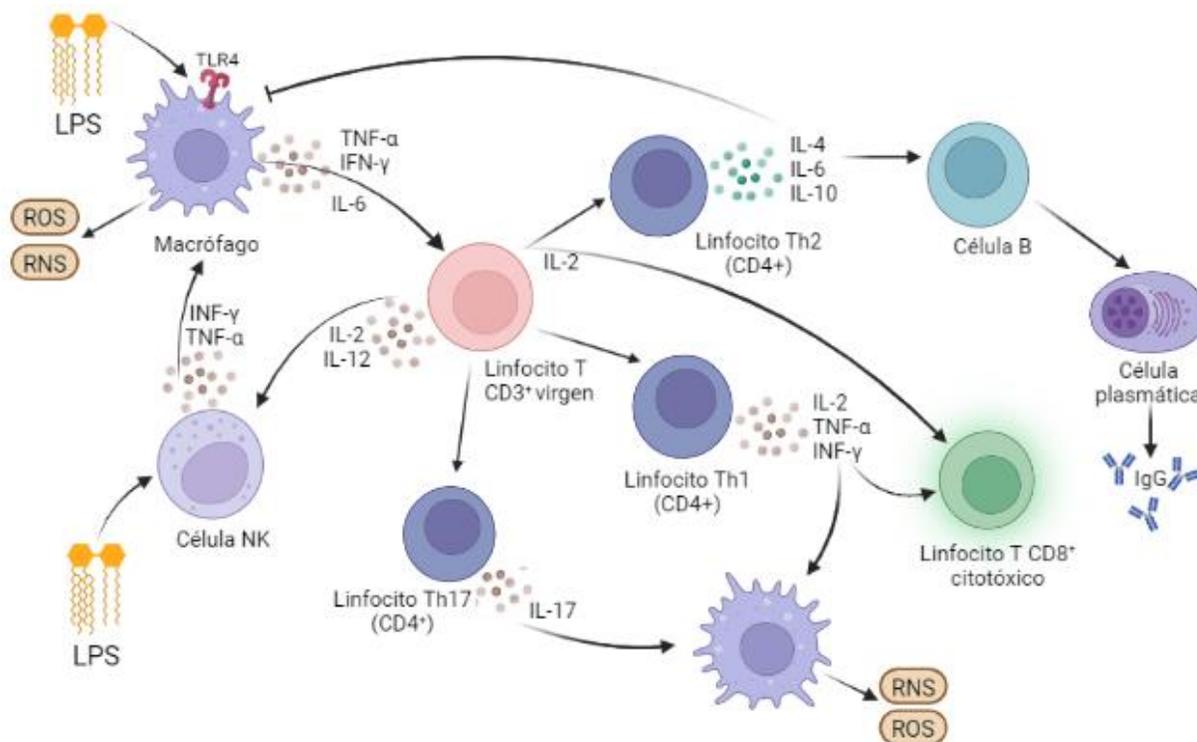


Figura 2. Activación de las células de la respuesta inmune durante la inflamación mediada por LPS. Los macrófagos se activan al reconocer LPS y producen las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-6 que influyen el microambiente de los linfocitos T. Los linfocitos T proliferan y se diferencian en Th1, Th2, Th17, CD8⁺, entre otros tipos. Los linfocitos Th2 sintetizan IL-4, IL-6 e IL-10, que promueven la maduración de las células B a células plasmáticas para la síntesis de anticuerpos. Los linfocitos Th1 sintetizan TNF- α , IFN- γ e IL-6 que continúan la activación de macrófagos. Los linfocitos CD8⁺ eliminan células infectadas o dañadas por acción citotóxica. Los linfocitos Th17 sintetizan IL-17 para promover la respuesta inflamatoria. Las células NK sintetizan a las citocinas TNF- α e IFN- γ para potenciar la función fagocítica de los macrófagos. Los macrófagos sintetizan especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno para eliminar el agente dañino. LPS: lipopolisacárido, TNF- α : factor de necrosis tumoral α , IL-1 β : interleucina 1 β , IL-6: interleucina 6, IL-4: interleucina 4, IL-2: interleucina 2, IFN- γ : interferón γ , IL-17: interleucina 17, ROS: especie reactiva del oxígeno, RNS: especie reactiva del nitrógeno, IgG: inmunoglobulina G. Fuentes: (31, 33-35, 38, 41, 42). Figura elaborada en BioRender.com

3.3. Estrés oxidativo

Los neutrófilos y los macrófagos se activan en el sitio de inflamación, además de producir los mediadores ya mencionados, liberan enzimas y especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS), para eliminar al agente reconocido como extraño (8). Sin embargo, la producción de especies reactivas puede ocasionar estrés oxidativo. El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción de especies oxidantes y su eliminación mediante agentes antioxidantes endógenos, la

concentración de oxidantes aumenta significativamente (43), lo que genera dificultad en el control redox, que si no se resuelve, las especies reactivas difunden fuera de las células, puede dañar a los tejidos y estimular la activación del proceso inflamatorio (8).

En condiciones normales, los seres vivos mantienen un nivel basal de sustancias oxidantes como consecuencia del metabolismo. Las especies reactivas de oxígeno se derivan de los metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos y que presentan una capacidad oxidante fuerte. A bajas concentraciones, los ROS son esenciales en la señalización celular y la inducción de la respuesta mitogénica (43).

Las células del sistema inmune innato producen ROS que incluyen al peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el hidroxilo, con la finalidad de eliminar a los patógenos, pero a su vez, esto contribuye a la inflamación de los tejidos (44). Para contrarrestar las ROS, los seres vivos desarrollaron mecanismos antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (43).

La enzima SOD transforma al superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. La catalasa requiere la presencia de NADPH para desempeñar su función, la cual es remover el peróxido de hidrógeno de las células al reducirlo en agua y oxígeno. La enzima GPx utiliza glutatión reducido (GSH) para reducir el peróxido de hidrógeno en agua y glutatión oxidado (GSSG) (Figura 3) (43).

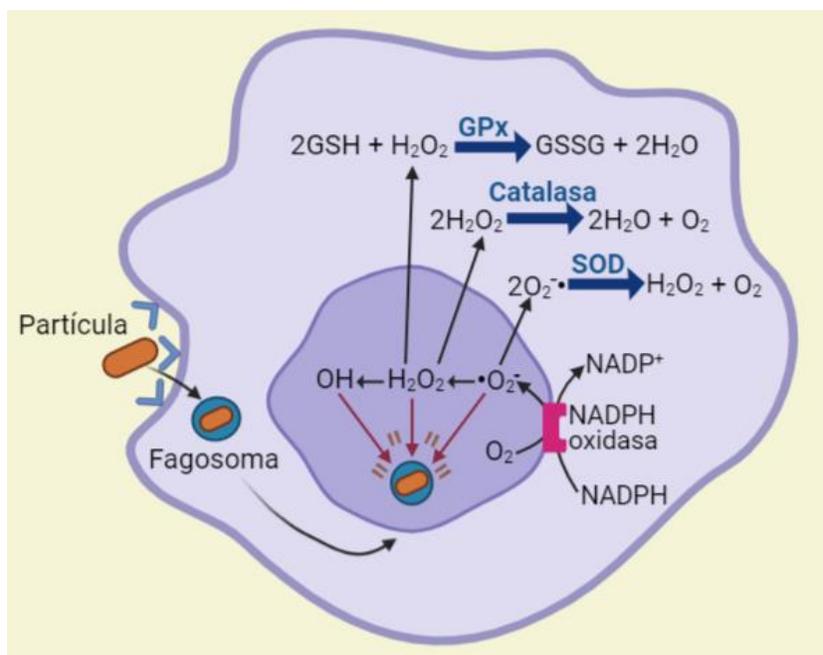


Figura 3. Producción de especies reactivas del oxígeno y mecanismos antioxidantes. Se representa a una célula fagocítica cuando atrapa a una partícula desconocida, se transforma en fagosoma e ingresa a la vacuola fagocítica, donde la coenzima NADPH oxidasa se activa en la membrana de la vacuola y produce O₂^{•-} que posteriormente se transforma en oxidantes más potentes como H₂O₂ y •OH. Las enzimas antioxidantes SOD, GPx y catalasa convierten a las ROS en especies no reactivas como H₂O y O₂. O₂^{•-}: radical superóxido, O₂: oxígeno molecular, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, •OH: radical hidroxilo, NADPH: nicotiamida adenina dinucleótido fosfato, H₂O: agua, GSH: glutatión reducido, GPx: glutatión peroxidasa, GSSG: glutatión oxidado, SOD: superóxido dismutasa. Modificada de Ruiz F, Trier A, et al., 1987 y Cascales M, 2005. Figura creada con Biorender.com

3.4. Tipos de inflamación

La respuesta inflamatoria aguda, es aquella que evoluciona en un periodo corto, en minutos u horas luego del estímulo dañino; dura poco, incrementa la permeabilidad tisular, la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (4). Además, se caracteriza por los cuatro signos de la inflamación: rubor, tumor, calor y dolor (1), causados por el aumento del flujo sanguíneo, edema y la migración de leucocitos (neutrófilos principalmente). A medida que se elimina el agente nocivo, se activan los mecanismos antiinflamatorios y se produce el aumento en la concentración de IL-4 e IL-10 y la inhibición de la maduración de las células dendríticas, lo que evita la presentación de antígenos y la activación de linfocitos T, por lo que inicia la reparación del daño en los tejidos (4).

La falta de eliminación del agente causal o una exposición prolongada conduce a la inflamación crónica (17). Su duración puede ser de meses a años y se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis, necrosis tisular (19) y la presencia de linfocitos y macrófagos (17). Puede ocasionar daños severos, como lesionar órganos, generar dolor e interferir con las funciones normales del cuerpo (1). Tal como ocurre en la artritis reumatoide, donde el dolor y la disfunción articular se deben a la constante inflamación de la membrana sinovial.

Para disminuir la sintomatología durante la inflamación, como el dolor y la fiebre (4), o evitar las consecuencias adversas de la inflamación exacerbada como en los trastornos autoinmunes, las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer (45), en la práctica clínica tradicional se utilizan medicamentos antiinflamatorios que se clasifican en dos grandes grupos: antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y esteroideos (12).

3.5. AINES

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son un grupo de medicamentos químicamente diversos, pero con las mismas propiedades terapéuticas. Se encuentran entre los medicamentos más antiguos y efectivos para el tratamiento de la fiebre, el dolor y la inflamación, por lo que son de los más recetados en el mundo (13).

El mecanismo de acción de los AINES consiste en inhibir la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, mediante acetilación reversible o irreversible de la ciclooxigenasa (COX), la enzima responsable de la conversión del ácido araquidónico en el mediador inflamatorio (13).

Se conocen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa: la COX-1, que es la responsable de la producción fisiológica de prostaglandinas y está implicada en procesos protectores gástricos, renales, etc., y la COX-2 que es inducida por la respuesta inflamatoria y es la responsable del aumento en la síntesis de citocinas. Todos los AINES inhiben en proporciones diferentes a la COX-1 y la COX-2, bajo este criterio se clasifican en inhibidores no selectivos (actúan en ambas isoformas), inhibidores preferenciales de la COX-2 e inhibidores selectivos de COX-2 (13, 14). A

continuación, se describirán las principales características del naproxeno y del paracetamol como algunos de los AINES más adquiridos en México, y que se consideran un estándar para comparar el efecto antiinflamatorio de otros fármacos de referencia.

3.5.1. Naproxeno

El naproxeno es un fármaco derivado del ácido propiónico (Figura 4). Es el único AINE que se administra como un enantiómero puro, el isómero (S), por tener mayor actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética (46). Se utiliza para reducir el dolor, la inflamación, la fiebre y la rigidez en afecciones como la artritis reumatoide, osteoartritis, cálculos renales, gota y cólicos menstruales. Es un inhibidor no selectivo de COX-1 y COX-2 (Figura 6), por lo que se asocia con efectos adversos como irritación gástrica, dolor abdominal y acidez estomacal (46, 47).

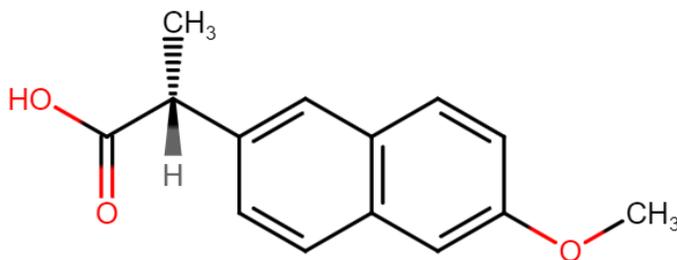


Figura 4. Estructura química del Naproxeno. Figura creada con Fishersci.es

3.5.2. Paracetamol

El paracetamol, también llamado acetaminofén, es un fármaco derivado de la acetilación del p-aminofenol (Figura 5), posee acción analgésica y antipirética (14). Su mecanismo de acción aún no está bien definido, pero estudios recientes sugieren su acción a nivel del sistema nervioso central con inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Figura 6) (14). El efecto antiinflamatorio de este fármaco es casi nulo debido a que no inhibe la síntesis de prostaglandinas a nivel periférico, ya que en presencia de altas concentraciones de peróxidos, como sucede en los sitios de inflamación, su capacidad para inhibir la ciclooxigenasa se vuelve deficiente, sin embargo, su potencia analgésica y antipirética es similar al ácido acetilsalicílico y otros

AINES (13). Presenta efectos secundarios a nivel gastrointestinal, renal y vascular, en menor grado que el naproxeno, sin embargo, estudios recientes informan la generación de daño hepático agudo (48, 49), por lo que debe usarse en la dosis efectiva más baja y por el menor tiempo posible.

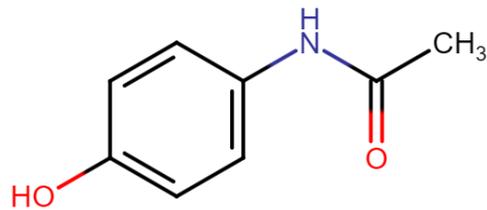


Figura 5. Estructura química del Paracetamol. Figura creada con Fishersci.es

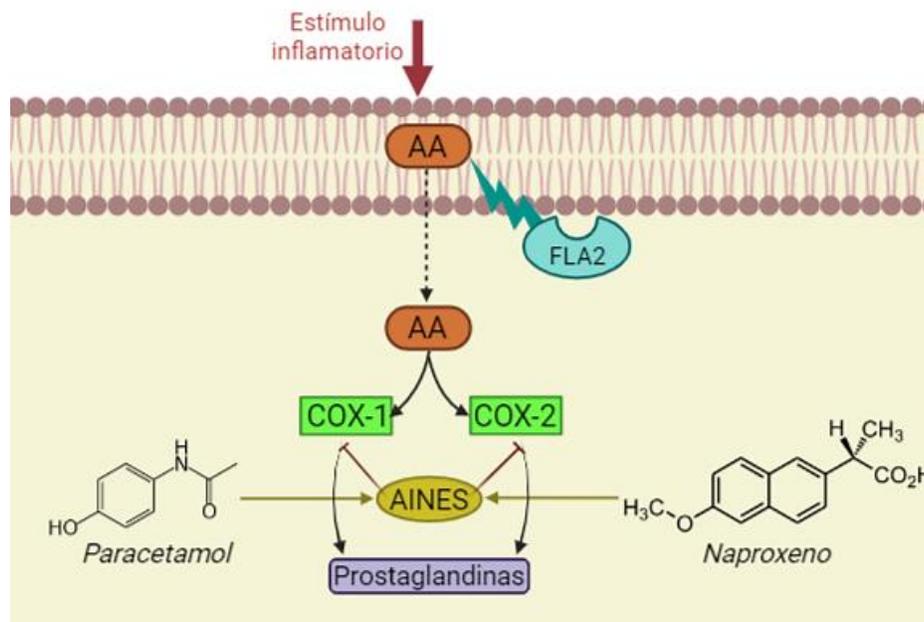


Figura 6. Mecanismo de acción de los AINES y estructura química de paracetamol y naproxeno.

En respuesta a un estímulo contra la célula, la enzima fosfolipasa A2 libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana, que por acción de las ciclooxigenasas se transforma en el mediador inflamatorio: las prostaglandinas. AA: Ácido araquidónico, FLA2: Fosfolipasa A2, COX-1: ciclooxigenasa 1, COX-2: ciclooxigenasa 2, AINES: antiinflamatorios no esteroideos. Basada y modificada de Cantú S, Jin Lee H, et al. 2017. Figura creada con Biorender.com

3.6. Corticosteroides

Los corticosteroides son compuestos hormonales derivados del colesterol. Según su función metabólica, se dividen en glucocorticoides y mineralocorticoides (50). El tratamiento con glucocorticoides está indicado para suprimir la respuesta inflamatoria. Los mineralocorticoides se utilizan para tratar la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares y renales, por su papel en la regulación de la concentración de los minerales corporales (51). El término corticosteroide se utiliza erróneamente para referirse solo a los glucocorticoides (50).

Los glucocorticoides que poseen actividad antiinflamatoria son de interés en este escrito, por lo que se describen sus características. Son sustancias lipofílicas pequeñas que atraviesan fácilmente las membranas celulares y se unen a los receptores de glucocorticoides (GR) en el citoplasma (52). La unión de los glucocorticoides con sus receptores forma un complejo receptor-corticosteroide que se activa y se transloca al núcleo, donde interactúa con proteínas coactivadoras o represoras transcripcionales que inducen el aumento o la inhibición de la expresión de genes inflamatorios (53). Cuando el complejo interactúa con la proteína coactivadora CBP se inhibe la actividad del dominio funcional histona acetiltransferasa (HAT) de manera directa, e indirectamente por la incorporación de la enzima HDAC2, que desacetila a las histonas centrales del complejo que activa la transcripción de genes proinflamatorios, lo que genera la inhibición del factor de transcripción NF- κ B (54), tal como se representa en la Figura 7.

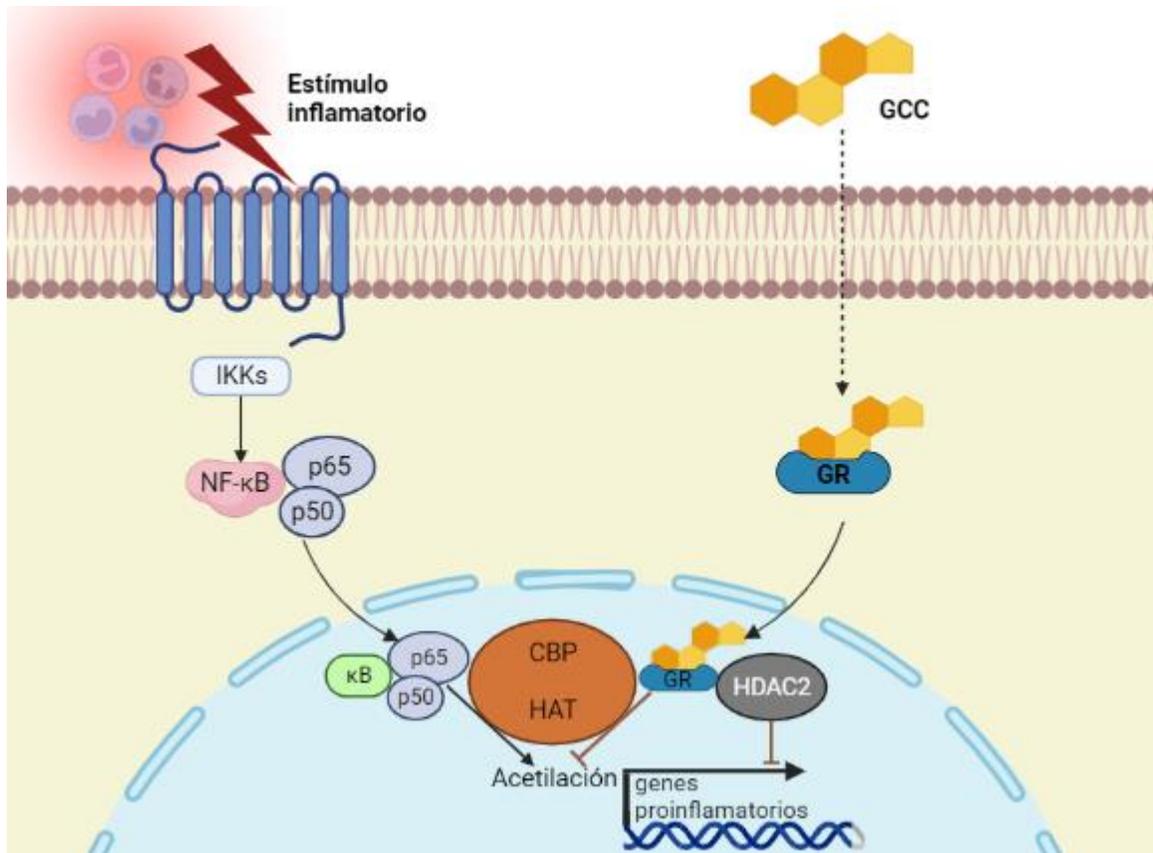


Figura 7. Mecanismo de acción de los glucocorticoides. El estímulo inflamatorio activa la vía de señalización NF-κB que inicia con IKK, que pone en marcha al factor de transcripción NF-κB. El complejo κB, p50 y p65 se transloca al núcleo y se acopla a la proteína coactivadora CBP donde se acetilan las histonas centrales e induce el incremento de la expresión de genes proinflamatorios. Sin embargo, en presencia de glucocorticoides, se forma el complejo receptor de glucocorticoide-glucocorticoide que ocasiona la desacetilación de las histonas en el núcleo y la consecuente represión de los genes inflamatorios. GCC: glucocorticoide; IKK: inhibidor del complejo cinasa NF-κB; MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno; NF-κB: factor nuclear-κB, IκB: inhibidor del NF-κB; p65: proteína p65; p50: proteína p50; CBP: proteína de unión a CREB; GR: receptor citosólico de glucocorticoide; HAT: histona acetiltransferasa; HDAC2: histona desacetilasa 2. Modificada de Barnes PJ. Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics; 2017. Figura creada con BioRender.com

3.6.1. Dexametasona

La dexametasona es un fármaco sintético análogo del cortisol, que pertenece a la clase de los glucocorticoides y es de los más utilizados de este grupo, con propiedades analgésicas, antiinflamatorias (a dosis bajas) e inmunosupresoras (en dosis más altas) (51). Se caracteriza por inducir la apoptosis y la extravasación de los neutrófilos; inhibir a la fosfolipasa A2, que es una molécula que promueve la formación de los derivados del ácido araquidónico; y especialmente por regular varios factores de transcripción

incluidos el NF- κ B y AP-1, que regulan la transcripción de genes clave en la inflamación (55). Sin embargo, el uso de dexametasona a largo plazo puede ocasionar efectos adversos como hiperglucemia, hipertensión, osteoporosis y alteraciones metabólicas, por mencionar algunos (56).

Dado que los AINES y los glucocorticoides presentan desventajas que no se pueden evitar, actualmente se continúa la búsqueda de terapias alternativas.

3.7. Péptidos

Los péptidos son secuencias de aminoácidos más cortas que las proteínas, unidos entre sí mediante enlaces peptídicos que se forman a partir de la asociación de un grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro (57).

La importancia de estas moléculas radica en las diferentes funciones que desempeñan en nuestro organismo, por ejemplo:

- Hormonas: la insulina, el glucagón, la oxitocina y la vasopresina.
- Agentes vasoactivos: la angiotensina II, la bradisinina y PNA (péptido natriurético atrial).
- Neurotransmisores: la encefalina, la sustancia P y las endorfinas.
- Antibióticos: la valinomicina y la gramicidina S.
- Cofactores enzimáticos: el glutatión, que es cofactor en algunas reacciones redox (58).

En las últimas décadas, se consideró a los péptidos como una alternativa terapéutica y constituyen una estrategia reciente e innovadora. Poseen un amplio espectro de beneficios clínicos y mayores ventajas con respecto a los fármacos tradicionales, proteínas y anticuerpos recombinantes, pues no solo presentan efectos antiinflamatorios, pueden tener actividad anticancerígena, antioxidante y de penetración celular. Algunas ventajas en comparación con las proteínas y anticuerpos recombinantes son la capacidad de penetrar a los tejidos, dado que presentan baja inmunogenicidad y menor tamaño, menores costos de producción por las técnicas de

síntesis y porque su almacenamiento es más eficiente a temperatura ambiente (59). En comparación con los fármacos, los péptidos presentan alta diversidad química y biológica, gran especificidad, gran actividad, pocos efectos secundarios y en general baja toxicidad, ya que no se acumulan en el organismo al tener una vida media relativamente corta (15).

Los péptidos antiinflamatorios pueden provenir de plantas, animales, hongos y de los alimentos. Sin importar su origen, los péptidos antiinflamatorios presentan efectos inmunomoduladores, que incluyen la modulación en la diferenciación de las células de la respuesta inmune e intervención en las vías de transducción de señales que se asocian con la expresión de citocinas proinflamatorias (16). Algunos péptidos que se evaluaron para prevenir y tratar el proceso inflamatorio son el cordymin, que proviene de un hongo medicinal (60) y el mastoparán, que se obtiene del veneno de la avispa (61).

Morales-Martínez y colaboradores describieron un péptido derivado del factor inhibitorio de la locomoción de monocitos (FILM) de *Entamoeba histolytica* (62). El péptido se constituye de tres aminoácidos esenciales: cisteína, asparagina y serina, que por el código de cada aminoácido se identifica con las siglas CNS. Esto se realizó en primera instancia, mediante la predicción de los estudios *ab initio* en Hartree-Fock y DFT (B3LYP), finalmente los análisis de la estructura electrónica y geométrica respectivamente, permitieron la identificación del grupo farmacóforo (63). Se le atribuyen propiedades antiinflamatorias del FILM, como la inhibición de la hipersensibilidad retardada cutánea al dinitroclorobenceno en cobayos y jerbos, y la inhibición del estallido respiratorio de fagocitos mononucleares humanos (62). Por lo que se procedió con su síntesis y posteriormente a probar su actividad antiinflamatoria *in vivo* para contrastar las predicciones teóricas realizadas.

4. Planteamiento del problema

La inflamación es una respuesta del sistema inmune que se presenta ante cualquier estímulo que puede ocasionar un daño, por lo que es un mecanismo de protección. Sin embargo, en algunos casos donde la respuesta no fue contenida adecuadamente o el daño no fue resuelto, la inflamación se transforma en exacerbada o crónica, que puede causar daño a los tejidos, órganos y limitar sus funciones, hasta inducir enfermedades crónicas y autoinmunes como artritis, arteriosclerosis e incluso cáncer. Para contrarrestar los efectos de la inflamación no controlada se utilizan antiinflamatorios, sin embargo, su uso prolongado ocasiona efectos adversos importantes que orillan a que el paciente abandone el tratamiento, por lo que es relevante generar nuevas terapias. Aquí es donde interviene la tecnología que, a través de la química computacional, permite el diseño y desarrollo de nuevas moléculas, así como el estudio de su estructura electrónica y el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas basadas en su reactividad química.

A través de métodos computacionales se desarrolló el péptido CNS que, según los estudios de la estructura electrónica y de reactividad química, mantiene las propiedades antiinflamatorias del pentapéptido antecesor, el factor inhibitorio de la locomoción de monocitos (FILM) de *Entamoeba Histolytica*. Por lo que en este trabajo de tesis la pregunta a abordar es si el péptido CNS posee propiedades antiinflamatorias *in vivo* como se estudió previamente, para ello se utilizó un modelo de inflamación inducida por LPS y se evaluó su efecto en comparación con medicamentos antiinflamatorios.

5. Hipótesis

Si el péptido CNS posee actividad antiinflamatoria, se modificará la respuesta inmune de manera que durante la inducción de la inflamación con LPS, disminuirá la concentración de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-6, así como la activación de las células, macrófagos, células NK y linfocitos T; y se inhibirá la producción de especies reactivas del oxígeno ROS, lo que evitará el estrés oxidativo.

6. Objetivo

6.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria del péptido CNS mediante un modelo experimental murino de inflamación aguda inducida por LPS.

6.2. Objetivos específicos

Determinar el efecto del péptido CNS en el índice esplénico de ratones macho CBA/Ca estimulados con LPS mediante el cociente obtenido del peso del bazo y el peso del ratón.

Determinar el efecto del péptido CNS sobre el número de las poblaciones celulares de linfocitos T CD3⁺, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, macrófagos, células NK y células B en el bazo de ratones macho CBA/Ca estimulados con LPS mediante citometría de flujo.

Determinar el efecto del péptido CNS en la concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones macho CBA/Ca estimulados con LPS por citometría de flujo.

Evaluar el efecto del péptido CNS en la actividad de enzimas antioxidantes SOD, GPx y catalasa, y en los niveles de MDA en sangre, bazo y cerebro de ratones macho CBA/Ca estimulados por LPS.

7. Diseño experimental

7.1. Diseño de estudio

Tipo de estudio: Prospectivo, transversal, comparativo, experimental.

7.2. Población o muestra

6 grupos de 5 ratones macho CBA/Ca de 19 semanas de edad.

7.3. Variables

7.3.1. Variable independiente

Inducción de inflamación por LPS.

Tratamientos (péptido CNS, dexametasona, paracetamol, naproxeno y vehículo como control).

7.3.2. Variable dependiente

Tamaño del bazo.

Concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en pg/mL.

Número de las poblaciones de linfocitos T, macrófagos, células NK y células B en porcentaje de células.

Actividad enzimática de SOD, GPx y catalasa en U/mg de proteína.

Concentración de MDA en nmol/mg de proteína.

7.4. Material

Pipetas Pasteur de vidrio

Tubos Falcon de 50 y 15 mL

Tubos Eppendorf de 1.5 y 600 μ L

Jeringas de 1 y 3 mL

Puntas para pipetas de 1000, 200, 50 y 10 μ L

Tubos de ensayo de poliestireno de fondo redondo de 5 mL

Placas de 96 pozos fondo plano para ELISA

7.5. Equipo e instrumentos

Balanza analítica marca Sartorius®

Balanza granataria marca Sartorius-OHAUS®

Micropipetas marca Eppendorf y Gilson de 1000, 200, 50, 10 y μ L

Centrífugas marca Eppendorf

Campana de flujo laminar marca Veco

Citómetro de flujo FACS Aria II Becton and Dickinson™

Espectrofotómetro UV/VIS para placas de 96 pocillos Multiskan GO marca ThermoScientific

7.6. Reactivos

Lipopolisacáridos de *Escherichia coli* 0111: B4; Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania

PBS

Péptido CNS

Fosfato sódico de dexametasona inyectable

Paracetamol solución inyectable

Naproxeno 100 mg/mL

PBS/Heparina

TRIzol™

Cloroformo/Alcohol isoamílico (49:1)

Alcohol isopropílico

Solución de limpieza BD FACS™

7.7. Metodología

7.7.1. Administración de tratamientos

Los fármacos se administraron vía intraperitoneal, a excepción del péptido, debido a que es la segunda vía que se absorbe más rápido gracias a que el peritoneo es una zona de gran irrigación sanguínea.

Se emplearon 4 grupos de ratones CBA/Ca a los que se les administró: el péptido CNS (10 mg/kg) vía intravenosa o dexametasona (1 mg/kg) (3) vía intraperitoneal o paracetamol (100 mg/kg) (64) vía intraperitoneal o naproxeno (7 mg/kg) (65) vía intraperitoneal. Además, se utilizaron dos grupos control, uno negativo al que se le administró únicamente el vehículo (PBS) y uno positivo al que se le administró LPS (5 mg/kg) (10), ambos por vía intraperitoneal. La administración del péptido, dexametasona, paracetamol y naproxeno se realizó una hora antes de la inducción de la inflamación con LPS (5 mg/kg) (10).

7.7.2. Obtención de muestras

Luego de dos horas de la administración de LPS, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical para extraer la sangre, el bazo y el cerebro.

Se expuso de inmediato el corazón para coleccionar la sangre en tubos Eppendorf y se agregaron 200 μ L de PBS-heparina. Se tomaron alícuotas de 20 μ L para realizar cada determinación de enzimas y MDA. A la alícuota para la determinación de MDA se agregaron 10 μ L de BHT. La muestra sobrante de sangre se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos para obtener el plasma.

El bazo se disgregó al hacerlo pasar a través de una malla de nylon, con ayuda del émbolo de una jeringa. Las células disgregadas se coleccionaron en un tubo Falcon que contenía PBS, el tubo se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió con 500 μ L de PBS estéril. Se tomó una alícuota de 100 μ L que se fijó con una solución comercial (BD FACS™ Lysing Solution, Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Además, se tomaron alícuotas de 30 μ L para cada determinación de enzimas y MDA. A la alícuota de MDA se adicionaron 10 μ L de BHT.

Al extraer el cerebro, se le adicionaron 200 μ L de PBS para sonificarlo y tomar alícuotas de 50 μ L para la cuantificación de actividad enzimática y concentración de malondialdehído (MDA). En la alícuota de MDA se agregaron también 10 μ L de BHT.

7.7.3. Determinación del índice esplénico

El índice esplénico se obtuvo como el producto del cociente del peso del bazo entre el peso del ratón.

7.7.4. Evaluación de las poblaciones celulares en bazo de ratones

CBA/Ca mediante citometría de flujo

Se prepararon 3 mezclas de anticuerpos monoclonales anti-ratón específicos para cada población celular acoplados a diferentes fluorocromos. La primera mezcla contenía antiCD3 conjugado con FITC, antiCD4 conjugado con APC, antiCD8 conjugado con PE y antiCD45 conjugado con PRCP; la segunda mezcla contenía antiCD19 conjugado con APC, antiCD107b conjugado con PE y antiCD45 conjugado

con PRCP; y la tercera contenía antiCD16/32 conjugado con PE y antiCD3 conjugado con FITC.

Las muestras de células de bazo se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregaron 165 µL de una solución PBS/Azida 0.1%/Albúmina 1% para resuspender el botón. Se realizó la tinción celular con 50 µL de cada suspensión celular y 50 µL de cada mezcla de anticuerpos monoclonales. Las preparaciones se incubaron durante 30 minutos protegidas de la luz a temperatura ambiente.

Se adquirieron 10,000 células por muestra en un citómetro de flujo FACS Aria II Becton and Dickinson y se analizaron en el software Flowing de Turku Bioscience, Tykistökatu 6, FI-20520 Turku, Finlandia.

7.7.5. Determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 mediante citometría de flujo

Se utilizó el estuche comercial BD Cytometric Bread Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD 560485, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se reconstituyó el estándar de citocinas con 2 mL de diluyente del estándar, se mezcló suavemente y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se preparó una curva con diluciones seriadas en el orden siguiente: blanco, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 y 1:4096. En el tubo blanco se adicionaron 100 µL de diluyente del estándar como la concentración cero de la curva. A los tubos subsecuentes se agregaron 100 µL de diluyente de ensayo. Se adicionaron 100 µL del estándar y 100 µL del diluyente al tubo 1:2, se agitó suavemente con ayuda de una micropipeta y se realizaron las diluciones seriadas mediante la transferencia de 100 µL del tubo 1:2 al tubo 1:4, del tubo 1:4 al tubo 1:8 y así hasta la última dilución de 4096, mezclando suavemente entre cada transferencia.

La adición de perlas de captura requirió la preparación de un pool, el cual se realizó tomando en cuenta el número de muestras, el número de puntos de la curva y el número de controles, ya que se pipetearon 3.3 µL de cada perla por reacción. Las

perlas se mezclaron suavemente antes de utilizarse. Se agregaron 17 μL de la mezcla de perlas a cada tubo y 17 μL de estándar a las muestras. Se adicionaron 17 μL de reactivo de detección de las citocinas a todos los tubos y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Después se agregaron 330 μL de amortiguador de lavado a cada tubo y se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 100 μL de amortiguador de lavado. Las soluciones se transfirieron a tubos de citometría y se enjuagó cada tubo de donde provenía la muestra con 100 μL de buffer de lavado.

La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACS Aria II, Becton and Dickinson y el software BD™ Cytometric Bead Array Software.

7.7.6. Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de SOD

La actividad antioxidante de SOD se evaluó a partir de la reacción de la xantina oxidasa con xantina, donde se produce ácido úrico y el anión superóxido, el cual posteriormente reacciona con INT o 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio, un colorante que al proveer tonalidades rojas indica la formación del compuesto formazán, el cual absorbe luz a 505 nm. La actividad de SOD se evaluó con el kit comercial RANSOD (Randox Laboratories, Antrim, Reino Unido) como el grado de inhibición de la formación de formazán.

Se utilizaron 3 μL de muestra (sangre diluida o tejido sonificado) y 100 μL de reactivo R1, se mezclaron y la reacción se llevó a 37°C en el MultiSkan Go. Después se agregaron 15 μL de reactivo R2 y transcurridos 30 segundos se tomó la lectura a 505 nm. Se realizó una curva estándar para determinar la actividad.

7.7.7. Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de catalasa

La actividad de catalasa en los eritrocitos se evaluó de acuerdo con el método descrito por Aebi. Primero, a las muestras de sangre se les determinó la concentración de hemoglobina con el reactivo de Drabkin, en el cual se mezclaron 2 μL de sangre con 498 μL de reactivo de Drabkin, se midieron en el espectrofotómetro a 540 nm y se

calculó la concentración de hemoglobina en una curva patrón. Se realizaron diluciones de cada muestra para ajustarlas a una concentración de 5 g/dL.

Se utilizaron 10 μ L de muestra (sangre a 5 g/dL o tejido sonicado), se diluyeron en 290 μ L de PBS estéril y se mezclaron vigorosamente. Se tomaron 12 μ L de la dilución y 188 μ L de PBS estéril para mezclarlos en una placa de cuarzo. Se adicionaron 100 μ L de H₂O₂ e inmediatamente se leyó la placa en el espectrofotómetro a 240 nm y se realizó una segunda lectura 60 segundos después.

La presencia de catalasa se calculó al considerar la diferencia entre la absorbancia final y la inicial. La actividad específica se obtuvo al dividir la actividad entre la concentración de hemoglobina para sangre o entre la concentración de proteínas totales para los tejidos.

7.7.8. Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de GPx

La determinación de GPx se fundamenta en una reacción acoplada con la enzima glutatión reductasa. Primero, la glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación del glutatión (GSH) con el hidroperóxido de cumeno, después el glutatión oxidado (GSSH) inmediatamente se convierte en su forma reducida de manera coordinada en la que NADPH se oxida y pasa a NADP⁺. Por lo tanto, la actividad de GPx se calculó a partir de la disminución de NADPH a 340 nm en el MultiSkan Go.

Se utilizó un estuche comercial marca RANDOX (Randox Laboratories, Antrim, Reino Unido). Se mezclaron 5 μ L de muestra (sangre diluida o tejido sonicado) con 300 μ L de diluyente RANSEL. Se tomaron 2.5 μ L de la dilución y se adicionaron 125 μ L del reactivo 1 RANSEL, se mezclaron y se agregaron 5 μ L de hidroperóxido de cumeno. Para medir la absorbancia, la reacción se llevó a 37°C y las lecturas se realizaron a 340 nm después de 1 y 2 minutos.

7.7.9. Evaluación de la actividad antioxidante mediante la determinación de la concentración de MDA

La concentración de MDA se evaluó con el método de Jentzsch. Se tomaron 20 μ L de muestra homogeneizada (sangre y tejidos) y se agregaron 87.5 μ L de agua destilada

estéril, se mezclaron con 100 μ L de ácido orto-fosfórico (0.2 M), 12.5 μ L de BHT (12.6 mM) y 12.5 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0.11 M en 0.1 M de NaOH). Los estándares y las muestras se calentaron en un baño de agua a 95°C por 45 minutos, después se colocaron en hielo para detener la reacción. Se mezclaron con 250 μ L de n-butanol y 25 μ L de una solución saturada de NaCl. Se centrifugaron y se tomó la fase orgánica, la cual se midió en el espectrofotómetro a 535 nm. Para calcular la concentración de MDA, se utilizó una curva estándar preparada con 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano.

7.7.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Graph Pad Prism 5. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis con prueba Post Hoc de Dunn. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron cuando $P \leq 0.05$.

8. Resultados

8.1. Efecto del péptido CNS sobre el índice esplénico de ratones CBA/Ca con inflamación inducida por LPS

El bazo es un órgano linfoide secundario clave en la fisiopatología de la inflamación exacerbada, esto se debe a que elimina glóbulos rojos envejecidos y filtra la sangre de patógenos y células anormales (66). Además, la evolución de la inflamación requiere de células del sistema inmune, que se activan para su proliferación en el bazo, por lo que a mayor proliferación mayor tamaño (67).

Para evaluar el efecto del péptido CNS sobre el índice esplénico, después de la inducción de la inflamación con LPS, se extrajeron los bazos y se pesaron, para calcular el cociente derivado del peso del bazo entre el peso del ratón. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que el péptido no modificó el índice esplénico (Figura 8).

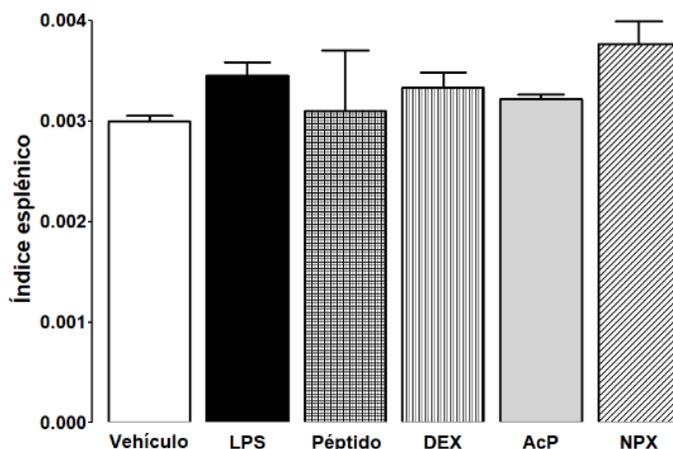
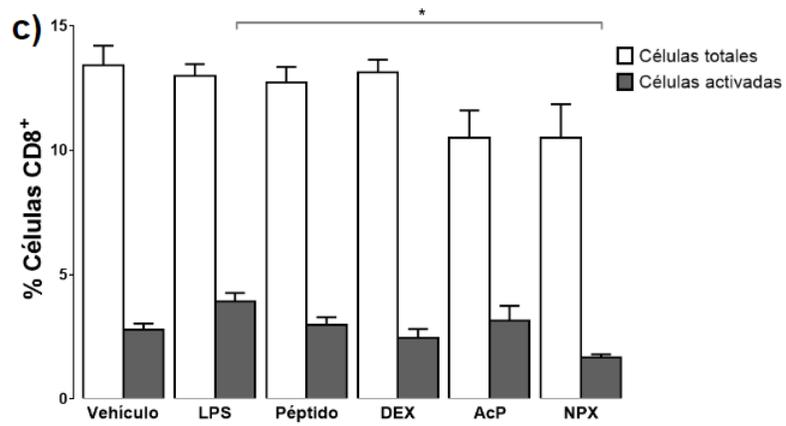
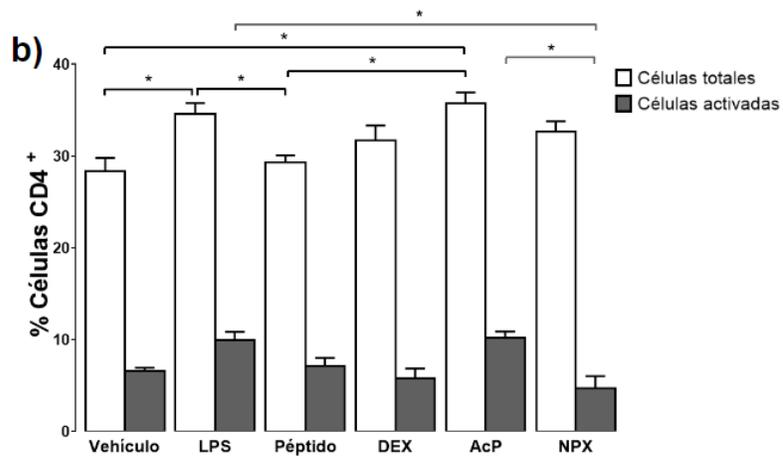
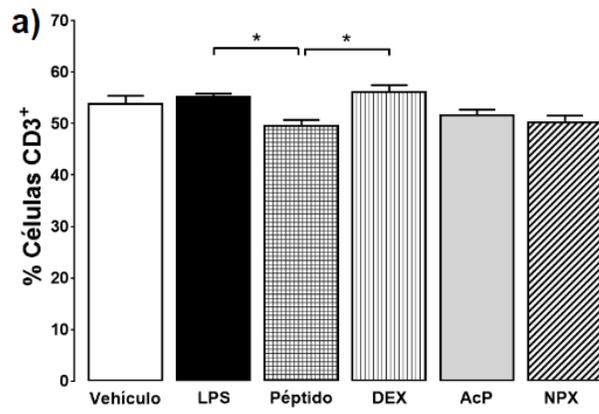


Figura 8. Efecto del péptido CNS sobre el índice esplénico de ratones CBA/Ca estimulados con LPS. Se analizaron 6 grupos de 5 ratones macho CBA/Ca cada uno. El grupo control negativo se trató únicamente con PBS (vehículo) y el grupo control positivo se trató con lipopolisacárido (5 mg/kg) (LPS). Los siguientes 4 grupos se trataron con: el péptido CNS (10 mg/kg) (Péptido), o dexametasona (1 mg/kg) (DEX), o paracetamol (100 mg/kg) (AcP) o naproxeno (7 mg/kg) (NPX) en una sola ocasión y una hora después se estimularon con LPS (5 mg/kg). Pasadas dos horas se extrajo el bazo y se pesó para determinar el índice esplénico. Cada columna representa la media \pm SEM de cada grupo. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn ($P \leq 0.05$).

8.2. Efecto del péptido CNS en las poblaciones celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, Mac-3⁺ y CD16⁺/32⁺ en el bazo de ratones CBA/Ca

Dado que el bazo contiene distintos linajes de células, que incluyen a los principales tipos de fagocitos mononucleares, células T y células B, que durante la filtración de la sangre identifican a los patógenos y antígenos lo que promueve la respuesta inflamatoria, en este trabajo se determinaron las poblaciones celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, Mac-3⁺, B220⁺ y CD16⁺/32⁺ en el bazo, así como la activación de las células CD4⁺, CD8⁺, Mac-3⁺ y B220⁺ para evaluar el efecto de la administración del péptido CNS en el modelo de inflamación aguda inducida.

El tratamiento con el péptido disminuyó la población de células CD3⁺ que corresponde a los linfocitos T CD3⁺, con relación al grupo control positivo tratado con LPS y al grupo tratado con dexametasona (Figura 9a). En la población de linfocitos CD4⁺, las células totales del grupo tratado con LPS incrementaron significativamente, en comparación con los grupos tratados con el vehículo y con el péptido, así como en el grupo tratado con paracetamol en comparación con los grupos tratados con el vehículo y con el péptido (Figura 9b). Las células activadas de linfocitos CD4⁺ disminuyeron significativamente en el grupo tratado con naproxeno en comparación al grupo tratado con paracetamol y al grupo control positivo tratado con LPS (Figura 9b). Con relación a los linfocitos CD8⁺, ningún tratamiento generó cambios en las células totales, sin embargo, el naproxeno disminuyó la activación de CD8⁺ en comparación al grupo control positivo tratado con LPS (Figura 9c). En el caso del porcentaje de células Mac-3⁺ no se detectaron cambios con ningún tratamiento (Figura 9d). Por otra parte, en el porcentaje de células B220⁺ que corresponde a linfocitos B, el grupo de ratones tratados con naproxeno incrementó significativamente esta población, tanto en células totales como en activadas en comparación con los grupos control (Figura 9e). Finalmente, se encontró que el péptido disminuyó significativamente la población CD16⁺/32⁺ que corresponde a las células NK, en comparación con el grupo control tratado con vehículo (Figura 9f).



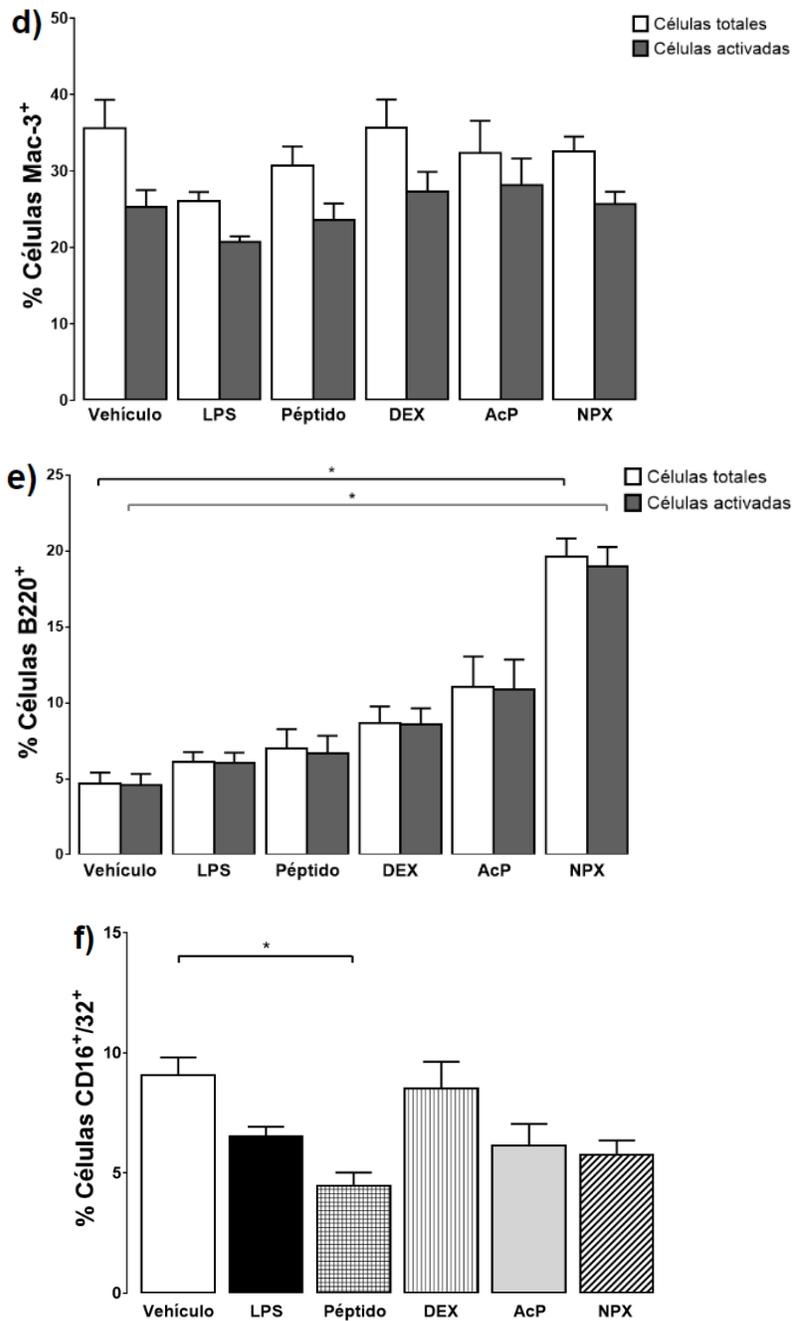
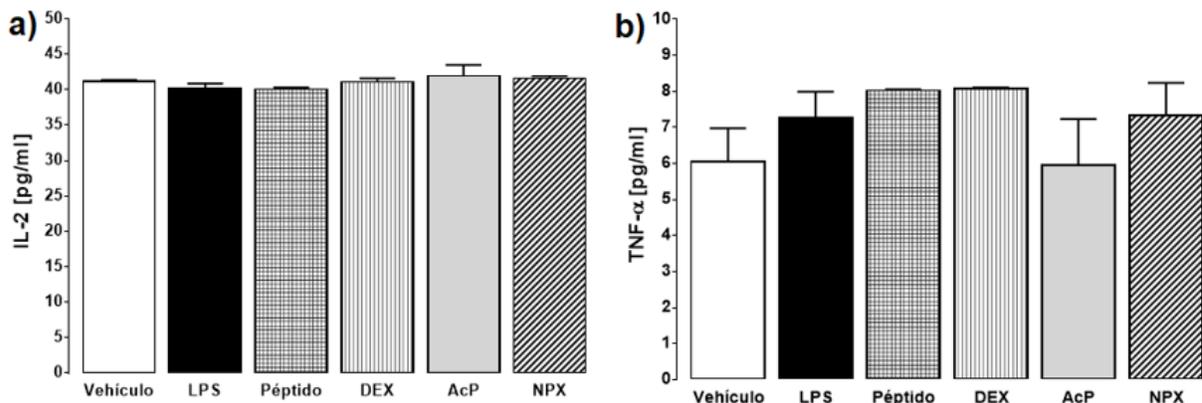


Figura 9. Efecto del péptido CNS sobre las poblaciones celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B220⁺, Mac-3⁺ y CD16⁺/32⁺ en el bazo de ratones CBA/Ca estimulados con LPS. Se analizaron 6 grupos de 5 ratones macho CBA/Ca cada uno. El grupo control negativo se trató con PBS (vehículo) o lipopolisacárido (5 mg/kg) (LPS) exclusivamente. Los siguientes cuatro grupos se trataron con péptido CNS (10 mg/kg) (Péptido), o dexametasona (1 mg/kg) (DEX), o paracetamol (100 mg/kg) (AcP) o naproxeno (7 mg/kg) (NPX) y una hora después se trataron con LPS (5 mg/kg). Dos horas más tarde se extrajeron los bazos, se procesaron las muestras para obtener las células, se tiñeron con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos y se determinó el porcentaje celular mediante citometría de flujo. En a) se representa el porcentaje de linfocitos T CD3⁺, en b) el porcentaje de células T CD4⁺, en c) el porcentaje de linfocitos T CD8⁺, en d) el porcentaje de macrófagos Mac-3⁺, en e) el porcentaje de linfocitos B y en f) el porcentaje de células CD16⁺/32⁺ correspondiente a células NK. Cada columna

representa la media \pm SEM de cada grupo. Las diferencias significativas se obtuvieron con la prueba estadística de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn ($P \leq 0.05$).

8.3. Efecto del péptido CNS en la determinación de citocinas Th1/Th2/Th17 en el plasma de ratones CBA/Ca

Las citocinas son uno de los principales mediadores que regulan el proceso inflamatorio. Los cambios en la concentración de las citocinas Th1/Th2/Th17 se evaluaron mediante citometría de flujo en el plasma de ratones CBA/Ca dos horas después de la inducción de la inflamación aguda con LPS. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la cuantificación de citocinas Th1, que corresponde a las citocinas proinflamatorias IL-2, TNF- α e IFN- γ (Figura 10a, 10b y 10c). Interesantemente, el péptido, la dexametasona y el naproxeno no modificaron la concentración de la IL-4, pero el paracetamol aumentó con diferencia estadística significativa cerca de seis veces la concentración basal de esta citocina (Figura 10d). En el caso de la IL-4, IL-10 e IL-17, ningún tratamiento generó diferencias estadísticamente significativas (Figura 10e, 10f y 10g).



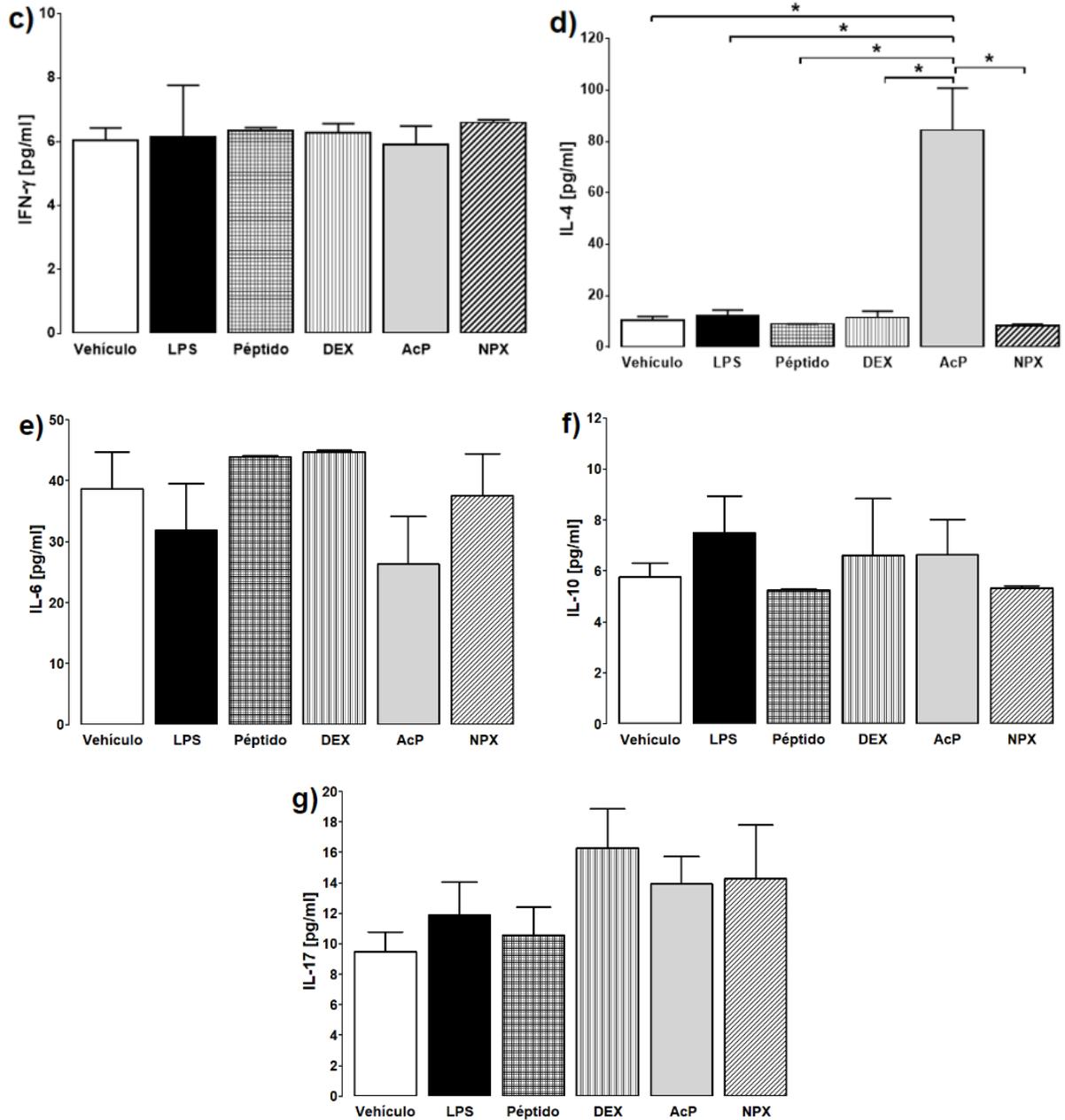


Figura 10. Efecto del péptido CNS en los niveles de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ en el plasma de ratones CBA/Ca estimulados con LPS. Se analizaron 6 grupos de 5 ratones macho CBA/Ca cada uno. El grupo control negativo se trató solamente con PBS (vehículo) y el grupo control positivo se trató con lipopolisacárido (5 mg/kg) (LPS) exclusivamente. Los siguientes 4 grupos se trataron con péptido CNS (10 mg/kg) (Péptido), o dexametasona (1 mg/kg) (DEX), o paracetamol (100 mg/kg) (AcP) o con naproxeno (7 mg/kg) (NPX) y una hora más tarde se trataron con LPS (5 mg/kg). Dos horas después se extrajo la sangre y se centrifugó para obtener el suero. Se adicionaron perlas de captura y se cuantificaron las citocinas por citometría de flujo. En a) se presenta la concentración de la citocina IL-2, en b) la concentración de TNF- α , en c) la concentración de INF- γ , en d) la concentración de IL-4, en e) de IL-6, en f) de IL-10 y en g) de IL-17. Cada columna representa la media \pm SEM de cada grupo. Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de Dunn ($P \leq 0.05$).

8.4. Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx y catalasa, y sobre la concentración de MDA en sangre de ratones CBA/Ca

El tratamiento con el péptido disminuyó en tendencia la actividad de SOD en comparación con el control negativo (Figura 11a) y la actividad de la enzima GPx con respecto al grupo tratado con dexametasona (Figura 11b) en sangre. No se detectaron diferencias significativas para la actividad de la enzima catalasa (Figura 11c). Finalmente, la concentración de MDA en sangre se mantuvo en los niveles basales en el grupo que recibió el péptido (Figura 11d). El tratamiento con naproxeno disminuyó considerablemente la actividad de SOD (Figura 11a), en comparación con el grupo LPS y el grupo vehículo.

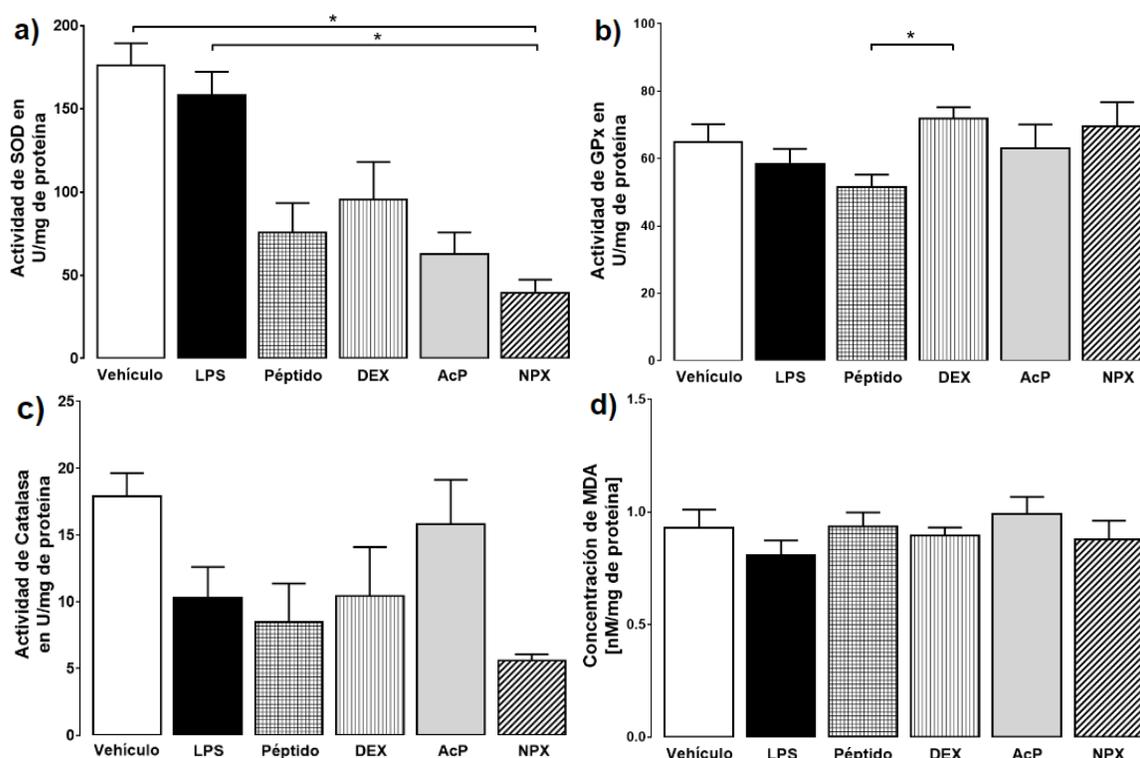


Figura 11. Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx y catalasa, y sobre la concentración de MDA en sangre de ratones CBA/Ca estimulados con LPS. Se analizaron 6 grupos de 5 ratones macho CBA/Ca cada uno. El grupo control negativo se trató solamente con PBS (vehículo) y el grupo control positivo se administró con lipopolisacárido (5 mg/kg) (LPS). Los siguientes 4 grupos se trataron con péptido CNS (10 mg/kg) (Péptido), o dexametasona (1 mg/kg) (DEX), o paracetamol (100 mg/kg) (AcP) o naproxeno (7 mg/kg) (NPX) y una hora más tarde se trataron con LPS (5 mg/kg). Dos horas después se obtuvieron las muestras sanguíneas y se realizaron las determinaciones correspondientes. En a) se representa la actividad de SOD, en b) la actividad de GPx,

en c) la actividad de catalasa y en d) la concentración de MDA en la sangre. Cada columna corresponde a la media \pm SEM de cada grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de Dunn ($P \leq 0.05$).

8.5. Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx, catalasa y sobre la concentración de MDA, en el bazo de ratones CBA/Ca

La administración del péptido, no modificó la actividad de la enzima SOD (Figura 12a), ni de la enzima catalasa (Figura 12c), pero aumentó la actividad de GPx con relación al grupo control negativo (Figura 12b) en el bazo. Por otro lado, el tratamiento con naproxeno elevó la concentración de MDA, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (Figura 12d).

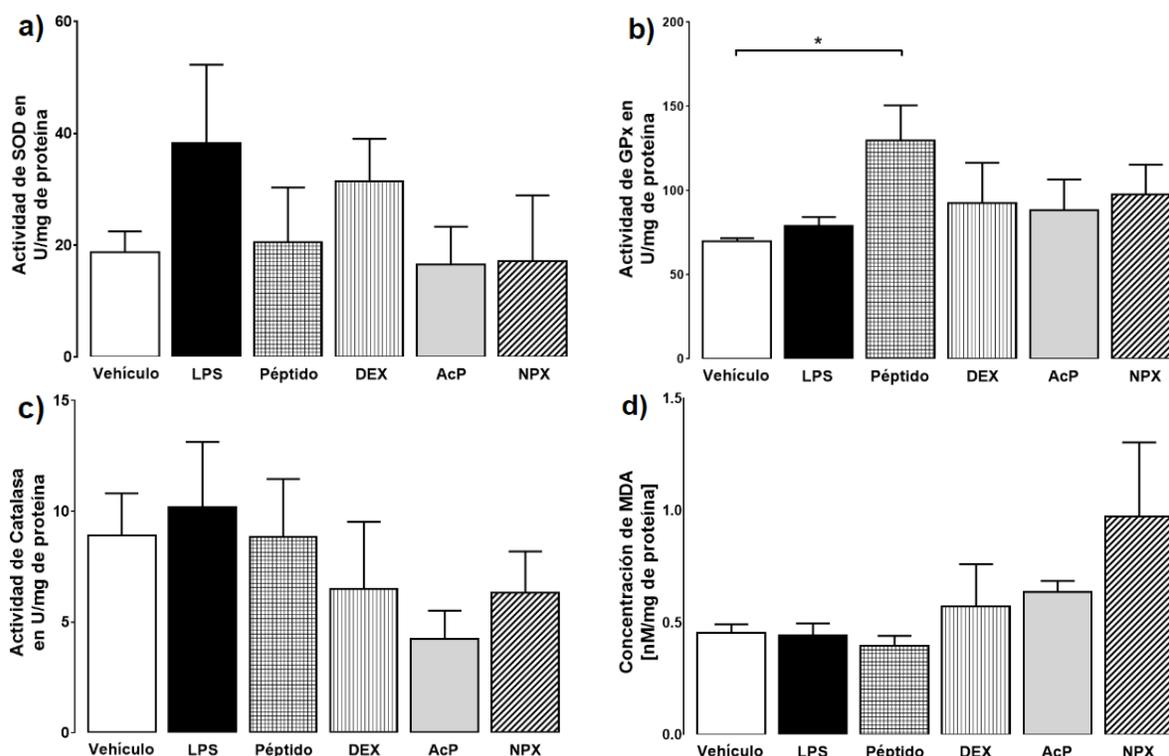


Figura 12. Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx, catalasa, y sobre la concentración de MDA en el bazo de ratones CBA/Ca estimulados con LPS. Se analizaron 6 grupos de 5 ratones macho CBA/Ca cada uno. El grupo control negativo se trató únicamente con PBS (vehículo) y el grupo control positivo se administró con lipopolisacárido (5 mg/kg) (LPS). Los siguientes 4 grupos se trataron con péptido CNS (10 mg/kg) (Péptido), o dexametasona (1 mg/kg) (DEX), o paracetamol (100 mg/kg) (AcP) o naproxeno (7 mg/kg) (NPX) y una hora más tarde se trataron con LPS (5 mg/kg). Dos horas después se obtuvieron las muestras del tejido y se realizaron las determinaciones correspondientes. En a) se representa la actividad de SOD, en b) la actividad de GPx, en c) la actividad de catalasa y en d) la concentración de MDA. Cada columna representa la media \pm SEM de cada grupo. Los datos se analizaron con la prueba estadística de Kruskal-Wallis y el post hoc de Dunn ($P \leq 0.05$).

8.6. Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx, catalasa y sobre la concentración de MDA, en el cerebro de ratones CBA/Ca

La actividad de la enzima SOD en el cerebro aumentó en el grupo tratado con el péptido, en comparación con el vehículo (Figura 13a), aunque sin diferencia estadística significativa. La actividad de GPx disminuyó cuando los ratones se trataron con dexametasona respecto al grupo control tratado con vehículo (Figura 13b). Ningún tratamiento modificó la actividad de catalasa (Figura 13c), ni la concentración de MDA (Figura 13d).

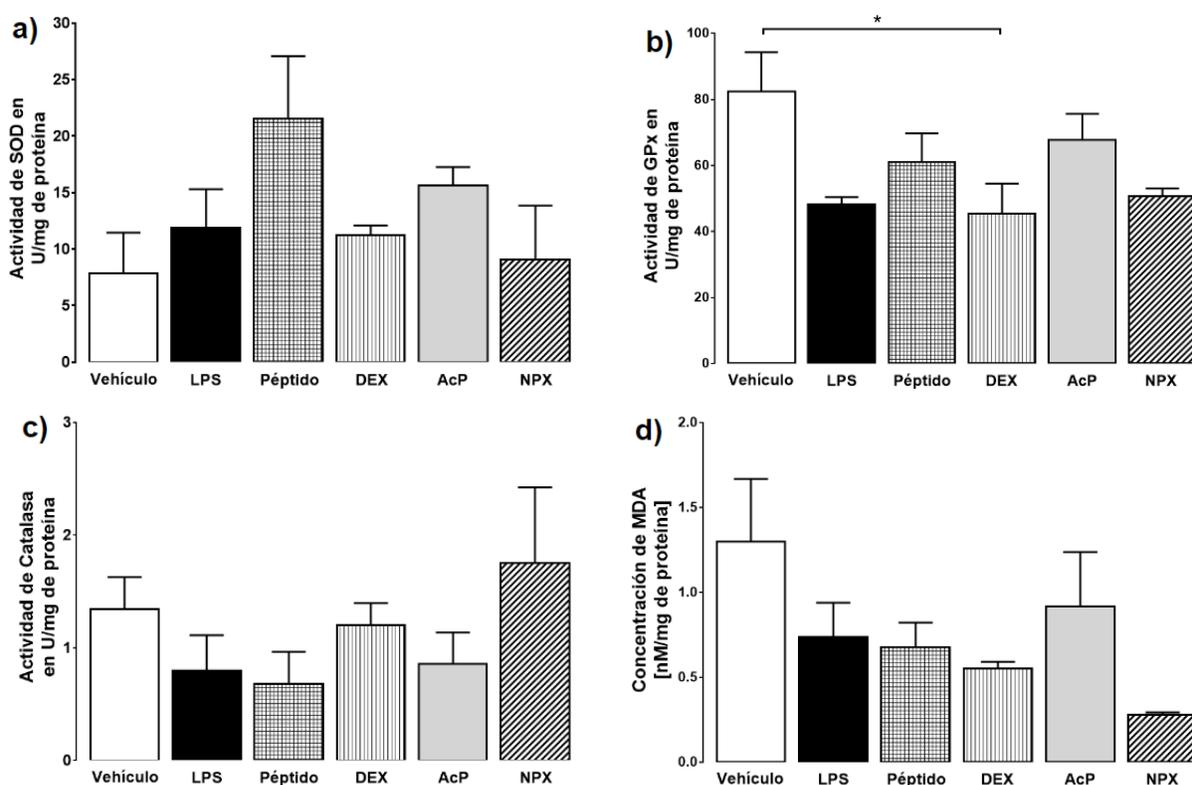


Figura 13. Efecto del péptido CNS sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx y catalasa, así como en la concentración de MDA en el cerebro de ratones CBA/Ca estimulados con LPS. Se estudiaron 6 grupos de 5 ratones macho CBA/Ca cada uno. El grupo control negativo se trató únicamente con PBS (vehículo) y el grupo control positivo se trató con lipopolisacárido (5 mg/kg) (LPS). Los siguientes 4 grupos se trataron con péptido CNS (10 mg/kg) (Péptido), o dexametasona (1 mg/kg) (DEX), o paracetamol (100 mg/kg) (AcP) o naproxeno (7 mg/kg) (NPX) y una hora más tarde se trataron con LPS (5 mg/kg). Dos horas después se obtuvieron las muestras del tejido y se realizaron las determinaciones correspondientes. En a) se representa la actividad de SOD, en b) la actividad de GPx, en c) la actividad de catalasa y en d) la concentración de MDA. Cada columna representa la media \pm SEM de cada grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn ($P \leq 0.05$).

9. Discusión

Gracias al trabajo de Soriano C. y colaboradores (62, 63) se caracterizó un péptido mediante descriptores de química cuántica y con base en los estudios teóricos se le atribuyó actividad antiinflamatoria. En este trabajo se estimularon ratones CBA/Ca con LPS para evaluar la actividad antiinflamatoria del péptido CNS *in vivo*.

Para llegar al objetivo principal, primero se determinó el índice esplénico, el cual se utilizó como medida de inflamación en el bazo. Los resultados mostraron que durante el experimento el bazo de los ratones permaneció en buenas condiciones ya que no se detectó alteración en el índice esplénico (Figura 8). Entonces se encontró una oportunidad de mejorar el experimento, debido a que el tiempo de multiplicación celular es mayor al tiempo que se dejó actuar el LPS.

La actividad antiinflamatoria se evaluó en función de los mediadores y efectores del proceso inflamatorio. En primer lugar, se cuantificaron las subpoblaciones celulares de linfocitos T (CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺), células B, macrófagos y células NK que son los principales componentes del sistema inmune y constituyen la primera línea de defensa. Se encontró que el péptido disminuyó la población de linfocitos T totales, lo que corresponde con la disminución no significativa en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Una probable explicación a este hallazgo sería que el péptido induce a apoptosis a estas células y por lo tanto disminuyó su porcentaje. Este hallazgo es de interés dado que los linfocitos T desempeñan un papel importante en la inflamación al sintetizar mediadores proinflamatorios y al contribuir con el reconocimiento de antígenos (68). Además, se ha descrito que los linfocitos T CD3⁺ son células que proliferan y se diferencian a CD4⁺ y CD8⁺ (33), por lo que su disminución podría ser una estrategia para modular la respuesta inflamatoria. Por otra parte, se informó que las células T CD8⁺ murinas carecen de expresión de TLR4, por lo tanto, no responden a LPS (69), lo que explica que no se hayan encontrado cambios en el porcentaje de células totales de esta población celular. Sin embargo, el menor porcentaje de células activadas de este linaje se presentó en el grupo tratado con naproxeno, resultado inesperado dado que en estudios anteriores se ha descrito que el tratamiento con AINES aumenta la presencia de linfocitos T CD8⁺ (70, 71), y para ello las células tuvieron que pasar por

un estado de activación y proliferación. Entonces este hallazgo probablemente se deba a que el naproxeno por ser un AINE de acción prolongada su efecto no muestra un inicio de acción rápido (72). Además, se detectó un incremento significativo de linfocitos T CD4⁺ en el grupo tratado con paracetamol (Figura 9b), que podría atribuirse a la hepatotoxicidad que puede producir este medicamento, pues Xuefu W. et al. (73) informaron que los subconjuntos de células T CD4⁺ como Th1, desempeñan un papel fundamental en la extensión de la lesión hepática inducida por paracetamol. El tratamiento con naproxeno presentó un gran incremento en la población de linfocitos B (Figura 9e), lo que es difícil de interpretar debido a que estas células para proliferar requieren activarse por las células T CD4⁺ (38) y en el número de CD4⁺ no se detectaron cambios con ese tratamiento. Una probable explicación sería que el naproxeno presenta un efecto quimioatrayente, sin embargo, no se encontró reportado en la literatura. La disminución de la población de células NK por parte del péptido (Figura 9f), es un resultado a destacar, porque el mecanismo antiinflamatorio podría derivarse de este hecho, ya que las células NK producen citocinas proinflamatorias, como IFN- γ y TNF- α , que en exceso pueden dañar los tejidos y las células (74). Se esperaba mayor variabilidad en la determinación de macrófagos, debido al papel que desempeñan desde el inicio de la inflamación, pues lideran la respuesta en caso de lesión hasta la reparación, producen citocinas que atraen a más células al sitio dañado y fagocitan a los patógenos, los procesan y los presentan a los linfocitos T (31, 75).

Además de los componentes celulares, las citocinas son elementos importantes para el progreso de la inflamación, gracias a que todas las células del sistema inmune producen citocinas y poseen receptores específicos para algunas de ellas (76). Un hallazgo interesante es que el paracetamol incrementó considerablemente la concentración de IL-4, citocina que se produce en los linfocitos T CD4⁺ específicamente en el subtipo Th2. Pires DA. et al. (77) reportaron que durante el metabolismo del paracetamol, la concentración de IL-4 se eleva en respuesta a la acumulación de un metabolito (N-acetil-p-benzoquinonamina) resultado de la conversión de exceso de paracetamol por las enzimas hepáticas del citocromo P450, lo que se traduce en hepatotoxicidad. Este resultado contrasta con el aumento de la

población de linfocitos CD4⁺ asociado a la administración de paracetamol, lo que evidencia que los resultados se deben a la hepatotoxicidad de este medicamento.

Dado que se presentaron diferencias en las poblaciones celulares, se esperaba también encontrar diferencias en la concentración de citocinas, sin embargo, no resultó así. La cuantificación de citocinas puede variar por la técnica utilizada como por el tiempo de obtención de la muestra. Seemann y colaboradores (10), informaron la variación en la concentración de citocinas TNF- α , INF- γ , IL-6 e IL-10 desde el tiempo cero hasta 72 horas después de la administración de LPS y se evidencian cambios considerables desde las primeras dos horas. Sin embargo, la edad de los ratones y la determinación de las citocinas por kits de ELISA, podrían explicar la discrepancia en los resultados descritos en la literatura y los obtenidos en este trabajo.

Para estudiar si la inflamación inducida por LPS se debía a un aumento de las especies reactivas del oxígeno, se evaluó la actividad de enzimas antioxidantes. El péptido disminuyó la actividad de SOD, GPX y catalasa en sangre. Sin embargo, solo en GPx se encontró diferencia estadística significativa en comparación con dexametasona; en el bazo el péptido no modificó la actividad de SOD, ni de catalasa, pero aumentó la actividad de GPx; mientras que en el cerebro, aumentó la actividad de SOD pero disminuyó la actividad de GPx y catalasa en comparación con el vehículo. Sin embargo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. El tratamiento con naproxeno disminuyó la actividad de SOD y catalasa en la sangre (Figura 11a y 11c), aunque la segunda sin diferencia estadística, una probable explicación es que se produjo un estrés oxidativo tan fuerte que la enzima se gastó de inmediato para neutralizar al radical superóxido, aunado al efecto retardado del fármaco por su acción prolongada. Por otra parte, se cuantificó el marcador de peroxidación lipídica que se genera en situaciones de estrés oxidativo, el MDA. Un incremento en la concentración de MDA indicaría aumento del estrés oxidativo. Sin embargo, en ningún tejido se presentaron cambios en el estrés oxidativo debido al péptido. La variación de la actividad de las enzimas antioxidantes en cada tejido, como la disminución o el aumento, demuestra que el organismo buscaba el equilibrio entre radicales y antioxidantes. El tratamiento con el péptido no aumentó el estrés oxidativo en la

sangre; sin embargo, en el bazo aumentó la actividad de GPx, por lo que podría estudiarse si este hallazgo se relaciona con la disminución de linfocitos T y células NK.

10. Conclusiones

Se analizaron las propiedades antiinflamatorias del péptido CNS, resultó que posee las propiedades antiinflamatorias de su antecesor FILM. Disminuyó el porcentaje de células que intervienen en la inflamación, linfocitos T totales y células NK. Sin embargo, la concentración de citocinas, la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de MDA, no demostraron la actividad antiinflamatoria del tripéptido CNS, por lo que se sugiere inducir la inflamación por mayor tiempo.

11. Perspectivas

Realizar determinaciones a diferentes tiempos (6, 12 y 24 horas) para evaluar si se detectan cambios en las mismas variables.

Evaluar la expresión de los genes de citocinas proinflamatorias mediante la extracción de RNA mensajero, retrotranscripción y la amplificación de DNA complementario.

Para realizar una evaluación más detallada de la actividad antiinflamatoria del péptido, analizar frente a otros estímulos inflamatorios o mediante otros modelos de inflamación que impliquen mecanismos distintos para deducir su mecanismo de acción, así como el mecanismo por el cual el péptido reduce la población de células NK y linfocitos T.

12. Referencias

1. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771-6.
2. Hall JE, Guyton AC. Tratado de fisiología médica. Duodécima edición ed: Elsevier Health Science; 2011.
3. Muñoz Carrillo JL, Villalobos Gutiérrez PT, Puebla Pérez AM, López Luna A, Flores De La Torre JA, Álvarez Barreto I, et al. El tratamiento con resiniferatoxina exhibe propiedades antiinflamatorias en un modelo murino de inflamación inducida por lipopolisacárido. *Revista Biomédica*; Vol 32, Núm 3 (2021). 2021.
4. León Regal ML, Alvarado Borges A, de Armas García JO, Miranda Alvarado L, Varens Cedeño JA, Cuesta del Sol JÁ. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*; Vol 5, núm 1 (2015). 2015.
5. Cruse JM, Lewis RE, Wang H. CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. *Immunology Guidebook*: Elsevier.; 2004. p. 47-124.
6. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters*. 2018;196:22-32.
7. Collino CJG, Rodríguez C, Sastre D, Heller V, Fernández E. Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2006;40(2):173-80.
8. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5698931.
9. Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol*. 2019;20(5):527-33.
10. Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of Biomedical Science*. 2017;24(1):60.
11. Le Jeune C. Pharmacologie des glucocorticoïdes. *La Presse Médicale*. 2012;41(4):370-7.
12. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019; 20(18).
13. Ortiz-Pereda V, López M, Arroita A, Aguilera L, Azkue J, Torre-Mollinedo F, et al. Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor. *Gaceta Médica de Bilbao*.

14. Williams BS, Buvanendran A. Chapter 17 - Nonopioid analgesics: NSAIDs, COX-2 inhibitors, and acetaminophen. In: Benzon HT, Raja SN, Liu SS, Fishman SM, Cohen SP, Hurley RW, et al., editors. *Essentials of Pain Medicine (Third Edition)*. Saint Louis: W.B. Saunders; 2011. p. 130-9.
15. La Manna S, Di Natale C, Florio D, Marasco D. Peptides as Therapeutic Agents for Inflammatory-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9).
16. Dadar M, Shahali Y, Chakraborty S, Prasad M, Tahoori F, Tiwari R, et al. Antiinflammatory peptides: current knowledge and promising prospects. *Inflammation Research*. 2019;68(2):125-45.
17. Pahwa R, Goyal A, Bansal P, Jialal I. *Chronic Inflammation*: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021 2021.
18. Singh A, Chibber P, Kolimi P, Malik TA, Kapoor N, Kumar A, et al. Rohitukine inhibits NF- κ B activation induced by LPS and other inflammatory agents. *International Immunopharmacology*. 2019;69:34-49.
19. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation : *Inflammation*. *Nature (London)*. 2008;454(7203):428-35.
20. González-Costa M, González AAP. La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2019;18:30-44.
21. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
22. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(7):499-511.
23. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.
24. Romero Hurtado S, Iregui CA. El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2010:37-45.
25. Abbas AK, Cotran RS, Fausto N, Kumar V, Robbins SL. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed: Elsevier; 2005.
26. Pavón Romero L, Jiménez Martínez MdC, Garcés Alvarez ME. *Inmunología molecular, celular y traslacional*: Wolters Kluwer; 2016.
27. Ganong WF, Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL, Blengio Pinto R, et al. *Fisiología médica*. 24a edición ed: McGraw-Hill Interamericana; 2013.

28. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37.
29. Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research*. 2014;102(2):258-69.
30. Galvão I, Sugimoto MA, Vago JP, Machado MG, Sousa LP. Mediators of Inflammation. In: Riccardi C, Levi-Schaffer F, Tiligada E, editors. *Immunopharmacology and Inflammation*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 3-32.
31. Porras R, Collado V, Cutuli M, Gomez-Lucia E. El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2008. 2008;2.
32. Moss RB, Moll T, El-Kalay M, Kohne C, Soo Hoo W, Encinas J, et al. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2004;4(12):1887-96.
33. Walsh AJ, Mueller KP, Tweed K, Jones I, Walsh CM, Piscopo NJ, et al. Classification of T-cell activation via autofluorescence lifetime imaging. *Nature Biomedical Engineering*. 2021;5(1):77-88.
34. Woodell-May JE, Sommerfeld SD. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2020;38(2):253-7.
35. Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annual Review of Immunology*. 2021;39(1):51-76.
36. Cosenza-Nashat MA, Kim MO, Zhao ML, Suh HS, Lee SC. CD45 isoform expression in microglia and inflammatory cells in HIV-1 encephalitis. *Brain Pathol*. 2006;16(4):256-65.
37. Khosravi Shahi P, Gil Herrera J, Castillo Rueda Ad. La importancia clínica de los polimorfismos del gen CD45. *Anales de Medicina Interna*. 2005;22:459-60.
38. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2012;23(4):446-57.
39. Miyagaki T, Fujimoto M, Sato S. Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. *International Immunology*. 2015;27(10):495-504.
40. Sepúlveda C C, Puente P J. Células natural killer y el sistema inmune innato en la patología infecciosa. *Revista médica de Chile*. 2000;128:1361-70.
41. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. *Inmunología celular y molecular*. Séptima edición ed: Elsevier; 2012.

42. Kiniwa T, Enomoto Y, Terazawa N, Omi A, Miyata N, Ishiwata K, et al. NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(36):10139-44.
43. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2019;36:91-100.
44. Agita A, Alsagoff MT. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Acta Med Indones*. 2017;49(2):158-65.
45. Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 2010;140(6):935-50.
46. Valentovic M. Naproxen. In: Enna SJ, Bylund DB, editors. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. New York: Elsevier; 2007. p. 1-6.
47. Grosser T, Ricciotti E, FitzGerald GA. The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(8):733-48.
48. Rotundo L, Pysopoulos N. Liver injury induced by paracetamol and challenges associated with intentional and unintentional use. *World J Hepatol*. 2020;12(4):125-36.
49. Wong A, Gaudins A. Risk prediction of hepatotoxicity in paracetamol poisoning. *Clinical Toxicology*. 2017;55(8):879-92.
50. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016;42(1):15-31, vii.
51. Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. *Principios de farmacología : bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico*. 3a. edición ed: Wolters Kluwer; 2012.
52. Yasir M, Goyal A, Sonthalia S. *Corticosteroid Adverse Effects: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022 2022*.
53. Caramori G, Nucera F, Mumby S, Lo Bello F, Adcock IM. Corticosteroid resistance in asthma: Cellular and molecular mechanisms. *Molecular Aspects of Medicine*. 2022;85:100969.
54. Barnes PJ. Pulmonary Pharmacology. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, editors. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
55. Patil RH, Naveen Kumar M, Kiran Kumar KM, Nagesh R, Kavya K, Babu RL, et al. Dexamethasone inhibits inflammatory response via down regulation of AP-1 transcription factor in human lung epithelial cells. *Gene*. 2018;645:85-94.
56. Ciriaco M, Ventrice P, Russo G, Scicchitano M, Mazzitello G, Scicchitano F, et al. Corticosteroid-related central nervous system side effects. *J Pharmacol Pharmacother*. 42013. p. S94-8.

57. Battaner Arias E. Biomoléculas. Una introducción estructural a la bioquímica. Salamanca, SPAIN: Ediciones Universidad de Salamanca; 2012.
58. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 2006;16(9):945-60.
59. Mun SJ, Cho E, Kim JS, Yang CS. Pathogen-derived peptides in drug targeting and its therapeutic approach. *J Control Release*. 2022;350:716-33.
60. Qian G-m, Pan G-F, Guo J-Y. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. *Natural Product Research*. 2012;26(24):2358-62.
61. Yibin G, Jiang Z, Hong Z, Gengfa L, Liangxi W, Guo W, et al. A synthesized cationic tetradecapeptide from hornet venom kills bacteria and neutralizes lipopolysaccharide in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 2005;70(2):209-19.
62. Morales-Martínez ME, Silva-García R, Soriano-Correa C, Giménez-Scherer JA, Rojas-Dotor S, Blanco-Favela F, et al. 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(1):46-51.
63. Soriano-Correa C, Sánchez-Ruiz JF, Rico-Rosillo G, Giménez-Scherer JA, Velázquez JR, Kretschmer RR. Electronic structure and physicochemical properties of the anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2006;769(1):91-5.
64. Minville V, Fourcade O, Mazoit JX, Girolami JP, Tack I. Ondansetron does not block paracetamol-induced analgesia in a mouse model of fracture pain. *Br J Anaesth*. 2011;106(1):112-8.
65. Dhir A, Padi SS, Naidu PS, Kulkarni SK. Protective effect of naproxen (non-selective COX-inhibitor) or rofecoxib (selective COX-2 inhibitor) on immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006;535(1-3):192-8.
66. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*. 2019;4(33).
67. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013;39(5):806-18.
68. Barrero S, Cuellar A, Rueda N, Cardozo-Romero C, Gonzalez J. Determinación de valores de linfocitos T CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ por citometría de flujo en donantes de sangre, adultos de Bogotá. *Acta médica colombiana: AMC: organo de la Asociación Colombiana de Medicina Interna*. 2001;26:280.

69. Komai-Koma M, Gilchrist DS, Xu D. Direct recognition of LPS by human but not murine CD8+ T cells via TLR4 complex. *Eur J Immunol.* 2009;39(6):1564-72.
70. Rao CV. Anti-Inflammatory Drugs Decrease the PD-L1 Expression and Increase the CD8+ T-Cell Infiltration. *Cancer Prevention Research.* 2022;15(4):209-11.
71. Cecil DL, Gad EA, Corulli LR, Drovetto N, Lubet RA, Disis ML. COX-2 Inhibitors Decrease Expression of PD-L1 in Colon Tumors and Increase the Influx of Type I Tumor-infiltrating Lymphocytes. *Cancer Prevention Research.* 2022;15(4):225-31.
72. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* 2020;180:114147.
73. Wang X, Sun R, Chen Y, Lian Z-X, Wei H, Tian Z. Regulatory T cells ameliorate acetaminophen-induced immune-mediated liver injury. *International Immunopharmacology.* 2015;25(2):293-301.
74. Liu S, Galat V, Galat Y, Lee YKA, Wainwright D, Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):7.
75. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology.* 2018;30(11):511-28.
76. Filella X, Molina R, Ballesta AM. Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral.* 2002;39(2):63-71.
77. Pires DA, Marques PE, Pereira RV, David BA, Gomides LF, Dias ACF, et al. Interleukin-4 deficiency protects mice from acetaminophen-induced liver injury and inflammation by prevention of glutathione depletion. *Inflammation Research.* 2014;63(1):61-9.