



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

**“EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO DE
GLUCOFOSFOPROTEÍNAS INMUNOESTIMULADORAS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

GERARDO ARREDONDO TECUATL

MÉXICO, D.F.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MA. DE LAS MERCEDES MARGARITA MEIJUEIRO MOROSINI
VOCAL: PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ
SECRETARIO: LOURDES MONSERRAT SORDO CEDEÑO
1er. SUPLENTE: FRANCISCO JAVIER PLACENCIA DE LA PARRA
2° SUPLENTE: MARCO ANTONICO CERBON CERVANTES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

QFB. LOURDES MONSERRAT SORDO CEDEÑO _____

SUSTENTANTE (S):

GERARDO ARREDONDO TECUATL _____



AGRADECIMIENTOS

A la QFB Monserrat Sordo, por ser una excelente tutora, mil gracias por formarme y enseñarme con su ejemplo a ser un profesional eficaz, eficiente, ético y sobre todo por ser una gran amiga, por sus consejos y por ser un apoyo moral tantas veces como lo he necesitado.

A la Dra. Ana María Salazar por su apoyo y orientación durante la realización de la tesis.

A la Dra. Patricia Ostrosky Shejet por darme la oportunidad de formar parte del grupo de trabajo de su laboratorio donde realicé este proyecto.

A los miembros del jurado por sus observaciones y valiosos comentarios en la revisión de este trabajo:

- M en C Ma. de las Mercedes Margarita Meijueiro Morosini
- Dr. Perla Carolina Castañeda López
- Lourdes Monserrat Sordo Cedeño
- Francisco Javier Placencia de la Parra
- Marco Antonio Cerbón Cervantes

A mis amigos de laboratorio Abel, Cintia, Eddy, Erick, Fer, Gonzalo, Ileana, Juan, Mariana, Natalia, Paty Men, Paula y Polett por estar siempre dispuestos a escucharme y regalarme siempre una gran cantidad de sonrisas y muy agradables momentos.

Sin lugar a duda este trabajo no pudo haberse realizado sin la formación que recibí durante mi estancia en la Facultad de Química (U.N.A.M.). Gracias a todos los maestros que contribuyeron en mi formación por todos sus consejos, sus formidables clases, su paciencia y su amistad como persona.



DEDICATORIAS

A mis padres:

Elena Tecuatl y Gerardo Arredondo, quienes han sido mi gran ejemplo a seguir y el pilar fundamental de mi formación tanto personal como profesional ya que gracias a su apoyo y amor me fue posible llegar hasta el final de mi meta universitaria. Muchas gracias papás por darme la vida y brindarme siempre su comprensión, consejos y apoyo en todos mis planes. Estoy inmensamente agradecido con Dios por darme a los mejores padres que pueden existir.

A mis queridos hermanos Karla y Pascual por brindarme su cariño y apoyo en todos mis proyectos de vida, por cada día darme ánimo, siempre estar cuando los necesito y por la gran cantidad de consejos brindados. Muchas gracias.

A ese hermano que siempre ha estado en los momentos más memorables y en los más difíciles de los últimos años de mi vida, brindando su amistad incondicional con la mejor disposición. Mil gracias Jair porque siempre me has enseñado a levantarme y a luchar por conseguir mis sueños. Que bendición la que Dios me dio al poner en mi vida un amigo como tú.

A mis grandes amigos: Areli, Bere, Betty, Celia, Cintia, Citla, Diana, Dulce, Erick, Fanny, Flor, Fonsy, Guille, Isabel, Jair, Mago, Maru, Maricela, Marco, Oscar, Paco, Sonia y Vero gracias por estar siempre a mi lado, ayudarme a crecer como persona con sus consejos y por regalarme muchos momentos felices e inolvidables. Espero contar con su amistad por siempre.



A cada uno de los integrantes de las familias Arredondo Suarez y Tecuatl Flores por el cariño, apoyo, consejos, momentos alegres y la confianza que siempre me han brindado incondicionalmente.

Y a todas y cada una de las personas que por la fragilidad de mi memoria no recuerdo en este momento, pero que con seguridad me apoyaron desinteresadamente.

Mil Gracias...



“Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir”.

(Gregorio Marañón)

“Aprendí que no se puede dar
marcha atrás, que la esencia
de la vida es ir hacia adelante.
La vida, en realidad,
es una calle de sentido único”.

(Agatha Christie)

“A veces podemos pasarnos años
sin vivir en absoluto,
y de pronto toda nuestra vida
se concentra en un solo instante”.

(Oscar Wilde)

“Lo pasado ha huido,
lo que esperas está ausente,
pero el presente es tuyo”.

(Proverbio árabe)



ÍNDICE

	Página
1.-Resumen.....	1
2.-Introducción.....	2
2.1.- Respuesta Inmune.....	2
2.1.1.-Respuesta Inmune Innata.....	2
2.1.2.-Respuesta Inmune Adaptativa.....	3
2.1.3.-Fármacos Moduladores de la Respuesta Inmunitaria.....	5
2.2.- Toxicología.....	7
2.2.1.-Genotoxicidad.....	7
2.2.2.- Biomarcadores.....	8
2.2.3.- Ensayo de Micronúcleos por Bloqueo de la Citocinesis.....	9
2.2.4 Criterios para Evaluar Células por el Ensayo de Micronúcleos.....	11
2.2.5. Criterios para Determinar Micronúcleos.....	11
2.3.- Glucoproteínas.....	12
2.3.1.- Las Cadenas de Oligosacáridos.....	13
2.3.2.- Clases de Glucoproteínas.....	15
2.3.3.- Glucoproteínas GFPI y GFPII.....	16
3.- Justificación.....	18
4.- Hipótesis.....	19
5.- Objetivo General.....	19
5.1.- Objetivos Particulares.....	19
6.- Parte Experimental	
Material y Métodos	
6.1.-Sujetos de Estudio.....	20
6.2.-Separacion de Linfocitos.....	20



6.3.-Conteo de Linfocitos.....	20
6.4.-Cultivos Celulares	21
6.5.-Tratamiento.....	21
6.5.1.-Citotoxicidad.....	21
6.5.2.-Citostaticidad y Genotoxicidad.....	22
6.6.- Evaluación <i>In vitro</i> del Efecto Citotóxico, Citostático y Genotóxico de los Posibles Metabolitos de GFP I y GFP II Mediante el Uso de S9.....	23
7.-Análisis Estadístico.....	26
8.-Resultados.....	27
8.1.- Efectos Citotóxicos, Citostáticos y Genotóxicos de GFPI y GFPII.....	27
8.2 Efectos Citotóxicos, Citostáticos y Genotóxicos de los Posibles Metabolitos de GFPI Y GFPII.....	31
9.-Discusión.....	36
10.- Conclusiones.....	39
11.- Referencias.....	40
12.- Anexo 1.....	44
13.- Glosario.....	45



ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Fármacos Inmunoestimuladores	6
Tabla 2. Fármacos inmunosupresores	7
Tabla 3. Funciones que desempeñan las glucoproteínas	13
Tabla 4. Efectos citotóxico, citostático y genotóxico de GFPI determinados <i>in vitro</i> en tres individuos sanos por triplicado.	27
Tabla 5. Efectos citotóxico, citostático y genotóxico de GFPII determinados <i>in vitro</i> en tres individuos sanos por triplicado.	28
Tabla 6. Efectos citotóxico, citostático y genotóxico de GFPI y GFPII con actividad metabólica determinados <i>in vitro</i> en un individuo sano por triplicado.	32



ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Estudio <i>in vitro</i> realizado en 3 individuos por triplicado para determinar el efecto citotóxico de GFPI Y II	29
Gráfica 2. Estudio <i>in vitro</i> realizado en 3 individuos por triplicado para determinar el efecto citostático de GFPI Y GFPII	30
Gráfica 3. Estudio <i>in vitro</i> realizado en 3 individuos por triplicado para determinar el efecto genotóxico de GFPI Y GFPII	31
Gráfica 4. Efecto citotóxico de GFPI y II con activación metabólica (S9), en un individuo por triplicado	33
Gráfica 5. Efecto citostático de GFPI y II con activación metabólica (S9), en un individuo por triplicado	34
Gráfica 6. Efecto genotóxico de GFPI y II con activación metabólica (S9), en un individuo por triplicado	35



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Células que participan en la respuesta del sistema inmune	5
Figura 2. Formación de Micronúcleos	10
Figura 3. Célula binucleada con micronúcleo	12
Figura 4. Secuencia de la GFPI	17
Figura 5. Secuencia de la GFPII	17
Figura 6. Cinética de proliferación de linfocitos	23
Figura 7. Diagrama de trabajo	25

**ABREVIATURA****SIGNIFICADO**

AC	Aberraciones cromosómicas
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BGC	Bacilo de Calmette-Guérin
BN	Células binucleadas
Células NK	Células natural killer
CMP-NeuAc	Citocin monofosfato ácido N-acetilneurámico
CsA	Ciclosporina A
CTL	Linfocitos T citotóxicos
Cyt B	Citocalasina B
CP	Ciclofosfamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FDA/EtBr	Diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio
GFPI	Glucoproteína I
GFPII	Glucoproteína II
Hcg	Gonadotropina coriónica humana
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IFN- γ	Interferón gamma
KDa	Kilodaltones
LSP	Lipopolisacárido
MDP	Muranildipéptido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MN	Micronúcleos
Mo	Células mononucleadas
P	Células Polinucleadas
PMN	Linfocitos polimorfonucleares
S9	Fracción microsomal del hígado de rata
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Th	Linfocitos T cooperadores
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UDP-Gal	Uridin difosfato-galactosa
UDP-GalNAc	Uridin difosfato-N-acetilgalactosa



RESUMEN

En los últimos años el empleo de inmunomoduladores cada vez es más frecuente debido a los efectos benéficos observados al reforzar el sistema inmunológico en diferentes enfermedades infecciosas, así como también en algunas enfermedades autoinmunes y cáncer.

Las glucoproteínas son proteínas que poseen cadenas de oligosacáridos (glucanos), unidos covalentemente a su estructura polipeptídica. Se pueden encontrar tanto en la membrana celular, como en el interior de la célula (inmunoglobulinas, hormonas, etc.). Tienen una gran diversidad de funciones, entre ellas, la participación en la respuesta inmune.

Estudios recientes muestran que glucoproteínas de origen natural tienen efectos positivos en el tratamiento de infecciones y algunas enfermedades.

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos citotóxico, citostático y genotóxico de dos glucoproteínas de reciente síntesis, derivadas de la pared celular de *Candida utilis* (GFPI y GFPII), con actividad inmunomoduladora, las cuales, se encuentran actualmente en los estudios preliminares para su comercialización.

La genotoxicidad y la citostaticidad se determinaron en linfocitos humanos *in vitro* por medio de la técnica de micronúcleos (MN). La citotoxicidad se midió por la técnica de doble tinción con diacetato de fluoresceína/ bromuro de etidio (2,7-diamino-10-etil-9-fenil-bromuro de fenantridinio).

Los resultados muestran que tanto la GFPI como la GFPII, a las dosis estudiadas, no producen efectos citotóxicos, citostáticos ni genotóxicos en linfocitos humanos *in vitro*, aún cuando se realizaron experimentos con el activador metabólico S9 (fracción microsomal del hígado de rata), para ver los efectos de los metabolitos.



2. INTRODUCCIÓN

2.1 RESPUESTA INMUNE.

El sistema inmunológico es el mecanismo de defensa del organismo ante cualquier agente patógeno. Está formado por un conjunto de células y moléculas que se caracterizan por su capacidad de reconocer específicamente estructuras moleculares o antígenos y posteriormente desarrollar una respuesta que conduce a su anulación funcional o a su destrucción [1].

Las células que participan en las respuestas inmunológicas se encuentran organizadas en tejidos y órganos; al conjunto de estas estructuras se le denomina sistema linfoide. Está formado por células como son: leucocitos, granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK y linfocitos T y B [2].

Ante la presencia de antígeno, se generan dos tipos de reacciones inmunológicas:

- Respuesta inmunológica inespecífica (inmunidad innata).
- Respuesta inmunológica específica o adaptativa (humoral ó celular).

2.1.1 RESPUESTA INMUNE INNATA

La respuesta inmune innata es un sistema de defensa poderoso, pero inespecífico basado en mecanismos físicos, bioquímicos y celulares de defensa como el epitelio, que constituye una barrera física que impide la entrada de microorganismos. El sistema inmune innato además produce una gran variedad de sustancias antimicrobianas, las cuales tienen como función básica eliminar a través de lisis a los posibles patógenos.



En la respuesta inmune innata participan células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos, citotóxicas como las natural killer (NK) y granulocíticas como eosinófilos y basófilos.

Este tipo de respuesta se caracteriza por estar presente aún sin un estímulo y por reaccionar sólo a microorganismos y no a sustancias no infecciosas (alérgenos). Además, siempre responde de igual forma a repetidas infecciones (no tiene especificidad). También carece de memoria inmunológica, ya que un encuentro previo con un antígeno (Ag) no garantiza que se genere una respuesta de manera más rápida, ni de mayor magnitud en el segundo encuentro con el mismo [3].

2.1.2 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Recibe este nombre debido a que en esta parte de la respuesta inmune se tiene la capacidad de responder adaptándose al tipo de infección y distinguir diferentes microorganismos y moléculas. Esta capacidad es llamada especificidad ó inmunidad específica. Otras características sobresalientes son: la memoria inmunológica, ya que después de la eliminación o el contacto con un antígeno, se almacena un grupo de células adaptadas para dicho estímulo ya conocido.

La parte celular está formada por linfocitos T y B. En la parte molecular se destacan anticuerpos (Ac), citocinas y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) [3].

Los linfocitos T se subdividen en: linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T cooperadores (Th). El primer grupo se encarga de eliminar células infectadas ó posibles células tumorígenas, mientras que los cooperadores coordinan la respuesta celular a través de la producción de citocinas, las cuales activan fagocitos, activan el crecimiento de CTL y ayudan a la formación de anticuerpos



por los linfocitos B. Los linfocitos B están encargados de producir anticuerpos para cada patógeno por lo que son específicos. Con la participación de células presentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas, ayudadas de macrófagos.

Cuando un antígeno se une a las escasas células capaces de reconocerlo, dichas células activan un proceso de proliferación masiva. El antígeno selecciona las clonas de células que son capaces de unirse a él y promueve su proliferación tanto de linfocitos B como de T y posteriormente, se desencadenan diversas respuestas inmunitarias en función del tipo de anticuerpo producido [4].

En la presentación de Ag participan un grupo de moléculas llamado complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Este complejo consta de especificidad y se divide en moléculas de clase I y moléculas de clase II, que son reconocidas por linfocitos CD8+ y por linfocitos CD4+, respectivamente. El MHC tiene diferentes funciones biológicas, entre las más importantes está la presentación de antígeno, su papel en la inmunobiología del trasplante, la formación de células T y la autoinmunidad [5]. En la Figura 1 se esquematiza de manera simplificada el sistema inmune.

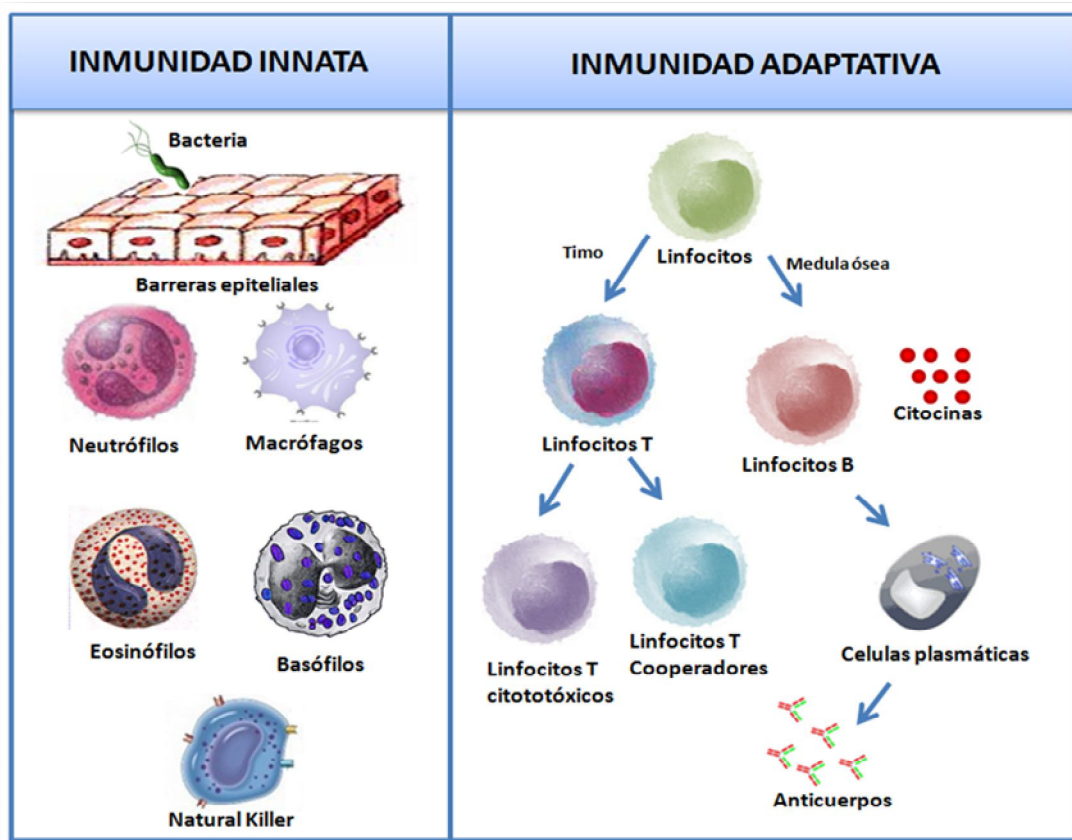


Figura 1. Células que participan en la respuesta del sistema inmune

2.1.3 FÁRMACOS MODULADORES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA.

En las últimas décadas se han producido grandes avances en el conocimiento de la fisiología del sistema inmunológico y de sus implicaciones defensivas y patogénicas en procesos inflamatorios y tumorales. Los fármacos con capacidad de interactuar con el sistema inmunológico se denominan moduladores de la respuesta inmune o inmunomoduladores [1].

Los inmunomoduladores son sustancias que se utilizan para aumentar o disminuir la repuesta del sistema inmune cuando éste se encuentra comprometido por condiciones de estrés o enfermedad, pueden ser inmunoestimuladores o



inmunosupresores. Los primeros se utilizan para favorecer la respuesta en enfermedades infecciosas, tumores, inmunodeficiencias primarias y secundarias. Los fármacos inmunosupresores están indicados para mitigar la respuesta inmunitaria en caso de rechazo de órganos trasplantados, enfermedades autoinmunitarias (pénfigo, lupus eritematoso, escleroderma, etc.), dermatitis atópica, alergias y otras enfermedades inmunomediadas [6].

Se considera que las bacterias, hongos y sus derivados son inmunoestimuladores naturales y se les atribuye la capacidad de inducir la actividad del sistema inmune. Se utilizan a menudo como coadyuvantes en las vacunas [7]. En la Tabla 1, se presenta un listado de fármacos inmunoestimuladores, mientras que en la Tabla 2, se enlistan fármacos inmunosupresores.

Tabla 1. Fármacos Inmunoestimuladores [7].

Familia	Fármaco	Efecto Farmacológico
Productos bacterianos y fúngicos	Bacilo de Calmette-Guérin (BGC)	APC (Macrófagos), células NK y linfocitos B
	Muranildipéptido (MDP)	Activa macrófagos (APC y fagocitosis)
	L-MTP-PE	Activa macrófagos (APC y fagocitosis)
	Lipopolisacáridos (LSP)	Activa macrófagos y linfocitos B
	Especies de <i>Propionibacterium</i> Glucanos	APC, fagocitosis, activa linfocitos Tc y B Fagocitosis
Factores Tímicos	Timosinas	Maduración de timocitos a linfocitos T
Fármacos Sintéticos	Levamisol	Maduración y actividad de T, fagocitosis y quimiotaxis
	Isoprinosina	Proliferación de linfocitos t; actividad de Th, Tc, NK, fagocitosis y quimiotaxis
Anticuerpos policlonales	Anticuerpos específicos	Desencadenan la fase efectora de la inmunidad específica contra varios antígenos
Citocinas recombinantes	IL-2	Activa linfocitos Th (proliferación), Tc (lisis) y B
	IL-1	Activa linfocitos Th
	IL-12	Proliferación de monocitos
	Interferón gamma (IFN- γ)	Activa macrófagos, linfocitos y células NK, aumenta la expresión de MHC II
Anticuerpos monoclonales	Anticuerpos específicos	Desencadenan la fase efectora de la inmunidad específica contra un antígeno
Vacunas	Antígenos	Desencadenan la inmunidad específica



Tabla 2. Fármacos Inmunosupresores [7].

Familia	Fármaco	Efecto Farmacológico
Fármacos que se fijan a las inmunofilinas	Ciclosporina A (CsA) Tacrolimus Sirolimos	Inhibe la transcripción génica de citocinas en linfocitos T Inhibe citocinas de linfocitos T Inhibe citocinas de linfocitos T
Glucocorticoides	Predrisona, dexametasona	Inhiben la transcripción de citocinas en linfocitos T y macrófagos
Citostáticos	Azatioprina Ciclofosfamida Micofenolato de mofetilo Leflunomida	Inhibe la proliferación celular Inhibe la proliferación celular Inhibe la proliferación de linfocitos T y B Inhibe la proliferación celular
Anticuerpos antilinfocitos	Anticuerpos policlonales Antitímocíticos	Desencadenan la fase efectora de la inmunidad específica contra linfocitos
Anticuerpos monoclonales	Muromonab (OKT3) Anticitocinas y antirreceptores	Destruye células CD3+ (linfocitos T) Neutralizan o destruyen moléculas del sistema inmunológico
Hiposensibilización	Alérgenos	Intervienen la respuesta de tipo IgE a IgC. Disminuyen la reactividad al alérgeno

2.2 TOXICOLOGÍA

Es la ciencia que se encarga del estudio de los efectos adversos producidos por agentes físicos, químicos o biológicos sobre organismos vivos, dañando sus tejidos, órganos y procesos. Las investigaciones en esta área analizan mecanismos de acción a nivel molecular y bioquímico [8].

2.2.1 GENOTOXICIDAD

Estudia los efectos que ejercen los agentes químicos y físicos en la integridad, expresión y regulación del material genético de los organismos. En la evaluación de las sustancias se busca reconocer aquellas con actividad genotóxica, con el fin de identificar el riesgo de exposición a éstas, así como caracterizar la relación dosis-respuesta y los mecanismos implicados en el



efecto^[8,9]. Asimismo, el daño al DNA puede ocasionarse a través de un proceso biológico alterado ^[10].

Si estos daños no son reparados, la replicación del DNA puede dar por resultado una lesión permanente en el DNA y en presencia de un promotor de tumor, originar células preneoplásicas, neoplásicas y finalmente metástasis. La célula posee diferentes mecanismos de respuesta a fin de mantener la fidelidad e integridad de la información genética ^[11].

2.2.2 BIOMARCADORES

Son indicadores de la variación de componentes o procesos bioquímicos o celulares que pueden ser medidos en muestras biológicas ^[12, 13].

Los biomarcadores pueden ser de:

1. Exposición: Miden la concentración del xenobiótico o de sus metabolitos en los fluidos biológicos.
2. Efecto: Determinan los cambios fisiológicos, bioquímicos, genéticos o moleculares que ocurren en las células o en los tejidos.
3. Susceptibilidad: implica una interacción especial del xenobiótico con las características genéticas del individuo ^[14].

Dentro de los marcadores de efecto, existen múltiples pruebas para detectar la inducción de daño genético en humanos, entre las cuales se encuentran: las aberraciones cromosómicas (AC), el intercambio de cromátidas hermanas (ICH), la electroforesis unicelular o ensayo cometa, el ensayo de micronúcleos (MN), entre otras ^[15].



2.2.3 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS POR BLOQUEO DE LA CITOCINESIS.

Las anormalidades de los cromosomas son una consecuencia directa y manifestación de daño al DNA. Éstas pueden observarse a través del ensayo de micronúcleos (MN).

El ensayo de micronúcleos es una de las técnicas más empleadas para el monitoreo del daño cromosómico inducido por agentes clastogénicos ó aneugénicos sobre cultivo de linfocitos humanos. El registro de micronúcleos también puede realizarse en células como fibroblastos y células exfoliadas de epitelio bucal y de orina [16].

Los micronúcleos son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal que se forman durante la transición de metafase a anafase. [17] Se originan en el citoplasma a partir de rompimientos de cromosomas que pueden ocurrir en G1 ó G2, o bien por cromosomas que sufren rezago anafásico (daño del huso acromático) o inactivación del centrómero.

En el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis, las células son tratadas con Citocalasina-B, metabolito aislado del hongo *Helminthosporium dematoideum* que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis durante la mitosis de manera que permite el análisis de células binucleadas que han sufrido una sola división [18,19]. La citocalasina B se utiliza con la finalidad de acumular prácticamente todas las divisiones celulares de la población de células en división. Permite distinguir fácilmente entre células mononucleadas las cuales no se han dividido y las células binucleadas o polinucleadas, las cuales han completado una o más divisiones celulares [20]. En la Figura 2 se representa la formación de micronúcleos.



Los factores que pueden alterar la frecuencia de micronúcleos son edad, sexo, en las mujeres la entrada a la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis, tabaco, deficiencia de ácido fólico y de vitamina B12 [21,22].

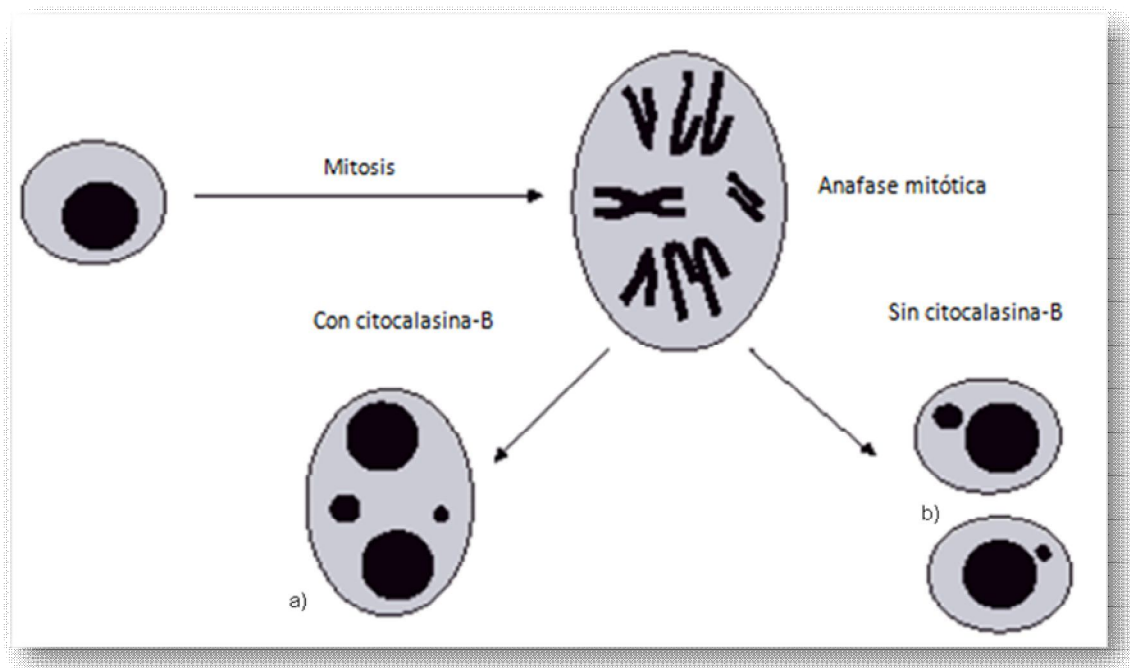


Figura 2. Formación de Micronúcleos: a) En una célula binucleada con Citocalasina-B y b) Células mononucleadas [10].

Comparado con otros ensayos citogenéticos, esta técnica tiene varias ventajas en la cuantificación de micronúcleos por su velocidad, precisión y es fácil de analizar, además de no requerir de la metafase de las células. Con esta técnica también se realiza el conteo de puentes nucleoplásmicos, gemaciones, células apoptóticas, necróticas y del índice de proliferación nuclear [19].



2.2.4 CRITERIOS PARA EVALUAR CÉLULAS POR EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.

Las células con bloqueo de citocinesis que se utilizan para evaluar la frecuencia de micronúcleos deben tener las siguientes características:

- Deben ser células binucleadas.
- Los límites de la membrana de la célula binucleada deben de estar intactos y distinguibles.
- Los dos núcleos en una célula binucleada, deben tener su membrana nuclear intacta y encontrarse dentro del citoplasma.
- Los dos núcleos en una célula binucleada deben ser del mismo tamaño aproximadamente, y con la misma tinción. Los dos núcleos de una célula binucleada pueden estar cerca pero lo ideal es que no estén encimados. Una célula con dos traslapes de núcleos puede considerarse sólo si los límites de cada uno de los núcleos son distinguibles [19].

2.2.5 CRITERIOS PARA DETERMINAR MICRONÚCLEOS

Los MN son morfológicamente idénticos pero más pequeños que los núcleos principales. Deben tener las siguientes características:

- El diámetro de un micronúcleo en linfocitos humanos por lo general está entre 1/16 y 1/3 de lo que mide el diámetro del núcleo principal.
- Los MN tienen una forma redonda u ovalada.
- Los MN no son refringentes y por lo tanto son fácilmente distinguibles de partículas de colorante.
- Los MN no deben estar unidos ni traslapados al núcleo principal,
- Si se encuentran muy cercanos al núcleo, el límite de los MN debe de ser distinguible del límite del núcleo principal.



- Los MN deben tener la misma intensidad de tinción que la del núcleo, aunque en ocasiones pueden ser más intensos o más claros [19].

En la Figura 3 se representa una célula binucleada con la presencia de un micronúcleo.



Figura 3. Célula binucleada con micronúcleo

2.3 GLUCOPROTEÍNAS.

Las glucoproteínas son proteínas que poseen cadenas de oligosacáridos, unidos de manera covalente a su estructura polipeptídica. Muchas de estas moléculas son excretadas por las células eucarióticas (inmunoglobulinas, así como ciertas hormonas y proteínas de la leche), mientras que otras se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática, en la matriz extracelular y en la sangre. Con excepción de la albúmina, casi todas las proteínas plasmáticas humanas son glucoproteínas. Muchas proteínas de la membrana celular contienen cantidades considerables de carbohidratos.



La glucómica se encarga de la determinación del complemento de las moléculas que contienen azúcares en una célula o tejido y en la determinación de la función de cada una de estas moléculas [23]. Las glucoproteínas están presentes en la mayoría de los organismos, desde las bacterias hasta los humanos. Tienen una gran diversidad de funciones (Tabla 3).

Tabla 3. Funciones que desempeñan las glucoproteínas [24].

Función	Glucoproteínas
Estructura molecular	Colágenas
Agente lubricante y protector	Mucinas
Molécula de transporte	Transferrina, ceruloplasmina
Molécula inmunológica	Inmunoglobulinas, antígenos de histocompatibilidad
Hormonas	Gonadotropina coriónica, hormona estimulante de la tiroides (TSH)
Enzima	Varias, por ejemplo, fosfatasa alcalina
Sitios de reconocimiento de unión celular	Varias proteínas que participan en interacciones célula-célula (espermatozoide-ovocito), virus-célula y hormona célula
Anticongelante	Algunas proteínas plasmáticas de los peces de agua fría
Interactúan con carbohidratos específicos	Lectinas, selectinas (lectinas de adhesión celular), anticuerpos

2.3.1 LAS CADENAS DE OLIGOSACÁRIDOS

En la naturaleza se encuentran alrededor de 200 monosacáridos sin embargo, solo ocho (galactosa, glucosa, manosa, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa), se identifican con



mayor frecuencia en las cadenas de oligosacáridos de glucoproteínas. En el organismo las glucoproteínas se forman mediante la donación progresiva de azúcares provenientes de nucleótidos, como UDP-GalNAc, UDP-Gal y CMP-NeuAc [23].

Estudios señalan que las cadenas de oligosacáridos codifican información biológica importante, y que tal codificación depende de los azúcares que los forman, de su secuencia y de sus conformaciones [24].

Algunas funciones de las cadenas de oligosacáridos de las glucoproteínas son:

- Modulan propiedades fisicoquímicas, por ejemplo, solubilidad, viscosidad, carga eléctrica, conformación, desnaturalización y sitios de unión para las bacterias y virus.
- Protegen contra proteólisis, desde el interior y exterior de la célula.
- Afectan el proceso proteolítico de proteínas precursoras de productos más pequeños.
- Participan en la actividad biológica, por ejemplo, de la gonadotropina coriónica humana (hCG).
- Participan en el reconocimiento de moléculas en la membrana celular, en la migración intracelular de proteínas, así como en su clasificación y secreción.
- Afectan el desarrollo y la diferenciación embrionaria.
- Pueden afectar los sitios de metástasis seleccionados por las células cancerígenas [24].



2.3.2 CLASES DE GLUCOPROTEÍNAS

Las glucoproteínas se dividen en tres clases principales de acuerdo a la naturaleza de la unión entre sus cadenas polipeptídicas y sus cadenas de oligosacáridos:

1. Aquellas que poseen enlaces O-glucosídicos, involucrados en la cadena lateral hidroxilo de serina o treonina y un azúcar como la N-acetilgalactosamina.
2. Las que poseen enlaces N-glucosídicos e involucran el nitrógeno amida de la asparagina y N-acetilglucosamina.
3. Aquellas unidas al aminoácido carboxilo terminal de una proteína, a través de la porción fosforiletanolamina unida a un oligosacárido (glucano) el cual, a su vez, está unido mediante una glucosamina al fosfatidilinositol (FI) [24].

La síntesis de O-glucoproteínas y N-glucoproteínas se lleva a cabo de diferente manera. En el caso de las N-glucoproteínas, la adición del oligosacárido a las proteínas se efectúa en el retículo endoplásmico rugoso durante o después de su traducción. Vesículas compuestas de éstas glucoproteínas se desprenden del retículo endoplásmico y se transportan hacia la cisterna *cis* del Aparato de Golgi. El procesamiento de las glucoproteínas para adquirir una función determinada, tiene su localización en las cisternas de Golgi (*cis*, *medial* y *trans*), donde las enzimas involucradas en el proceso terminan de sintetizar dichas glucoproteínas. En el caso de las O-glucoproteínas, las proteínas recién sintetizadas son glucosiladas para formar O-glucoproteínas directamente en el complejo de Golgi, donde se añaden los oligosacáridos unidos por enlace O. En el complejo de Golgi también se clasifican las proteínas, mediante mecanismos todavía no aclarados por completo, para ser enviadas a sus destinos finales [23].



2.3.3 GLUCOPROTEÍNAS GFPI Y GFPII

Las glucoproteínas GFPI y GFPII, de reciente síntesis, son derivadas de la pared celular de *Candida utilis*.

Estudios realizados con GFPI y GFPII han mostrado la capacidad de estas glucoproteínas para inducir la proliferación tanto de linfocitos T citotóxicos como de linfocitos T cooperadores, lo que les confiere una alta posibilidad para ser utilizados como medicamentos inmunomoduladores [33].

La GFPI y la GFPII son glucoproteínas de tipo O-glucosídicas unidas a la cadena polipeptídica a través del aminoácido serina. La GFPI tiene un peso molecular de 1.776 KDa, mientras que el de la GFPII es de 2.54 KDa. La estructura de la proteína es de tipo α hélice (Figuras 4 y 5) [29].

El desarrollo de estas dos glucoproteínas se basa en el estudio de Alonso y colaboradores (1987) [26], quienes describieron el efecto inmunológico de una glucoproteína actualmente conocida como AM3, formada por la unión covalente de un glucósido extraído de la pared celular de *Candida utilis* (hongo no patógeno para el humano), y una proteína extraída de semillas de *Ricinus communis* [25], con potente actividad inhibitoria del factor de necrosis tumoral (TNF- α) al ser inducido por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas en sistemas *in vivo* e *in vitro* [26]. Los principales blancos de esta glucoproteína son las células accesorias, fagocitos, NK y los linfocitos T [1]. Se ha empleado en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), produciendo un incremento significativo en la citotoxicidad de las células NK, así como un aumento de monocitos, linfocitos polimorfonucleares (PMN) y un incremento de fagocitos [27]. Asimismo, ha sido usado como coadyuvante de la vacuna para la Hepatitis B, donde se determinó que incrementa el título de anticuerpos específicos contra hepatitis B [28].

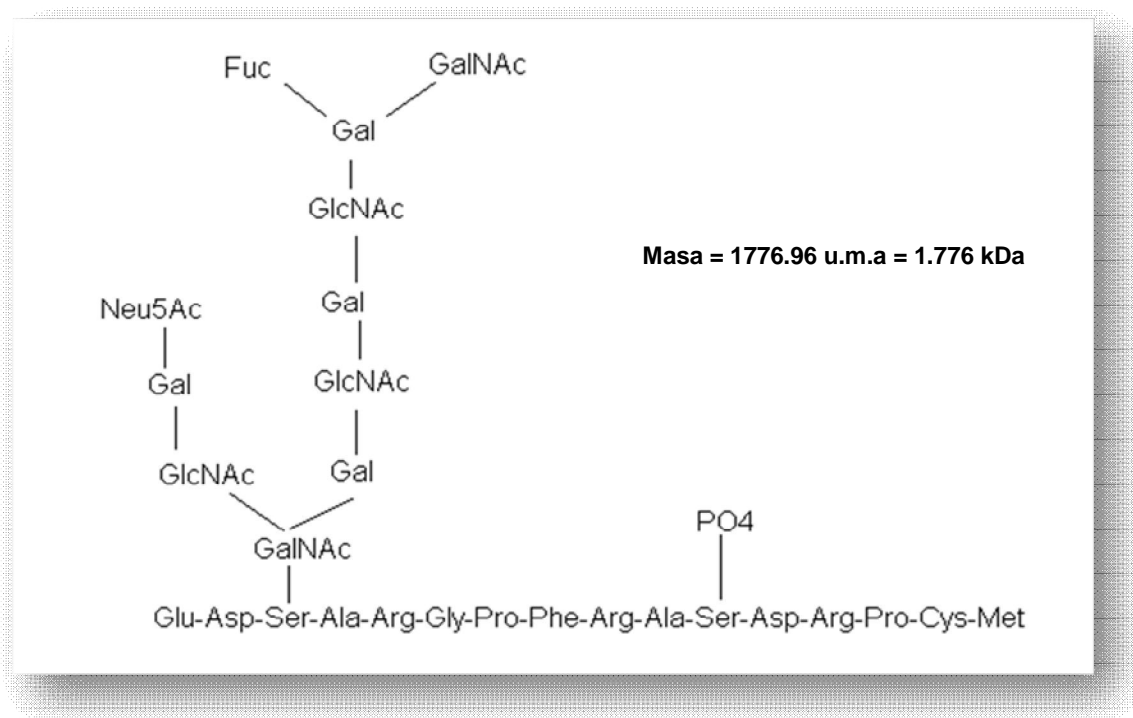


Figura 4. Secuencia de la GFPI. [29]

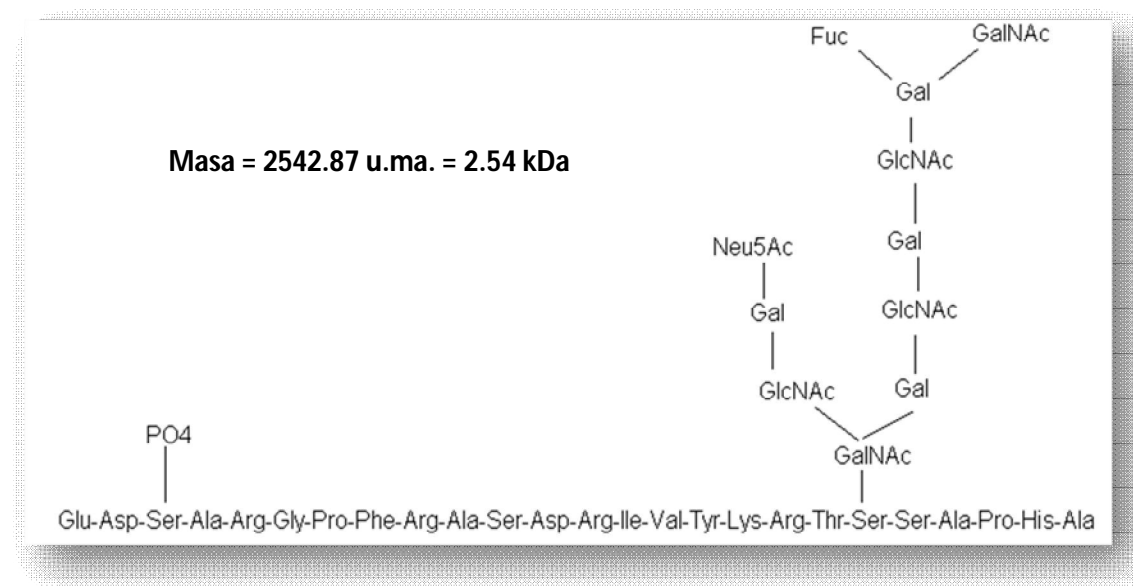


Figura 5. Secuencia de la GFPII. [29]



3 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el empleo de inmunomoduladores cada vez es más frecuente debido a los efectos benéficos observados al reforzar el sistema inmunológico. Las glucoproteínas GFPI y GFPII de reciente síntesis, se encuentran en fase de investigación preclínica para su comercialización como medicamentos inmunomoduladores. Sin embargo, antes de comercializar un fármaco o sustancia es importante que éste pase por diversas pruebas para evitar que cause efectos adversos en las personas que lo consumirán. Muchas de estas sustancias resultan genotóxicas, es por eso que es necesario someter las GFPI y GFPII a pruebas de genotoxicidad para corroborar el uso seguro en la salud de los futuros consumidores de estas sustancias.



4 HIPÓTESIS

Las glucoproteínas GFPI y GFPII, son compuestos ajenos al organismo (xenobióticos), por lo que podrían producir efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos.

5 OBJETIVO GENERAL

- Determinar en linfocitos humanos *in vitro* el efecto citotóxico, citostático y genotóxico de dos glucoproteínas derivadas de la pared celular de *Candida utilis*, a las que se han denominado GFPI y GFPII.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar por medio de la técnica de doble tinción FDA/EtBr el efecto citotóxico de GFPI y GFPII en linfocitos humanos *in vitro*.
- Determinar los efectos citostático y genotóxico de GFPI y GFPII por medio de la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos humanos *in vitro*.
- Exponer linfocitos humanos *in vitro* a GFPI y GFPII mediante activación metabólica con S9 para determinar los efectos citotóxico, citostático y genotóxico de los posibles metabolitos.



6 PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 SUJETOS DE ESTUDIO.

El estudio se llevó a cabo en linfocitos provenientes de muestras de sangre heparinizada obtenida por venopunción de tres donadores masculinos sanos, con un rango de edad entre 20 y 27 años.

6.2. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS.

La separación de los linfocitos de la sangre completa se llevó a cabo en esterilidad utilizando tubos cónicos de 15 ml conteniendo 6 ml de Histopaque 1077 (Sigma), e igual volumen de sangre completa, el cual se deposita por estratificación. Se centrifuga durante 20 min a 1600 rpm. De esta manera se obtiene por gradiente, un anillo de células blancas, el cual se recupera cuidadosamente. Se lava con 10 ml de medio RPMI-1640 por centrifugación a 3000 rpm durante 20 min. Se retira el sobrenadante y el botón de células se resuspende en 1 ml de medio RPMI-1640 para contar el número de células.

6.3 CONTEO DE LINFOCITOS

En un tubo eppendorf se colocan 900 μ l de medio RPMI-1640, 80 μ l de azul tripano (Sigma) y 20 μ l de las células resuspendidas. Para el recuento de linfocitos, se utilizan los cuatro cuadrantes externos de un hemocitómetro. El número de células se determina con la fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ cel/ml} = \text{N}^\circ \text{ células contadas}/4 \times 50 \times 10000.$$



6.4 CULTIVOS CELULARES.

En 3ml de medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con 1% de L-Glutamina (Sigma), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (SFB, PAA) se sembraron 1.5×10^6 linfocitos. La proliferación de los linfocitos se estimuló mediante la adición de 90 μ l de Fitohemaglutinina (PHA, Sigma). Las células se incubaron a 37°C. El tratamiento se aplicó durante las últimas 48 h, la citocalasina B durante las últimas 24h y la cosecha celular se realizó a las 72 h de cultivo.

6.5 TRATAMIENTO.

Se realizaron por triplicado curvas dosis-respuesta al tratamiento con GFPI y GPII. Las dosis utilizadas para ambas glucoproteínas fueron: 0, 5, 10, 20 y 50 μ M. En los ensayos se utilizó un control negativo y como control positivo se utilizó arsenito de sodio 1 μ M, concentración a la cual no es citotóxico, aunque presenta ligero efecto genotóxico y 5 μ M concentración a la cual se observa tanto citotoxicidad, citostaticidad, como genotoxicidad.

Las dosis de las GFP's se calcularon con base en la dosis diaria propuesta para ser administrada a los pacientes que es de 0.06g/día. Un individuo de 70 Kg tendría una concentración sanguínea de 0.015 mg/ml, lo que equivale a una concentración aproximada de 5 μ M para llevar a cabo los estudios *in vitro*.

6.5.1 CITOTOXICIDAD.

La toxicidad celular se midió por la técnica de doble tinción con diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/EtBr, Sigma). El FDA penetra en las células



intactas y se hidroliza en el lisosoma en su fluorocromo, la fluoresceína, el cual se retiene en la célula dándole un color verde al ser observada al microscopio de fluorescencia. El bromuro de etidio es un indicador de la pérdida irreversible de la integridad de la membrana, tiñe los ácidos nucleicos de las células con membrana dañada, pudiéndose observar de color rojo al microscopio de fluorescencia [30]. Al término del tiempo de cultivo, previo a la fijación de las células, se toma una alícuota de 100 µl para realizar esta determinación. Se considera citotóxica una sustancia que baja la viabilidad celular a menos del 70 %.

6.5.2 CITOSTATICIDAD Y GENOTOXICIDAD (ENSAYO DE MICRONÚCLEOS POR BLOQUEO DE LA CITOCINESIS).

Para llevar a cabo el ensayo de MN, los linfocitos se cultivaron como antes se mencionó, de acuerdo al método por bloqueo de la citocinesis y a los criterios establecidos por Fenech M. y colaboradores (2003), con algunas modificaciones_[19]. Los tratamientos se aplicaron durante las últimas 48 h de cultivo y en las últimas 24 h de cultivo, se agregó Citocalasina B (Cyt B, Sigma) a una concentración final de 6 µg/ml, para bloquear la citocinesis y acumular células que se han dividido una sola vez. Las células fueron cosechadas, fijadas y lavadas 4 veces con una solución fría de fijador de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1). Se prepararon laminillas por duplicado y se tiñeron con tinción Hemacolor (Merck, Alemania) para su evaluación al microscopio (Olympus BH-2). Todas las laminillas fueron codificadas para su recuento.

La cinética de proliferación de los linfocitos fue analizada en 200 células, determinando la frecuencia de células mononucleadas (Mo), binucleadas (BN) y polinucleadas (P), las cuales corresponden a 0, 1, y 2 o más divisiones, respectivamente (Figura 6). La actividad citostática de las GFP's, se calculó mediante el Índice Nuclear (IN), utilizando la siguiente ecuación:

$$IN = [Mo + 2BN + 3P]/200.$$



Para determinar el efecto genotóxico de la GFPI y GPFII, se determinó la frecuencia de MN en 1000 linfocitos BN por tratamiento.

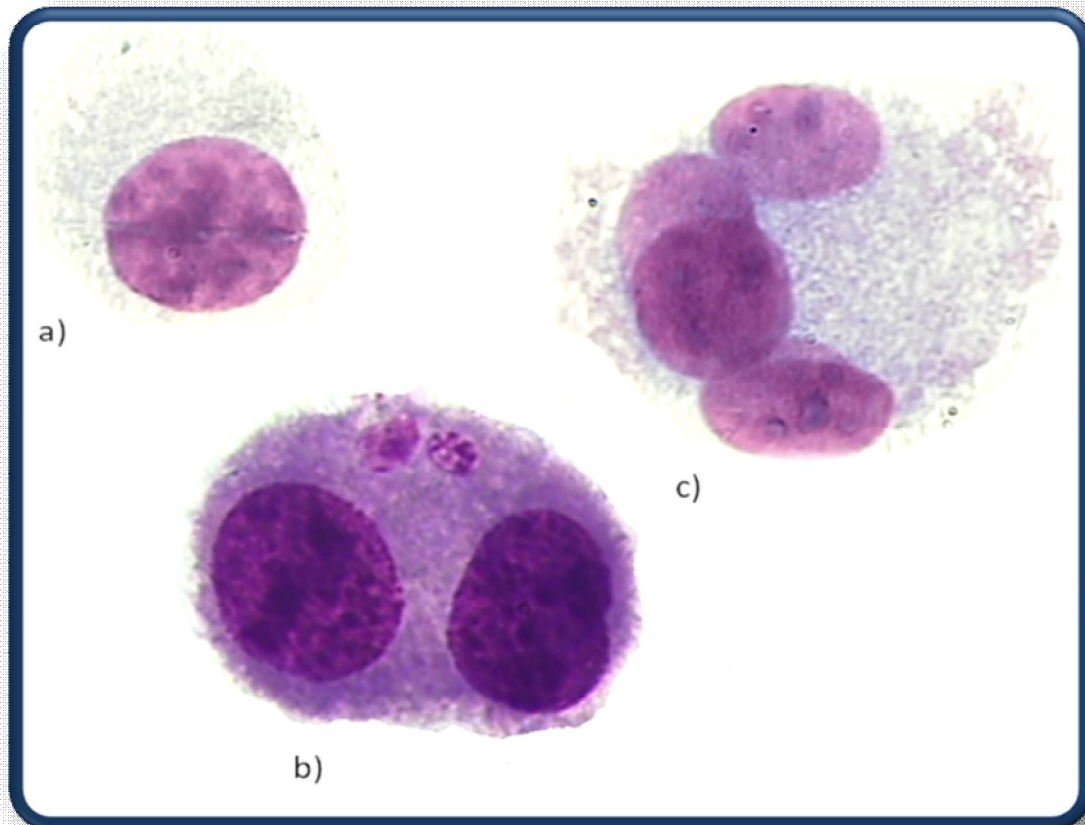


Figura 6. Células: a) mononucleada, b) binucleada y c) polinucleada utilizadas en la determinación de la cinética de proliferación de linfocitos.

6.6 EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO CITOTÓXICO, CITOSTÁTICO Y GENOTÓXICO DE LOS POSIBLES METABOLITOS DE GFPI Y GPFII MEDIANTE EL USO DE S9.

Con el fin de determinar si los posibles metabolitos de GFPI y GFP II son capaces de producir algún efecto citotóxico, citostático y genotóxico, se procedió a realizar un ensayo de activación metabólica *in vitro*, utilizando S9 al 10% (fracción



microsomal de las enzimas del hígado de rata (Anexo 1). El ensayo se llevó a cabo en linfocitos de un donador sano. Se repitieron por triplicado los experimentos de citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad antes descritos. Para llevar a cabo la activación metabólica, a las 48 h de cultivo se adiciona el S9 junto con los tratamientos de las GFP's correspondientes (0, 5, 10, 20 y 50 μ M). Se utilizaron tres controles positivos que incluyen las tres condiciones que se pueden presentar con el uso de la ciclofosfamida (CP): (c/CP, s/S9); (c/CP, c/S9); (s/CP, c/S9). La CP se utilizó 0.25 mM, concentración a la cual no presenta citotoxicidad pero si se observa genotoxicidad [31]. Se incubó durante 3 h a 37°C, después de las cuales, las células se lavan con medio RPMI-1640 y se vuelven a sembrar en el medio suplementado y con Cyt B (6 μ g/ml). Se incuban por 24 h más. Se cosechan y se continúa con el procedimiento establecido. En la figura 7 se representa el diagrama de flujo con el que se llevó a cabo este trabajo.

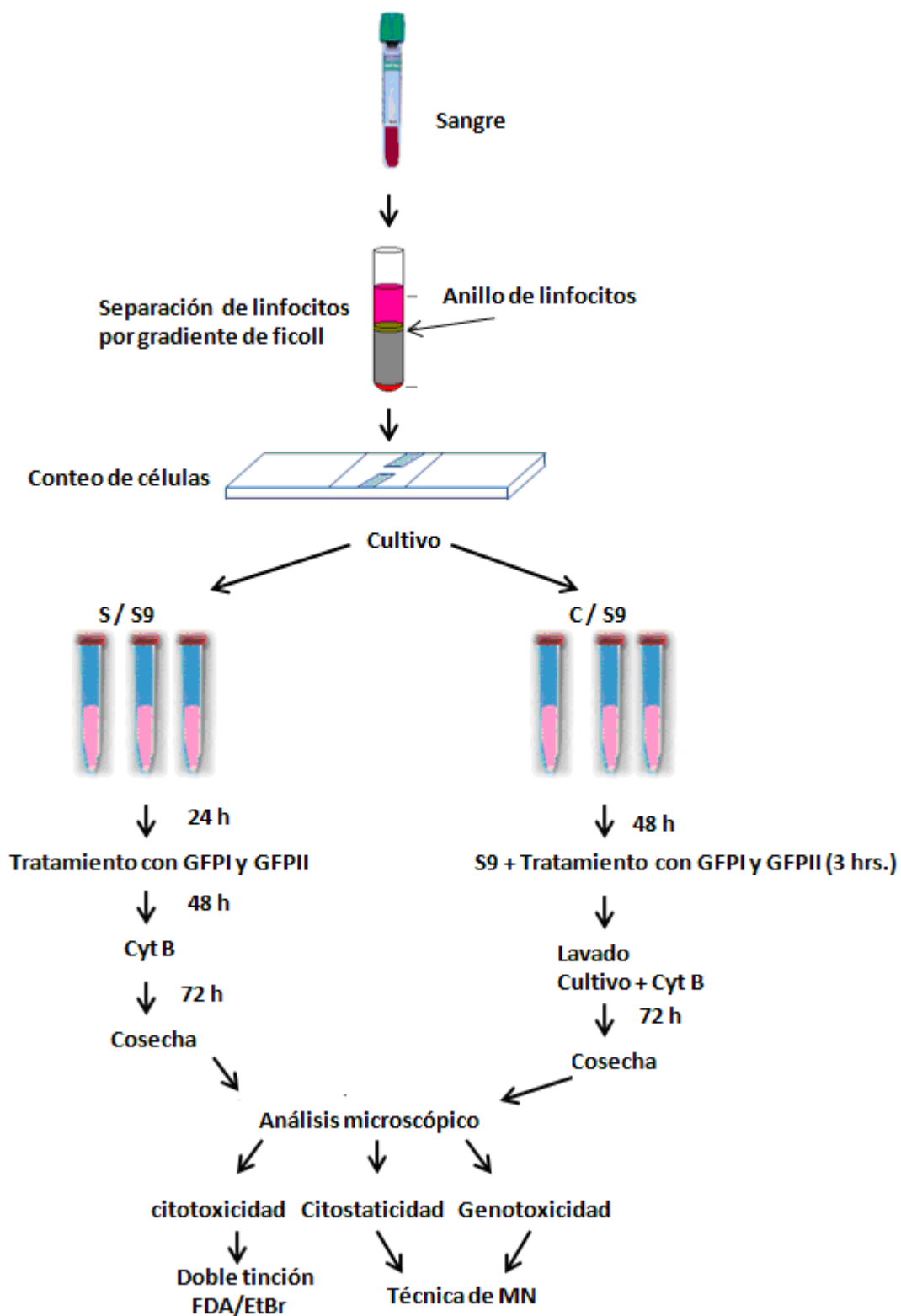


Fig. 7 Diagrama de trabajo



7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Graph Pad Prism 5.0. Todos los valores en este estudio se expresaron como promedios y desviación estándar. Para determinar las diferencias entre los tratamientos y sus controles se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. El nivel de significancia fue $P < 0.05$.



8 RESULTADOS

8.1 EFECTOS CITOTÓXICOS, CITOSTÁTICOS Y GENOTÓXICOS DE GFPI Y GFPII.

Se realizaron curvas dosis-respuesta para las glucoproteínas GFPI y GFPII. Las concentraciones utilizadas para ambas fueron: 5, 10, 20 y 50 μM . En las tablas 4 y 5 se muestran los resultados de citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad de los tres donadores realizados por triplicado, así como el promedio general, para las glucoproteínas GFPI y GFPII.

Tabla 4. Efectos citotóxico, citostático y genotóxico de la GFPI determinados *in vitro* en tres individuos sanos por triplicado.

Dosis μM	Citotoxicidad (% Viabilidad)				Citostaticidad (Índice Nuclear)				Genotoxicidad (MN/1000 células BN)			
	D1	D2	D3	Promedio	D1	D2	D3	Promedio	D1	D2	D3	Promedio
C	98.01	93.65	87.1	92.56	1.75	1.75	1.75	1.75	3	1	2.33	2.67
5	97.4	93.22	91.03	94.21	1.74	1.77	1.76	1.75	2.33	2.33	3	2.67
10	97.1	94.96	82.74	89.92	1.82	1.85	1.77	1.79	2.33	2.33	2.67	2.5
20	97.33	94.71	88.48	92.91	1.71	1.66	1.79	1.75	2.33	1	3	2.67
50	98.11	93.21	90.75	94.43	1.86	1.78	1.72	1.79	2.5	2	3.33	2.92
As 1	90.09	96.04	93	91.55	1.64	1.8	1.721	1.68	4	5	4	4
As 5	87.93	81.2	72.32	80.12***	1.61	1.42	1.33	1.47***	2.33	22.5	32	27.5***

*** $p < 0.0001$

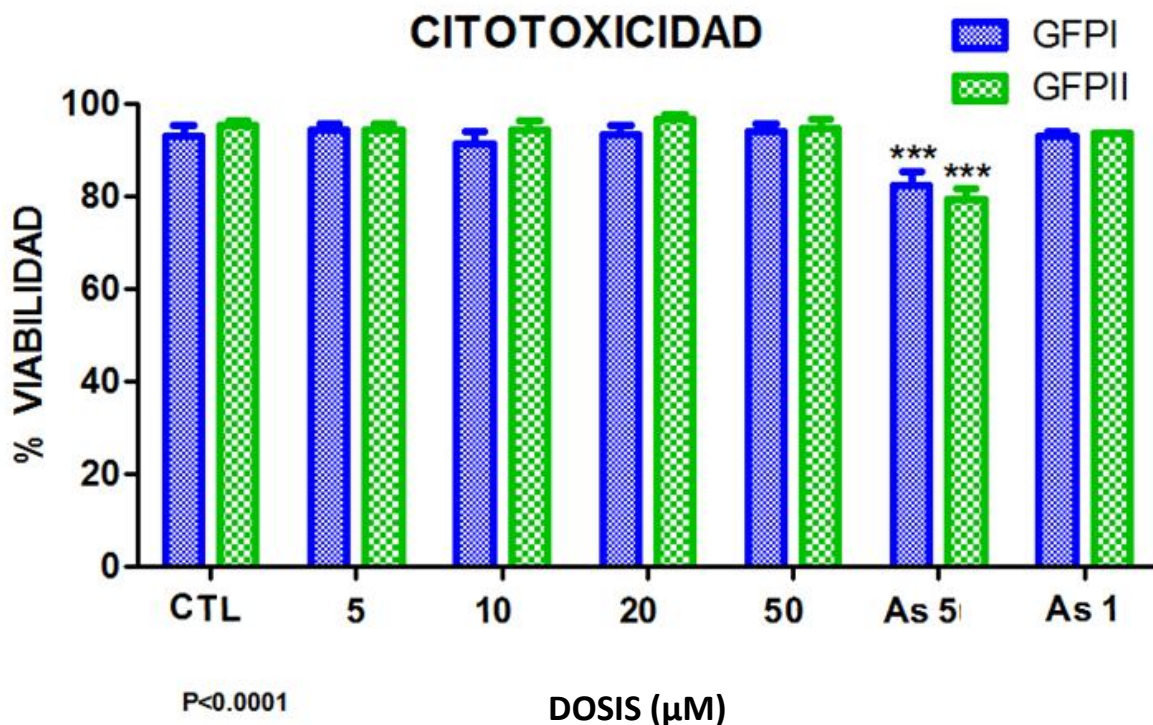


Tabla 5. Efectos citotóxico, citostático y genotóxico de la GFPII determinados *in vitro* en tres individuos sanos por triplicado.

Dosis μM	Citotoxicidad (% Viabilidad)				Citostaticidad (Índice Nuclear)				Genotoxicidad (MN/1000 células BN)			
	D1	D2	D3	Promedio	D1	D2	D3	Promedio	D1	D2	D3	Promedio
C	97.28	94.18	93.79	93.98	1.75	1.75	1.75	1.75	2.67	1.33	4	3.33
5	97.1	92.69	92.77	94.94	1.83	1.74	1.72	1.78	2	1	2.33	2.17
10	97.1	95.06	90.71	93.9	1.81	1.61	1.75	1.78	2.67	2	3	2.83
20	98.62	94.21	97.35	97.99	1.81	1.76	1.75	1.78	3.33	2.67	2.33	2.83
50	99.03	89.38	95.64	97.33	1.80	1.66	1.74	1.77	2	2.33	4	3
As 1	93.46	94	93.5	93.46	1.80	1.70	1.65	1.73	3	4	4	3.5
As 5	87.9	74.43	75.73	81.82***	1.43	1.31	1.24	1.34***	21	22.5	27.33	24.17***

*** $p < 0.0001$

La GFPI y GFPII no mostraron efectos citotóxicos en las dosis estudiadas ya que en todas se observan valores superiores al 90% de viabilidad. El arsénico 5 μM, utilizado como control positivo, produjo una disminución de la viabilidad celular en función de la susceptibilidad individual. Sin embargo, la concentración de arsénico 1 μM, como se esperaba, no modificó la viabilidad celular (Gráfica 1).

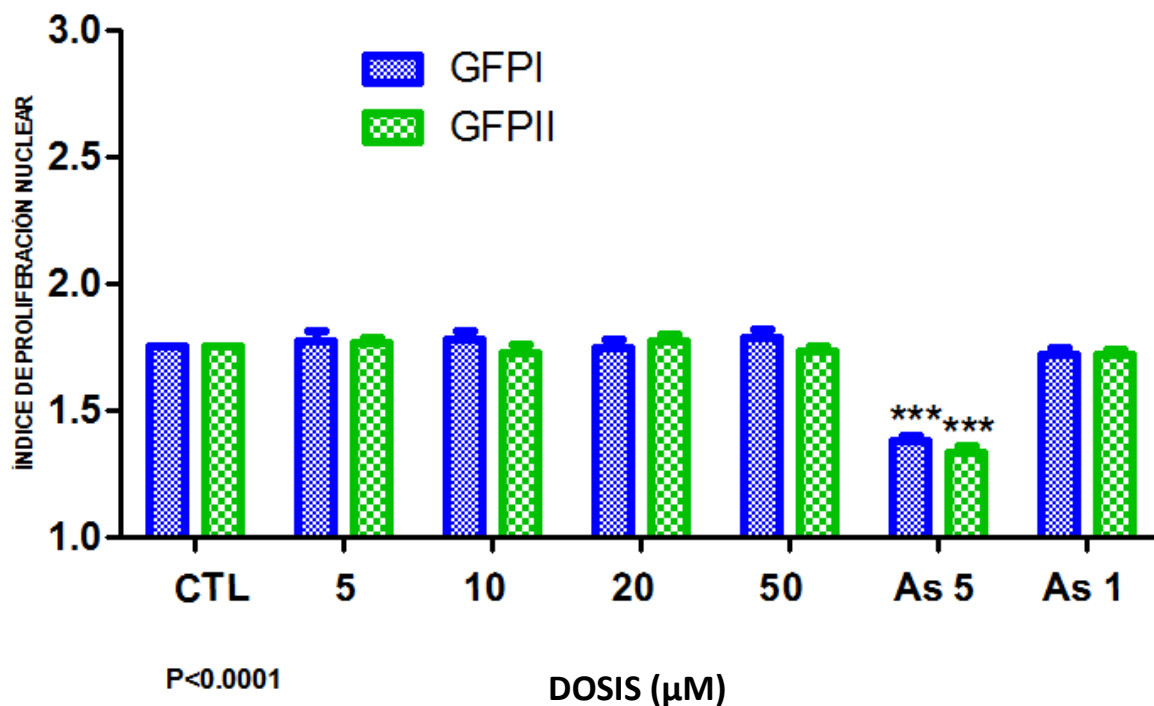


Gráfica 1. Estudio *in vitro* realizado en 3 individuos por triplicado para determinar el efecto citotóxico de GFPI Y II. Los resultados corresponden a los promedios y su desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

Los valores correspondientes al índice de proliferación nuclear para las diferentes concentraciones de GFPI y GFPII no se vieron alterados. El control positivo de arsénico $5 \mu\text{M}$ presenta una disminución significativa en la proliferación celular mientras que el arsénico $1 \mu\text{M}$ no modifica la proliferación celular (Gráfica 2).



CITOSTATICIDAD

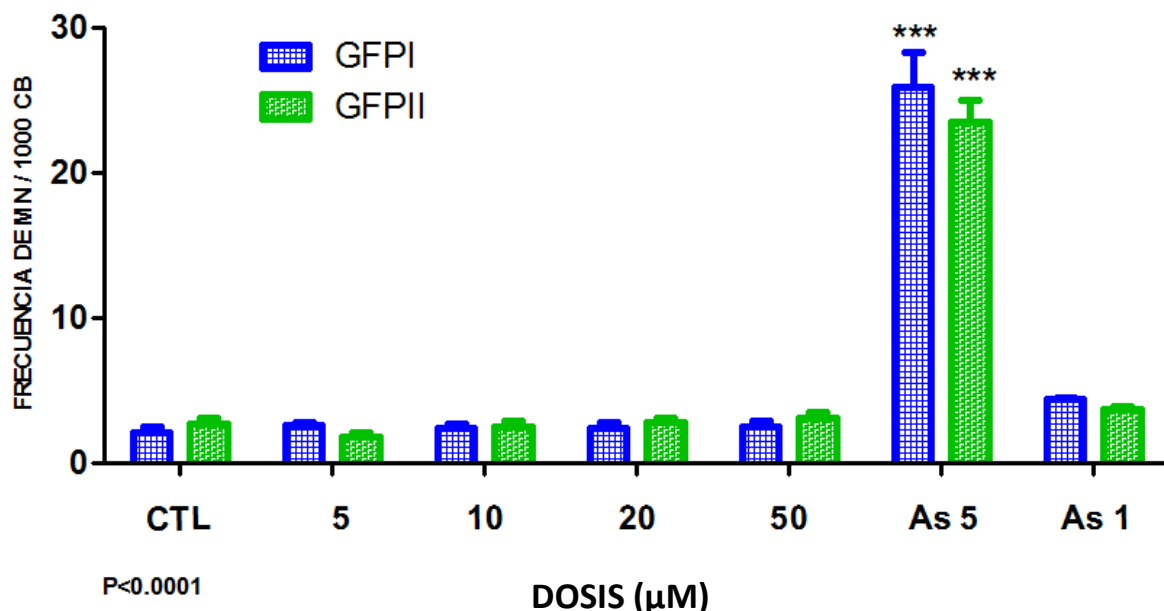


Gráfica 2. Estudio *in vitro* realizado en 3 individuos por triplicado para determinar el efecto citostático de GFPI Y GFPII. Los resultados corresponden a los promedios y su desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

Los resultados de genotoxicidad, no muestran diferencias significativas en ninguna de las dosis con respecto al control. El control positivo de arsénico $5 \mu\text{M}$, como se esperaba, muestra un incremento muy significativo con respecto al control (Gráfica 3).



GENOTOXICIDAD



Gráfica 3. Estudio *in vitro* realizado en 3 individuos por triplicado para determinar el efecto genotóxico de GFPI Y GFPII. Los resultados corresponden a los promedios y su desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

8.2 EFECTOS CITOTÓXICOS, CITOSTÁTICOS Y GENOTÓXICOS DE LOS POSIBLES METABOLITOS DE GFPI Y GFPII.

Los resultados de los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos producidos por la activación metabólica con S9 de GFPI y GFPII se muestran en la Tabla 6. Se utilizó como control positivo a la ciclofosfamida (CP), a una dosis no citotóxica (0.25mM). Se sabe que los metabolitos de la CP son más genotóxicos que el compuesto parental. Se utilizaron tres diferentes controles positivos, con el fin de demostrar que son los metabolitos, los que incrementan la frecuencia de MN. El control con CP pero sin S9 (C c/CP), nos permite ver el efecto de la CP a la concentración antes mencionada. El control sin CP pero con S9 (C c/S9), representa el efecto que por sí solo pudiera generar la activación metabólica. El



control con CP y con S9 (C c/CP, c/S9), es el que confirma que la activación metabólica incrementa la genotoxicidad del compuesto [31].

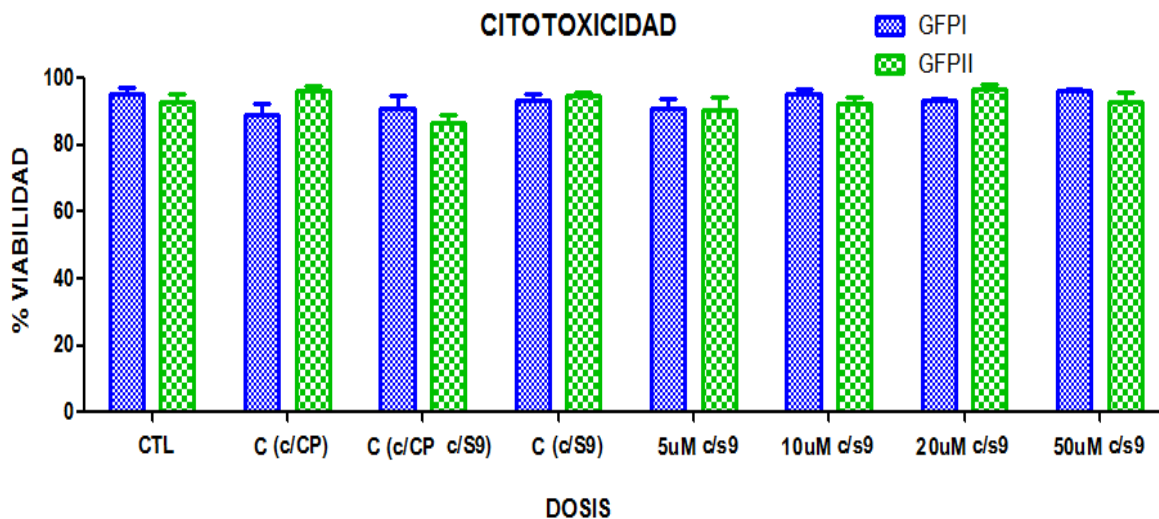
Las GFPI y GFPII, no mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo.

Tabla 6. Efectos citotóxico, citostático y genotóxico de las GFPI y GFPII con actividad metabólica determinados *in vitro* en un individuo sano por triplicado.

DOSIS	Citotoxicidad (% Viabilidad)		Citostaticidad (Índice Nuclear)		Genotoxicidad (MN/1000 células BN)	
	GFPI	GFPII	GFPI	GFPII	GFPI	GFPII
C (-)	95.10	92.76	1.75	1.75	1.33	2
c (c/CP)	89.09	96.18	1.78	1.62	3	3.33
c (c/CP, c/S9 10%)	91.11	86.5	1.69	1.75	8.67***	9.33***
c (c/S9 10%)	93.49	94.65	1.8	1.83	4	3
5µM c/s910%	91.13	90.25	1.76	1.82	2.67	2.67
10µM c/s910%	95.18	92.2	1.94	1.71	3.67	3.33
20µM c/s910%	93.32	96.48	1.75	1.74	2.67	3.33
50µM c/s910%	96.16	93.01	1.75	1.78	3.33	3.33

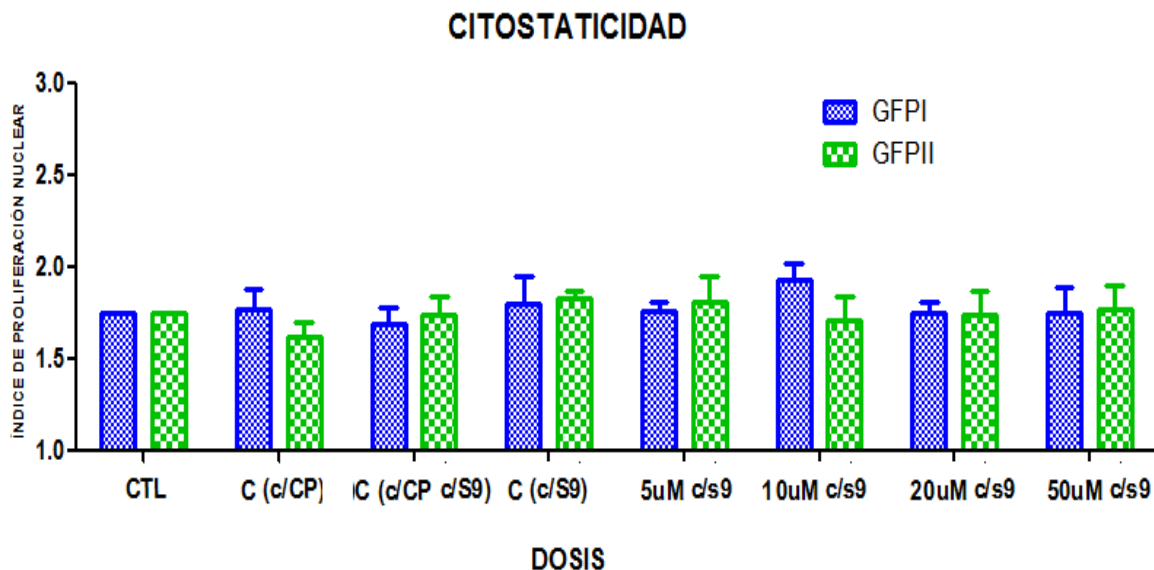
***p<0.0001

En la gráfica 4, se presentan los efectos citotóxicos *in vitro* ocasionados por la activación metabólica con S9 de las sustancias estudiadas. En ninguna de las dosis utilizadas de GFPI y GFPII se observó cambio significativo en la viabilidad celular con respecto al control.



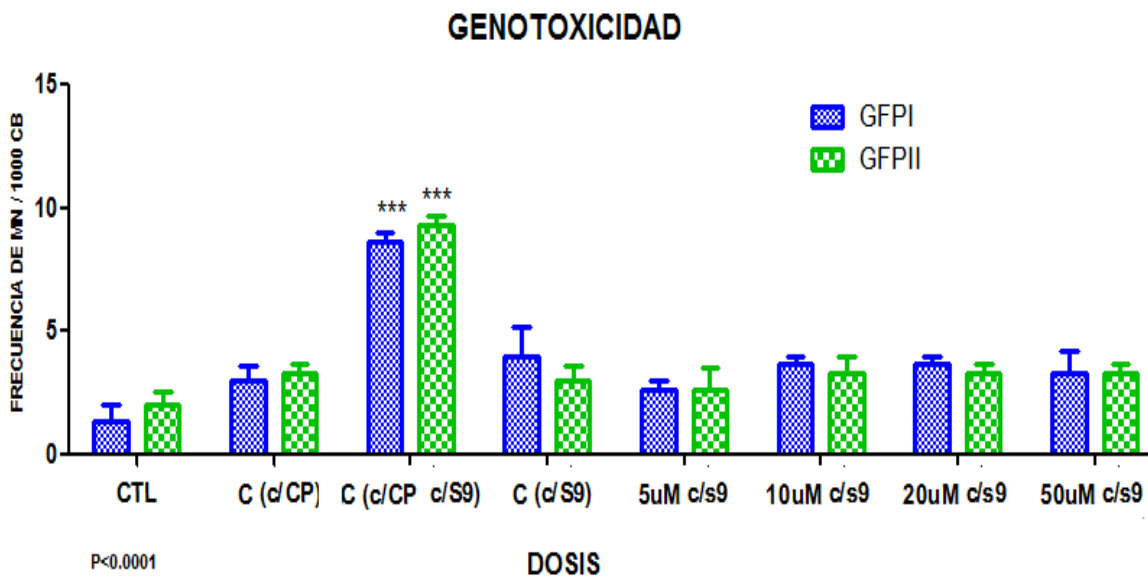
Gráfica 4. Efecto citotóxico de GFPI y II con activación metabólica (S9), en un individuo por triplicado. Los resultados corresponden a los promedios y su desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

En la gráfica 5 se puede observar que no hubo cambios en la proliferación celular debidos a la activación metabólica en las GFP's. Asimismo, ninguno de los controles modificó la proliferación celular, como era de esperarse al utilizar CP 0.25 mM.



Gráfica 5. Efecto citostático de GFPI y II con activación metabólica (S9), en un individuo por triplicado. Los resultados corresponden a los promedios y su desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

Los resultados de los efectos genotóxicos de los posibles metabolitos de GFPI y GFPII se presentan en la gráfica 6. La activación metabólica de las glucoproteínas no modificó la frecuencia de MN en ninguna de las concentraciones evaluadas en este estudio. Mientras que el control con CP activada metabólicamente con S9 incrementó muy significativamente la frecuencia de MN ($p < 0.0001$) con respecto al control negativo.



Gráfica 6. Efecto genotóxico de GFPI y II con activación metabólica (S9), en un individuo por triplicado. El control positivo con CP y S9 muestra un incremento muy significativo en la frecuencia de MN. Los resultados corresponden a los promedios y su desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.



9 DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizaron las glucoproteínas GFPI y GFPII sintetizadas a partir de la pared celular de *Candida utilis*. Estas glucoproteínas poseen propiedades inmunomoduladoras y se pretenden utilizar como medicamentos inmunoestimuladores. Estudios realizados con ambas glucoproteínas demuestran que actúan en el sistema inmune produciendo: inhibición del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α) [32]. Asimismo, producen incremento en la expresión del marcador de proliferación celular CD69 en: linfocitos NK (CD3-CD56+), en linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+) y en linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) las cuales son pruebas indicativas de sus posibles efectos inmunomoduladores [33].

En este estudio, GFPI y GFPII fueron sometidas a pruebas de citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad *in vitro*.

Se determinó que ninguna de las dos glucoproteínas presentó efectos citotóxicos en las diferentes dosis utilizadas. Asimismo, no modificaron los valores del índice de proliferación nuclear en las diferentes concentraciones de exposición, indicando que no producen efectos citostáticos.

Con respecto a los resultados de genotoxicidad, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dosis comparadas con el control, por lo que se considera que a las concentraciones usadas no producen efectos genotóxicos.

Los estudios de citotoxicidad y genotoxicidad de sustancias que van a ser utilizadas como medicamentos se realizan en sistemas *in vitro* y en animales de laboratorio para que dicha sustancia pueda pasar a las pruebas clínicas de fase I.

Cuando los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* son positivos, la acción de rechazo sobre la sustancia en pruebas preclínicas es contundente. Sin embargo, aun cuando las pruebas de genotoxicidad resulten negativas, no se puede asegurar que dicha sustancia pueda pasar a la fase clínica en humanos.



Esto se debe a que muchas sustancias ingeridas por el ser humano son inocuas, pero al ser metabolizadas en el organismo, en ocasiones se generan metabolitos activos que pueden ocasionar diversos problemas de salud [34]. Por esta razón, en este trabajo también se determinaron los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de GFPI y GFPII mediante la activación metabólica con S9. Los resultados mostraron que no se afectó la viabilidad celular, tampoco la proliferación celular y no hubo un incremento en la frecuencia de MN en ninguna de las dosis utilizadas de GFPI y GFPII con respecto a sus controles negativos, por lo que los metabolitos, si es que estos se producen, parecen ser inocuos.

Aunque no se sabe si GFPI y GFPII son capaces de atravesar la membrana celular, por los resultados de los análisis de activación y proliferación *in vitro* realizados por De la Fuente M. y col. (2008), se podría sugerir que actúan a nivel de superficie de membrana [33]. El gran número de glucoproteínas en la célula, y la similitud en la estructura química de dichas moléculas con GFPI y GFPII podrían hacer que éstas se confundan con las propias y por ello no generar toxicidad, ni causar algún daño al material genético de las células.

En la actualidad, millones de personas en el mundo padecen enfermedades como cáncer, diabetes, Herpes zoster o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), entre otras, las cuales provocan una alteración del sistema inmune, dejando a la persona en un estado vulnerable frente a diversas infecciones [35]. La aplicación que se pretende dar a las sustancias en estudio es la de mejorar la actividad natural del sistema inmune, ya que en enfermedades como las arriba mencionadas, se presentan infecciones recurrentes a las que el organismo no es capaz de responder, o bien, como coadyuvante en el tratamiento de padecimientos en los que al reforzar el sistema inmune, tanto el pronóstico como el tiempo de recuperación, se mejoren (tratamientos de quimioterapia, radioterapia, quemaduras, etc).



Finalmente, cabe señalar que este estudio aportó evidencias de que GFPI y GFPII no generan efectos genotóxicos en las células. Este hecho es de suma importancia ya que permite continuar con los estudios preclínicos en animales de laboratorio.



10. CONCLUSIONES

Las glucoproteínas GFPI y GFPII no presentaron efectos citotóxicos, citostáticos ni genotóxicos significativos en linfocitos humanos *in vitro* con respecto al control en las dosis utilizadas.

La activación metabólica de GFPI y GFPII en linfocitos humanos *in vitro* no mostró diferencias significativas con respecto al control en los parámetros analizados y a las dosis utilizadas.

Se observaron diferencias en la respuesta individual de GFPI y GFPII. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas con respecto a su control o entre donadores.

Con los resultados obtenidos en este estudio *in vitro*, se considera que estas sustancias son inocuas y por lo tanto, es posible continuar con la fase preclínica en animales de laboratorio.



11. REFERENCIAS

1. Alvarez M., Albilos A., Manzano L. Modificadores de la respuesta biológica. España, Fundación José Casares Gil, 2003. 7-11.
2. Guyton A. Tratado de fisiología médica. 11ª ed. España, Editorial Elsevier, 2006. pp 429-450.
3. Abbas A. and Lichtman A. Cellular and molecular Immunology, 6a ed. Estados Unidos. Saunders, 2007. pp35-76.
4. Stites DP., Terr Al., Parslow. Inmunología básica y clínica, 9ª ed, México, Editorial El Manual Moderno, 1998. pp51-63.
5. López A., Chávez C., Granados J. Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. Revista de Investigación Clínica, 2005. 57(2): 132,141.
6. Kirkpatrick C. Transfer Factors: Identification of Conserved Sequences in Transfer Factor Molecules. Molecular Medicine, 2000. 4(6): 332-341.
7. Sumano López Héctor, Ocampo Camberos Luis. *Farmacología Veterinaria*. 3ª. Ed, España, Editorial Mc Graw-Hill, 2006. pp 1054-1059.
8. Casarett y Doull. Manual de Toxicología. 5ª ed. México, editorial Mc Graw Hill, 2001. pp 981.
9. Rodríguez, R. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Serie: La ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica: ILCE. V3. Libros Electrónicos, 1995, (visitado en Marzo de 2011).
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html>.
10. Robert R. Genetic toxicology: Web resources. Toxicology, 2002. 173:103–121.
11. Verhoeven D., Verhagen R., et al. A review of mechanisms underlying antiarcinogenicity by Brassia vegetables. Chem-Biol. Interac, 1997. 103:79-129.



12. Garte S. y Bonassi S. Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-special issue overview. *Mutat Res*, 2005. 592: 3-5.
13. Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol*, 2006. 98: 336-345.
14. Ostrosky P., Gonshebbat M.E. El Tejido Linfo-citario en la Evaluación de Biomarcadores de Efecto, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, 2006.
15. Pastor S., Gutierrez S., Creus A., Cebulska-Wasilewska A., Marcos R. Micronuclei in Pheripheral Blood Lymphocutes and Buccal Epithelial Cells of Polish Farmers Exposed To Pesticides, *Mutation Research*, 2001. 495:147-156.
16. Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, *Anales Sis San Navarra*, 2005. 28, (2):227-236.
17. Rigger M. G. Glossary of Genetics Classical and Molecular. Alemania, Springer Verlag, 1981. pp. 339-335.
18. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res*, 1993. 285:35-44.
19. Fenech, M, Chang, W.P., Kirsch-Volders, M, Holland, N, Bonassi, S. y Zeiger, E. HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 2003. 534: 65-75.
20. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res*, 2000. 455:81-95.
21. Landi S., Lazzolino E., Barale R. Are baseline frequencies of SCEs, CAs and MN in human lymphocytes related to haematological values?. *Mutat. Res*, 2000. 469: 159-166.



22. Lee B., Lee S., Kim H. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonil contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, betacarotene and red ginseng). *Cancer Lett*, 1998. 132: 219-227.
23. Lehninger Albert. *Principios de Bioquímica*. 5a. ed. México. Editorial Ediciones Omega, 2009. pp 255-256.
24. Robert K. Murray. *Bioquímica de Harper*, 15ª. ed, México. Editorial Manual Moderno, 2001, pp 773-793.
25. Majano P, Alonso J. L., et al. AM3 inhibits LPS-induced iNOS expression in mice. *International Immunopharmacology*, 2005. 5:1165–1170.
26. Alonso J L. Et al. AM3, a new antagonist of LPS-induced tumor necrosis factor production. *Immunobiology*, 1987. 75 (1-2): 124.
27. Prieto A, Reyes E, Berstein E. Defective Killer and Phagocytic Activities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease are restored by Glycophosphopeptical (Imunoferon). *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 163:1578-1583.
28. Pérez García R, Pérez García A, Verbeelen D et al. AM3 (Imunoferón) as an adjuvant to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. *Kidney International*, 2002. 61:1845-1852.
29. Castro Martínez M, Valencia Quiroz I. Trabajo realizado con el programa Hyperchem. V.8.0. Depto. Fís. Y Quím. Teórica. Facultad de Química, UNAM, 2010.
30. Aeschbacher M, Reinhardt CA, Zbinden G. A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry. *Cell Biol Toxicol*, 1986. 2(2): 247-255
31. A. Elhajouji, A. P. Santos, P. Van Hummelen and M. Kirsch-Volders. Metabolic differences between whole blood and isolated lymphocyte cultures for micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and benzo[a]pyrene. *Mutagenesis*, 1994. 9(4):307-313.
32. Informe de Industria Farmacéutica Andrómaco S.A. DE C.V.: Inmunol (glicofosopeptical) México. Reg. Núm. 085M88.



33. De La Fuente M., Pérez S. M. Informe de Análisis de la activación y proliferación *in vitro* de linfocitos de sangre periférica en respuesta al estímulo con "Glico 1". Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 2008
34. Zúñiga G. *Sistemas de detección de daño genético*, Ed. *Genética, ambiente y salud*, 2ª ed, México, 2001, pp.127-150
35. Kindt, Thomas J. *Inmunología de Kuby*, 6a ed. Mexico, Editorial Mc Graw Hill, 2007, pp 525-544.



12. ANEXO 1

TRATAMIENTO CON S-9 EN CULTIVOS DE LINFOCITOS

Usar la siguiente mezcla:

Sales MgCl ₂ -KCl *	0.11ml
1M Glucosa-6-Fostato	0.0275ml
0.1M NADP **	0.22ml
0.2M Buffer de Fosfatos***	2.75ml
H ₂ O estéril	0.3685ml
S9	<u>0.11ml</u>
	1.1 ml

* 1.23g de KCl + 0.814g de MgCl₂ y aforar a 10ml

** NADP 76.6mg en 1ml de H₂O estéril

*** (Monobásico + Dibásico) pH 7.4

Agregar 500µl de la mezcla a cada cultivo de 5ml a las 27 o 30 horas de iniciada la incubación.

El tratamiento dura 3 horas; posteriormente se retira la mezcla, centrifugando y eliminando el sobrenadante. Finalmente se reconstituye el mismo vol. (5ml) con RPMI, 100µl de PHA y 500µl de SFB y se vuelven a incubar los cultivos.



13. GLOSARIO

Anticuerpo: Proteínas sintetizadas por la línea de células B denominadas inmunoglobulinas; tienen la propiedad de fijarse específicamente y con gran afinidad a un antígeno.

Antígeno: Agente que desencadena la respuesta inmunitaria; se refiere a la propiedad de una molécula de ser reconocida por una inmunoglobulina o receptor de célula T y actuar como blanco de una respuesta.

Células NK: Subgrupo de linfocitos que nacen de una célula precursora en la médula ósea, pueden identificarse por la presencia de ciertos antígenos característicos de diferenciación. No poseen especificidad por el antígeno y no adquieren memoria inmunológica.

Citostaticidad: Capacidad de producir una alteración en la cinética celular.

Citotoxicidad: Capacidad de producir un daño tóxico a las células.

Genotoxicidad: Capacidad de inducir daño en el material genético de las células.

Glucano: Compuesto formado por varias unidades de azúcares.

Glucoproteína: Proteína que posee cadenas de oligosacáridos unidos covalentemente a su estructura polipeptídica.

Inmunógeno: Molécula o conjunto de moléculas que pueden inducir una respuesta inmunitaria en un huésped particular.

Inmunomodulador: Fármaco con capacidad de interacción con el sistema inmune, actúa normalizando aquellos parámetros que se encuentran incrementados o se manifiestan de manera excesiva en el individuo, o aumentan los que se encuentran disminuidos o defectuosos.

Linfocito B: células que expresan inmunoglobulinas en la membrana, la cual se encuentra asociada a otras moléculas de la superficie formando el complejo receptor de antígeno de las células B (BCR).

Linfocitos T: Células del sistema inmune que se identifican por su receptor de membrana llamado TCR.

Metabolito: Sustancia producida o utilizada durante el metabolismo (digestión).

Polipéptido: Polímero formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.