



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACCIÓN DE LA CUMARINA Y
DE LA 7-HIDROXICUMARINA, EN LA INDUCCIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE LA INTERLEUCINA-3 EN EL RATÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

PATRICIA CUAUTLE RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

**COMITÉ TUTORAL: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA**



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **CUAUTLE RODRÍGUEZ PATRICIA** con número de cuenta **98049064**, con la tesis titulada **"ESTUDIO IN VITRO DE LA ACCIÓN DE LA CUMARINA Y DE LA 7-HIDROXICUMARINA EN LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA INTERLEUCINA-3 EN EL RATÓN."**, realizada bajo la dirección del: **DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS**.

Presidente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS
Suplente: DRA. DOROTHEA INGENBORG BECKER FAUSER
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 noviembre de 2011

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, senda de sueños y formación hacia la investigación, por el apoyo brindado para la formación de nuevos caminos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado (CONACYT 98729).

Al comité tutorial, Dr. Juan A. Molina Guarneros, Dr. Abraham Landa Piedra y Dr. Luis Felipe Jiménez García, con toda mi gratitud por guiarme en el camino de la investigación, por permitirme observar su forma de concebir la ciencia y contagiar ese ímpetu y curiosidad, esa necesidad de explicar y resolver inquietudes. Al Dr. Juan A. Molina Guarneros, tutor de este proyecto por enseñar más allá de la ciencia.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,
FIRMAMENTO INFATIGABLE, SIEMPRE EN EXPANSIÓN.

A los miembros del jurado: Dra. María Isabel Soto Cruz, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Juan A. Molina Guarneros, Dr. Abraham Landa Piedra y Dra. Ingeborg Becker Fauser.

Por las observaciones, correcciones realizadas y el tiempo dedicado a este trabajo.

A la Facultad de Medicina.

El trabajo de investigación realizado para esta tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunofarmacología, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Juan Molina, porque sin universitarios como él, difícilmente se puede tener el privilegio de sentir la esencia y conocer el valor de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Agradezco la oportunidad que brinda a los alumnos, el empuje para continuar en el camino del conocimiento y la investigación; la visión para siempre proponer nuevas metas y fomentar la formación de nuevos profesionistas. Por su valiosa experiencia vertida en nosotros; por su generosidad al compartirnos, impulsarnos y enseñarnos a crecer con la universidad en otras áreas y por ser un ejemplo de trabajo. Con todo mi respeto y admiración.

Al Dr. Abraham Landa Piedra, por su valiosa colaboración. Gracias por sus observaciones, correcciones, y ayuda en la parte metodológica; porque tuvo la paciencia y tiempo para revisar los avances y apoyarme con su experiencia para concluir este proyecto. Por permitirme trabajar en su laboratorio, prestarme sus equipos, por siempre hacer observaciones para mejorar el trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, agradezco la forma en que enriqueció cada examen tutorial, por todas esas preguntas que motivaron siempre a la investigación y al aprendizaje. Por su calidez humana y amabilidad en su forma de transmitir el conocimiento.

Al Laboratorio de Inmunofarmacología, un gran equipo: A Maribel, mi compañera de trabajo y mi amiga, por compartir conmigo tantas experiencias y por ser siempre un ejemplo a seguir; por su enorme simpatía y alegría. Gracias a Xanic, Marcela, Luis y Tere, que formaron parte de este laboratorio y que nos ayudaron a iniciar esta nueva etapa en nuestra vida académica, el apoyo a la docencia. A Doña Maty, gracias.

A la Dra. Lucía Jiménez, por sus enseñanzas a lo largo de mi formación académica, por ayudarme a resolver múltiples problemas con las técnicas y por poder revisar con ella varios aspectos importantes de este proyecto.

Al Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* y a sus integrantes por su ayuda.

CON TODA MI ALMA, CORAZÓN Y VIDA

PARA MIS PADRES

HERMANAS

SOBRINOS

ARTURO

AMIGOS

*ENTUSIASTA Y OSADA HA DE SER LA JUVENTUD.
SIN ENTUSIASMO NO SE SIRVEN HORMOSOS IDEALES;
SIN OSADÍA NO SE ACOMETEN HONROSAS EMPRESAS.
UN JÓVEN ESCÉPTICO ESTÁ MUERTO EN VIDA,
PARA SI MISMO Y PARA LA SOCIEDAD.*

*UN ENTUSIASTA, EXPUESTO A EQUIVOCARSE,
ES PREFERIBLE A UN INDECISO QUE NO SE EQUIVOCA NUNCA.
EL PRIMERO PUEDE ACERTAR;
EL SEGUNDO, JAMÁS.*

LA IMAGINACIÓN Y LA EXPERIENCIA VAN DE LA MANO.
SOLAS NO ANDAN.

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACCIÓN DE LA CUMARINA
Y DE LA 7-HIDROXICUMARINA, EN LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE LA INTERLEUCINA-3 (IL-3) EN EL RATÓN.

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	01
1.1 Abstract	02
2. INTRODUCCIÓN	04
2.1 Cumarinas	04
2.1.2 Aplicaciones y usos de las cumarinas	06
2.1.3 Evidencia de actividad inmuno-moduladora	07
2.1.4 Cumarina en la inducción de interleucinas	08
2.2 Citocinas	09
2.2.1 Inducción y aplicación de citocinas	10
2.3 Interleucina-3	11
2.3.1 Actividades biológicas de IL-3	13
2.3.2 Aplicaciones clínicas de IL-3	13
2.4 Interleucina-3 y cumarina	14
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	15
4. OBJETIVOS	16
5. HIPÓTESIS	16
6. PARTE EXPERIMENTAL	17
6.1 Material y Reactivos	17
6.1.1 Material biológico	18
6.2 Metodología	18

CONTENIDO

	Página
6.3 Obtención de células	18
6.3.1 Macrófagos	18
6.3.2 Esplenocitos	19
6.4 Cultivos celulares	19
6.5 Extracción de RNA total	19
6.6 Extracción de gDNA	20
6.7 Cuantificación de ácidos nucleicos	21
6.8 Electroforesis horizontal (Agarosa)	21
6.9 Estandarización de la Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)	22
6.10 Exposición de Esplenocitos a Cumarina o 7-hidroxycumarina	24
6.11 Ensayos de transcripción <i>in vitro</i> (RT-PCR) de IL-3	25
6.12 Densitometrías y análisis cuantitativo de la expresión del mRNA de IL-3	26
6.13 Ensayos de Viabilidad Celular (MTT)	27
6.14 Ensayos de Citotoxicidad Celular (LDH)	28
6.15 Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Extracción de RNA total	30
7.2 Extracción de gDNA	31
7.3 Cuantificación de ácidos nucleicos	31
7.3.1 Cuantificación RNA	31
7.3.2 Cuantificación DNA	32
7.4 Estandarización de la Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)	33
7.4.1 Temperatura de alineamiento óptima para los primers de IL-3 y GAPDH y curva de cantidad para gDNA para PCR	33
7.4.2 Temperatura de alineamiento óptima para primers IL-3 y GAPDH y curva de cantidad para RNA total como templado para RT-PCR	37

CONTENIDO

	Página
7.5 Determinación de la expresión de mRNA de IL-3 de ratón, en esplenocitos expuestos a cumarina o 7-hidroxycumarina	40
7.5.1 RNA Total tiempos: Exposición a Cumarina o 7-hidroxycumarina a tiempo 0, 3, 6, 12 y 24 h	40
7.5.2 RT-PCR tiempos: Exposición a Cumarina o 7-hidroxycumarina a tiempo 0, 3, 6, 12 y 24 h	43
7.6 Densitometrías y análisis cuantitativo de la expresión del mRNA de IL-3	45
7.7 Determinación de Viabilidad Celular (MTT)	48
7.8 Determinación de Citotoxicidad Celular (LDH)	51
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	54
9. REFERENCIAS	58
10. APÉNDICE	64

FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la cumarina (Leung, 2005)	04
Figura 2. Estructura química de las α - y γ -pironas (Lacy, 2004)	04
Figura 3. Tipos de Cumarinas (Clasificación, características y ejemplos) (Lacy, 2004)	04
Figura 4. Metabolismo de la cumarina (Lacy, 2004).	05
Figura 5. Formación de 7-hidroxycumarina como porcentaje del metabolismo total de cumarina (Lake, 1999).	06
Figura 6. Esquema de la estructura tridimensional de la IL-3 de ratón (Yao, 2010).	11
Figura 7. Sitios probables de N-glucosilación en la secuencia de aa de IL-3 en el ratón.	11
Figura 8. Ubicación del gen de IL-3 en el cromosoma 11 en el ratón.	12
Figura 9. Esquema de la estructura del gen y mRNA no maduro.	12
Figura 10. Esquema de obtención y cuantificación celular.	19
Figura 11. Esquema de extracción de RNA Total.	20
Figura 12. Esquema de perfil de absorbancia para la cuantificación de ácidos nucleicos.	21
Figura 13. Cámara de electroforesis horizontal,	22
Figura 14. Geles de identidad de RNA y gDNA no degradados.	22

	Página
Figura 15. Esquema que muestra la preparación de las diluciones seriales de los fármacos utilizados	25
Figura 16. Esquema de exposición a los fármacos.	26
Figura 17. Esquema que muestra el diseño de experimento para determinar la viabilidad celular por MTT.	27
Figura 18. Esquema que muestra el diseño de experimento para determinar la citotoxicidad celular por LDH.	28
Figura 19. Espectro de absorbancia para la lectura espectrofotométrica de sal de formazán y reacción enzimática de LDH para la conversión de piruvato a lactato.	29
Figura 20. Fotografías de geles de agarosa al 2 % de electroforesis a partir de RNA Total extraído de diferente número de células de las líneas P-815 o B-16.	30
Figura 21. Fotografía de un gel de agarosa al 2 % de electroforesis a partir de RNA Total extraído de diferente número de esplenocitos de ratón.	30
Figura 22. Fotografía de electroforesis de muestra de gDNA y su cuantificación. El gel de la derecha corresponde a los productos de amplificación obtenidos al usar oligos IL3-2A y 5+3 en reacción de PCR a 55 °C.	31
Figura 23. Gel con productos de amplificación de reacciones de PCR con un Kit PCR y otro RT-PCR a 54, 55 y 56 °C con los oligos IL3-2A y 5+3.	34
Figura 24. Productos de amplificación obtenidos al utilizar las parejas de primers IL3-2A y GAPDH de ratón.	34
Figura 25. Productos de amplificación obtenidos con primers IL3-2A y Tm de 54 °C con 3 cantidades de templado.	36
Figura 26. Productos de amplificación obtenidos con Primers IL3-2A y Tm de 55 °C templado RNA = 4 µg y 2 µg de gDNA, se cargaron 5 µL del producto / pozo	36

	Página
Figura 27. Productos de amplificación obtenidos con Primers IL3-2A y Tm de 57 °C, 5 µL del producto / pozo.	37
Figura 28. Productos de amplificación obtenidos con primers IL3-2A y Tm de 58 °C, 5 µL del producto / pozo.	38
Figura 29. Productos de amplificación obtenidos con primers IL3-2A y Tm de 56 °C, 5 µL del producto / pozo.	38
Figura 30. Curva de cantidad de templado de RNA total para las reacciones de RT-PCR (2, 3 y 4 µg), oligos IL3-2A con muestras de células B-16 y Esplenocitos.	38
Figura 31. Productos de amplificación obtenidos por RT-PCR con templados de RNA Total de células P-815 y Macrófagos, Tm= 56 °C (Control positivo: Línea P-815 y control negativo: Macrófagos).	38
Figura 32. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxicumarina al tiempo 0 de incubación.	39
Figura 33. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxicumarina al tiempo 3 Y 6 h de incubación.	40
Figura 34. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxicumarina al tiempo 6 Y 12 h de incubación.	41
Figura 35. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxicumarina al tiempo 12 y 24 h de incubación.	41
Figura 36. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxicumarina al tiempo 24 h de incubación y controles de Con A + PMA a las 3, 6, 12 y 24 horas.	42
Figura 37. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de 7-hidroxicumarina al tiempo 24	42

	Página
<p>Figura 38. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina y Con A + PMA al tiempo cero y 3 horas y realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).</p>	43
<p>Figura 39. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina y Con A + PMA al tiempo 6 horas y realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).</p>	44
<p>Figura 40. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina y Con A + PMA al tiempo 12 horas; realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).</p>	44
<p>Figura 41. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina y Con A + PMA al tiempo 24 horas; realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).</p>	45
<p>Figura 42. Gráfico que muestra la cuantificación densitométrica realizada a partir de los productos de amplificación (RT-PCR) para cada concentración (18 µg/mL, 37 µg/mL, 75 µg/mL y 150 µg/mL) de Cumarina y sus respectivos controles Etanol al 3 % y Con A (15 µg/mL) + PMA (50 ng/mL).</p>	46

Figura 43. Gráfico que muestra la cuantificación densitométrica realizada a partir de los productos de amplificación (RT-PCR) para cada concentración (18 µg/mL, 37 µg/mL, 75 µg/mL y 150 µg/mL) de 7-hidroxicumarina y sus respectivos controles Etanol al 3 % y Con A (15 µg/mL) + PMA (50 ng/mL).	47
Figura 44. RNA Ensayo de viabilidad celular (MTT) de esplenocitos expuestos a cumarina.	48
Figura 45. RNA Ensayo de viabilidad celular (MTT) de esplenocitos expuestos a 7-hidroxicumarina.	49
Figura 46. RNA Ensayo de viabilidad celular (MTT) de esplenocitos expuestos a cumarina y 7-hidroxicumarina.	49
Figura 47. Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a cumarina.	50
Figura 48. RNA Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a 7-hidroxicumarina.	51
Figura 49. Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a cumarina o 7-hidroxicumarina.	52
Figura 50. RNA Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a cumarina o 7-hidroxicumarina.	52
Figura 51. RNA Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a cumarina y/ o 7-hidroxicumarina.	53

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
GAPDH	Glucosa 3-fosfato deshidrogenasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
gDNA	DNA genómico
cDNA	DNA complementario
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
g	Gramos
h	Horas
IL	Interleucina
IL-3	Interleucina-3
TNF	Factor de necrosis tumoral
t½	Tiempo de vida media
min	Minutos
mL	Militros
mM	Milimolar
TF	Factor de transcripción
nt	Nucleótidos
bp	Pares de bases
PBS	Amortiguador de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pmol	Picomol
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
xg	Constante de gravedad
50X	50 veces la concentración
1X	Una vez la concentración
aa	Aminoácidos
RNApol	RNA polimerasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
kDa	Kilo Daltones
Da	Daltones

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
s	Segundos
TAFs	Factores asociados a cada TATA
V	Voltios
A	Amperes
W	Watts
P-815	Línea celular de mastocitoma murino
B-16	Línea celular de melanoma murino
AP-1	Factor de transcripción
NFT-IL3	Factor de transcripción nuclear de IL-3
NFkB	Factor de transcripción nuclear
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol miristato acetato
Con A	Concanavalina A
NK	Células asesinas naturales
PKC	Proteín cinasa C
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LPS	Lipopolisacárido
NFAT	Factor nuclear de transcripción de células T.
Kd	Constante de afinidad
IP3	Inositol trifosfato
DAG	Diacilglicerol
IL-6	Interleucina-6
TNF-alpha	Factor de necrosis tumoral apha
G-CSF	Factor estimulador de colonias granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago
aa	aminoácidos
CFU-S	Factor estimulador de colonias
Multi-CSF	Actividad de estimulador de multi-colonias
MTT	Ensayo de viabilidad celular mediante reducción de sales de formazán
LDH	Ensayos de citotoxicidad mediante estimación de Deshidrogenasa láctica.

SFB	Suero Fetal Bovino
RPMI	Royal Perk Memorial Institut
DMEM	Medio Esencial mínimo modificado por Dubelcos
DEPC	Dietil pirocarbonato
ϵ_{260}	Coefficiente de extinción molar (RNA o gDNA)
T _m	Temperatura de alineamiento
DMSO	Dimetil Sulfóxido
mcg	Microgramo
Cum	Cumarina
7 OH	7-hidroxycumarina

RESUMEN

La interleucina-3 (IL-3) es un factor estimulador de colonias (multi-CFS, HCGF, CFU-SA), juega un papel esencial en el sostenimiento y sobre vivencia de células previniéndolas de la apoptosis. Su síntesis está restringida a pocas estirpes celulares: linfocitos T y células cebadas. El efecto biológico de la Interleucina-3 sobre la hematopoyesis dirige su uso clínico, para sostén y aceleración de la hematopoyesis en desórdenes mieloides y después de altas dosis de quimioterapia. La IL-3 de ratón existe como copia única, el gen (cromosoma 11) es de 3 Kb y su mRNA es de 0.9 Kb. Las cumarinas son benzopironas de origen natural, se ha reportado que *in vitro* en células inmunes murinas (linfocitos, células NK y macrófagos) tienen acción inmuno-estimulante. En estudios previos en células esplénicas de ratón, se ha reportado que algunos productos de hidroxilación de la cumarina tienen actividad inmuno-estimulante, mediante cuantificación de la secreción de Interleucina-3 por métodos inmunoenzimáticos. La primera parte del estudio tiene el propósito de establecer las condiciones de los ensayos para investigar si la cumarina o de la 7-hidroxycumarina inducen la expresión del mRNA de IL-3 en esplenocitos de bazo de ratón por estimulación a nivel transcripcional, mediante ensayos de transcripción *in vitro*. Se realizó el diseño de dos pares de primers (sentido y antisentido) de 20 bases. Se estudiaron diferentes condiciones para las reacciones de RT-PCR, encontrándose las condiciones idóneas para la amplificación de las muestras ($T_m = 56\text{ }^\circ\text{C}$, 4 μg de RNA templado y 35 ciclos). Encontramos que solamente una de las parejas de primers diseñados para la amplificación fue la adecuada (IL3-1 e IL3-2A), también se diseñaron los primers para la detección de GAPDH de ratón. Se realizaron los ensayos de transcripción *in vitro* de 4 concentraciones (18, 37, 75 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cumarina y 7-hidroxycumarina a 5 diferentes tiempos (0, 3, 6, 12 y 24 horas). Se obtuvo el RNA total para cada tratamiento y se cuantificó. Se realizaron reacciones de RT-PCR para detectar si existía inducción de mRNA de IL-3. Como resultados obtuvimos que a ningún tiempo ni a ninguna concentración se logró detectar el mRNA de IL-3 por lo que probablemente las cumarinas no tienen un efecto inductor de éste mensajero, se utilizó como control para los ensayos de transcripción *in vitro* a GAPDH que es un gen constitutivo. Se logró detectar IL-3 en células estimuladas con Con A + PMA y en la línea celular P-815.

ABSTRACT

Interleukin-3 (IL-3) is a colony-stimulating factor (multi-CFS, HCGF, CFU-SA), plays an essential role in sustaining and survival of cells avoid apoptosis. His synthesis is restricted to few cell lines: T lymphocytes and mast cell. The biological effect of interleukin-3 on the hematopoiesis directs its clinical use, sustaining and accelerating hematopoiesis in myeloid disorders and after high-dose chemotherapy.

The development of agonists of IL-3 with specific effects on hematopoiesis and low activity on mature leukocytes is currently in progress. The IL-3 mouse exists as only copy, the gene (chromosome 11) is 3 Kb and its mRNA is 0.9 kb.

The coumarins are benzopironas of natural origin, it has been reported that in vitro immune cells from murine (lymphocytes, NK cells and macrophages) have action immuno-stimulant. In previous studies in splenocytes cell mouse, it has been reported that some products of hydroxylation of coumarin have activity immuno-stimulant, through quantification of the secretion of Interleukin-3 by enzyme immunoassay methods.

The first part of the study intends to establish the conditions of the tests to investigate if the coumarin or 7-hydroxycoumarin have an inductor effect on the mRNA expression of IL-3 in splenocytes of mouse by stimulation at the transcriptional level, through tests in vitro transcription. The design of two pairs of primers (sense and antisense) of 20 databases.

We studied different conditions for the reactions of RT-PCR, while the conditions for the amplification of samples ($T_m = 56\text{ }^\circ\text{C}$, 4 μg RNA temperate and 35 cycles). We found that only one of the couples of primers designed for the amplification was adequate, were also designed primers for the detection of GAPDH mouse. The trials were conducted transcription in vitro for 4 concentrations concentrations (18, 37, 75 and 150 $\mu\text{g/ml}$) of coumarin and 7-hidroxicumarina 5 different times (0, 3, 6, 12 and 24 hours). It was obtained the total RNA for each treatment and was quantified Coumarin and 7-hidroxicumarina by 5 different times (0, 3, 6, 12 and 24 hours). It was obtained the total RNA for each treatment and was quantified. Reactions were carried out RT-PCR to detect if there was induction of mRNA for IL-3.

As a result we got that no time nor to any concentration we failed to detect the mRNA for IL-3 by what is probably the coumarins do not have an inducing effect of this messenger, was used com control for testing in vitro transcription to GAPDH which is a gene establishing. It was possible to detect IL-3 in cells stimulated with Con A + PMA and the P-815 cell line.

INTRODUCCIÓN

2.1 CUMARINAS

Las cumarinas son benzopironas (1,2 – benzopironas), su estructura consta de un anillo aromático fusionado a un anillo de pirona. Es un cristal blanco sólido (peso molecular: 146.15 g/mol) soluble en etanol, cloroformo, di etil éter, aceites y es ligeramente soluble en agua (Leung, 2005, Zänker, 1984, Lake, 1999). Estos compuestos pueden sub dividirse a su vez en α -pironas (cumarinas) y en γ -benzopironas (flavonoides).

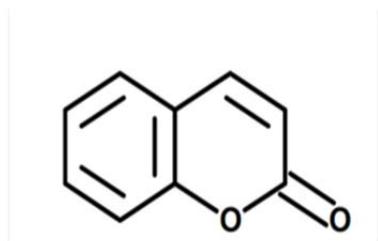


Figura 1. Estructura química de la cumarina (Leung, 2005)

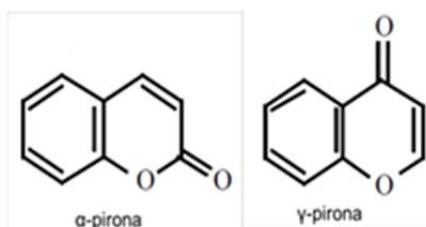


Figura 2. Estructura química de las α - pironas y γ -pironas (Lacy, 2004)

El término cumarina se debe al nombre de Coumarou, ya que se aisló por primera vez en 1820 a partir del haba del tonka de la Guyana (*Coumarouna odorata*) por Vogel (Murray, 1982) y en 1868 Perkin la obtuvo por síntesis química (Lake, 1999).

Existen 4 subtipos principales de Cumarinas (Zänker, 1984).

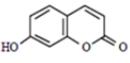
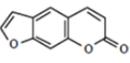
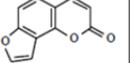
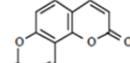
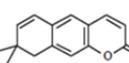
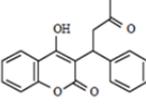
Clasificación	Características	Ejemplos
Cumarinas simples	Hidroxiladas, alcohexiladas o alquiladas en anillo de benceno	 7-Hidroxicumarina
Furanocumarinas	Furano (5 miembros) unido a anillo de benceno (lineal o angular)	 Psoraleno  Angelicina
Pirano cumarinas	Pirano (6 miembros) unido a anillo de benceno (lineal o angular)	 Seselina  Xantilecina
Cumarinas sustituidas en pirona	Sustituidos en anillo de pirona (posiciones 3 y 4)	 Warfarina

Figura 3. Tipos de Cumarinas (clasificación, características y ejemplos) (Lacy, 2004)

Al menos 1300 cumarinas han sido identificadas como metabolitos secundarios en plantas verdes, vegetales, té verde, semillas (café, nuez) y frutas (arándanos) consumidas por humanos y animales. También se encuentran en hongos y bacterias (novobiocina y la cumericina de *Streptomyces*); y en altos niveles en aceites (canela, casia y lavanda) y vinos (Zänker, 1984). El compuesto prototipo es la cumarina y presenta propiedades aromáticas características (Hoult, 1996).

La cumarina es rápidamente absorbida por el tracto gastro intestinal y es extensivamente metabolizada en el hígado por enzimas del citocromo P450 (CYP 2A6) y resulta en la hidroxilación a la forma 7 hidroxycumarina en humanos y 3-hidroxycumarina en ratones (Lake, 1999). La cumarina experimenta una segunda fase de biotransformación al conjugarse con glucurónido para ser excretada por la orina (Pelkonen, 1997).

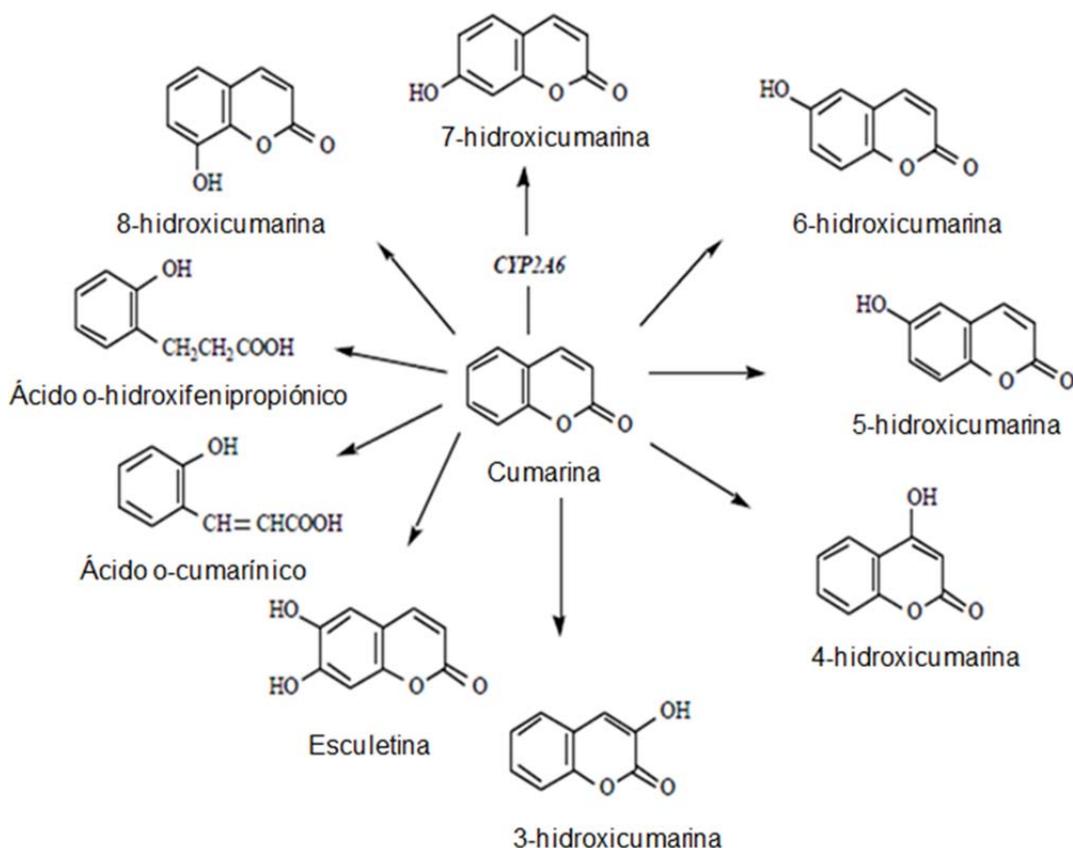


Figura 4. Metabolismo de la cumarina (Lacy, 2004)

La actividad de la 7-hidroxilasa es excepcionalmente alta en microsomas humanos y la actividad de la 3-hidroxilasa es muy alta en los microsomas de roedores pero está ausente en humanos (Lake, 1999).

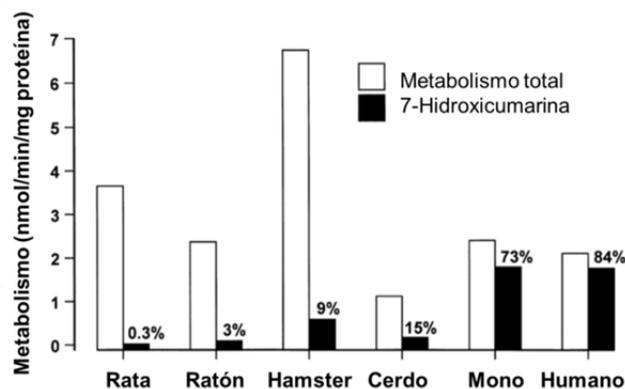


Figura 5. Formación de 7-hidroxicumarina como porcentaje del metabolismo total de cumarina

Resultados de estudios de carcinogenicidad, mutagenicidad y potencial genotóxico sugieren que la cumarina no es un agente genotóxico, ya que no induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en células germinales de machos de *D. melanogaster* expuestos a cumarina, no induce micronúcleos en células de sangre periférica de ratones hembras ni machos (Lake, 1999) y proporciona resultados negativos para mutagenicidad en la prueba de Ames (Finn, 2002).

No se reportan efectos adversos a la cumarina en respuesta a una dosis 100 veces mayor que la expuesta por la dieta (0.02 mg/Kg/día) (Lake, 1999).

2.1.2 APLICACIONES Y USOS DE LAS CUMARINAS

Las aplicaciones no terapéuticas de la cumarina son como fijador y agente potenciador en perfumes; es adicionada a jabones de baño y detergentes, pastas de dientes, cosméticos, productos del tabaco y algunos brebajes alcohólicos. Así como saborizante, dulcificante, aditivo y aromatizante en algunos alimentos y también se usan grandes cantidades en la producción de materiales plásticos, pinturas y aerosoles para neutralizar aromas.

Las actividades biológicas y farmacológicas de la cumarina y de sus derivados están relacionados con el núcleo cumarínico, entre estas actividades se han observado: acción anti-bacterial, anti-trombótica, anti-mutagénica, anti-edema, anti-inflamatoria, anti-tumoral, la inhibición de la lipo-oxigenasa y ciclo-oxigenasa. Evitar o recoger especies reactivas de oxígeno y efectos anti-tumorigénicos (Finn, 2002; Leung, 2005).

La cumarina se ha utilizado en la clínica para el tratamiento de edemas (Stuhlmeier, 1991). También se ha utilizado en modelos animales como agente protector contra carcinógenos, agentes químicos y en humanos se han hecho estudios en cáncer de próstata (Mohler, 1994) y melanoma (Thornes, 1994).

2.1.3 EVIDENCIA DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LA CUMARINA

En la actualidad, los valores medicinales de los fitoquímicos han despertado mucho interés, especialmente como inmunomoduladores o agentes usados para el tratamiento del cáncer (Leung, 2005).

En 1979, Köh reportó la existencia del efecto estimulante de la cumarina, al observar un incremento en la producción de fosfatasa alcalina intracelular y la secretada en animales *in vivo*. También observó la reducción de lesiones primarias inducidas por adyuvantes inductores de artritis y que estos efectos fueron similares a los producidos por el

inmunomodulador Levamisol. Junto con este reporte existen otros que señalan el incremento en la migración de macrófagos y la activación de células inmunes por la cumarina (Köh, 1979).

También se estudió el efecto sobre linfocitos tratados con fitohemaglutinina (PHA) más cumarina y se observó un incremento del 50 – 61 % en la formación de rosetas comparada con las células tratadas únicamente con PHA (Berkarda, 1983).

En células mononucleares expuestas a cumarinas *in vitro* provenientes de pacientes con cáncer, se observó un incremento del 20 - 25 % en la citotoxicidad comparado con el control (Berkarda, 1983) y en pacientes tratados con cumarinas por 8 días, se incrementó en 94 % la transformación de sus linfocitos.

En tratamientos con 7-hidroxycumarina en concentraciones de 2 y 20 $\mu\text{g/mL}$ se generó un incremento en la fagocitosis de 124 y 84 % tanto en granulocitos de sangre periférica como en macrófagos peritoneales murinos, respectivamente (Roskopf, 1992).

Cumarinas como la escopoletina poseen un efecto dual sobre linfocitos, al inducir apoptosis o proliferación de células T normales. Se observó que 10 $\mu\text{g/mL}$ escopoletina incrementan la proliferación celular y se ha relacionado con la participación de la vía proteína cinasa C (PCK) en la acción proliferativa en linfocitos normales en presencia y ausencia de estaraurosporina (inhibidor no selectivo de la vía PKC) y GF 109203 un inhibidor selectivo de PKC (0.1 μM) (Manuele, 2006).

Por su parte Leung también estudió el efecto inmunomodulador de la esculetina (6,7-dihidroxycumarina) *in vivo* tras observar un incremento en la migración de macrófagos peritoneales de manera dosis dependiente, además de incrementar la producción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) e incrementar la mitogénesis de linfocitos esplénicos, por lo que parece que la esculetina posee efectos inmunomoduladores sobre macrófagos y linfocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Leung, 2005).

2.1.4 CUMARINA EN LA INDUCCIÓN DE INTERLEUCINAS

La cumarina y sus derivados 7-hidroxycumarina y 4-hidroxycumarina fueron capaces de potenciar la producción de IL-1 β en células mononucleares humanas estimuladas por lipopolisacárido (LPS) de manera dosis dependiente. También hay sinergismo de la cumarina y LPS en la inducción de IL-6 y TNF- α , en un pequeño porcentaje de células mononucleares de donadores sanos (Stuhlmeier, 1991). Tanto la cumarina como la 7-hidroxycumarina *in vitro* claramente muestran un efecto dosis dependiente en la producción de IL-1 β por células mononucleares en concentraciones de 1 -300 μ g/mL (Stuhlmeier, 1991).

2.2 CITOCINAS

Las citocinas son polipéptidos simples o glicoproteínas con un peso molecular menor o igual a 30 KDa. Su producción constitutiva es usualmente baja o ausente; y ésta es regulada por varios estímulos inductores a nivel transcripcional o traduccional (Londei, 1990). El radio de acción es usualmente corto y se produce tras la unión a su receptor específico de superficie celular.

Las citocinas incrementan o disminuyen la tasa de proliferación, modifican el estado de diferenciación, son capaces de estimular o inhibir la producción de otras citocinas y/o producen cambios en la expresión de algunas funciones celulares. Son producidas por células menos especializadas y varios tipos celulares no relacionados pueden producir la misma citocina (V.gr. IL-1 es producida por monocitos/macrófagos, células mesangiales, células NK, células B, células T, etc). Sin embargo, hay excepciones (V.gr. IL-2, IL-3, IL-4 e INF-gamma son producidas únicamente por células linfoides, especialmente por células T).

Dentro del grupo de las citocinas se encuentran: interleucinas, interferones, factores estimuladores hematopoyéticos (colonias), factores de necrosis tumoral y diversos polipéptidos como factores de crecimiento celular y quimiocinas (Gilliland, 1990).

2.2.1 INDUCCIÓN Y APLICACIÓN DE CITOCINAS

Una amplia variedad de sustancias (V.gr. químicas), organismos y actividades son capaces de interactuar con componentes específicos de la superficie de membrana celular o citoplasma para desencadenar la expresión de genes.

Las vías de señalización intracelular están involucradas en la amplificación de la señal por fosforilación y desfosforilación de varios sustratos citoplasmáticos, por enzimas regulatorias particulares (V.gr. proteínas cinasas y fosfatasa), que culminan en la activación y translocación de factores de transcripción específicos al núcleo. Estos factores de transcripción se unen a elementos regulatorios en el extremo 5' río arriba de los genes de citocinas dentro del DNA para activar la transcripción de mRNAs de citocinas. Los mRNAs dejan el núcleo y son traducidos por los ribosomas en el retículo endoplásmico.

Varias citocinas representan opciones terapéuticas que en la actualidad se estudian por sus beneficios potenciales en desórdenes de inmunidad, en infecciones y en malignidad.

En estudios clínicos fase 1 y fase 2 realizados con G-CSF y GM-CSF por sus efectos proliferativos y de diferenciación se encontraron condiciones de uso óptimo de la dosis y de las vías de administración.

Las citocinas proveen una red importante de comunicación en el sistema inmune por lo que en varios estudios clínicos se han reconocido varios blancos de aplicación clínica como en el crecimiento de células malignas, su utilización contra agentes infecciosos y para la regeneración de tejidos y células.

La administración local de las citocinas puede proveer un mecanismo para maximizar el efecto local mientras la toxicidad sistémica es limitada. La modulación de la producción de citocinas in vivo podría obviar la necesidad por su administración sistémica (Peschel, 1993).

2.4 INTERLEUCINA-3

La interleucina-3 es una glicoproteína de 166 aminoácidos (aa) con un peso de 23 – 30 kDa dependiendo del grado de glucosilación. Los primeros 26 aa corresponden a la péptido señal, que se escinde y genera un proteína madura de 140 aa (Murphy, 2010).

La Interleucina-3 pertenece a la familia de citocinas hematopoyéticas con estructura de 4 de hélices α (Brüht, 2009). Tiene 4 sitios posibles para N-glicosilación (Asn-X-Ser) en las posiciones 42-44, 70-72, 77-79 y 112-114. Esta Interleucina es altamente glucosilada, aunque esta glucosilación no es esencial para su actividad biológica (Ozu, 1992; Shruti, 2010; Mayo, 1995).

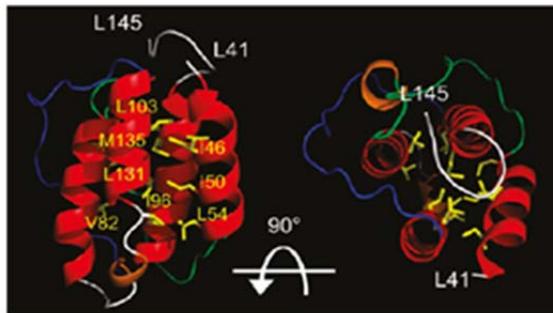


Figura 6. Esquema de la estructura tridimensional de la IL-3 de ratón. (4 hélices α , unidas por loops)

Pertenece a un grupo de proteínas solubles reguladoras del crecimiento celular, su producción es transitoria y su tiempo de vida media es breve (10 minutos a varias horas) (Ozu, 1992; Ziltener, 1993).

```

1: K03233.Reports Mouse interleukin...[gi:198338]
LOCUS      MUSIL3B                3140 bp    DNA    linear    ROD 27-APR-1993
DEFINITION Mouse interleukin 3 gene, complete cds.
           /translation="MVLASSTTSIHTMLLLLIMLFLHGLQASISGRDTHRLTRTLNCS
           SIVKEIIGKLPPEPKTDDEGPSLRNRSFRRVNLKRFVESQGEVDPEDRYVIKSNLQK
           LNCCLPTSANDSALPGVFIRDLDLDFRKKLRFYMVHLNDLETVLTSTRPPQPASGSVSPN
           RGTVEC"

```

Figura 7. Sitios probables de glucosilación en secuencia de aa de IL-3 de ratón

La IL-3 de ratón existe como copia única en el cromosoma 11 dentro de un cluster de genes de citocinas (IL-4, -5, -13 y GM-CSF) (Hawwari, 2002), el tamaño del gen es de 3 Kb y contiene 5 exones interrumpidos por 4 intrones. El mRNA es de 0.9 Kb con 6 motivos AUUUA (Clark, 1987; Mayo, 1995).

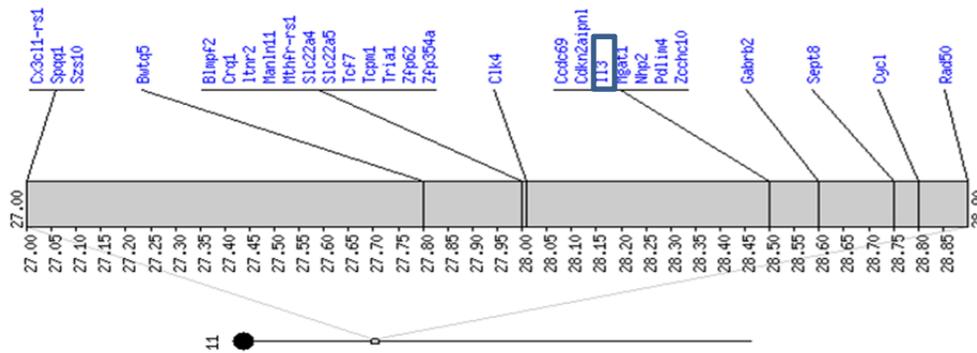


Figura 8. Ubicación del gen de IL-3 en el cromosoma 11 en el ratón

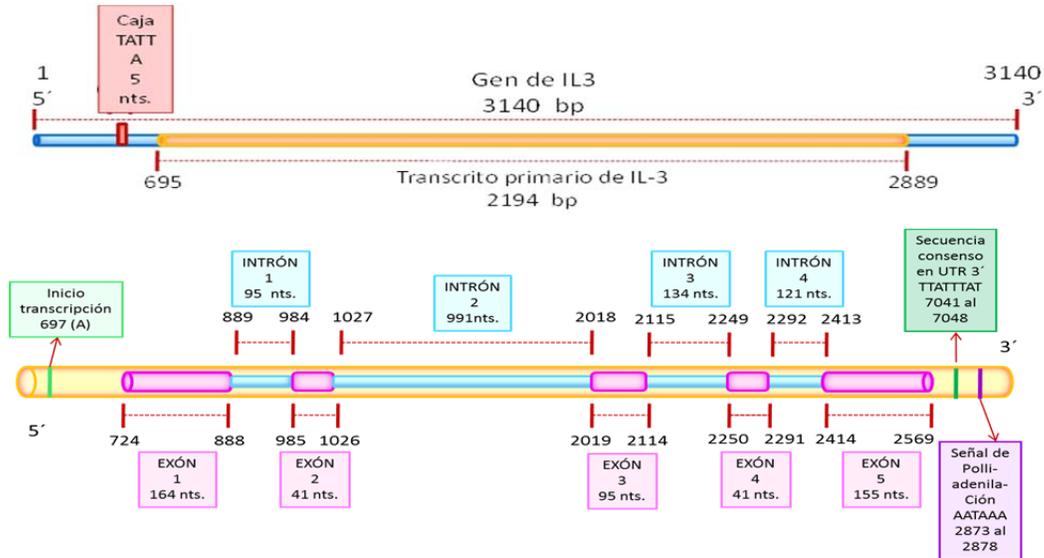


Figura 9. Esquema de la estructura del gen y mRNA de IL-3

2.4.1 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE IL-3

La Interleucina-3 es una de las citocinas producidas transitoriamente en respuesta a un estímulo específico por células T activadas, su mRNA es expresado tanto por células CD4 como CD8 y tiene un mecanismo de control para una rápida modulación de sus niveles (Van Straaten, 1994). IL-3 tiene actividades importantes en la regulación de células linfoides y mieloides en procesos inmunes e inflamatorios (Ozu, 1992). Entre sus funciones están el sostenimiento de la proliferación de precursores mieloides y es esencial para la sobrevivencia de las células previniendo la apoptosis.

Las actividades biológicas de IL-3 se dan en etapas tempranas de maduración celular y están involucradas en la hematopoyesis inducible. Es capaz de estimular *in vitro* la proliferación y diferenciación de neutrófilos, eosinófilos y monocitos; también estimula células maduras (neutrófilos) (Ozu, 1992). Ésta proteína es un mediador crítico de la inflamación y de la respuesta inmune a infecciones. En la actualidad se sabe que además de las células T, las células cebadas son capaces de producir IL-3 (Murphy, 2010).

2.4.2 APLICACIONES CLÍNICAS DE IL-3

Las complicaciones severas de morbilidad y mortalidad de pacientes que reciben altas dosis de quimioterapias son elevadas, ya que muchos agentes quimioterapéuticos dañan linfocitos y suprimen la inmunidad mediada por células. Varias citocinas han sido usadas para reducir esta morbilidad y mortalidad (Mangi, 1999). La regeneración de linfocitos T después de la quimioterapia ocurre desde la médula ósea, éste proceso es lento y la recuperación completa es obligada por el daño quimioterapéutico del epitelio tímico.

La IL-3 humana recombinante utilizada en ensayos clínicos *in vivo* mostró la reducción del déficit celular producido por quimioterapias e indujo una regeneración más rápida de

granulocitos y plaquetas (Mangi, 1999). La mayoría de los estudios sugieren que la administración de IL-3 seguida de altas dosis de quimioterapias resulta en una rápida regeneración de neutrófilos y plaquetas; y que la combinación de IL-3 y GM-CSF potencia la regeneración de células mononucleares incluso más que IL-3 sola.

La terapia con IL-3 en los estados de remisión, disminuye el riesgo de infecciones y mejora la calidad de vida en pacientes con cáncer (Mangi, 1999).

2.5 INTERLEUCINA – 3 Y CUMARINA

Tratamientos con 7-hidroxycumarina *in vitro* en esplenocitos de ratón mostraron un incremento en la secreción de Interleucina-3 de 554 % y 461 % con las concentraciones de 18 y 75 µg/mL de 554 % y 461 % en presencia de LPS ($p < 0.05$), estimado mediante ELISA Indirecto (Ramírez, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se ha demostrado que varias citocinas representan opciones terapéuticas al tener blancos de aplicación clínica, como es el caso de la Interleucina-3 en trastornos hematopoyéticos. También se sabe que las cumarinas tienen actividades inmuno-moduladoras, entre ellas la inducción de Interleucina-1 β , sin embargo aún no se ha explorado la posibilidad de la inducción de Interleucina-3 por las cumarinas, lo que significaría explorar un nuevo uso de las cumarinas como sustituto de administración de IL-3 para apoyar y acelerar la hematopoyesis en trastornos mieloides.

4. OBJETIVOS

- Estudiar si la cumarina y la 7-hidroxycumarina tienen efecto inductor en la expresión del mRNA de IL-3 en esplenocitos de ratón mediante ensayos de transcripción *in vitro*.
- Estudiar si el efecto es dependiente de la concentración de las cumarinas.
- Estudiar el curso temporal del efecto.
- Estudiar la viabilidad de las células expuestas a las cumarinas mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) y de citotoxicidad (LDH).

5. HIPÓTESIS

La cumarina y su principal producto de biotransformación en humanos (7-Hidroxycumarina), tienen acciones estimulantes *in vitro* en esplenocitos de ratón, sobre la transcripción del mRNA de la Interleucina-3 y este efecto es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a estos fármacos.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 MATERIAL Y REACTIVOS

Equipos

- Espectrofotómetro
Amersham Biosciences
- Cámara para electroforesis
Hoefer MiniVE
- Fuente de poder: EPS 100,
Amersham Pharmacia
Biotech
- Campana de flujo laminar
clase II A/AB3, Nuaire

Biological Safety Cabinets
UN-426-300 Serie 24
- Biofuga Heraus Sorvall
- Balanza analítica Adventure
Ohaus 1899012
- Estuche de disección
- Charolas para linfocitos
- Cajas petri (NUNC)
- Jeringas para insulina (BD)
- Tubos para 15 y 50 mL
(NUNC)
- Equipo para fotografía de
geles
- Cámara de Neubauer
(SIGMA)
- Placas de cultivo 6 y 96 pozo
(NUNC)

Reactivos

- Medio de cultivo RPMI 1600
al 10 % SFB
- Medio de cultivo RPMI 1600
sin SFB
- Ficoll-Histopaque (SIGMA)
- Azul de Tripán (SIGMA)
- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo (SIGMA)
- Isopropanol (SIGMA)
- Etanol 96 °
- Agua DEPC 0.1 %
(Invitrogen)
- Buffer TAE 1X (pH 8.0)
- Buffer carga 2X
- Kit SS One Step RT-PCR
with Platinum Taq polimerasa
(Invitrogen)
- Cumarina y 7 hidroxycumarina
con 99 % de pureza (Sigma-
Aldrich)
- Etanol absoluto (Merck).

6.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Línea celular P-815 (Mastocitoma murino)
- Línea celular B-16 (Melanoma murino)
- Macrófagos peritoneales de ratones no inducidos
- Esplenocitos de bazo de ratones Balb/c machos de 12 semanas de edad y 20 – 30 g de peso

6.2 METODOLOGÍA

6.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS

6.3.1 OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES

El ratón se sacrifica por dislocación cervical, se coloca en un área aséptica y se inyectan 10 mL de PBS 1X estéril en el peritoneo. Se realiza un lavado de 3 min y se aspira el líquido peritoneal, éste se coloca en un tubo cónico (NUNC) de 15 mL y se centrifuga a 420 xG por 5 minutos. Se lisan los eritrocitos con 5 mL NH_4Cl 144 mM y se incuban 5 min. Se centrifuga nuevamente, se resuspenden las células en 10 mL de medio RPMI-SFB al 10 % y se incuban durante 2 horas para separar los linfocitos (en suspensión) de los macrófagos adheridos a la placa mediante lavados con PBX 1X frío. Se recuperan los macrófagos por centrifugación para finalmente contar el número de células mediante azul de Trypan 0.2 % en un hemocitómetro.

6.3.2 OBTENCIÓN DE ESPLENOCITOS

Se sacrifica un ratón por dislocación cervical, se extrae el bazo en un área aséptica. El órgano se disgrega y perfunde con 15 mL de medio DMEM sin suero. La suspensión celular se centrifuga a 420 xG por 5 minutos. Se lisan los eritrocitos con 5 mL de NH_4Cl 144 mM incubando 5 minutos, este proceso se repite hasta que el botón celular se observe blanco. Finalmente se determina la viabilidad celular y se cuantifican las células con azul de Tripán en hemocitómetro.

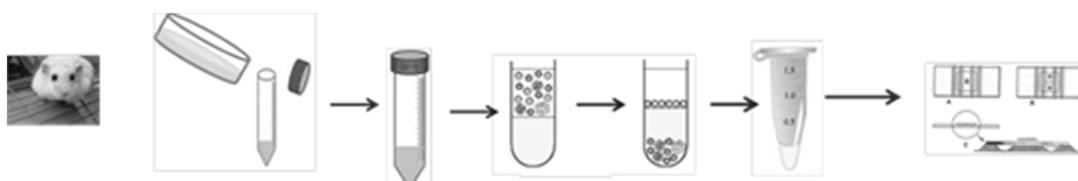


Figura 10. Esquema de obtención y cuantificación celular.

6.4 CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares P-815, B-16, los esplenocitos y macrófagos se mantuvieron en medio RPMI-160 suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFB) (Hyclone) y antibióticos 100 U/mL (penicilina-estreptomicina, Sigma) y 2 mM L-glutamina. Se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO_2 .

6.5 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

A partir de 2×10^6 células de las líneas celulares y 5×10^6 esplenocitos o macrófagos se realizó la extracción de RNA total. El botón celular se resuspendió en 200 μL de medio RPMI-SFB y se adicionó 1 mL de Trizol (Invitrogen), se homogenizó con repetidos pipeteos y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 μL de cloroformo y se homogenizó por agitación manual durante 15 segundos, se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min para la separación en fases para transferir la fase acuosa a un tubo nuevo estéril, a ésta fase se le adicionan 500 μL de isopropanol para precipitar el RNA y se deja incubar 10 min a 4 °C.

Tras la precipitación se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 min para formar el pellet de RNA, el cual se lava con etanol al 70% (en agua tratada con DEPC). Se decanta el sobrenadante y el pellet se seca a temperatura ambiente por 10 min. El RNA se resuspende en 20 μ L de agua tratada con DEPC (Dietil pirocarbonato). Las muestras se guardan a -70°C .



6.6 EXTRACCIÓN DNA GENÓMICO

La extracción de gDNA (DNA genómico) se realizó a partir de 1×10^6 células, las cuales se centrifugan a 3,000 rpm durante 5 minutos. Se retira todo el sobrenadante, se adicionan 500 μ L de amortiguador de lisis (200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) y 3 μ L de RNasa A (10 mg/mL) (Sigma). Se incuban a 37°C por 1 hora, posteriormente se adicionan 4 μ L de Proteinasa K (25 mg/mL) (Sigma), se incuban a 50°C por 2 horas y 1 hora a 60°C para inactivar las enzimas. Se adicionan 200 μ L de NaCl 5 M y se agita suavemente durante 15 segundos, se centrifuga a 3,000 rpm por 5 min. Se recupera el sobrenadante para adicionar 1 volumen de isopropanol para precipitar el gDNA, se centrifuga nuevamente y la pastilla se lava en dos ocasiones con etanol al 70%, se deja secar la pastilla durante 10 minutos y se resuspende en 50 μ L de agua tratada con DEPC. Las muestras se guardan a -70°C .

6.7 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Para la cuantificación de las muestras se realizaron diluciones 1: 300 en agua tratada con DEPC tanto para RNA total como para gDNA. Se realizaron lecturas espectrofotométricas a 260, 280 y 320 nm obteniéndose la concentración de las muestras en $\mu\text{g/mL}$ y las relaciones 260/280 para conocer el grado de contaminación con proteínas cuando la relación es menor a 1.8.

$$A_{260} = \epsilon_{260} [\mu\text{g/mL}]; [\mu\text{g/mL}] = A_{260} / \epsilon_{260}$$

Para gDNA cuando la $A_{260} = 1$ y $\epsilon_{260} = 0.02$;

50 $\mu\text{g/mL}$

Para RNA cuando la $A_{260} = 1$ y $\epsilon_{260} = 0.025$;

40 $\mu\text{g/mL}$

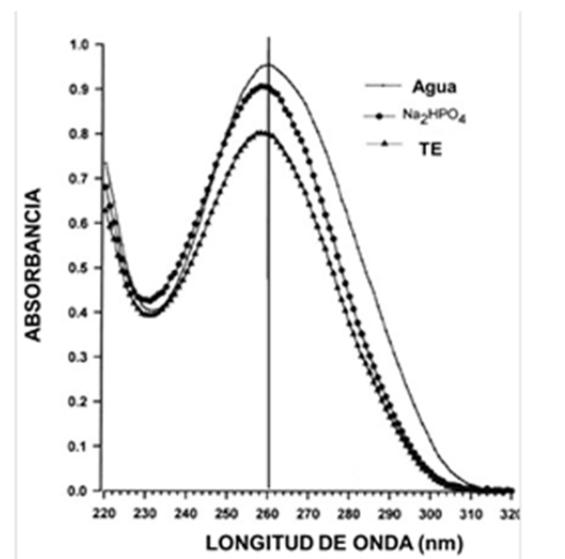


Figura 12. Esquema de perfil de absorción para la cuantificación de ácidos nucleicos

6.8 ELECTROFORESIS HORIZONTAL (AGAROSA)

Se prepararon geles de agarosa al 2 %. Para cada gel se utilizaron 25 mL de amortiguador TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA) y se adicionaron 0.5 g de agarosa (Invitrogen), se calentó para que se disuelva la agarosa. Se deja enfriar a 60 °C y se adicionan 1.25 μL de Bromuro de etidio (10 mg/mL; Sigma) se homogeniza (concentración final = 0.5 $\mu\text{g/mL}$ en cada gel) y se vierte a la cuba de electroforesis, se coloca el peine y se deja solidificar durante 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 8°C.

Se corrieron geles de integridad para observar la calidad de las muestras de gDNA y RNA. Por cada gel se corría un marcador de tamaños de base y muestras ya sea de RNA o gDNA para verificar en caso del RNA que se observaban las dos bandas ribosomales características de 28S y 18S y que las muestras no estaban degradadas. En el caso del gDNA se hacía lo mismo para verificar que el gDNA no se encontraba fragmentado.

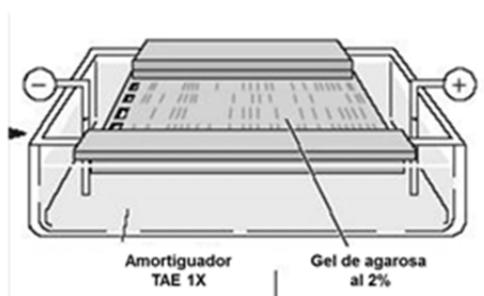


Figura 13. Cámara de electroforesis horizontal

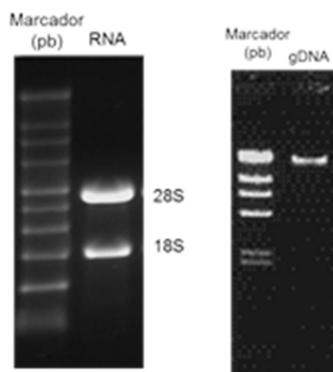


Figura 14. Geles de integridad de RNA y gDNA. No degradados.

6.9 ESTANDARIZACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (RT-PCR)

Con gDNA se estandarizaron las temperaturas de alineamiento para las dos parejas de primers IL3-2 e IL3-2A, además de los oligos para GAPDH de ratón. Se inició con 1 mg de gDNA, las T_m (Temperaturas de alineamiento) fueron 52, 54, 56 y 58 °C con Kit PCR Promega. También se realizó esta misma estandarización con *Taq* polimerasa, dNTPs, (Invitrogen). Para la estandarización de RT-PCR se realizó una curva de cantidad de RNA templado 1, 2 y 4 mg. Se utilizó el Kit Super Script One Step RT-PCR (Invitrogen). Para cada una de las estandarizaciones se utilizaron controles de reacción, control positivo y negativo.

PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Se realizó 1 ciclo: 94°C – 1 min; 52 – 58°C – 1 min; 72°C – 1 min

35 ciclos: 94 °C – 1 min; 52 – 58 °C – 1 min; 72 °C – 1 min

1 ciclo: 72°C – 15 min (Extensión)

RT - PCR (Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa)

Se realizó 1 ciclo: 50°C – 30 min (Transcriptasa reversa)

1 ciclo: 94°C – 1 min; 52 – 58°C – 1 min; 72°C – 1 min

35 ciclos: 94 °C – 1 min; 52 – 58 °C – 1 min; 72 °C – 1 min

1 ciclo: 72°C – 15 min (Extensión)

Diseño de primers de IL-3 y GAPDH

Los primers fueron diseñados por el Dr. Abraham Landa Piedra a partir de la secuencia de la clona de cDNA murino (Genbank ACC. No. K03233, Invitrogen) primer intrón. Se espera un fragmento de 196 pb, si se identifica en el ARN y uno de 296 pb si se identifica en el DNA.

1. Primer sentido: 5' ATG GTT CTT GCC AGC TCT AC 3' (3 IL1)
anti –sentido: 5' CTG GGA GCT TCC CTA TAA TC 3' (3 IL2)
2. Primer sentido: 5' ATG GTT CTT GCC AGC TCT AC 3' (3 IL1)
anti –sentido: 5' AGA GGG TCC TTC ATC ATC AG 3' (IL3-2A)

6.10 EXPOSICIÓN DE ESLENOCITOS A CUMARINA O 7-HIDROXICUMARINA

La cumarina y las 7-hidroxycumarinas se disolvieron en etanol absoluto: 5 mg/1mL y se realizaron diluciones seriales para obtener las 4 concentraciones: 18, 37, 75 y 150 $\mu\text{g/mL}$

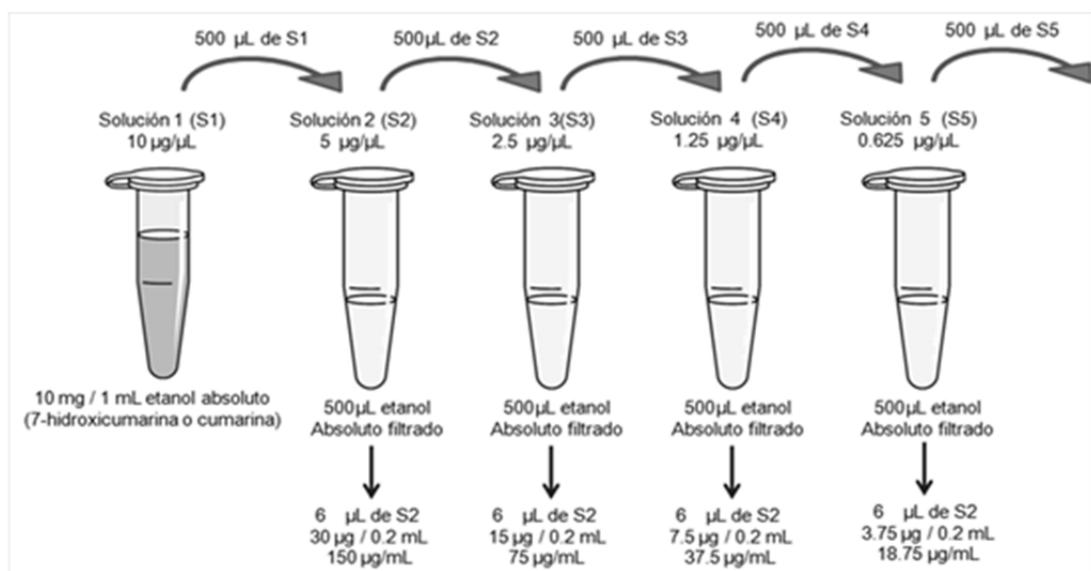


Figura 15. Esquema que muestra la preparación de las diluciones seriales de los fármacos utilizados

Para la exposición a los fármacos se sembraron en placas de 6 pozos 5×10^6 esplenocitos / mL de medio RPMI-1640 (SFB-10% más antibióticos) por pozo y se adicionaron 30 μL de cada una de las concentraciones de los fármacos. Todas las células fueron expuestas al 3% de etanol absoluto más su fármaco, se utilizaron 2 controles: negativo = sólo etanol y positivo = 15 $\mu\text{g/mL}$ de Con A + 50 ng/mL PMA.

En la figura 16 se observan 2 placas de 6 pozos donde se muestra como se realizó la exposición a los fármacos.

Se realizó la exposición a los fármacos durante 5 tiempos: 0, 3, 6, 12 y 24 horas, la exposición a los fármacos se realizó por triplicado. Una vez transcurridos los tiempos de exposición se realizó el muestreo colocando las células en un tubo de polipropileno (Eppendorf) estéril, se centrifugó la muestra a 1600 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 μL de medio RPMI, finalmente se procedió a realizar la extracción de RNA total.

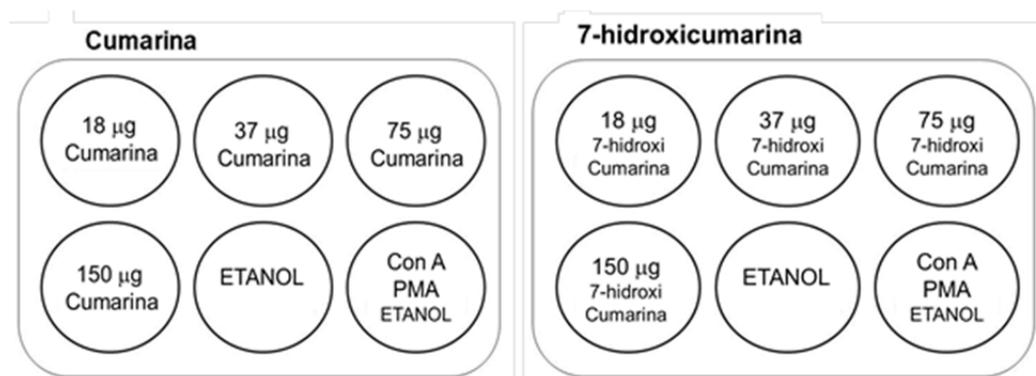


Figura 16. Esquema de exposición a los fármacos

6.11 ENSAYOS DE TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* (RT-PCR)

Se obtuvieron las muestras de RNA total de cada una de las concentraciones y tiempos de exposición a los fármacos. A cada una de las muestras previamente cuantificadas se les adicionó DNasa I y amortiguador 10X, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se adicionó 1 μL de Amortiguador EDTA 2.5 mM por cada 1 μL de DNasa I utilizada, se incubó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Para asegurar la inexistencia de gDNA contaminante en las muestras.

Para las reacciones de RT-PCR se utilizaron 4 μL de RNA total como templado, se adicionaron 25 μL de amortiguador 2X, 1 μL primer sentido, 1 μL primer anti-sentido, 18 μL de agua tratada con DEPC y 1 μL de la mezcla de enzimas y dNTPs para un volumen final de 50 μL para cada una de las muestras (Kit Super Script One Step RT-PCR, Invitrogen).

Para las reacciones de RT-PCR se utilizó el siguiente programa:

RT - PCR (Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa)

Se realizó 1 ciclo: 50°C – 30 min (Transcriptasa reversa)

1 ciclo: 94°C – 1 min; 52 – 58°C – 1 min; 72°C – 1 min

35 ciclos: 94 °C – 1 min; 52 – 58 °C – 1 min; 72 °C – 1 min

1 ciclo: 72°C – 15 min (Extensión)

Los fragmentos de amplificación obtenidos se cargaron en geles de agarosa al 2% para la realización de electroforesis horizontal en amortiguador TAE 1X, a 100 V por 1 hora. Para finalmente fotodocumentar el gel y observar si se detecta el mRNA de IL-3. Las reacciones de RT-PCR se realizaron una corrida por cada tiempo de exposición (4 concentraciones de cada fármaco y los controles) más los controles de reacción y GAPDH de ratón. Cada corrida se realizó por triplicado.

6.12 DENSITOMETRÍAS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL MENSAJERO DE IL-3

Se documentaron los geles con los productos de amplificación de los ensayos de transcripción *in vitro*, con éstas imágenes se realizaron las densitometrías para cuantificar la intensidad de la señal de cada banda correspondiente al producto amplificado del mRNA de IL-3 con el fotodocumentador Kodak y se analizaron las imágenes con el software Image J. Se normalizó la intensidad de cada banda de IL-3 con respecto a la banda de GAPDH ratón.

6.13 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

Se sembraron las células como se indica en el diagrama y se adicionaron los fármacos, de cada concentración 6 μL para tener las concentraciones establecidas 150, 75, 37 y 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada cumarina en 3% de etanol con los respectivos controles de etanol al 3 % y Con A + PMA + Etanol al 3 %.

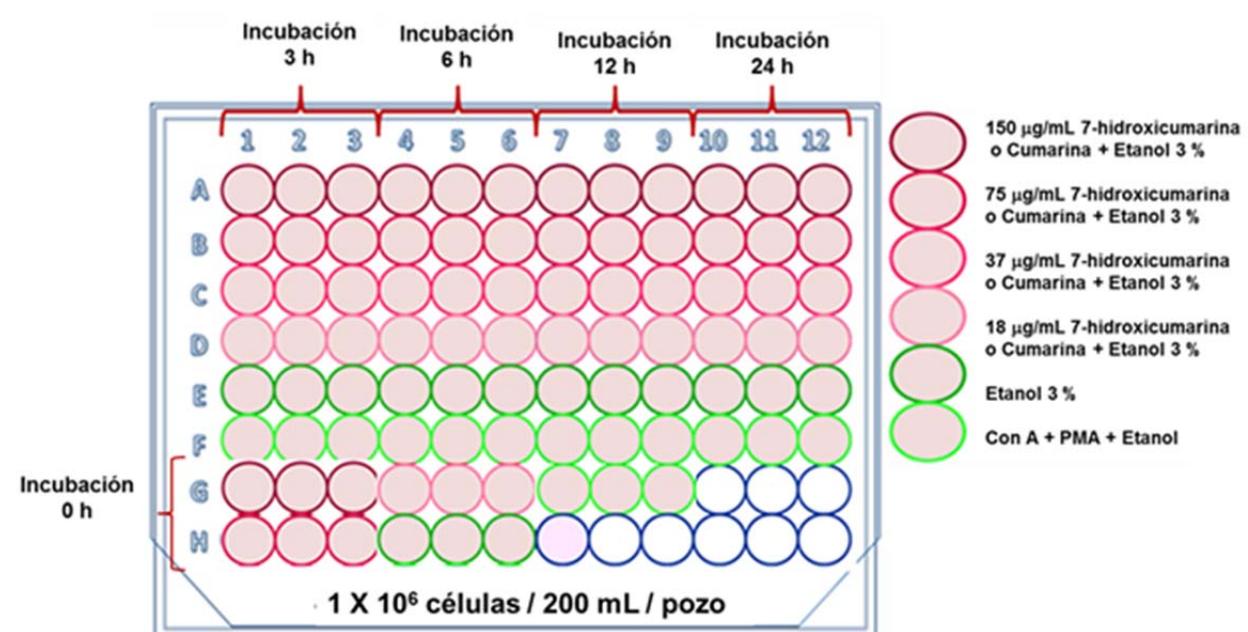


Figura 17. Esquema que muestra el diseño de experimento para determinar la viabilidad celular mediante MTT.

Posterior a cada uno de los tiempos de incubación se procedió a adicionar 40 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de bromuro de (3-(4-, 5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (5 mg/mL), se dejó incubar durante 2 horas, después se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Los cristales que se formaron se disolvieron con 200 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de DMSO estéril y se realizaron lecturas espectrofotométricas a 570 nm. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Este ensayo de MTT es un ensayo de viabilidad celular, la formación de cristales con coloración violeta son un indicativo de la respiración celular pues solamente las células vivas son capaces de transformar el difeniltetrazolio a formazán.

6.14 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR (LDH)

Para evaluar la existencia de citotoxicidad inducida por los fármacos se realizó el ensayo para la determinación de la deshidrogenasa láctica liberada por las células dañadas. En este ensayo se mide la actividad enzimática de la LDH liberada al añadir su sustrato más el cofactor NAD⁺, una diaforasa y un reactivo colorido (sal de tetrazolio, amarilla) el cual por la presencia de la enzima activa se obtendrá como producto la sal de formazán (roja). Una vez transcurridos 30 minutos, se procede a la lectura espectrofotométrica a 490 nm. La información obtenida se presenta como % de Citotoxicidad. Las células se sembraron con el mismo esquema que para los ensayos de viabilidad celular por MTT.

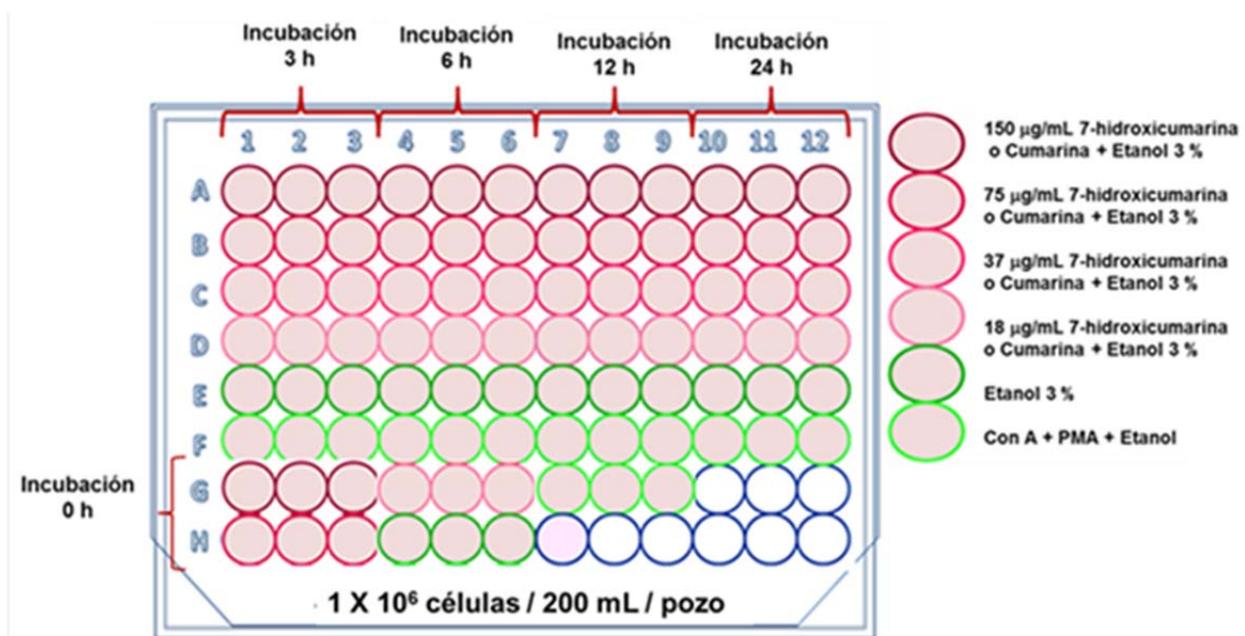


Figura 18. Esquema que muestra el diseño de experimento para determinar la citotoxicidad celular mediante LDH

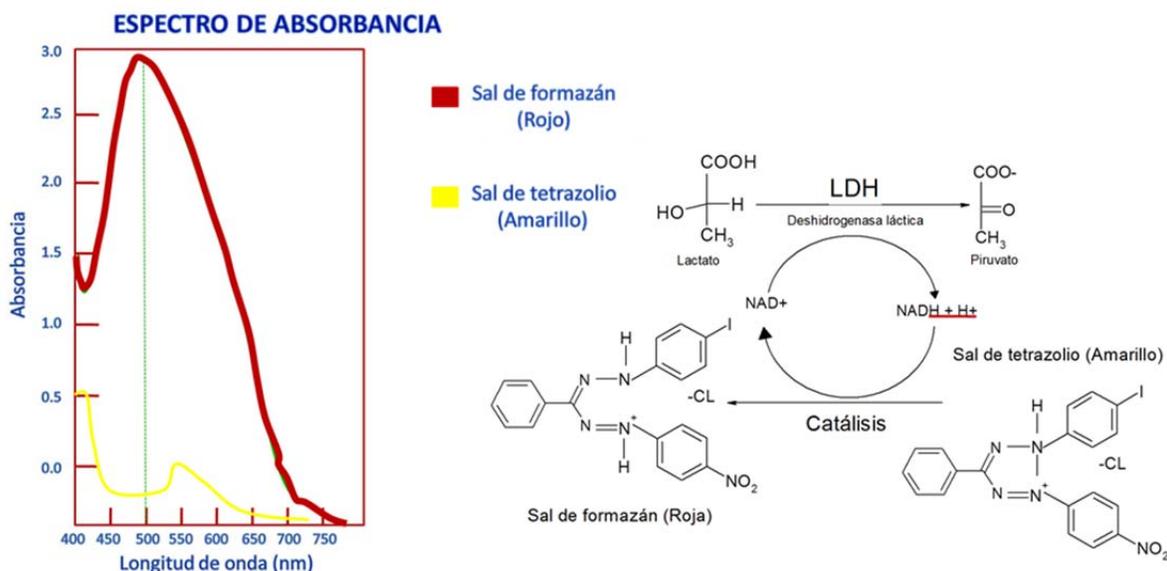


Figura 19. Espectro de Absorbancia para la lectura espectrofotométrica de la sal de formazán y reacción enzimática de LDH para la conversión del Piruvato a lactato

6.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la existencia de diferencias entre los efectos producidos por las concentraciones de cumarinas y de estas con sus controles se realizó el análisis estadístico con la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se realizó la prueba Dunnett para determinar entre que tratamientos existió diferencia estadísticamente significativa, dichos análisis se realizaron con el software Sigma Stat Ver. 3.5. Se consideró un nivel de confianza de $p < 0.05$.

Las gráficas se realizaron con el software Sigma Plot Ver. 11.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de RNA total

Para la extracción del RNA Total se estandarizó el número de células a utilizar para cada extracción. Se inició con 10×10^6 células de las líneas P-815 y B-16, las extracciones posteriores se realizaron a partir de 2×10^6 . En la figura 20 se observa que para las tres cantidades de células obtuvimos RNA no degradado, pues se observan las dos bandas de RNA ribosomal (28S y 18S) para las líneas celulares. En el caso de 10×10^6 células hay mayor cantidad de gDNA contaminante en la muestra y a partir de 2×10^6 células se obtiene RNA no degradado con sus bandas características de RNA ribosomal con menor contaminación de gDNA. Resultados similares se obtuvieron para el RNA total extraído de esplenocitos de ratón, en la figura 21 se aprecia el gel de integridad para 1, 2 y 5 $\times 10^6$ células donde se observa que con 2×10^6 células el rendimiento de RNA total obtenido es menor que con el mismo número de células a partir de las líneas celulares.

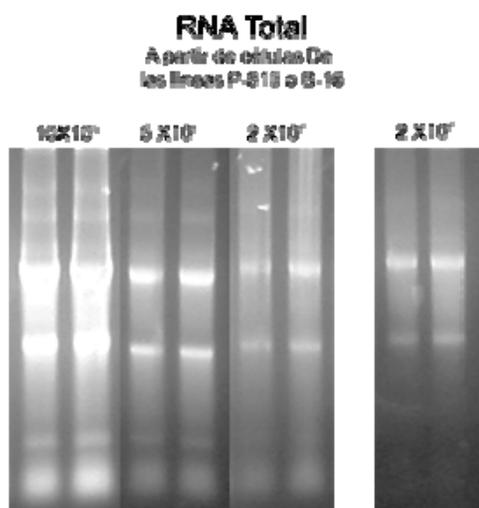


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de RNA total extraído a partir de diferente número de células de las líneas P-815 o B-16

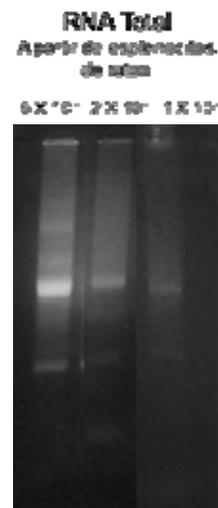


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de RNA total extraído a partir de diferente número de células de esplenocitos de ratón.

Para la extracción de RNA Total a partir de esplenocitos de ratón se utilizaron 5×10^6 para obtener mayor cantidad de muestra para poder realizar las reacciones de RT-PCR.

7.2 Extracción de gDNA (DNA genómico)

Se extrajo gDNA a partir de 0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6 y 5×10^6 esplenocitos, en la figura 22 se observa la calidad del gDNA, sin degradación. A mayor número de células se obtiene mayor cantidad de gDNA pero a 4×10^6 células hay mayor cantidad de carbohidratos y proteínas que podrían contaminar la calidad del gDNA.

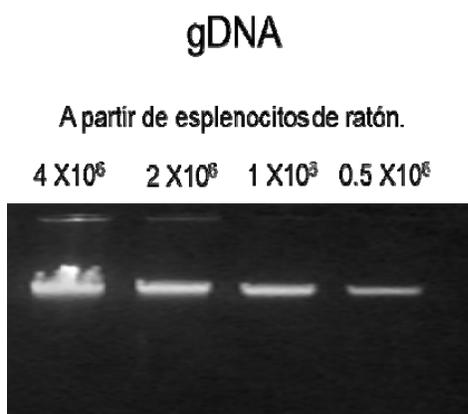


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de muestras de gDNA extraído a partir de diferente número de esplenocitos de ratón.

7.3 Cuantificación de Ácidos Nucleicos

7.3.1 Cuantificación de Ácidos Nucleicos (RNA total)

Se realizó la cuantificación del RNA Total mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm de las muestras para estandarizar la extracción de ácidos nucleicos, este mismo procedimiento se realizó para los ensayos de transcripción *in vitro* de esplenocitos expuestos a la cumarina y 7-hidróxicumarina. Se realizaron diluciones 1:300 para las muestras 10×10^6 , 5×10^6 , 2×10^6 de líneas celulares y para las muestras de esplenocitos: 5×10^6 , 2×10^6 y 1×10^6 se utilizaron diluciones 1:100.

Las lecturas espectrofotométricas también se realizaron a 280 nm para verificar la calidad de RNA, pues la relación 260/280 nm es un indicador de pureza de la muestra. Valores menores a 1.8 indican mayor grado de contaminación con proteínas. En la siguiente tabla se presentan las cuantificaciones de las muestras de RNA total que se observan en las figuras 20 y 21 y en los observamos que a menor número de células se obtiene una menor contaminación con proteínas pues los valores son mayores a 1.8.

	RNA Total (P-815 o B-16)			RNA Total (Esplenocitos ratón)		
	10X10 ⁶	5X10 ⁶	2X10 ⁶	5X10 ⁶	2X10 ⁶	1X10 ⁶
Abs. 260 nm	0.36	0.18	0.12	0.15	0.2	0.105
260 / 280	1.65	1.8	1.9	1.83	1.85	1.84
[µg/µL]	4.34	2.16	1.5	1.87	0.8	0.36
2.5 µL (gel)	10.8 µg	5.4 µg	3.5 µg	4.5 µg	2 µg	0.9 µg

7.3.2 Cuantificación de Ácidos Nucleicos (gDNA)

Se realizó cuantificación de gDNA mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm, las diluciones utilizadas fueron 1:300.

A menor número de células se obtuvieron valores superiores a 1.8 lo que significa que se reduce la contaminación con proteínas. En la siguiente tabla se muestran las cuantificaciones de gDNA de las muestras presentadas en la figura 22.

	gDNA Esplenocitos de ratón			
	5X10 ⁶	2X10 ⁶	1X10 ⁶	0.5X10 ⁶
Abs. 260 nm	0.43	0.36	0.28	0.19
260 / 280	1.78	1.83	1.9	1.9
[µg/µL]	6.45	5.2	3.8	2.8
1.5 µL (gel)	9.7 µg	7.5 µg	5.6 µg	4.2 µg

7.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (RT-PCR)

7.4.1 Temperatura de alineamiento óptima para los primers de IL-3 y GAPDH, curva de cantidad para gDNA para PCR.

Se inició la estandarización con las parejas de oligos IL3-2A y una como control de amplificación de un gen constitutivo 5+3 (sonda de GAPDH cisticerco) a 55 °C. Se utilizó gDNA de esplenocitos de ratón, dicha muestra se cuantificó y se le realizó el gel de integridad, los resultados se muestran en la figura 23. A partir de esta muestra se realizó la reacción en cadena de polimerasa a 55°C y en la misma figura 23 observamos los productos de amplificación obtenidos. Encontramos que los oligos IL-2A se pegan inespecíficamente al gDNA a ésta temperatura pues se obtienen varias bandas y para los oligos de GAPDH de cisticerco también se obtiene más de una banda.

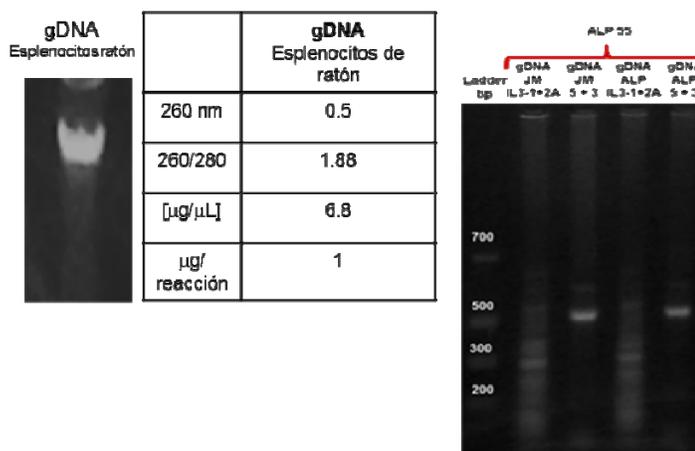


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de muestra de gDNA y su cuantificación. El gel de la derecha corresponde a los productos de amplificación obtenidos al usar oligos IL3-2A y 5+3 en reacción de PCR a 55 °C.

A continuación se realizaron reacciones de PCR con las dos parejas de primers antes mencionadas, ahora con las temperaturas 54, 55 y 56 °C y se utilizó un Kit PCR y otro RT-PCR.

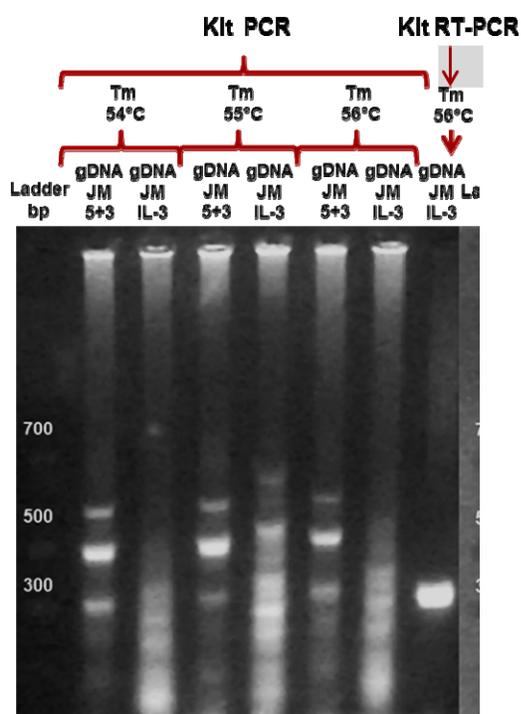


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de reacciones de PCR con un Kit PCR y otro RT-PCR a 54, 55 y 56 °C con los oligos IL3-2A y 5+3.

Se utilizó la misma muestra de gDNA que para la primera reacción de PCR previamente cuantificada y verificada su calidad. Como se observa en la figura 24, para los oligos de IL3-2A a 54°C se observa un barrido, ni si quiera se observan bandas, con forme se incrementa la temperatura se ve como aparece un patrón de varias bandas de pegado inespecífico de éstos oligos. Al utilizar un Kit de RT- PCR distinto con la misma muestra de gDNA con los oligos IL3-2A a 56 °C obtenemos una banda nítida para el gen de IL-3, una banda de 300 pb que es el tamaño esperado. Para GAPDH esperamos un producto de amplificación de 500 pb, a las 3 temperaturas empleadas se observa un patrón de bandas, una de mayor y otra de menor tamaño.

Se diseñó una pareja de oligos para GAPDH de ratón a partir de la secuencia del Genbank 000072 del gen de GAPDH ratón (Dr. Abraham Landa) para utilizar en lugar de la sonda de GAPDH de cisticerco, la secuencia de los oligos es la siguiente:

Sentido: 5´ACCACAGTCCATGCCATCAC 3´

Anti-sentido: 5´TGTCGTTGTCCCACCACCT 3´

En la siguiente imagen se presentan los productos de amplificación obtenidos de las reacciones de PCR con el Kit RT-PCR probando 4 temperaturas de alineamiento y dos parejas de primers (IL 3-2A y GAPDH ratón).

Se extrajo nuevamente gDNA de ratón, se cuantificó y verificó su calidad, en la figura 25 se observa que al utilizar el Kit RT-PCR se obtienen bandas nítidas para IL-3 (296 pb) y para GAPDH ratón (300 pb) a las 4 temperaturas probadas (52, 54, 56 y 58 °C). Las bandas para GAPDH son más intensas que las de IL-3 en todos los casos y para IL-3 se observa una banda más intensa a los 58°Cm, sin embargo; también hay una segunda banda de menor tamaño.

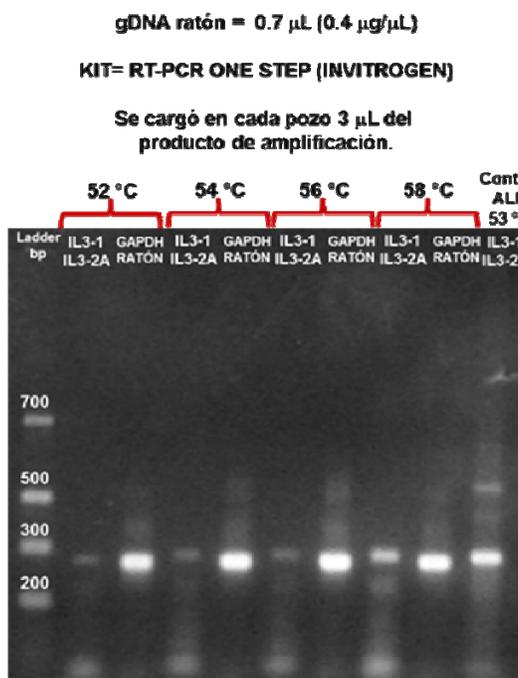


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación obtenidos con los oligos IL3-2A y GAPDH de ratón.

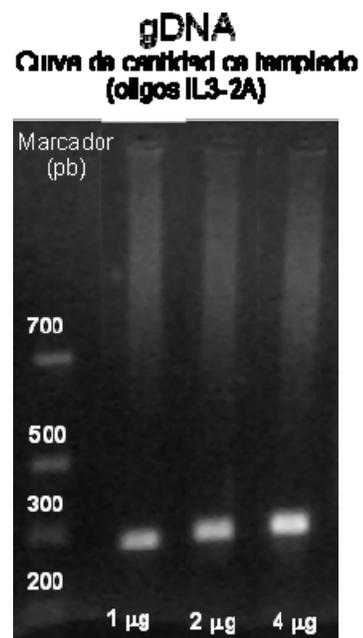


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación obtenidos con los oligos IL3-2A y Tm de 56 °C con 3 cantidades de gDNA, se cargaron 5 μ L del producto / pozo.

En la figura 26 se aprecian los productos de amplificación de mayores cantidades de gDNA con los oligos IL3-2A a 56 °C.

7.4.2 Temperatura de alineamiento óptima para los primers de IL3-2A Y GAPDH, curva de cantidad para RNA total para RT-PCR.

Se realizaron las reacciones de RT-PCR con las parejas de oligos IL3-2 e IL3-2A con Tm de 55, 57, 58 y 56 °C y los controles de reacción con gDNA, curva de cantidad de RNA Total de esplenocitos expuestos a Con A + PMA para usar como templado 2, 3 y 4 µg; e identificación de control positivo de transcripción de mRNA de IL-3 en Línea celular P-815 y de control negativo: Macrófagos peritoneales de ratones no inducidos.

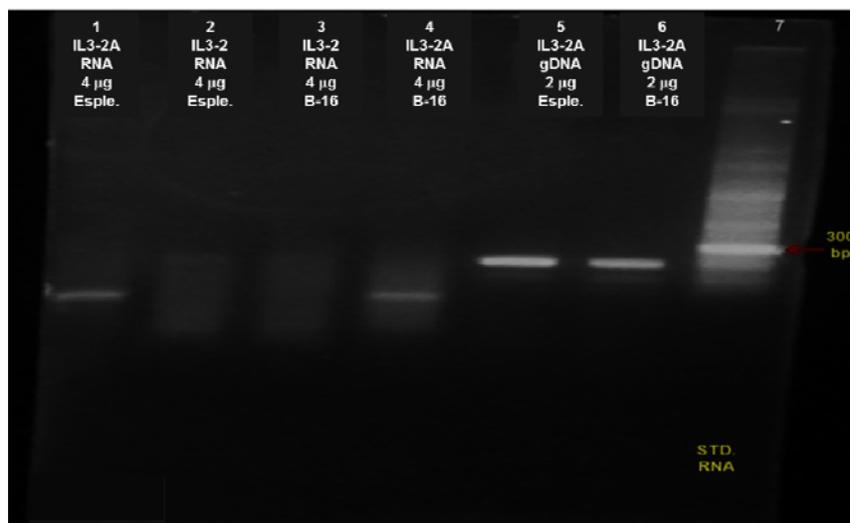


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los p roductos de amplificación obtenidos Con los primers IL3-2A y Tm de 55 °C templado RNA = 4 µg y 2 µg de gDNA, se cargaron 5 µL del producto / pozo.

Al utilizar la temperatura de 55 °C para RT-PCR con muestras de RNA (figura 27) obtuvimos

Para los controles ge gDNA una banda nítida de 296 pb como se esperaba pero para las muestras de RNA (banda esperada de 196 pb): para esplenocitos de ratón con los oligos IL3-2A una banda nítida con un barrido hacia arriba y hacia abajo y con los oligos IL3-2 se obtiene un barrido de pegado inespecífico. Lo mismo sucedió con las muestras de RNA de células B-16.

Para mejorar la especificidad de los oligos diseñados se incrementó la temperatura de alineamiento a 57 °C y se observó (figura 28) que para muestras de gDNA de esplenocitos de ratón se obtenía una banda nítida y un ligero barrido pero para el de la muestra de células B-16 el barrido era mayor al igual que para las muestras de RNA de células B-16. Se realizó otras reacciones de RT-PCR con las muestras de RNA previamente utilizadas pero con una temperatura de alineamiento de 58 °C y a esta temperatura observamos que para el RNA tanto de las células B-16 como de esplenocitos de ratón la banda no es difusa y con barrido (figura 29).

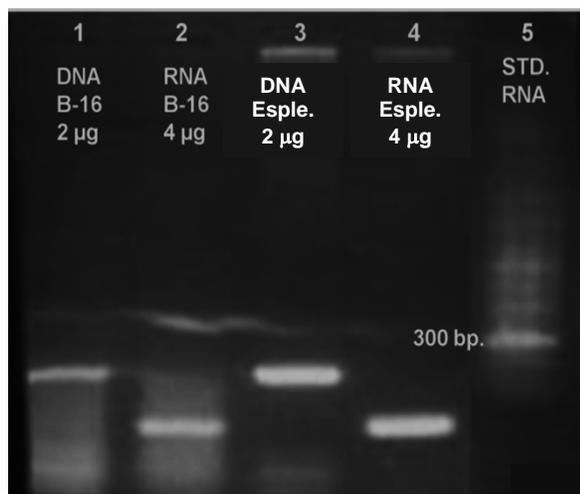


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con primers IL3-2A y Tm de 57 °C, 5 µL del producto / pozo.



Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con primers IL3-2A y Tm de 58 °C, 5 µL del producto / pozo.

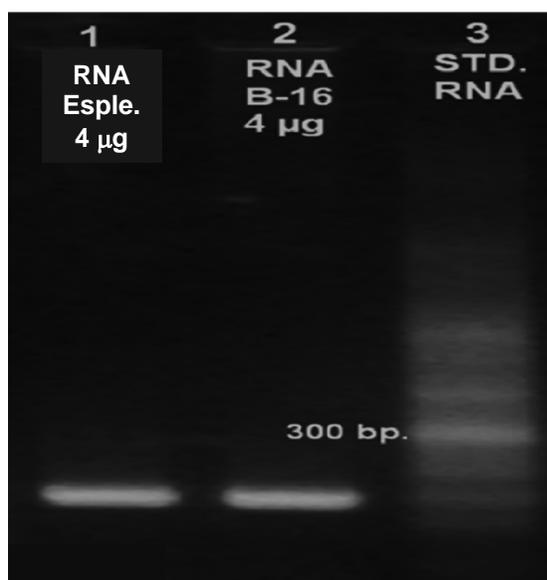


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación obtenidos con primers IL3-2A y Tm de 56 °C. 5 µL del producto / pozo.

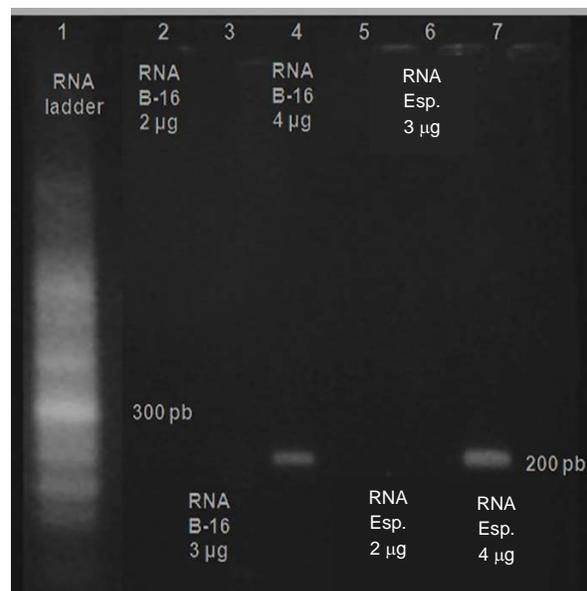


Figura 31. Curva de cantidad de templado de RNA total Para las reacciones de RT-PCR (2, 3 y 4 µg), oligos IL3-2A con muestras de células B-16 y Esplenocitos.

Por lo anterior se disminuyó la temperatura de alineamiento 2 °C a 56°C y se repitió el experimento pero con esta nueva condición. Como se muestra en la figura 30, las bandas obtenidas para muestras de RNA total a partir de las cuales se detectó el mRNA de IL-3 de células B-16 y esplenocitos de ratón fue nítida y del tamaño esperado 196 pb.

Una vez obtenida esta temperatura, se realizó una curva de cantidad para optimizar la cantidad de templado a utilizar, como resultado obtuvimos que para 2 y 3 µg de RNA total no se observan productos de amplificación y para 4 µg se aprecia una banda nítida de tamaño aproximado al esperado (196 pb) tanto para células B-16 como esplenocitos de ratón (figura 31).

**RT-PCR 4 µg RNA total células
P-815 y Macrófagos
peritoneales no inducidos**

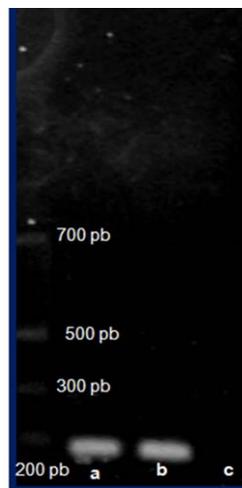


Figura 32. Productos de amplificación obtenidos por RT-PCR con templados de RNA Total de células P-815 y Macrófagos, $T_m = 56$ °C (Control positivo: Línea P-815 y control negativo: Macrófagos).

En la figura 32 se muestra que para RNA de células P-815 también se detecta el mRNA de IL-3, una banda nítida de aproximadamente 200 pb (196 pb) a las condiciones previamente establecidas ($T_m = 56$ °C y 4 µg de templado). Para el RNA de macrófagos no observamos productos de amplificación de mRNA de IL-3. Por lo anterior también se puede utilizar a ésta línea celular como control positivo y a los macrófagos como control negativo para la detección del mRNA de IL-3.

7.5 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE mRNA de IL-3 DE RATÓN, EN ESPLENOCITOS DE RATÓN EXPUESTOS A CUMARINA O 7-HIDROXICUMARINA

7.5.1 RNA total: Exposición a cumarina ó 7-hidroxicumarina.

Tiempos de incubación: 0, 3, 6, 12 Y 24 h.

Luego de la exposición de 5×10^6 esplenocitos de ratón/mL de medio a cada una de las 4 concentraciones de cumarina o 7-hidroxicumarina (18, 37, 75 y 150 $\mu\text{g/mL}$) y a los controles (etanol ó Con A + PMA + Etanol), se realizó la extracción de RNA Total de todas las muestras. Se realizaron los geles de agarosa al 2% para verificar la integridad de las muestras para las reacciones de RT-PCR.

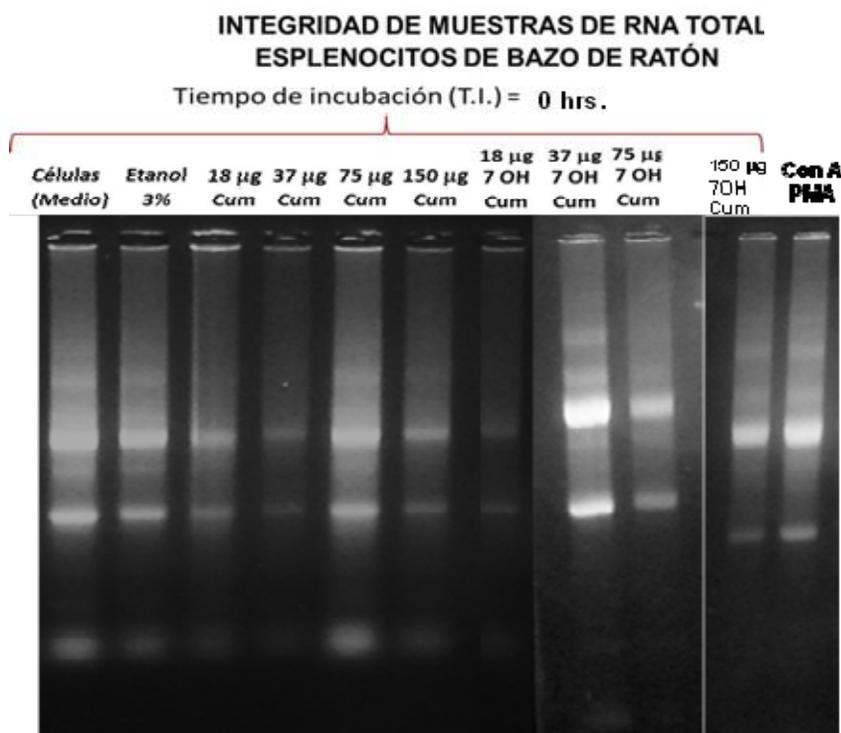


Figura 33. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 μg de cumarina o 7-hidroxicumarina al tiempo 0 de incubación.

**INTEGRIDAD DE MUESTRAS DE RNA TOTAL
(ESPLENOCITOS DE RATÓN)**

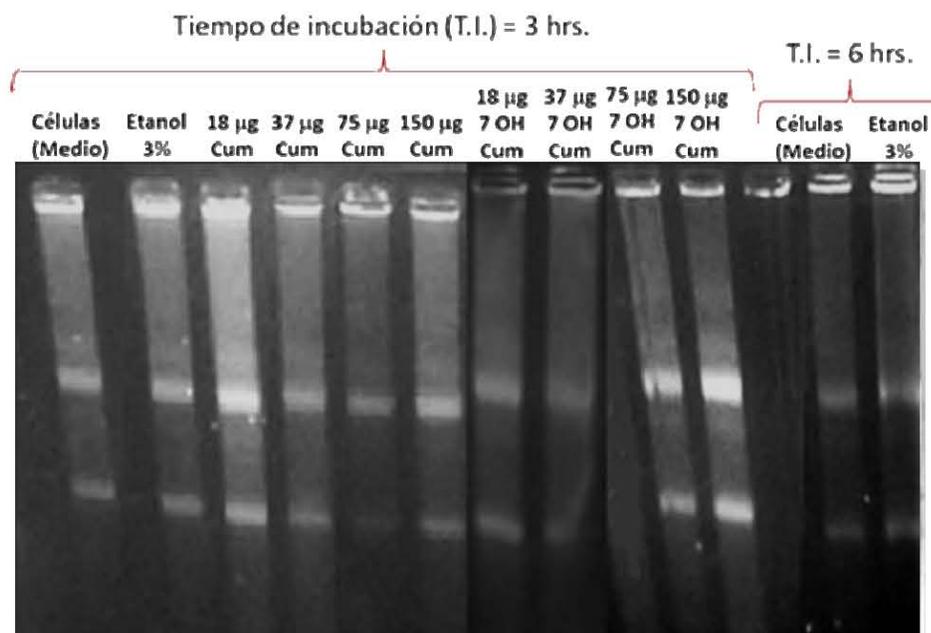


Figura 34. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxycumarina al tiempo 3 Y 6 h de incubación.

**INTEGRIDAD DE MUESTRAS DE RNA TOTAL
(ESPLENOCITOS DE RATÓN)**

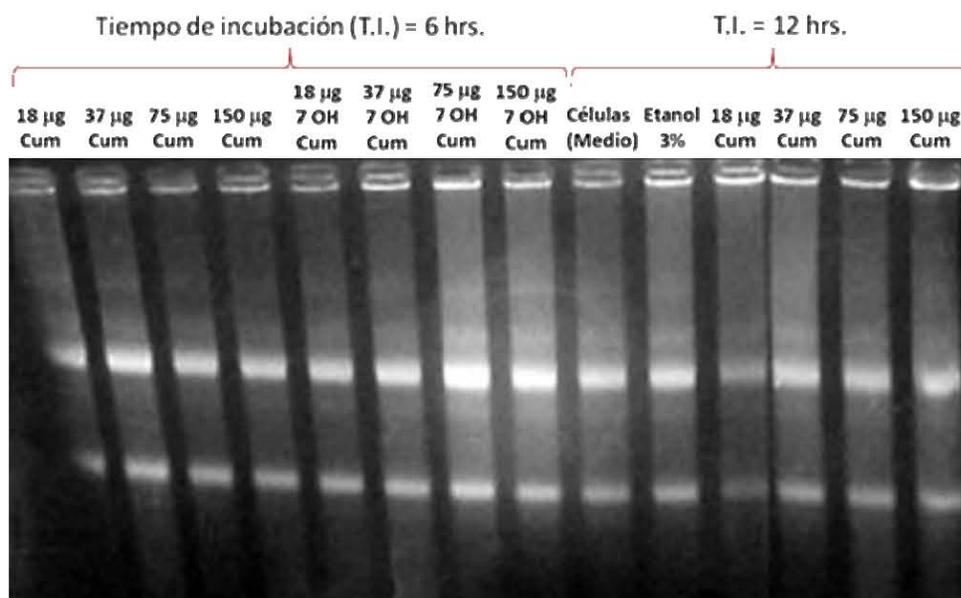


Figura 35. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxycumarina al tiempo 6 Y 12 h de incubación.

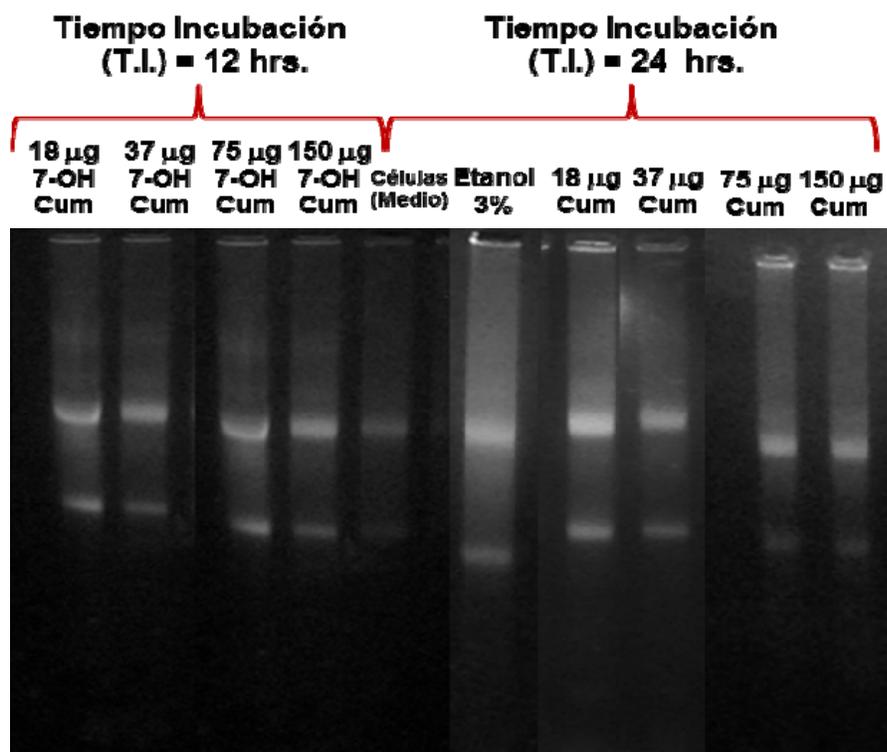


Figura 36. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxycumarina al tiempo 12 y 24 h de incubación.

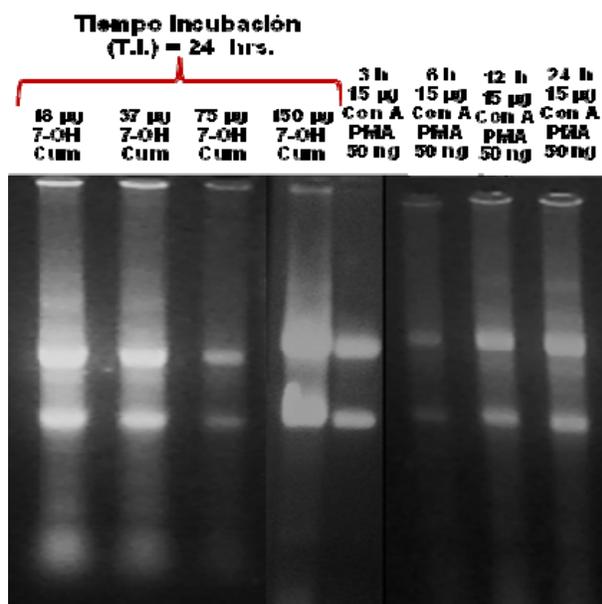


Figura 37. RNA Total obtenido a partir de 5×10^6 esplenocitos expuestos a 18, 37, 75 y 150 µg de cumarina o 7-hidroxycumarina al tiempo 24 h de incubación y controles de Con A + PMA a las 3, 6, 12 y 24 horas.

En las figuras 33 a 37 se observa la integridad de los RNA totales obtenidos, no hay degradación y la presencia de las dos bandas de RNA ribosomal características, la banda 28S más intensa que la 18S. Por lo que estas muestras fueron utilizadas para la detección del mRNA de IL-3, también fueron previamente tratadas con DNAsa I para eliminar cualquier contaminación con gDNA.

7.5.2 RT-PCR: EXPOSICIÓN A CUMARINA O 7-HIDROXICUMARINA

TIEMPOS: 0, 3, 6, 19 Y 24 h.

Posterior a la exposición a cumarina o 7-hidroxycumarina se extrajo el RNA total, éste se cuantificó y se realizaron las reacciones de RT-PCR para detectar al mRNA de IL-3 y a GAPDH como control. Se obtuvieron fragmentos de amplificación que se corrieron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio para finalmente realizar las densitometrías.

RT-PCR

A partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina y 7-hidroxycumarina al tiempo cero y 3 horas

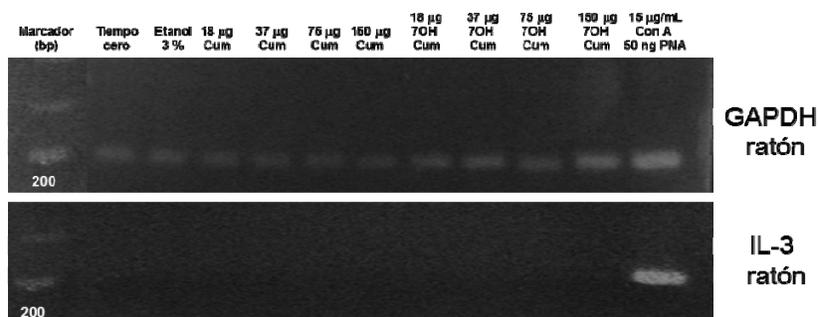


Figura 38. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina ó Con A + PMA. Tiempo cero y 3 horas, realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).

Al tiempo cero no se observa banda, no se logra detectar mRNA de IL-3 en células no estimuladas ni a las 3 horas de exposición con cumarina o 7-hidroxycumarina. Se obtuvo una banda del tamaño esperado (196 pb), logrando identificar así al mRNA de IL-3 a las 3 horas de exposición a Con A y PMA (figura 39). Se logró detectar mRNA de GAPDH al tiempo cero y 3 horas en éstas mismas muestras.

RT-PCR

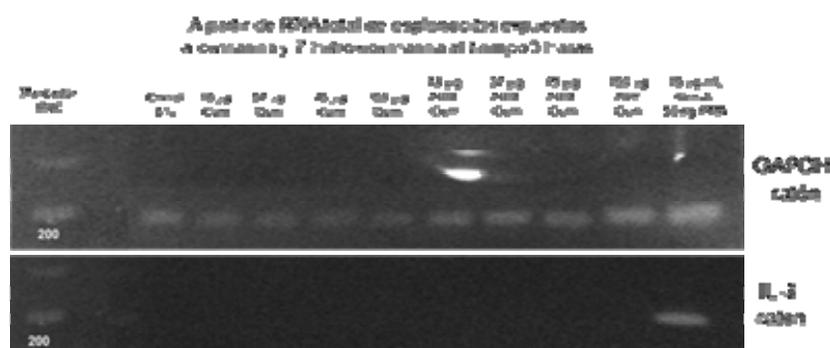


Figura 39. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina ó Con A + PMA. Tiempo 6 horas, realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).

Transcurridas 6 horas de exposición a los fármacos y a los mitógenos (figura 40) se logra detectar a GAPDH pero no a IL-3 en ningún caso, excepto en las células expuestas a Con A y PMA, se observa una banda del tamaño esperado pero menos intensa que a las 3 horas de exposición.

RT-PCR

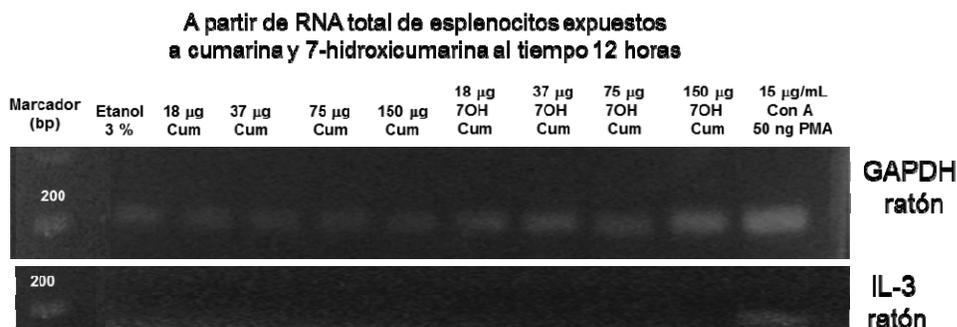


Figura 40. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina ó Con A + PMA. Tiempo 12 horas, realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).

A las 12 y 24 horas de exposición (figuras 40 y 41) se obtuvieron resultados similares, se logra identificar al mRNA de GAPDH del tamaño esperado (200 pb) en todas las muestras pero no al mRNA de IL-3 con excepción de las células expuestas a los mitógenos. A las 12 horas la intensidad de la banda de IL-3 para éstas células es de menor intensidad que a las 6 y a las 3 horas, para las 24 horas ésta banda es prácticamente imperceptible.

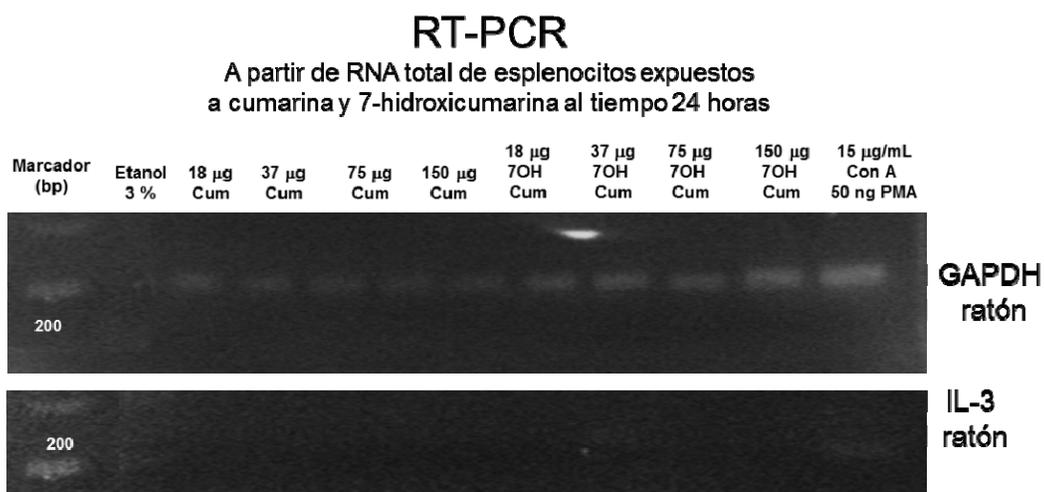


Figura 41. Productos de amplificación obtenidos a partir de RNA total de esplenocitos expuestos a cumarina, 7-hidroxycumarina ó Con A + PMA. Tiempo 24 horas, realización de transcripción inversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).

7.6 DENSITOMETRÍAS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA de IL-3

De las imágenes digitales de los geles de agarosa donde se corrieron los productos de amplificación obtenidos de las reacciones RT-PCR, se realizaron densitometrías con el software Image J (Image Processing and Analysis in Java) obteniéndose la intensidad de cada banda/pixel para cada tratamiento a tiempo cero, 3, 6, 12 y 24 horas.

Los resultados obtenidos fueron como se aprecia en la figura 42 que se logra identificar el mRNA de IL-3 a partir de las 3 horas de exposición a Con A y PMA y que la expresión de este mensajero disminuye dependiendo del tiempo. En el caso de las células expuestas a Cumarina, se aprecia que con ninguna de las concentraciones utilizadas se logra inducir la expresión del mRNA de IL-3 y no se detectó.

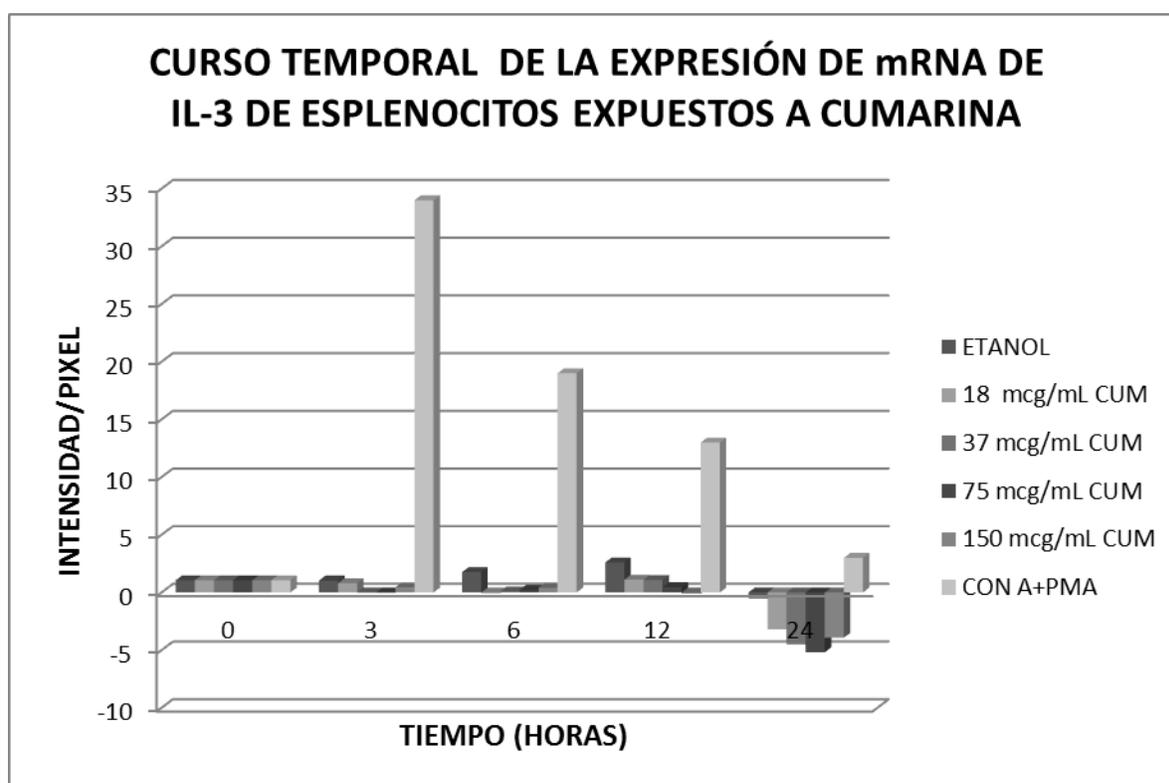


Figura 42. Gráfico que muestra la cuantificación densitométrica realizada a partir de los productos de amplificación (RT-PCR) para cada concentración (18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de Cumarina y sus respectivos controles Etanol al 3 % y Con A (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PMA (50 ng/mL).

En el caso de las células expuestas a 7-hidroxycumarina no se observó un estímulo en la inducción del mRNA de IL-3 tal como sucedió con las células expuestas a cumarina, en el caso de las células expuestas a los mitógenos se observa la detección del mRNA a partir de las 3 horas de incubación y la cual va disminuyendo con respecto al tiempo.

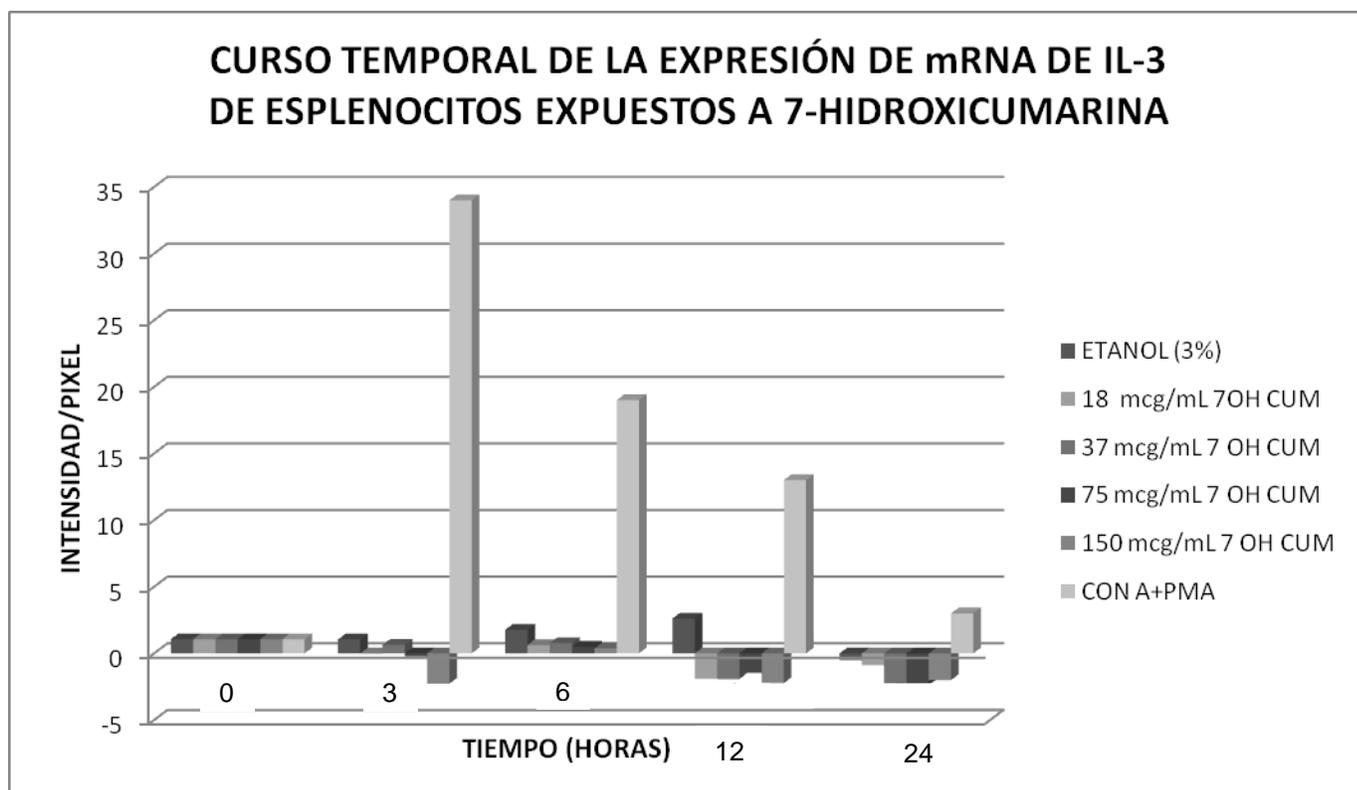


Figura 43. Gráfico que muestra la cuantificación densitométrica realizada a partir de los productos de amplificación (RT-PCR) para cada concentración (18, 37, 75 ó 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 7-hidroxycumarina y sus respectivos controles Etanol (3 %) y Con A (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PMA (50 ng/mL).

7.7 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR (MTT)

Posterior a la incubación de las células con el reactivo [3-(4-, 5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT), los cristales violetas se disolvieron con DMSO, se homogenizaron y se realizaron las lecturas espectrofotométricas de las Absorbancias a 570 nm. A partir de las absorbancias obtenidas se calcularon los porcentajes (%) de viabilidad celular con respecto a las absorbancias al tiempo cero para cada caso, se realizaron las gráficas de las concentraciones de cada fármaco con respecto al % de viabilidad.

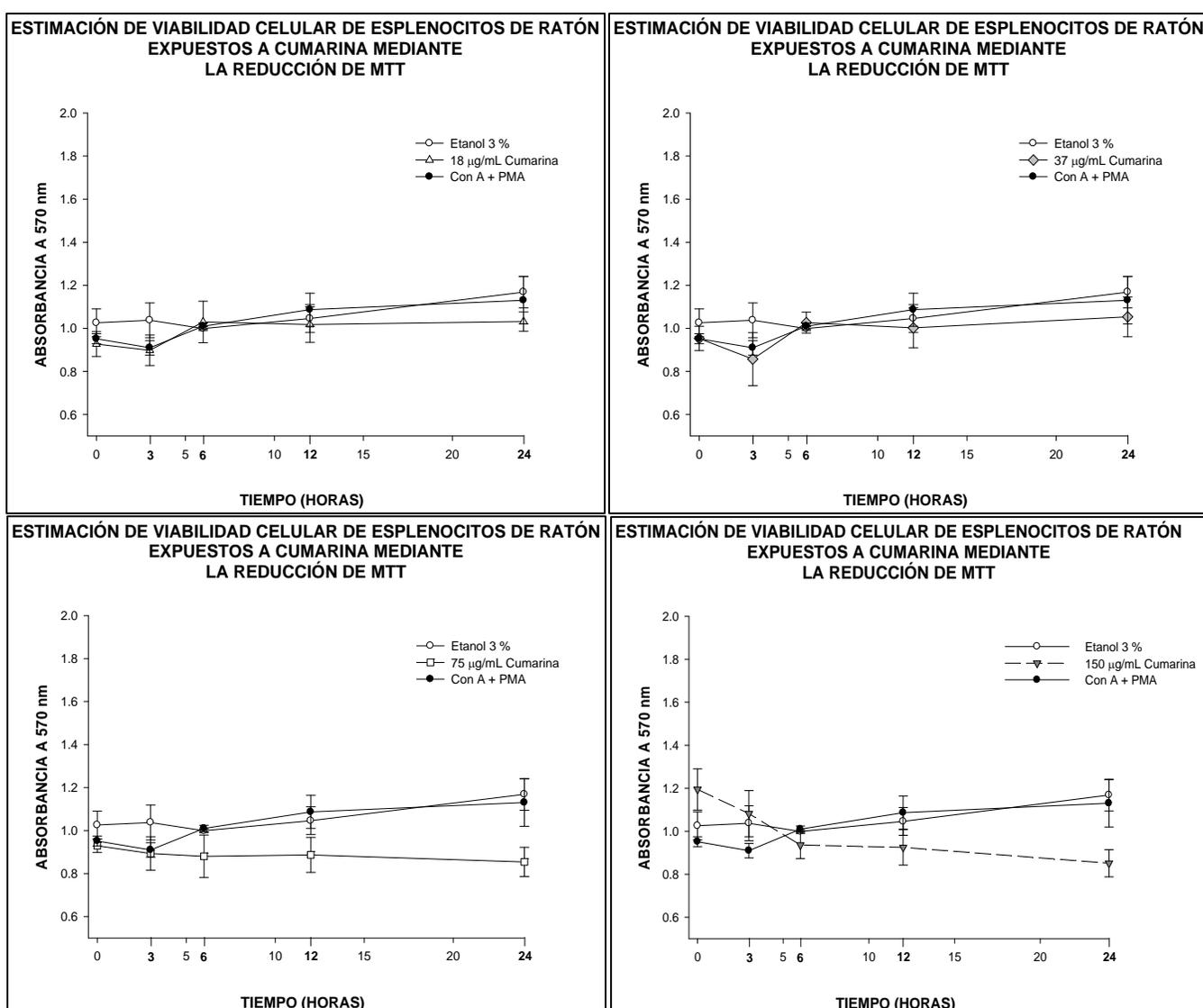


Figura 44. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de esplenocitos expuestos a cumarina.

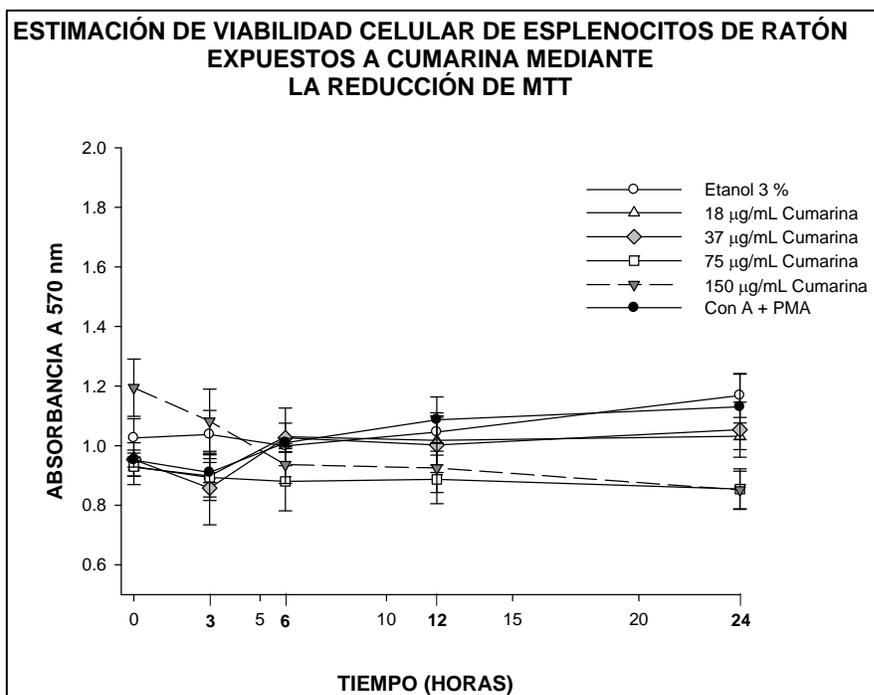


Figura 45. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de esplenocitos expuestos a cumarina.

Como se muestra en las figuras 44 y 45 la viabilidad de células expuestas a cumarina no disminuye dependiendo la dosis de cumarina a la que fueron expuestas con respecto al tiempo y tampoco varía con respecto a las células expuestas a los controles etanol y mitógenos.

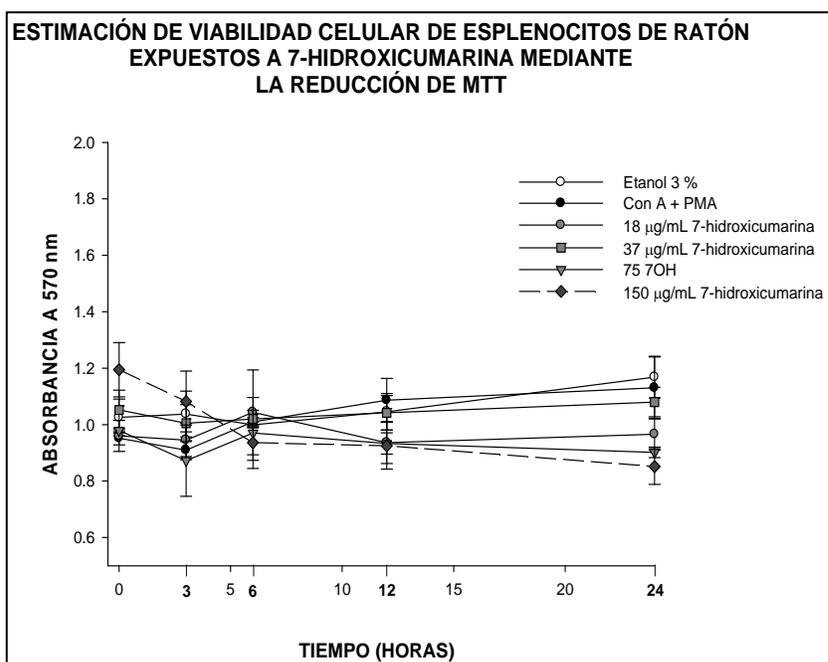


Figura 46. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de esplenocitos expuestos a 7-hidroxicumarina.

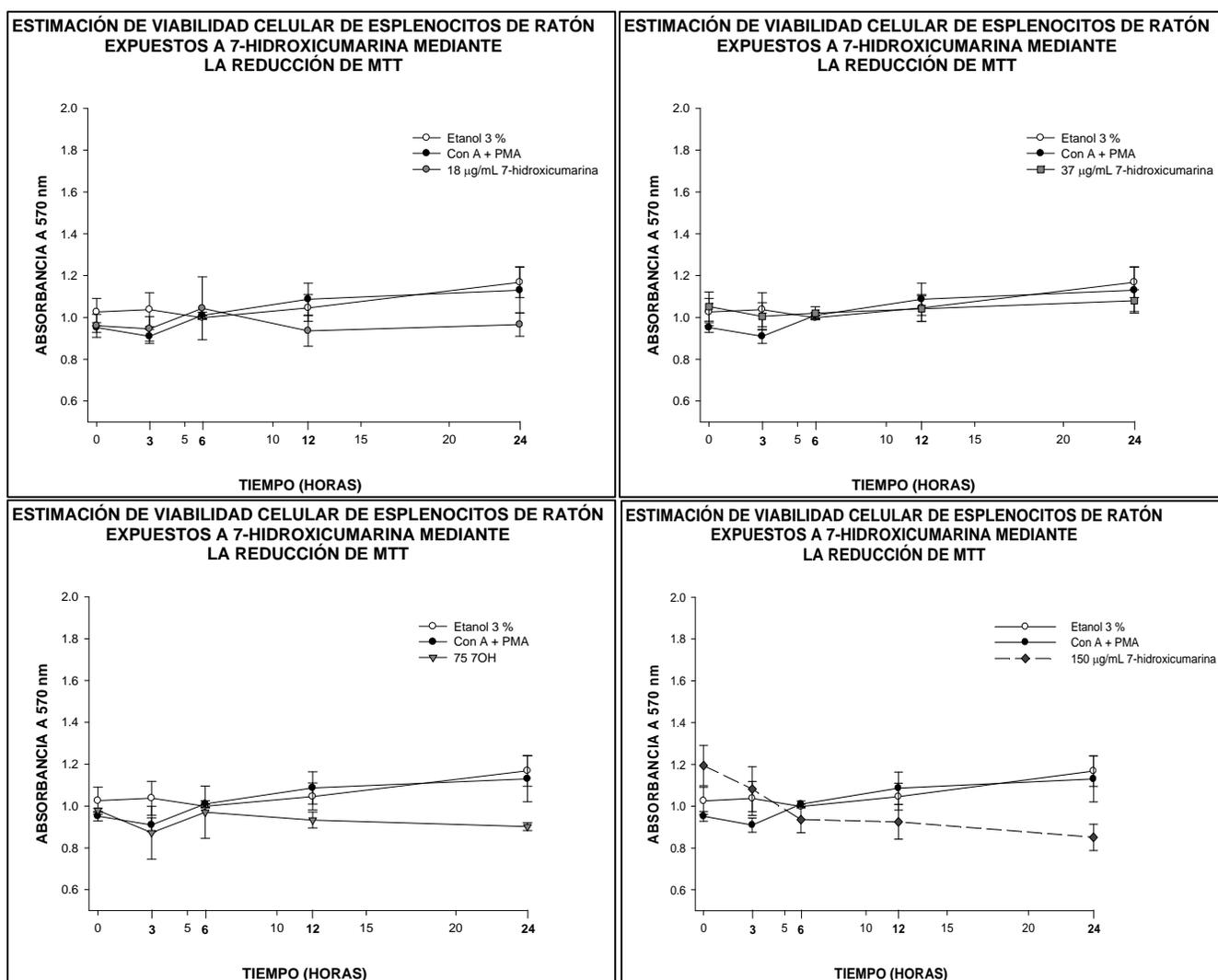


Figura 47. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de esplenocitos expuestos a cumarina.

Como se muestra en las figuras 46 y 47, la viabilidad de células expuestas a 7-hidroxycumarina no disminuye dependiendo la dosis a la que fueron expuestas con respecto al tiempo y tampoco varía con respecto a las células expuestas a los controles etanol y

7.8 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR (LDH)

Las células expuestas a cumarina o 7-hidroxycumarina se incubaron según los tiempos establecidos para el estudio, posteriormente se adicionó la mezcla de reacción que contiene al cromóforo y al cofactor necesario para la generación de color. Se realizaron las lecturas espectrofotométricas de las Absorbancias a 409 nm. A partir de las absorbancias obtenidas se calcularon los porcentajes (%) de citotoxicidad celular con respecto a las absorbancias al tiempo cero para cada caso, se realizaron las gráficas de las concentraciones de cada fármaco con respecto al % de citotoxicidad.

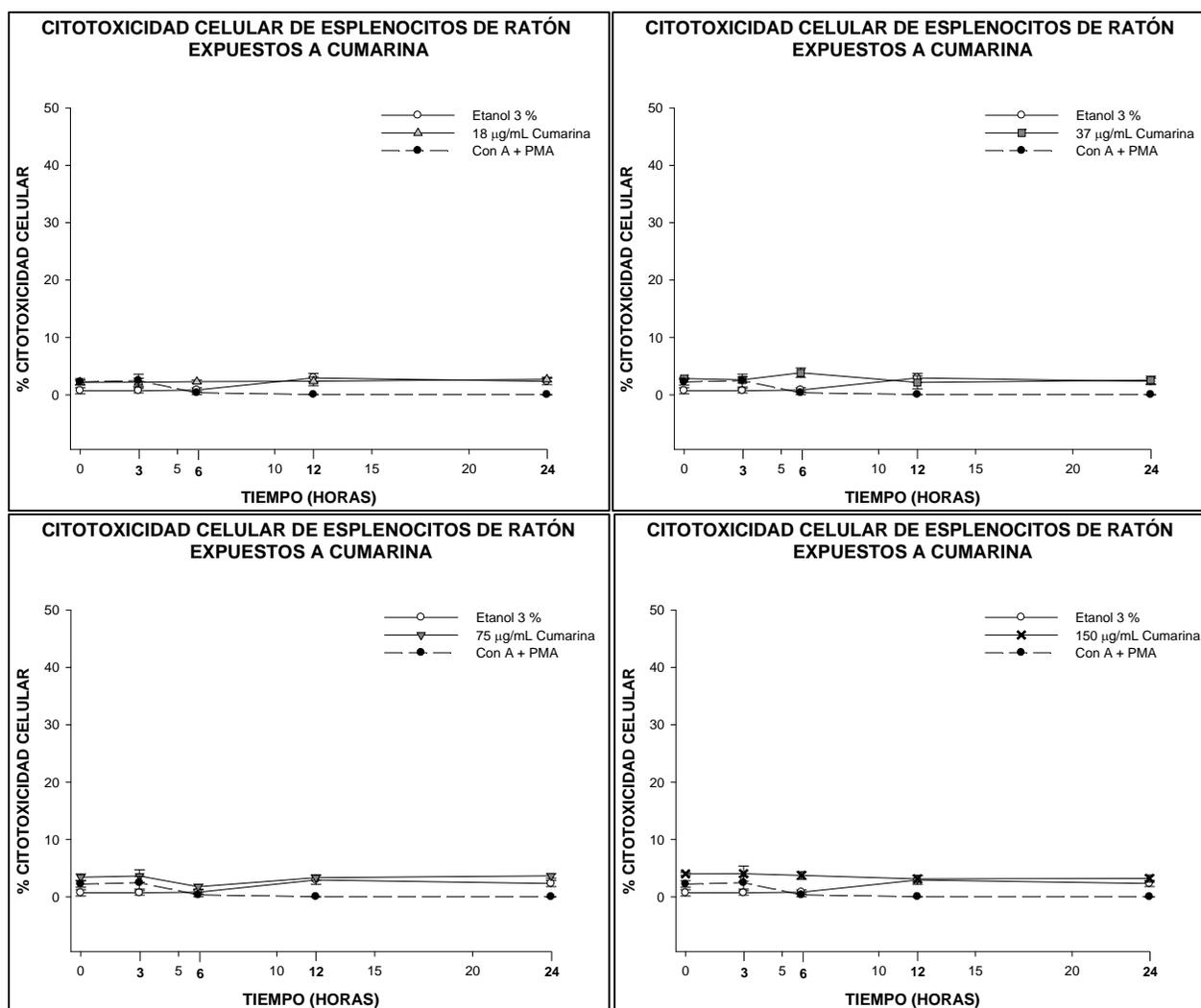


Figura 48. Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a cumarina.

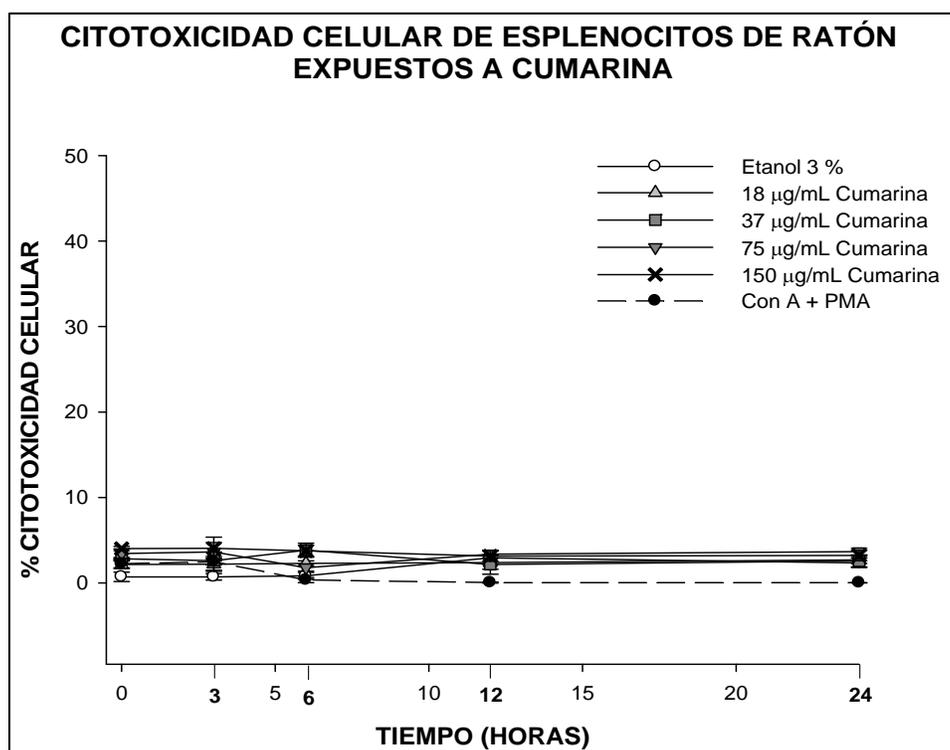


Figura 49. Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a cumarina.

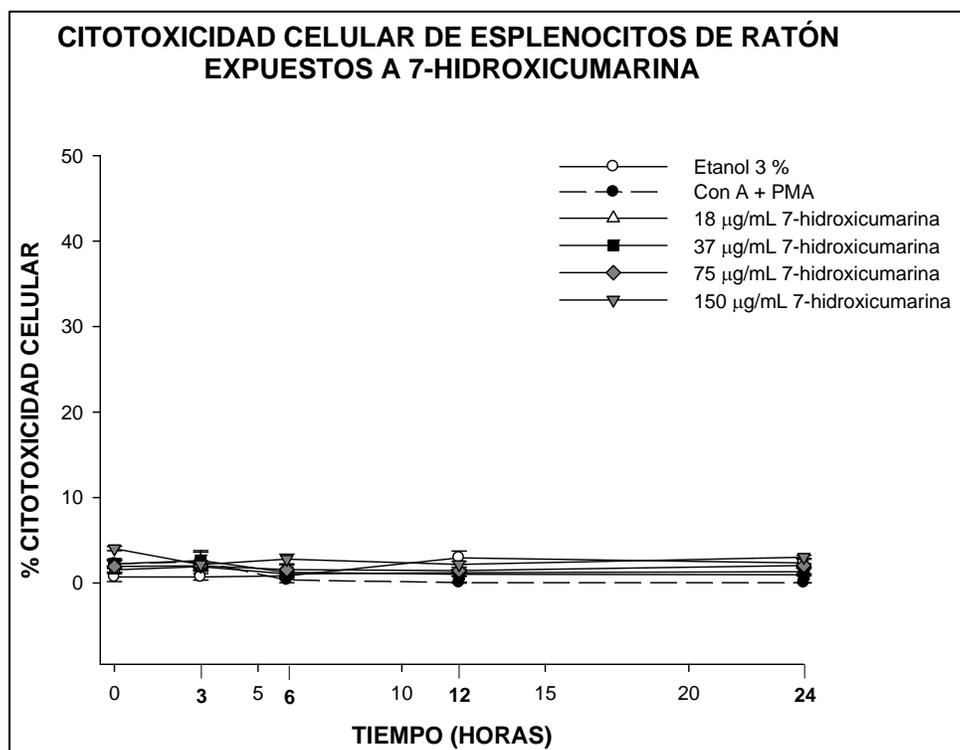


Figura 50. Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a 7-hidroxicumarina.

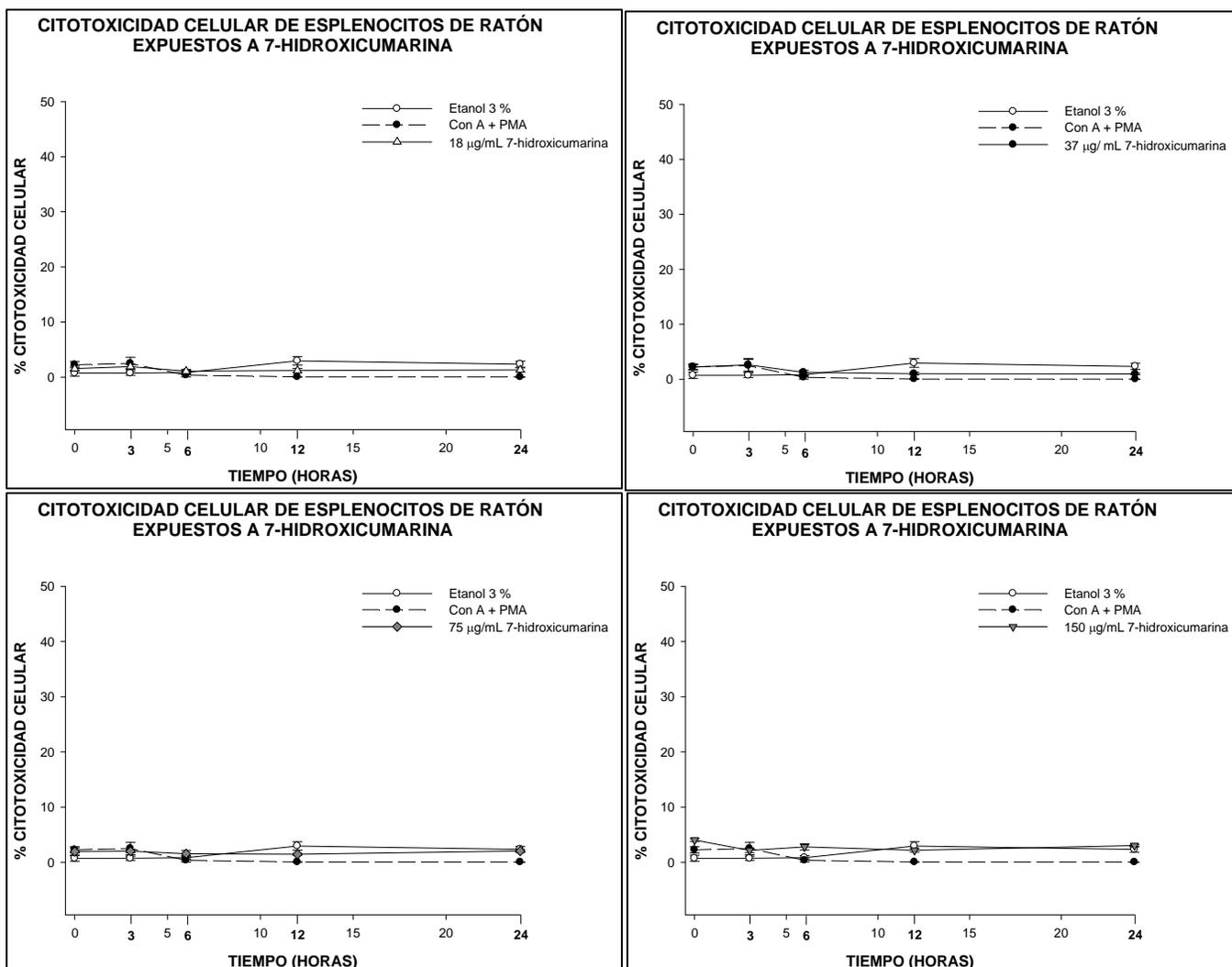


Figura 51. Ensayo de citotoxicidad celular (LDH) de esplenocitos expuestos a cumarina.

Como se observa en las figuras 48 a 51 la citotoxicidad producida por las cumarinas es muy similar a la generada por el etanol y los mitógenos; en todos los casos fue menor al 5%.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En estudios previos realizados en linfocitos T de ratón (expuestos *in vitro*) a escopoletina (7-hidroxi, 6-metoxicumarina) se observó un incremento de la proliferación celular (Manuele, 2006). En esplenocitos de ratón (estudio *in vivo*) expuestos a esculetina (6, 7-dihydroxicumarina), se indujo mitogénesis (Leung, 2005). Stuhlmeier (1991) observó que la cumarina y dos de sus derivados 7-hidroxycumarina y 4-hidroxycumarina, fueron capaces de potenciar la producción de IL1- β en células mononucleares humanas estimuladas por lipopolisacárido de *E. coli* (LPS), de manera concentración-dependiente. En el presente estudio se investigó la capacidad de la cumarina y de la 7-hidroxycumarina para inducir la expresión del mRNA de IL-3 de ratón mediante ensayos de transcripción *in vitro*, se realizó la exposición a 4 concentraciones de cumarina o 7-hidroxycumarina, basándose en los antecedentes descritos anteriormente, con los que se construyó la hipótesis de este trabajo, “La cumarina y su principal producto de biotransformación en humanos (7-hidroxycumarina) tienen acciones inmuno estimulantes *in vitro* en esplenocitos de ratón, sobre la transcripción del mRNA de la interleucina-3 y este efecto es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición a éstos fármacos”. En la sección de resultados en las figuras 38 – 41 se observan los productos de amplificación obtenidos para las reacciones de RT-PCR para muestras de RNA total de esplenocitos de ratón expuestos a las cumarinas por separado, así como células control negativo (tratadas con etanol al 3%) y células tratadas mediante Con A + PMA, empleadas como control positivo. En éstos tratamientos *in vitro* con cumarina ó 7-hidroxycumarina, no se detectó el mRNA de IL-3 ya que no se aprecian bandas del tamaño esperado (196 bp), a ninguna concentración ni tiempo de exposición. En estos ensayos se utilizó el RNA total de esplenocitos tratados, el cual mostró ser de calidad para la detección de mRNAs por la técnica RT-PCR ya que se pudo detectar el mRNA de GAPDH (gen constitutivo) como se observa en las figuras 38 – 41 a todos los tiempos y a todas las concentraciones de ambas cumarinas y los controles.

También se logró detectar en las líneas celulares sin estimular B-16 (melanoma murino) y P-815 (mastocitoma murino), con ésta técnica y con los oligos diseñados por el Dr. Landa al mRNA de IL-3.

10. REFERENCIAS

- Abrahams, J. et al. Development of rat anti-mouse interleukin 3 monoclonal antibodies which neutralize bioactivity in vitro. *J. of Immunology*. (1988); 131-137.
- Berkarda, B; Bouffard, E. Dermann, U. Agents and Action. (1983): 13.
- Berry, N.; Katsuhiko, A.; Akira, K. *Proc. Natl. Acad.* (1990): 87: 2294 – 2298.
- Brüht, H. Cihak, J.; Niedermeier, M. Important role of Interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. (2009): 60: 1352 – 1361.
- Campbell, D. et al. Cloning and nucleotide sequence of the murine interleukin3 gene. *Eur. J. Biochem.* (1985) 150: 297 – 304.
- Chung, Y. et al. Human IL-3 (Multi-CSF): Identification by Expression Cloning of a Novel Hematopoietic Growth Factor Related to Murine IL-3. *Cell*. (1986); 3 -10.
- Clark. et al. Interleukin-3 (Chapter 3); Ed. Academic Press Limited. (1988)
- Dokter, W.; Esselink, M.; Sierdsema, J. Transcriptional and Posttranscriptional regulation of the Interleukin-4 and Interleukin-3 genes in human T cells. *Blood* (1993): 81 (1): 35 – 40.
- Dokter, W.; Sierdsema, S.; Esselink, M. IL-7 enhances the expression of IL-3 and Granulocyte-Macrophage-CSF mRNA in activated human T cells by post-transcriptional mechanisms. *The Journal of Immunology* (1993): 150 (7): 2584 – 2590.
- Ega, D. et al. The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarina and coumarin-related compounds. *Drug Metab. Rev.* (1990); 22: 503 – 529.
- Finn, G.; Kenealy, E.; Creaven, B. *Cancer Letter*. (2002): 183: 61 – 68.
- Galicchio, V.S.; Hulette, B.C.; Harmon, C. Toxicity of Coumarin (1,2-benzopyrone) on human peripheral blood mononuclear cells and human and murine bone marrow progenitor stem cells. *J. Biol. Response Mod.* (1989): 8: 116 – 121.
- Guba, S; Stella, G; Turka, L. Regulation of Interleukin 3 gene induction in normal human T cells. *J. Clin. Invest.* (1989): 84: 1701 – 1706.
- Hawwary, A.; Burrows, J.; Vadas, M. The Human IL-3 Locus is regulated cooperatively by two NFAT-dependent enhancers that have distinct tissue-specific activities. *The Journal of Immunology*. (2002): 1876 – 1886.

- Hongan, P.; Chen, L.; Nardone, J. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes and Dev.* (2003): 17: 2205 – 2232.
- Hoult, J.R.S.; Payá, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. (1996): 27: 713 – 722.
- Kaibuchi, K.; Takai, Y.; Nishizika, Y. *The Journal of Biological Chemistry.*(1985); 260: 1366 – 1369.
- Kay, J.E. The role of the stimulant in the activation of lymphocytes by PHA. *Exptl. Cell Res.* (1969): 185 – 187.
- Köh, M.s. and Willoughby, D.D.; A comparison of Coumarin and Levamisole on Parameters the Inflammatory Response. *Agents and Actions.* (1979): 9(3): 284 – 288.
- Lacy, A.; O’Kenedy, R.; Studies on coumarins on coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr. Pharm. Design* (2004): 10: 3797 – 3811.
- Lake, B.G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology* (1999): 37: 423 – 453.
- Leung, K.; Leung, P.; Kong, L. immunomodulatory effects of esculetina (6,7-dihydroxycoumarin) on murine lymphocytes and peritoneal macrophages. *Cellular and Molecular Immunology.* (2005): 2 (3): 181 – 188.
- López, J.S; Prado, G. H, Aguilar, D. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* (2004): 43: 275 – 283.
- Mangi, M.; Newland, A. *Cytokine, Cellular and molecular Therapy.* (1999): 5: 87 – 95.
- Manuele, M.G; Ferraro, G.; Barreiro, M.L. Comparative immunomodulatory effect of scopoletin on tumoral and normal lymphocytes. *Life Sciences.* (2006): 2043 – 2048.
- Marshall, M.E. et al. Effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine on peripheral blood lymphocytes, natural killer cells, and monocytes in patients with advanced malignancies. *J. Biol. Response Mod.* (1989): 62 – 69.
- Marshall, M.E.; Conley, D.; Hollingsworth, P; Effects of coumarin (1,2 benzopyrone) on lymphocyte, natural killer cell, and monocyte functions in vitro. *J. Biol. Response Mod.* (1989). 8 (1): 70 – 85.

- Marshall, M.E.; Rhoades, J.L.; Mattingly, C.; Coumarin (1,2 benzopyrone) enhances DR and DQ antigen expressions by peripheral blood mononuclear cells. *Mol. Biother.* (1991): 4: 204 – 206.
- Mayo, M.; Wang, X.; Algate, A. Synergy Between AUUUA motif disruption and enhancer insertion results in autócrina transformation of Interleukin-3 dependent hematopoietic cells. *Blood.* (1995): 86 (8): 3139 – 3150.
- Ming, X-F; Kaiser, M; Moroni, C. c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. (1998): 17 (20): 6039 – 6048.
- Möhler, J.L.; Williams, B.T.; Thompson, I.M. Coumarin (1,2 -benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (1994): 120: S35 – S38.
- Mosmman, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxic assay . *Immunol. Methods* (1983): 65: 55 – 63.
- Murphy, J.; Metcalf, D.; Young, I. A convenient method for preparation of an engineered mouse interleukin-3 analog with high solubility and wild-type bioactivity. *Growth Factors* (2010): 28 (2): 104 – 110.
- Nair, A.; Hirsch, H.; Colombi, M. Cyclosporin A promotes translational silencing of autócrina Interleukin-3 via Ribosome-associated deadenylation. *Molecular and cellular biology.* (1999): 19 (1): 889 - 897.
- Niemeyer, C; Sieff, C; Mathey-Prevot. Expression of human interleukin-3 (multi-CSF) is restricted to human lymphocytes and T-cell tumor lines. *Blood.* (1989): 73 (4): 945 – 951
- Otsuka, T. et al. Isolation and characterization of an expressible cDNA encoding human IL-3. *The Journal of Immunology.* (1988); 2288-2295.
- Ozu, M.; Koyano, N.; Nishida, J. Regulation of the IL-3 gene and structure and function of the IL-3 receptor. *Advances in Neuroimmunology.* (1992): 2 : 33 – 53.
- Papoian, R. et al. A sensitive ELISA for measuring recombinant human interleukin-3 in human plasma or serum. *Journal of Immunological Methods.* (1991); 161 – 165.
- Papoian, R.; Duffy, F.; Sanner, M. A sensitive ELISA for measuring recombinant human Interleukin-3 in human plasma or serum. *Journal of Immunological Methods.* (1991): 145: 161 – 165.

- Pelkonen, O.; Raunio, H.; Rautio, A. The metabolism of Coumarin. In: O'Kennedy R.; Thornes, R.D.; editors. *Coumarins Biology, applications and mode of action*. Chichester, John Wiley and sons Ltd.; (1997): 67 – 92.
- Peterseim, U.; Sarkar, S.; Kupper, T. Production of IL-3 by non-transformed: primary neonatal murine keratinocytes: Evidence for constitutive IL-3 gene expression in neonatal epidermis. *Cytokine* (1993): 5 (3): 240 – 249.
- Phillips, J.A.; López, A.F.; Milton, M.A. Synthesis and expression of the gene encoding human interleukin-3. *Gene*. (1989): 84: 501 – 507.
- Roskopf, F; Kraus, J.; Franz, G. Immunological and antitumor effects of coumarin and some derivative. *Pharmazie*. (1992): 47 (2): 139 – 142.
- Ryan, G.R.; Milton, S.E; López, A.F. Human Interleukin-3 mRNA accumulation is controlled at both the transcriptional and posttranscriptional level. (1991). *Blood*: 77 (6): 1195 – 1202.
- Scheel, L.D. et al. The Biological action of coumarins. *Microbiol Toxins*. (1972); 8: 47 – 66.
- Schroeder, J.; Chichester, K.; Bieneman, A. Human Basophils Secrete IL-3: Evidence of autócrina priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *J. Immunol*. (2009): 182: 2432 – 2438.
- Silvennoien, O. et al. Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci*. (1993); 84: 8429- 8433
- Stoecklin, G.; Hahn, S.; Moroni, C. Functional hierarchy of AUUUA motifs in mediating rapid Interleukin-3 mRNA decay. *The Journal of Biological Chemistry* (1994): 269 (46): 28591 – 28597.
- Stuhlmeier, K; Theyer, C; Baumgartner, G.; Synergistic effect of coumarin (1,2 benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin. Exp. Immunol*. (1991): 84: 317 – 323.
- Thornes, R.D.; Daly, L.; Lynch, G. Treatment with Coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. (1994): 120: S32 – S34.
- Van Angerer, E. et al. Antitumor activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. (1994); 120: S14-16.
- Van Straaten, J.F; Dokter, W.H; Stulp, B. The regulation of Interleukin 5 and Interleukin 3 gene expression in human T cells. *Cytokine*: (1994): 6 (3): 229 – 234;

Wodnarfilipowicz, A; Moroni, C. Regulation of interleukin 3 mRNA expression in mast cells occurs at the posttranscriptional level and is mediated by calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1990): 87 : 777 – 781)

Yang, Y.; Ciarletta, A.; Temple, P. Human IL-3 (Multi-CSF): Identification by Expression Cloning of a Novel Hematopoietic Growth Factor Related to Murine IL-3. *Cell.* (1986): 47: 3 – 10.

Yokota, T.; Lee, F.; Rennick, D. Isolation and characterization of a mouse cDNA clone that expresses mast-cell growth factor activity in monkey cells. *Proc. Natl. Acad.* (1983): 81: 1070 – 1074.

Zänker, K.S.; Blümel, G; Lange, J. et al. Coumarin in melanoma patients: An experimental and clinical study. *Drugs Clin. Res.* (1984): X(11): 767 – 774.

Ziltener, H. Glycosylation does not affect in-vitro biological activity of Interleukin-3. *Cytokine* (1993): 4 (5): 291 – 297.

Zlabinger, G.J.; Nöhammer, G.A.; Böhmig, J.E. Mode of action of coumarin in immune cells. (1994): 120: S17 – S18.

11. APÉNDICE

Preparación de reactivos y disoluciones.

EDTA 0.5 M

Se pesan 182.12 g de EDTA y se adicionan 700 mL de agua destilada en agitación constante, se adiciona NaOH hasta pH= 8.0 para la disolución del EDTA. Se ajusta a 1 L. Se agita hasta su completa disolución.

TRIS-CL 0.1 M

Se pesan 157.6 g de Tris y se adicionan 700 mL de agua destilada en agitación constante, se ajusta hasta pH= 8.0, se lleva hasta 1 L. Se agita hasta su completa disolución.

AMORTIGUADOR TAE 50X (TRIS-ACETATO-EDTA)

Se pesan 242 g de Tris base y se adicionan a 700 mL de agua destilada, se agregan 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0.5 M. Se ajusta hasta volumen final de 1 L y se agita constantemente. Se hace dilución para obtener TAE 1X (1mL TAE 50 X en 50 mL de agua destilada).

AMORTIGUADOR TE pH 7.4 (TRIS-EDTA)

Se prepara a partir de Tris-Cl 10 mM pH= 8 y EDTA 1 mM pH= 8.0, finalmente se ajusta el pH a 7.4.

AMORTIGUADOR DE CARGA 6X

0.1 % de azul de bromofenol, 0.2 M de EDTA, Ficoll al 15 % a temperatura ambiente. Se diluye con amortiguador TE a 1X.

GELES AGAROSA AL 2%

Se pesan 0.5 g de agarosa (Invitrogen) y se humecta con 25 mL de amortiguador TAE 1X, se calienta en microondas hasta que se funde. 3.5 minutos a un 20 % de potencia. Se deja enfriar a 60 °C para adicionar 1.25 µL bromuro de etidio (10 mg/mL, Sigma) para que el gel tenga una concentración final de 0.5 µg/µL. Se deja solidificar a temperatura ambiente y 10 minutos a 4 °C.

NH₄Cl PARA LISIS DE ERITROCITOS

Se prepara Tris-base 17 mM a pH 7.2, por cada 100 mL de éste reactivo se adicionan 0.763 g de NH₄Cl para tener una concentración final de 144 mM NH₄Cl

PBS 10X

Se prepara 1L de fosfato di básico: Hidratado 42.2 g o anhidro =21.29 más 87. 66 g de NaCl. Se preparan 100 mL de fosfato mono básico y se adiciona a la disolución anterior. Y se ajusta el pH a 7.4

NaOH 0.5 M

Se pesan 20 g de NaOH y se disuelven en 1 L de agua bi-distilada.

AMORTIGUADOR DE LISIS (PURIFICACIÓN DNA)

Se prepara una disolución 200 mM de NaCl (11.7 g para 1 L), se adicionan 9.306 g de EDTA (concentración final 25 mM EDTA) y 5 g de SDS (concentración final 0.5 % SDS).