

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO y DE DIAGNOSTICO EN  
SALUD (SELADIS)



MODULACION DE LA RESPUESTA  
AUTOINMUNE EXPERIMENTAL POR Savia  
de *Musa Paradisiaca* (SMP)

Postulante:

Univ. Álvaro Martín Bonsak Arce

Tesis para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica

La Paz - Bolivia  
2006

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO EN  
SALUD



“MODULACION DE LA RESPUESTA  
AUTOINMUNE EXPERIMENTAL POR Savia de  
*Musa Paradisiaca* (SMP): Establecimiento  
de las condiciones óptimas para evaluar la  
actividad inmunomoduladora humoral y  
celular contra colágeno tipo II”

Postulante : Univ. Álvaro Martín Bonsak Arce

Asesor : Dr. Roger Carvajal S., PhD.

Tesis para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica

La Paz - Bolivia  
2006

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por tener a mi madre que inspira mi vida, por mi hermana que me demostró que la voluntad lo puede todo, por darme una familia que encuentra la fuerza en la unidad.

Agradezco a Dios por haber sido asesorado y guiado por el Dr. Roger Carvajal, que posibilitó cumplir este sueño, heredándome el legado de su sabiduría y conocimiento científico y enseñándome que la inteligencia no se pregona sino se demuestra.

Agradezco a Dios por permitirme formarme en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas con Docentes predispuestos a ayudar y enseñar, plantel Administrativo honesto y cooperador, compañeros y amigos que me brindan su amistad.

Agradezco a Dios por permitirme encontrar el complemento a mi vida, Carmen quien impulsa mi destino.

Agradezco a Dios por poner pruebas en mi camino para creer mas en Él y saber que lo que uno hace en la vida sino cuesta esfuerzo y dedicación no vale la pena.

### **DEDICATORIA**

*A quien con sabiduría infinita guió mi vida  
mientras duro la suya*

*De quien recibí tanto amor y abrazos  
mientras pudo dármelos*

*Con quien reímos, jugamos, lloramos  
mientras pudimos hacerlo*

*A Rosa E. Ortiz Vda. de Arce, mi abuelita,  
mi mamitay que es y será*

*Por siempre la luz de mis días, la fuerza en  
mi corazón y la paz en mi alma*

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I INTRODUCCIÓN.	1
II ANTECEDENTES	2
A Origen etnobotánico de la <i>Musa paradisiaca</i>	5
B Validación científica de las propiedades de la Savia de <i>Musa Paradisiaca (Smp)</i>	6
1 Estudios locales	6
2 Estudios internacionales	7
C Características fitoquímicas de la <i>Smp</i> con implicancia inmunomoduladora	8
D Colágeno como antígeno	11
E Modelo Experimental Artritis Inducida por Colágeno II (C.I.A.)	14
III MARCO TEORICO	17
A Autoinmunidad	17
B Mecanismos generales de autoinmunidad	24
C Modelos animales de autoinmunidad	26
D Acercamiento terapéutico para enfermedades autoinmunes	26
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
V PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
VI JUSTIFICACIÓN	31
VII PROPÓSITO DEL ESTUDIO	31
VIII RUTA CRITICA	32
IX OBJETIVOS	33
X HIPÓTESIS	34
XI MATERIAL Y METODOS	35
A Extractos	35
B Modelo Animal	39
C Diseño Experimental	40

D	Diseño de Investigación	42
E	Estandarización de Procedimientos	42
	1 Inducción de CIA	42
	2 Cuantificación de Anticuerpos anti-CII circulantes	46
	3 Bioensayo <i>in vitro</i> de activación de esplenocitos por reducción de sales de tetrazolio	55
F	Efectos de <i>Smp</i> sobre modelo experimental de autoinmunidad	63
XII	<b>RESULTADOS</b>	65
A	Extractos	66
	1 Savia de <i>Musa paradisiaca</i> ( <i>Smp</i> )	66
	a. Especificaciones Organolépticas	66
	b. Preparación y Conservación	66
	2 Extracto Antigénico.	67
B	Estandarización de Procedimientos	70
	1 Inducción C.I.A. en ratones <i>Balb/c</i>	70
	2 Cuantificación de Anticuerpos anti- Colágeno II circulante	72
	3 Bioensayo <i>in vitro</i> de Activación de Esplenocitos por Sales de Tetrazolio	77
C	Valoración del Efecto Inmunomodulador de Savia de <i>Musa Paradisiaca</i> ( <i>Smp</i> ) sobre el modelo experimental de autoinmunidad anti colágeno II, aplicando técnicas <i>ex vivo</i> estandarizadas.	81
	1 Efecto sobre la respuesta Celular	81
	2 Efecto sobre la respuesta Humoral	83
XIII	<b>DISCUSIÓN</b>	88
XIV	<b>CONCLUSIÓN</b>	96
XV	<b>RECOMENDACIONES</b>	98
XVI	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	100

## RESUMEN

Los procesos autoinmunes y su severidad, por su etiología desconocida con reactividad inmunológica contra diversas estructuras propias o autoantígenos, requiere de alternativas terapéuticas no citotóxicas que modulen el sistema inmunológico.

El extracto de Savia de *Musa paradisíaca* (*Smp*) obtenido a partir del psudotallo es un producto natural con antecedentes empíricos en etnomedicina de nuestro país aplicado como anti-inflamatorio, protector del daño tisular y resorción ósea en artritis reumatoide, mientras que estudios de validación científica demostraron su actividad inmunomoduladora en Tuberculosis pulmonar, estableciéndose su margen de seguridad preclínica.

En este estudio se evaluó la *Smp* como inmunomodulador de la autoinmunidad experimental murino inducida por Colágeno tipo II (CII) bovino vía subcutánea. Se trataron a los ratones con *Smp* vía oral a dosis 1ml/Kg, 3.3 ml/kg y 10 ml/kg. Las 3 dosis de *Smp* se ensayaron en tiempos determinados por el Calendario de Inmunización (ANTES: 7d. Antes de 1ª inmunización (CII+CFA); DURANTE: A partir de la 1ª inmunización; DESPUÉS: A partir de la 2ª inmunización (CII+IFA)).

La estandarización de la extracción de CII, inmunización con CII, Sistema E.L.I.S.A., y Bioensayo MTT previamente a la evaluación de *Smp* como inmunomodulador de autoinmunidad experimental, estableció que el CII tiene efecto inductor de inmunogenicidad, el monitoreo del peso corporal de los ratones durante la experimentación esta relacionado a la inmunomodulación de *Smp* a tiempo DURANTE. El Sistema E.L.I.S.A. estandarizó el coating o pegado (2-5 ug/ml), dilución de suero hiperinmune (1/30), y dilución del Conjugado HRP-IgG cabra anti-Fc Ig raton (1/105). El Bioensayo MTT estandarizó el tiempo optimo de activación de esplenocitos incubados *ex - vivo* (8 horas) y la dilución de CII para la activación *in vitro* (1/ 1000).

La actividad inmunomoduladora de *Smp* a tiempo DURANTE , dosis 10 ml/kg, moduló el equilibrio Th1/Th2 potenciando la respuesta inmune mediada por anticuerpos, siendo la respuesta celular suprimida considerándose las clonas autoreactivas anérgicas o apoptóticas.

De estos resultados se concluye que la *Smp* tiene actividad sobre autoinmunidad experimental inducida por colágeno, dependiente de la dosis y tiempo de administración, incluyendo un efecto anti inflamatorio a estudiar, para una terapia potencial a nivel clínico.

**PALABRAS CLAVE**: *Smp* Savia de *Musa paradisíaca*; CIA Artritis inducida por Colágeno II; CFA Adyuvante Completo de Freund; IFA Adyuvante Incompleto de Freund; E.L.I.S.A Ensayo Inmunoenzimatico; MTT sal monotetrazolica reducida en células vivas o apoptóticas.

## ABSTRACT

The autoimmunity processes and their severity, for their unknown etiology with immunologic reactivity against diverse own structures or autoantigens, it requires of alternatives therapeutic non cytotoxic that modulate the immunologic system.

The extract of Sap of *Musa paradisiaca* (*SMP*) obtained starting from the pseudo-stem it is a natural product with empiric antecedents in ethnomedicine of our country applied as anti-inflammatory, protective of the damage tissue and bony resorption in arthritis reumatoid, while studies of scientific validation demonstrated their immunomodulatory activity in lung Tuberculosis, settling down their margin of preclinical security .

In this study was evaluated the *SMP* like immunomodular of the experimental autoimmunity mice induced by Collagen type II (CII) bovine subcutaneous injection. They talked to the mice to *SMP* orally to dose 1ml/Kg, 3.3 ml/kg and 10 ml/kg. The 3 doses of *SMP* were rehearsed in times determined by the Calendar of Immunization (BEFORE: 7d. Before 1<sup>a</sup> immunization (CII+CFA); DURING: Starting from the 1<sup>a</sup> immunization; LATER: Starting from the 2<sup>a</sup> immunization (CII+IFA)).

The standardization of the extraction of CII, immunization with CII, E.L.I.S.A system., and MTT Bioassay previously to the evaluation of *SMP* like immunomodular of experimental autoimmunity, it established that the CII has effect inducing immunogenicity, the supervision of the corporal weight of the mice during the experimentation this related to the immunomodulation of *SMP* on time DURING. The E.L.I.S.A.system it standardized the coating (2-5 ug/ml), dilution of serum hiperimmune (1/30), and dilution of the Conjugated HRP-IgG goat anti-Fc Ig mouse (1/105) .The MTT Bioassay standardized the good time of former activation of splenocytes incubated *ex-vivo* (8 hours) and the dilution of CII for the activation *in vitro* (1 / 1000).

The immunomodulatory activity of *SMP* on time DURING, dose 10 ml/kg, modulated the balance Th1/Th2 increased the potentiality of the immune answer mediated by antibodies, being the suppressed cellular answer being considered the autoreactivity subpopulations anergic or apoptotic.

From the results, it was concluded that the *SMP* has activity it has more than enough experimental autoimmunity induced by collagen II, clerk of the dose and time of administration, including an effect anti-inflammatory to study, for a potential therapy at clinical level.

**KEY WORDS:** *SMP* Sap of *Musa paradisiaca*; CIA. Collagen II Induced Arthritis ; CFA Complete Freund's Adjuvant; IFA Incomplete Freund's Adjuvant; E.L.I.S.A Enzyme Linked Immunosorbent Assay; MTT monotetrazolium salt reduced in alive cells or apoptotics.



## I INTRODUCCIÓN.

Desde la descripción de los procesos autoinmunes realizada por Erlich, se ha cuestionado el rol del sistema inmunológico en el desencadenamiento y patología de estos procesos, realizándose innumerables estudios de los mecanismos inmunológicos regulatorios y efectores que podrían involucrar la remisión de la patología autoinmunitaria.

Es así que la multifactorialidad y las complejas características clínicas de los procesos y enfermedades autoinmunes, han conducido a la síntesis y diseño de drogas cuyos mecanismos de acción deben ser combinados, demostrando citotoxicidad de estirpes celulares inmunocompetentes en muchos casos, por lo que el aumento de la relación riesgo/beneficio es frecuente en estas asociaciones farmacológicas.

Sin embargo, son siglos de la existencia de las enfermedades autoinmunes, que como toda enfermedad, constituyó parte de la problemática socioeconómica de muchas culturas en el mundo.

Las estrategias empíricas en etnobotánica y etnomedicina de diversas culturas llevaron a la búsqueda de sustancias de origen natural con capacidad nutricional y medicinal sobre enfermedades autoinmunes, mecanismos que otorgarían a estas sustancias una actividad inmunomoduladora en estos procesos.

La aplicación de estudios preclínicos de autoinmunidad, más estrechamente del Modelo de artritis experimental inducida por colágeno tipo II (C.I.A.) ha posibilitado el estudio de especies botánicas como *Ulmus davidiana* así como extractos de té verde, aplicados empíricamente en su par humano, la artritis reumatoide.

La validación científica de la capacidad inmunomoduladora de Savia de *Musa paradisiaca* (*SMP*) sobre procesos autoinmunes, debió primeramente reproducir el modelo experimental de autoinmunidad inducida por colágeno tipo II, estableciéndose la reactividad inmunogénica en respuesta al colágeno exógeno. Partiendo de esta evidencia, se desarrolló el ensayo para la valoración de la capacidad inmunomoduladora de *SMP* sobre el modelo experimental de autoinmunidad, para el cual se diseñó y trabajó en base a un esquema de tiempos y dosis de administración de *SMP* en relación al calendario de inmunización, paralelo al cual se estandarizaron las técnicas E.L.I.S.A. y el Bioensayo MTT. Finalmente, aplicando los procesos y técnicas estandarizadas, se determinó *in vitro* (E.L.I.S.A.) y *ex vivo* (Bioensayo MTT) la capacidad inmunomoduladora de *SMP* (en dosis y tiempo de administración) sobre la respuesta humoral y celular.



## II ANTECEDENTES

El proceso salud-enfermedad en el humano, puede ser modificado por las propiedades de diversas plantas medicinales propias de culturas que desarrollaron métodos primitivos de elaboración de fitofármacos capaces de aliviar síntomas de enfermedades o enriquecer su dieta.

Es así que, el estudio de cuevas de Neandertales que vivieron hace 60000 años<sup>205</sup>, por análisis de suelos y restos óseos del lugar, demostraron la presencia de 8 especies vegetales de las cuales siete están relacionadas a investigaciones etnobotánicas y forman parte de farmacopeas<sup>19,97</sup>.

En los últimos años, en regiones mundiales ricas en recursos botánicos ligados a la cultura medicinal, se han realizado numerosas investigaciones etnobotánicas sobre la base de inventarios de plantas útiles, a los estudios sobre las relaciones entre las plantas y la cultura, y a las interpretaciones sobre el impacto de las plantas en la cosmovisión de la sociedad y en su economía<sup>58</sup>.

Actualmente, un cuarto de las drogas prescritas y dispensadas por las farmacias comunitarias en Estados Unidos, contiene por lo menos un ingrediente activo derivado de plantas medicinales.<sup>62,97,58</sup> Todos estos fitofármacos en estudio o ya implementados en producción farmacéutica, corresponden a trabajos sustentados en la visión actual de la **Etnobotánica** por lo que el principal método de investigación es la recolección de la información de los usos médicos de las plantas en la comunidad y confieren un importante valor al manejo de las plantas.

"La **Etnofarmacología** es la exploración científica interdisciplinaria de los agentes bioactivos tradicionalmente empleados u observados por el hombre"<sup>28</sup>. Tiene como objetivo el análisis de las acciones farmacológicas, de los impactos fisiológicos y clínicos del uso de las plantas en la salud humana y el de encontrar compuestos químicos importantes en la flora medicinal nativa<sup>55</sup>.

Definitivamente, ambas aplicaciones actuales de la etnomedicina dependieron y lo seguirán haciendo, de la medicina tradicional. Esta ciencia popular de culturas completas merece la preocupación de diversos investigadores con relación a la pérdida de memoria histórica de las poblaciones:

"Es preocupante observar como culturas completas, actualmente reposan en solamente algunas personas viejas y sabias, relictos de ancestrales comunidades, con lengua antigua, dialecto que solo ellas conocen y en los cuales se han narrado la tradición y la ciencia popular a través del tiempo. Hoy desaparece paulatinamente y mañana morirá con ellos" <sup>175,58</sup>

Según diversos autores, la investigación etnobotánica tiene varios aspectos de vital importancia que pueden contribuir de forma notable al progreso de la ciencia. 1) la protección de las especies vegetales en peligro de extinción; 2) el rescate de los conocimientos sobre los vegetales y sus propiedades, que poseen las culturas que están en peligro de rápida desaparición; y 3) la domesticación de nuevas plantas útiles, o en términos más amplios, la conservación del plasma genético de las plantas económicamente prometedoras. <sup>192</sup>

Las observaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas aportan informaciones inestimables sobre la relación entre cultura y naturaleza. Como hipótesis de trabajo muchos autores plantean el hecho de que "mientras más aculturada es una comunidad, más extensivo es el uso de las plantas y mayor el número de especies medicinales utilizadas, así mismo, para un mayor número de afecciones" <sup>118,58</sup> Las plantas introducidas tienen un uso extenso debido a su valor medicinal, a su propiedad primaria como alimento ( ejemplo: *Musa paradisíaca*), y a otras aplicaciones medicinales ( ejemplo. Gel de Aloe vera) <sup>17,150,193,27</sup>.

La conclusión de una investigación etnobotánica mas allá del origen de la planta se rige a criterios de validación científica con relación al estudio de sus propiedades y a los métodos que se emplean para tal efecto <sup>58</sup>. Un concepto básico señala que si se demuestra que una determinada planta ha sido usada en terapéutica humana durante siglos, debe concederse, de alguna manera, un cierto grado de credibilidad a su eficacia y un bajo índice de toxicidad a sus principios activos <sup>139</sup>.

Massó Lago y colaboradores proponen que las fases de la investigación de un fármaco de origen vegetal deberían ser las siguientes <sup>140</sup>.

1. Investigación etnobotánica e identificación de las muestras.
2. Screening farmacológico.
3. Extracción cuantitativa, purificación y evaluación farmacológica.
4. Determinación estructural o de composición.
5. Síntesis y modificación estructural.
6. Evaluación toxicológica.
7. Evaluación clínica.

Nosotros trabajamos con otros criterios y por lo tanto proponemos la siguiente secuencia:

1. Investigación etnobotánica
2. Estudio clínico preliminar ( validación de uso)
3. Evaluación toxicológica
4. Modelo preclínico experimental
5. Estudio clínico
6. Estudios de mecanismos de acción en Modelos animales
7. Aislamiento bioguiado
8. Determinación estructural
9. Evaluación biofarmaceutica

Si bien muchas investigaciones pueden dirigirse por diversos objetivos que condicionan su estudio, en el proceso de validación que se realice deben existir criterios básicos:

El uso consuetudinario de una planta de la medicina tradicional, puede acreditar seguridad sobre su eficacia y la carencia de efectos tóxicos. Validar una planta medicinal de uso tradicional o popular es, en sentido estricto del término, comprobar los beneficios de su uso en la especie humana, es decir, garantizar que el fitoterápico es eficaz y de baja toxicidad<sup>58</sup>. Los componentes antinutricionales como los minerales, fenoles, alcaloides, saponinas, esteroides y otros pueden ser analizados por ensayos fitoquímicos por pruebas rápidas de evaluación cualitativa por cambios de coloración, o mediante métodos calorimétricos usando espectrofotómetro UV/VIS. Estas pruebas resultan importantes en evaluación de efectos toxicológicos de diferentes extractos vegetales con elevada cantidad de elementos antinutricionales, y especialmente en procesos metabólicos modificados a causa de su consumo animal y humano<sup>241</sup>.

Lo fundamental es considerar a las plantas medicinales como medicamentos y, consecuentemente, hacer una validación como si se tratara de cualquier compuesto de síntesis. Los modernos protocolos de validación de medicamentos a ser utilizados en la especie humana tienen dos etapas que se diferencian por los sujetos en los que se realizan los ensayos

La denominada **etapa preclínica** debe ser realizada en 3 especies de animales de laboratorio, una especie debe ser no roedora. Los objetivos fundamentales de esta validación preclínica son:

- a) Comprobar la efectividad con métodos farmacológicos *in vivo*, reservando las preparaciones *in vitro* para estudiar los mecanismos de acción.
- b) Evaluar el potencial de toxicidad en test o ensayos agudos y crónicos con dosis repetidas acompañando las determinaciones hematológicas, de bioquímica plasmática y anatomo-patológica.

Con la aplicación de todos estos exámenes es posible determinar el margen de seguridad del medicamento. Una vez concluida esta etapa preclínica, una planta tiene los prerequisites éticos para ser testada en seres humanos, inicialmente en voluntarios sanos y después en voluntarios enfermos. Se deben tomar los más estrictos cuidados en cuanto al control de la toxicidad interrumpiendo inmediatamente el tratamiento cuando se detecte cualquier alteración patológica provocada por la droga que se está ensayando.

En una **segunda etapa preclínica** los medicamentos activos en voluntarios son estudiados con una batería de ensayos especiales tratando de determinar la interferencia del medicamento en la reproducción, mutagenicidad, carcinogénesis y dependencia <sup>124</sup>. Solo así puede quedar listo un medicamento eficaz e inocuo <sup>58</sup>.

Existen resultados de investigaciones de Proyectos diversos, en los que se mencionan y estudian numerosas plantas medicinales con un criterio de validación estricto y novedoso. Una de las plantas más estudiadas y que es base de este estudio es la *Musa paradisiaca*. ( Estudios locales pg.6)

## A ORIGEN ETNOBOTANICO DE LA MUSA PARADISIACA

Según la clasificación taxonómica, las bananas y plátanos pertenecen a la familia *Musaceae*, género *Musa*, la cual incluye a especies productoras de frutas como *Musa paradisiaca* con 50 variedades <sup>130</sup> y varias que tienen aplicación ornamental, decorativa, o en la industria. Como uso ancestral además tiene valor en alimenticio, en la vestimenta de etnias, y en la construcción de refugios y utensilios.

Por su origen genético, la *Musa paradisiaca* es un híbrido que procede de *M. acuminata Colla*, una especie de la que se encuentra ejemplares diploides (2n:22; AA) o triploides ( 3n:33; AAA) y *M. balbisiana Colla* especie dotada de características únicas del genero como su resistencia a enfermedades o plagas, tolerancia a drogas plaguicidas, y en general una mejor resistencia a factores ambientales. Es una especie diploide representada por BB. La migración logra la hibridacion de estas especies obteniéndose tres nuevos genotipos con sus respectivas frecuencias:

***M. acuminata* x *M. balbisiana* Colla: AB (1/2); AAB(1/4); ABB(1/4).**

La obtención de este híbrido comestible originado en el sudoeste de Asia, del Este al Sur de India, norte de Australia, Filipinas, Islas del este del Pacífico, incluyendo Hawai, tuvo su llegada a Europa en el siglo X, mientras que el Oeste de África, Sudamérica y Caribe se privilegio de la *Musa paradisiaca* el siglo XVI. Hoy se hallan inmensos cultivos en prácticamente toda la región tropical del mundo, otorgando movimiento económico importante<sup>158</sup>.

La aplicación medicinal remonta a antecedentes culturales de la región polinesia en Hawai, donde las virtudes medicinales de la Savia de *Musa paradisiaca* se utilizaron en procesos alérgicos como el asma, en problemas gastrointestinales combinando la Savia con el fruto, y en resolución de casos traumatológicos<sup>130</sup>.

La población cubana tradicionalmente utiliza la savia de *Musa paradisiaca* en el tratamiento de manifestaciones sintomatológicas de enfermedades respiratorias, con resultados alentadores<sup>81</sup>.

La revisión de aplicaciones medicinales de Savia de *Musa paradisiaca* en Bolivia, se basa en relatos ancestrales no publicados de su uso en prevención y tratamiento de enfermedades respiratorias, especialmente en la Tuberculosis Pulmonar, además de afecciones reumáticas de origen autoinmune aliviando su sintomatología y remitiendo el daño articular patológico.

## **B VALIDACIÓN CIENTÍFICA DE LAS PROPIEDADES DE LA SAVIA DE *Musa paradisiaca***

### **1 ESTUDIOS LOCALES**

El conocimiento de aplicaciones de la savia de *Musa paradisiaca* (*SMP*) relacionadas con sus efectos en tuberculosis pulmonar propuso el inicio de una serie de investigaciones que luego de encontrar un efecto microbicida leve, se enfoco hacia el estudio de actividad como inmunomodulador. Conclusión de varios estudios coincidieron en la capacidad de inhibir la síntesis de anticuerpos, carecer de efectos citotóxicos sobre tejidos especializados, además de potenciar la respuesta inmune celular<sup>33</sup>.

El trabajo realizado por la Dra. Patricia Gómez investigando la actividad inmunomoduladora de *SMP*, encontró que este producto si bien no evitaba la presencia de células plasmáticas, estas no producían anticuerpos contra un antígeno que se había inoculado (GRC) en ratones, verificando no ser citotóxico para células inmunocompetentes. Este estudio siguió en la evaluación del proceso fagocítico, en el que se halló un efecto estimulador de la actividad microbicida y en la captura<sup>78,77,33</sup>.

Los prometedores resultados condujeron a establecer nuevas estrategias de evaluación *in vitro*. Este trabajo realizado por la Dra. Katty Terrazas estableció sistemas biológicos estándares con múltiples aplicaciones en investigación y que hoy se utilizan en el estudio *in vitro* de la *Smp*<sup>221,220,33</sup>.

Con la intención de indagar en posibles mecanismos de acción, se trabajó en determinar el efecto inductor de IL-2 por *Smp*, este fue comprobado por resultados de laboratorio y fue ratificado por la Universidad de Buenos Aires<sup>33</sup>.

Un requerimiento del proceso de validación preclínica son los que establecen Márgenes de Seguridad en el uso del medicamento o fitofarmaco analizado. La investigación sobre Seguridad Preclínica, elaborado paralelamente al presente trabajo, por la Dra. Ximena Subieta quien no encuentra toxicidad en los componentes naturales de la *Smp*, con lo que establece el primer paso para aplicación clínica de este producto en tratamiento de la Tuberculosis.

Complementando a las propiedades de *Smp*, los estudios realizados por Noemí Tirado y Carla Villegas muestra que la *Smp* tiene efectos antimutagenicos, anticancerosos y antigenotóxicos<sup>225,33</sup>.

Todo lo anterior demuestra la necesidad y posibilidad de indagar el papel de la *Smp* en el control de la Respuesta Inmune contra autoantígenos, característica principal en el desarrollo de autoinmunidad y enfermedades autoinmunes en modelos experimentales<sup>47,207,104,105,219,232</sup>. La capacidad de modular disminuyendo la producción de anticuerpos, permitiría el manejo de procesos autoinmunes como la artritis reumatoide mediada por complejo inmunes fijados en moléculas de la estructura articular.

## 2 ESTUDIOS INTERNACIONALES

La utilidad terapéutica de Savia de *Musa paradísíaca* en tratamiento de enfermedades respiratorias crónicas como el asma bronquial, cuenta con reportes en la cultura polinesia de Hawai<sup>130</sup>, y tiene estudios clínicos no controlados sobre sus efectos en dicha enfermedad<sup>195,48</sup>. También se ha descrito su aplicación en estudios en animales de laboratorio, con acciones sobre el aparato cardiovascular y bloqueo de placa neuromuscular<sup>194,196,48</sup>.

Intentando respaldar y comprobar su aplicación en asma, un ensayo clínico controlado evaluando el "polvo" de *M. Paradísíaca* en el tratamiento de inter crisis del asma bronquial, obtuvo resultados con diferencias no significantes para las variables, por lo que se concluyó que el polvo de *Musa paradísíaca* careció de utilidad terapéutica en dicho estudio<sup>48</sup>.

Se ha comprobado que la Savia de *Musa paradisíaca* posee propiedades analgésicas y protege al sistema linfático y eritroide de la acción de los citostáticos<sup>125,177</sup>. Poblaciones Peruanas indígenas utilizan al látex de *Musa paradisíaca* para curar enfermedades como la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*)<sup>50</sup> y la Uta (*Leishmania brasiliensis peruvianum*)<sup>198</sup>.

El *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, protozoo de la misma familia que la *Leishmania* fue base para validar el efecto de látex de *M. paradisíaca*. Para este fin se utilizaron soluciones acuosas del látex y se probó el efecto tóxico en diferentes concentraciones sobre algunos estadios de *T. cruzi*. Un estudio de la capacidad tripanocida del "Látex" de *Musa paradisíaca*, hidrosoluble a diferentes dosis, y aplicado a diferente tiempo de incubación *in vitro*, permitió deducir, por sus resultados, que el látex tiene efecto sobre el crecimiento del parásito, mientras que *in vivo* se alcanzó poblaciones disminuidas 10 veces al control negativo<sup>198</sup>.

Las características químico-farmacéuticas y propiedades farmacológicas de extractos de *Musa paradisíaca* enmarcan un estudio en el que además se evaluó la actividad exploratoria de ratas neuroestimuladas, la cual disminuyó después de ser administrados los extractos<sup>64</sup>.

Análisis cromatográficos de componentes polisacáridos en fracciones hidrosolubles de savia de *Musa paradisíaca* obtenida de pseudotallo y hojas, revelaron los azúcares en mayor cantidad según el método empleado<sup>251,212,201</sup>.

Pruebas y ensayos toxicológicos de fitofarmacos elaborados a partir de extracto de pseudotallo de *Musa paradisíaca*, miel de abejas y propóleos, se realizaron como parte de evaluación preclínica en ratas Sprague Dawley, y para establecer el margen de seguridad que garantice el empleo como medicamento, (el cual no fue necesario establecer en este estudio), se concluyó que la DL50 es superior a 2 g/Kg como dosis límite<sup>81</sup>.

## C CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE LA SMP CON IMPLICANCIA INMUNOMODULADORA

La *Musa paradisíaca* es una planta monocotiledónea, de 7.62 m (25 pies) de alto promedio, con un pseudotallo o tallo no verdadero por ser la agregación cilíndrica de las bases de las hojas que llegan a 2.74 m(9 pies) de largo y con una porción perenne cercana a la tierra. La longitud total del pseudotallo desde el momento de la producción del fruto a los 9-12 meses de edad hasta los 4-5 años de excelente producción frutal, contiene Savia en gran cantidad la que por desagregación de capas del pseudotallo puede ser recolectada fácilmente<sup>209</sup>.

Como fruto, su composición química en 100 g de la parte comestible esta dada de la siguiente manera:

- proteínas 1,5 g
- carbohidratos 68 g
- fibra 1,1 g
- cenizas 1,2 g
- calcio 10 mg
- fósforo 80 mg
- hierro 0,8 mg
- caroteno 0,72 mg
- tiamina 0,11 mg
- riboflavina 0,22 mg
- niacina 0,90 mg
- ácido ascórbico 1,4 mg<sup>204</sup>

La familia *Musaceae* presenta los siguientes componentes químicos no alimenticios:

- Fructosanas
- ácido fenólico
- antocianinas
- terpenoides
- esteroides
- alcaloides aislados como la amina alcalóidica y alcaloides indólicos<sup>231,198</sup>

Respecto a la composición de la savia o látex de *Musa paradisíaca*, se encontró una lectina inductora de síntesis de Ac tipo IgG4 homocitotópicos como la IgE, con efecto competitivo en la fijación a mastocitos, bloqueando la reactividad anafiláctica<sup>81,119</sup>.

El elevado contenido de sustancias tánicas y polifenólicas esta relacionado a la resistencia de la planta a infecciones, mientras que la concentración de oligoelementos y vitaminas es similar a los que se encuentra en fruto y parece ser suficiente para potenciar las aplicaciones medicinales a escala inmunológica<sup>170,81</sup>.

Procesos de obtención de fracciones fenólicas y extractos fluidos de Savia de *Musa paradisíaca*, aplicados al estudio de propiedades como la peroxidación lipídica en modelo *in vivo*, demostraron la disminución de esta actividad dependiente de dosis con ambos extractos. El extracto produjo inhibición de edema en pata con carragenina para la prueba antiinflamatoria y aumento del umbral de dolor como efecto analgésico<sup>64</sup>.

Por métodos analíticos se determinó la presencia de componentes polisacáridicos presentes en fracciones savia de *Musa paradisiaca* obtenidas por solventes hidrofílicos, se pudo identificar la D-glucosa, L-arabinosa, D-Xilosa, y una amilopectina de tipo D-glucano como carbohidratos elementales caracterizados fisicoquímicamente<sup>251,212,201</sup>.

Otros estudios de fracciones hidrosolubles por análisis cromatográficos determinan el contenido de polisacáridos en arabinosa, xilosa, ácido galacturónico como azúcares en mayor cantidad, encontrándose trazas de galactosa, ramnosa, manosa, y residuos de glucosa. Por metilación, amilopectinas tipo I fueron identificadas como arabinoxilano, arabinopiranosil unidos a arabinogalactano, todos verificados por prueba de oxidación peryodato<sup>201</sup>.

Existen diversas moléculas presentes en *SMP*, las que tienen notables efectos inmunomoduladores a distintos niveles y que pudieran tener implicancia en el modelo experimental de autoinmunidad reproducido.

Las lectinas tienen propiedades biológicas como aglutinación de células y virus, inducción mitógena, y citotoxicidad sobre linfocitos (inmunosupresión)<sup>24,178,173</sup>.

Las lectinas también inducen IgG4 homocitotrópica en anafilaxia<sup>81,119</sup> las que podrían favorecer la síntesis de Ig competitivas con complejos inmunes en estructuras articulares.

Experimentalmente los flavonoides poseen actividad anti inflamatoria, producen aumento del umbral de dolor<sup>64,195,194</sup>, corrigen errores metabólicos en Diabetes por mecanismos no totalmente esclarecidos<sup>164,156</sup>, y actúan contra ciertos microbios y virus<sup>134</sup>.

Existe evidencia de la actividad vascular y bioquímica de los Flavonoides en Inhibición de la hialuronidasa y en aumento de hidroxilación de Prolina y Lisina, mecanismos que incrementan la estabilidad y resistencia de colágeno a factores degradativos<sup>56</sup>.

Los taninos según su peso molecular puede intercalarse en espacios interfibrilares de cartílago. Así, las antocianidinas bloquean específicamente enzimas mediadoras de inflamación y protegen a plaquetas modificando la vía de las prostaglandinas<sup>86</sup> y merece especial atención la capacidad protectora y estabilizadora de las antocianidinas, formando enlaces o puentes interfibrilares en colágeno, proteína que es base de nuestro estudio<sup>183,170,81</sup>.

Los terpenos cumplen función antioxidante, protegiendo membranas, la sangre y otros fluidos corporales de agresión por radicales libres. Los xantófilos, actúan potenciando la respuesta inmune y protegiendo las células de la piel <sup>16,172,134</sup>, además de proteger de la oxidación a vitamina A y E. La vitamina C se relaciona con el mantenimiento de la estructura del colágeno en tejido conectivo <sup>56</sup>.

## D COLAGENO COMO ANTIGENO

La identificación de estructuras articulares como blancos para la instauración de autoinmunidad, o desarrollo de enfermedades autoinmunes, es fundamental en modelos de autoinmunidad experimental.

En este trabajo, el colágeno tipo II representa el antígeno del modelo de artritis autoinmune por inducción con autoantígeno o Collagen Induced-Arthritis (CIA).

Varias investigaciones han demostrado que la capacidad del Colágeno tipo II en inducción de artritis por respuesta humoral, la aplicación terapéutica en procesos autoinmunes por inducción de tolerancia oral, y en inducción por anticuerpos monoclonales hacia colágeno Tipo II.

Existe además evidencia que demuestra alteración en la síntesis de colágeno tipo II, encontrándose un aumento de polipeptidos de pro colágeno en cartílago durante un proceso Osteoartrítico, lo cual no se refleja en los niveles de suero <sup>61</sup>.

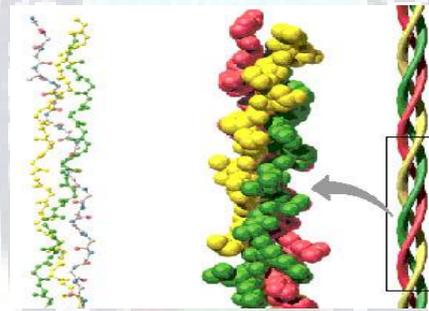
El colágeno tipo II constituye el mayor componente proteico en cartílago (15- 25 %), siendo aproximadamente la mitad del peso seco de cartílago <sup>182,61</sup>, representando 90 - 95 % del total de colágeno contenido en tejido <sup>142,87,61</sup>

Las proteínas fibrilares de colágeno de tipo II están constituidas por tres cadenas codificadas en los cromosomas 7 y 17 de los osteoblastos y fibroblastos. Son 3 cadenas aminoácidas 1 alfa <sup>184,187</sup>, codificadas por los genes COL1A1 y, son altamente susceptibles a la actividad de factores de transcripción que pueden alterar su síntesis, originando otro tipo de enfermedades como:

- Síndrome de Ehlers-Danlos: reciben este nombre un conjunto de por lo menos 10 desórdenes que son clínica, genética y bioquímicamente diferentes, pero que se manifiestan todos ellos por una debilidad estructural del tejido conjuntivo.
- Osteogénesis imperfecta: se conocen al menos 4 enfermedades con este nombre caracterizadas por fracturas múltiples y deformidades

- Escorbuto: resulta de la deficiencia de vitamina C en la dieta, con lo cual no puede formarse la hidroxiprolina ya que la enzima lisil-oxidasa necesita esta vitamina como cofactor. El colágeno de los enfermos de escorbuto es menos estable de lo normal lo que explica muchas de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad
- Síndrome de Marfan: un desorden del tejido conjuntivo que afecta sobre todo a los sistemas musculoesquelético y cardiovascular y a los ojos. Los pacientes muestran una complejión asténica, con estatura alta, largos brazos y manos y dedos como los de una araña. La musculatura está pobremente desarrollada, con poca grasa subcutánea y una gran laxitud de las articulaciones y ligamentos. La enfermedad se debe a una mutación del gen *FBN1* que codifica la fibrilina-1<sup>122</sup>.

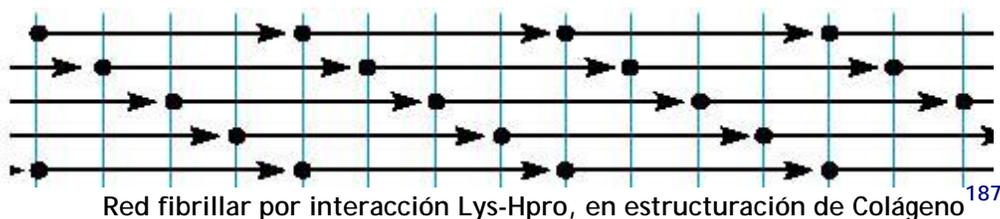
El proceso de síntesis de Colágeno Tipo II forma hélice de tres cadenas idénticas de 35 kDa, unidos covalentemente por puentes disulfuro pueden ser detectados en la matriz extracelular por métodos inmunohistoquímicos<sup>126</sup>.



Estructura molecular de colágeno la formación de hélice tricaténaria 1-alfa, hasta la formación de fibrillas<sup>187</sup>

Las moléculas de pro colágeno II o tropo colágeno son secretadas de la célula hacia la matriz extracelular donde actúan C- y N-proteinasas específicas<sup>176</sup> y se forman las fibrillas las cuales contienen en su región central un elevado contenido de Glicina cada tres aminoácidos y existe la conversión aminoacídica de prolina a hidroxiprolina que constituye el 9,9 % de aminoácidos totales<sup>187</sup>.

Las fibrillas se ordenan por formación de enlaces de lisina en forma de aldehído con hidroxiprolina de otras fibrillas<sup>122</sup>, formando redes de estructuras sobrepuestas a  $\frac{1}{4}$  de la plantilla paralela<sup>61</sup>.



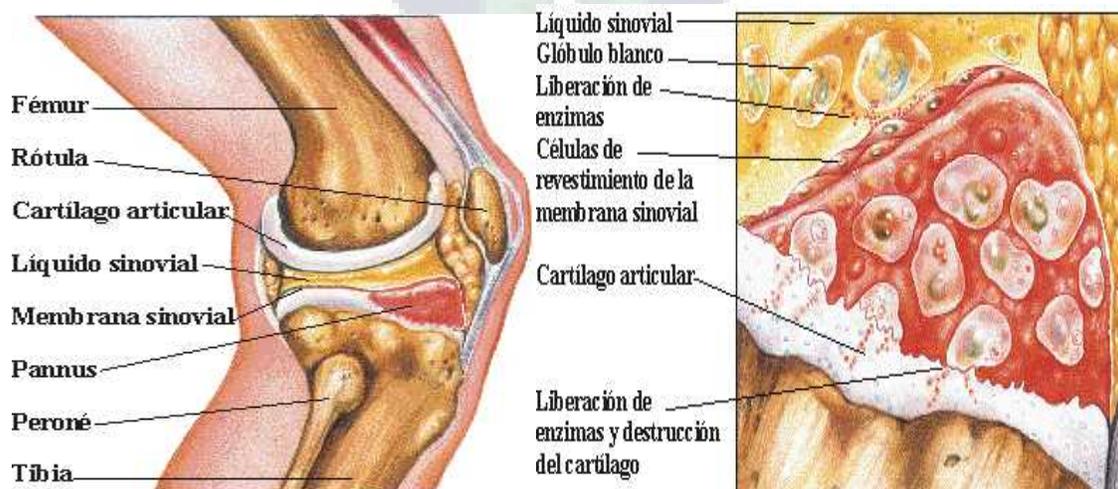
La interacción de redes fibrillares formadas, se realiza principalmente con estructuras circundantes a los sitios de síntesis. El colágeno Tipo II se halla en abundancia en estructuras articulares siendo por lo mismo una de las principales moléculas reconocida como autoantígeno.

A partir del reconocimiento de autoantígeno por una IgG alterada, o linfocito T MHC específico a epítopo en Colágeno II, se forman complejos Ag-Ac, el cual se fija en estructuras articulares, activa al sistema de "complemento" (C'), produciéndose fagocitosis, vasodilatación capilar y aumento de la permeabilidad.

La presencia de Factor reumatoide y complemento (FR-C'), facilita la liberación de enzimas específicas que, actuando sobre la membrana sinovial, producirían los fenómenos clásicos que llevan a la formación del "pannus".

A través de la fagocitosis de anticuerpos, factor reumatoide y complemento realizada por glóbulos blancos polimorfonucleares (PMN), se liberan enzimas productoras de inflamación aguda, como por ejemplo colagenasas, proteasas, etc. la producción de diversas enzimas ejerce capacidad de degradación sobre el cartílago articular, erosionándolo y gradualmente destruyéndolo de manera irreparable.

Simultáneamente, en la sinovial afectada se pueden producir anticuerpos alterados, los que en conjunto con el factor reumatoide y el complemento (IgG-FR-C') son fagocitados por macrófagos, llevando a la liberación de enzimas con carácter destructivo sobre el cartílago<sup>10</sup>.



Esquema normal y amplificado de articulación de rodilla con proceso artrítico inflamatorio y degradativo del cartílago articular<sup>10</sup>

En condiciones normales, los componentes de una articulación interactúan para mantener la integridad entre ellas. El ácido Hialurónico abundante en líquido sinovial está formado por N-acetilglucosamina y ácido glucurónico, proteoglicanos de elevado peso molecular que intervienen en el movimiento celular, fagocitosis y formación de vasos sanguíneos. Actúan eliminando radicales libres del medio y tiene capacidad antioxidante<sup>200,6</sup>. Además estimula la síntesis de ADN y la división celular de fibroblastos<sup>79,166</sup>.

Un elemento importante del colágeno tipo II que contiene en un 20 %, es el Condroitin Sulfato (CS), que es uno de los seis proteoglicanos que son estructuralmente vitales en tejido conectivo<sup>36</sup>. El Condroitin Sulfato (CS) parcialmente depolimerizado, es un efectivo antiinflamatorio sin efectos negativos como indometacina o ibuprofeno<sup>197,49,166</sup>. El CS actúa como inhibidor enzimático de colagenasa, elastasa y proteoglicanasa aumentadas en procesos patológicos articulares. CS promueve la síntesis de Ácido hialurónico.

El colágeno tipo II contiene una Matriz Glicoproteica de Cartílago (CMGP) con actividad antioxidante al transportar minerales esenciales hacia Condrocitos de la matriz del cartílago, los cuales producen colágeno nuevo y mucopolisacáridos que intervienen en la amortiguación y lubricación articular. Los condrocitos estimulados producen Superóxido Dismutasa (SOD), enzima destructora de radicales libres involucrados en daño articular<sup>49,166</sup>.

La pérdida del equilibrio molecular en tejido articular en procesos patológicos autoinmunes estimula la necesidad de encontrar terapias moduladoras de respuesta inmune en autoinmunidad y enfermedades autoinmunes.

## E MODELO EXPERIMENTAL C.I.A.

La identificación de varias moléculas artritogénicas en estructuras articulares, promovieron el estudio de diversos antígenos inductores de autoinmunidad.

Varias investigaciones utilizan modelos de artritis experimental por inmunización con adyuvante<sup>110</sup>, aceite<sup>95</sup>, pristano<sup>237</sup>, componentes de pared bacteriana<sup>247</sup>, proteoglicanos<sup>168,169,1</sup>, colágeno tipo II<sup>190,82,99,144,252,80,239</sup> y transferencia de anticuerpos monoclonales anti colágeno tipo II epitope específico<sup>199,89,131</sup>. Este último modelo disminuye el tiempo de inducción (3 días), exacerbación de artritis. La severidad e incidencia de este modelo son controladas por la dosis administrada y según la edad de la cepa utilizada<sup>11,12,105</sup>.

El modelo mas utilizado experimentalmente es la artritis inducida por colágeno tipo II (C.I.A. o Collagen Induced Arthritis), el que muestra características inmunológicas y patológicas de la artritis humana y es extensamente utilizada en estudios de test terapéuticos y de patogénesis por ser un modelo altamente reproducible, en el que con algunas consideraciones generales se logra inducir la artritis con la suficiente incidencia y severidad<sup>185,159</sup>.

La susceptibilidad a CIA esta ligada a moléculas MHC clase II, pero también depende del tipo de colágeno II usado en inmunización. El colágeno tipo II heterólogo es mas inmunogénico y artrítogénico que el colágeno tipo II homólogo en algunos animales. Por otro lado, el modelo CIA puede ser inducido en cepas resistentes a CIA tales como C57BL/6 (H2b) y *Balb/c* (H2d) en las que las señales de INF-gamma y IL-10 pueden ser abolidas por deleción génica. Esto demuestra que genes no-MHC juegan un rol regulatorio importante en proceso inflamatorio de artritis<sup>89,185</sup>.

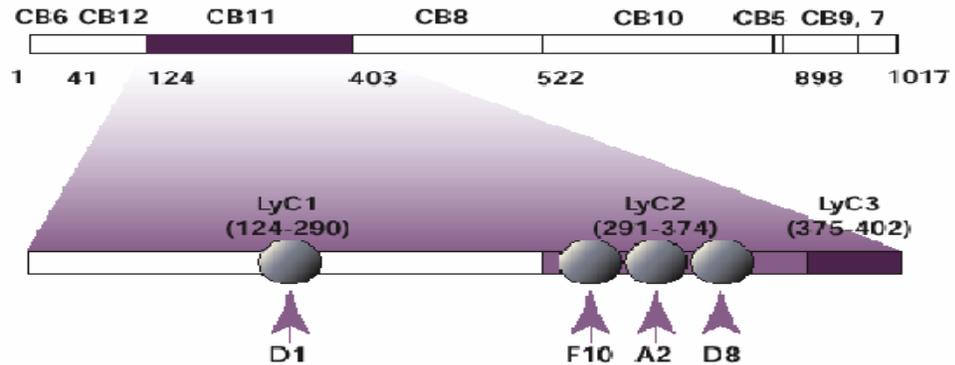
De forma mas general, tras la deleción en línea germinal de los genes TCR, expresados normalmente en células T, causa resistencia en la inducción de autoinmunidad CIA<sup>253,39,41</sup>, mientras que, cepas de ratone susceptibles deficientes en linfocitos B, no desarrollaron artritis<sup>211,253</sup>.

Es este equilibrio de respuesta autoinmune TH1 y TH2 mediadas por células inmunocompetentes, los que pueden desencadenar cambios bioquímicos intrínsecos y generar factores extrínsecos circulantes o de superficie con actividad pro inflamatoria, antiinflamatoria, apoptotica, citotóxica, quimo táctica, receptora, inductora de transcripción y secretoria para otras células y moléculas involucradas en los procesos autoinmunes.

Inmunologicamente en Collagen-induced arthritis, el colágeno tipo II como antígeno es dependiente de células T<sup>217</sup>. Collagen-induced arthritis esta mediado por auto anticuerpos a colágeno tipo II interactuando con complemento. Estos autoanticuerpos auto reactivos reconocen determinantes antigénicos particulares o epítopes artrítogénicos localizados en el fragmento CB11 a CB del colágeno tipo II dependiendo del MHC.

Estas secuencias de aminoácidos del fragmento artrítogénico son comunes en el colágeno tipo II de varias especies incluyendo pollo, ratón, rata, bovinos, porcinos, monos, y humanos.

## Colágeno Tipo II



Amplificación de segmento CB11 de colágeno tipo II que contiene a diferentes determinantes antigénicos reconocidos por MHC<sup>11,12</sup>.

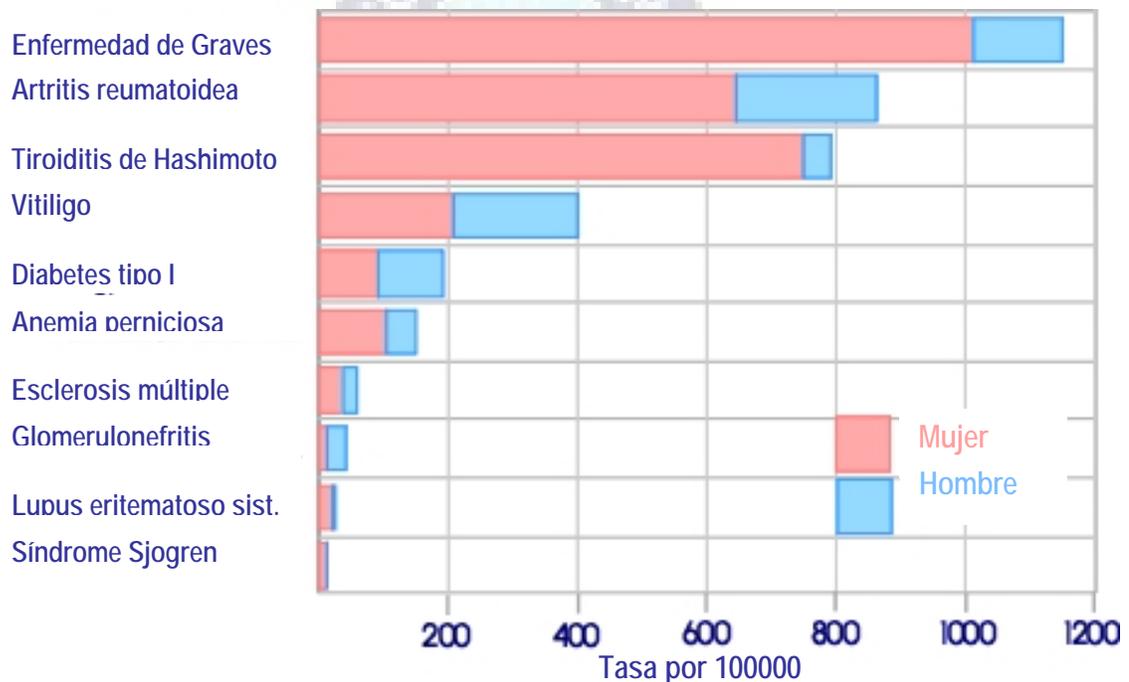
Actualmente los modelos experimentales basan sus investigaciones en probar dominios determinantes de inmuno y artritogenicidad, obtenidos sintéticamente, por recombinación entre tipos de colágeno, por recombinación con colágeno II humano, por transgénesis loci CII a ratones (colágeno quimérico) y otros experimentos que involucran las fibras aminoácidas de colágeno II<sup>47,207,104,105</sup>.



### III MARCO TEORICO

#### A AUTOINMUNIDAD

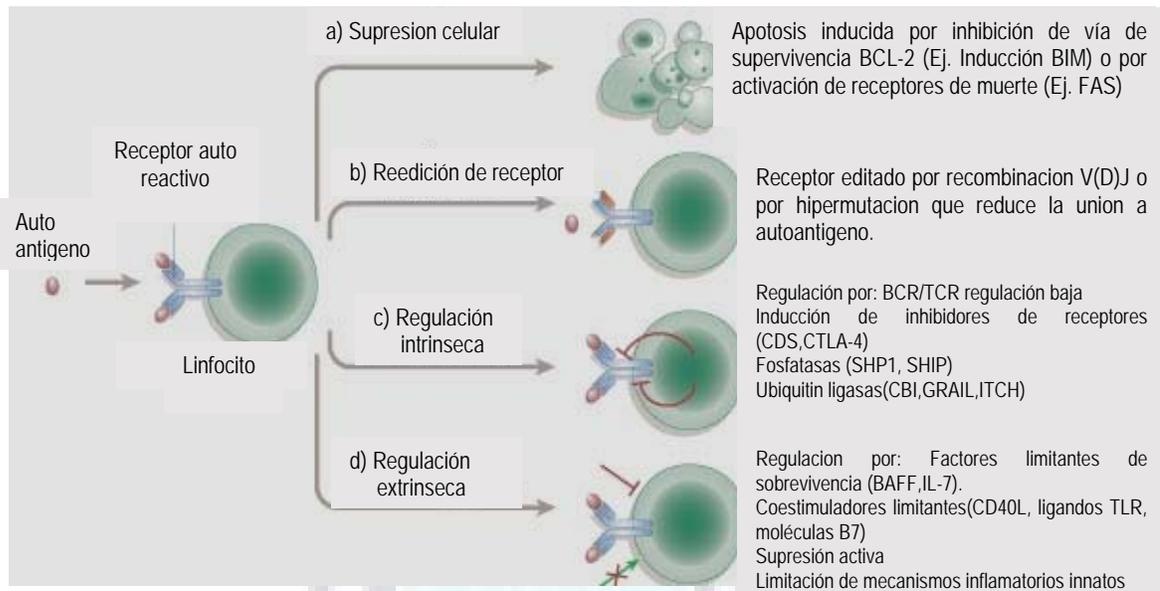
A principios del siglo veinte, Paúl Erlich describe y conceptualiza a los procesos autoinmunes como "Horror autotóxico"<sup>53</sup>. Hoy las enfermedades autoinmunes son la mayor causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, por la obvia razón de que los autoantígenos no pueden ser eliminados<sup>101</sup>. Un ejemplo de la tasa de prevalencia para las enfermedades autoinmunes, en el Reino Unido, lo demuestra el siguiente cuadro:



Prevalencia de las más comunes enfermedades autoinmunes en el Reino Unido, según género. (Fuente: Clin Immunol Immunopathol 84: 223-243, 1997)

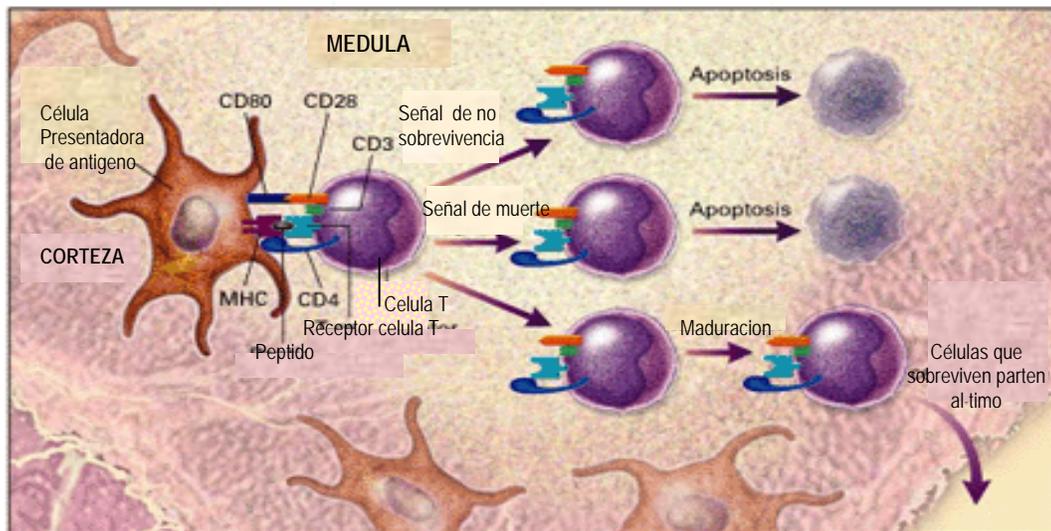
Un mecanismo muy estudiado es la selección positiva y negativa de linfocitos T con moléculas MHC unidas a autopéptidos, todo durante su desarrollo en timo, donde la selección positiva rescata linfocitos programados a apoptosis y los conduce a maduración a repertorio de células T dirigidos a antígenos extraños unidos a MHC<sup>115,218,20</sup>, mientras selección negativa es clave en mecanismos de inducción de tolerancia por eliminación del potencial autoreactivo de células T<sup>213,107,155,114</sup>

Durante la diferenciación de Linfocitos T y B, las células usan cuatro estrategias destinadas a regular receptores autoreactivos<sup>40,206</sup>.

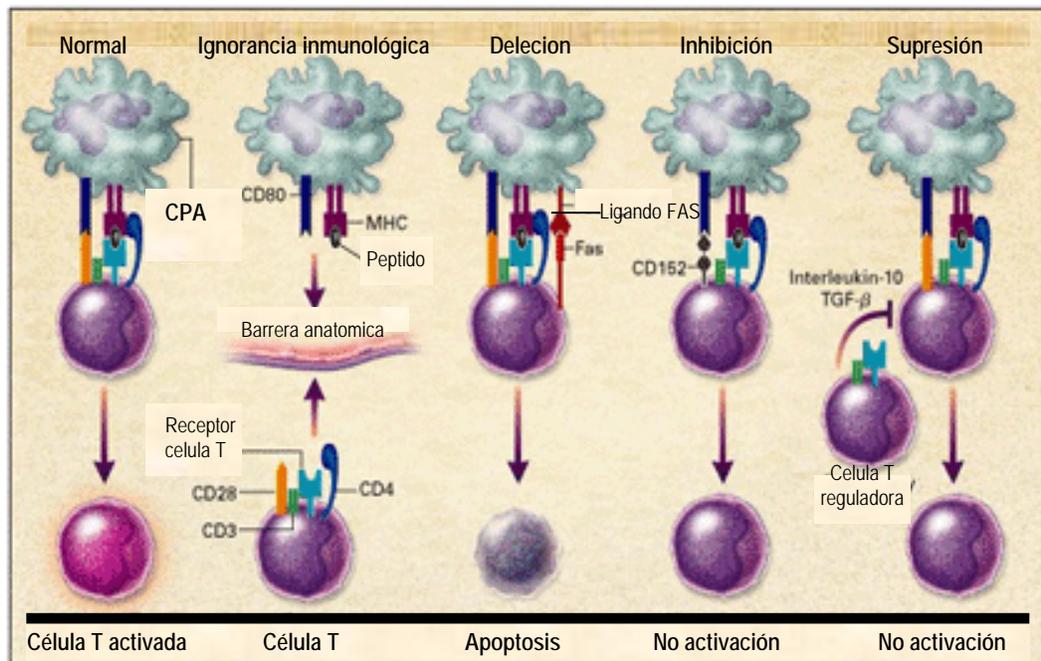


Regulación de Receptores Autoreactivos en Diferenciación linfocitaria (Fuente: Christopher C. Goodnow, et all. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity Nature 435, 590-597 ,2 June 2005)

Para evitar el rompimiento de tolerancia que active clonas autoreactivas, nuestro sistema inmune desarrollo dos eficientes sitios de supresión y control de tolerancia; uno central en timo, y otro periférico en barreras entre autoantígeno y Linfocito T autoreactivo, que generan ignorancia inmunológica, deleción, inhibición o supresión de células T<sup>223</sup>.



Mecanismo Central de Inducción de Tolerancia (Fuente: Thomas Kamradt, M.D., y N. Avrion Mitchison, Ph.D. Tolerance and Autoimmunity, N Engl J Med March 1, 2001Volume 344:655-664 Number 9)



Mecanismo Periférico de Inducción de Tolerancia (Fuente: *Thomas Kamradt, M.D., y N. Avrion Mitchison, Ph.D. Tolerance and Autoimmunity, N Engl J Med March 1, 2001 Volume 344:655-664 Number 9*)

Existe información que involucra a subpoblaciones de células dendríticas en inducción experimental de tolerancia<sup>135</sup>

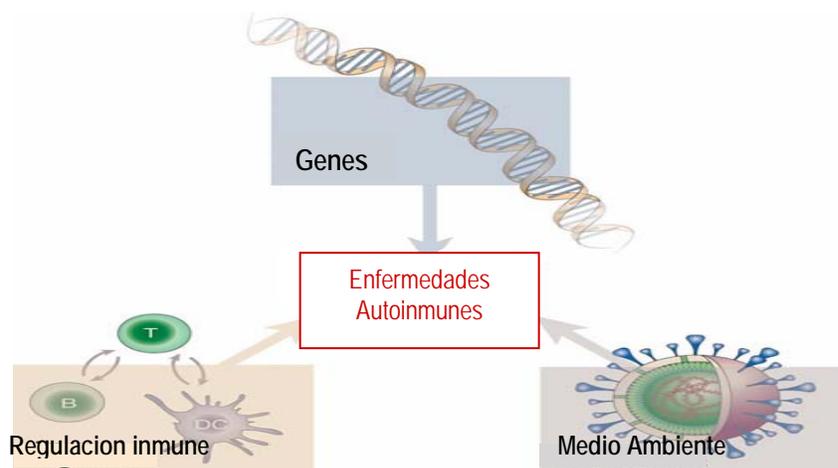
Inmunologicamente, clonas celulares específicas para autoantígenos, evitan la reactividad por estos mecanismos de autotolerancia, balance regulatorio que al romperse genera ataque a estructuras autólogas<sup>96</sup>. El daño autoinmune involucra a autoanticuerpos y Linfocitos T efector<sup>3</sup>.

En general el estudio de enfermedades autoinmunes define los factores que inician la autoreactividad, los mecanismos inmunológicos que intervienen en la forma patológica, y las características clínicas de la enfermedad.

El desarrollo de diversos experimentos está enfocado en estudiar el ataque inmunológico a estructuras tisulares o celulares autólogas. Las primeras investigaciones, dirigieron al análisis de estructuras específicas de órganos afectados, estudios que luego comenzaron a determinar semejanzas clínicas en enfermedades autoinmunes, en las que se prueban blancos moleculares comunes para el tratamiento.

Procedimientos recientes recurren a uso tecnológico genómico y proteómico analizando receptores moleculares y rutas metabólicas en autoinmunidad<sup>53,32</sup>. Nuevas estrategias para estudio de mecanismos patogénicos y terapia podrían surgir del uso de Células madre Hematopoyéticas, idea aun controversial para su aplicación<sup>53</sup>.

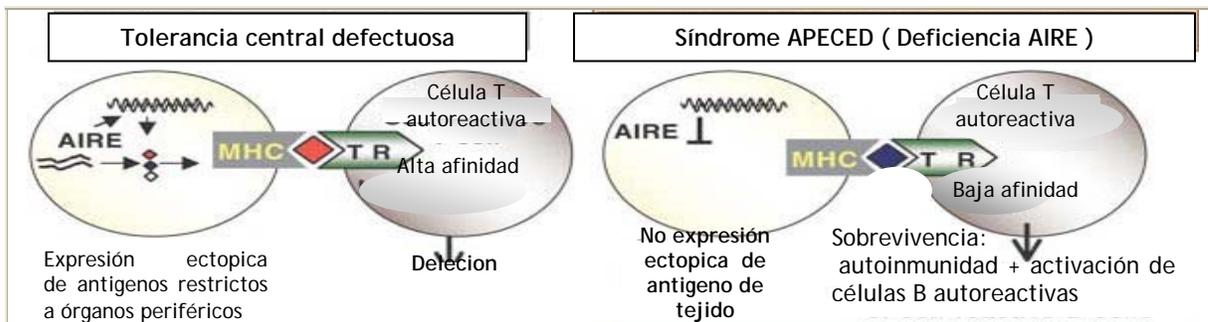
Las enfermedades autoinmunes resultan principalmente de la interacción de tres componentes: genético, ambiental y regulatorio<sup>32,57</sup>



Factores ambientales pueden desencadenar autoinmunidad en individuos genéticamente susceptibles bajo condiciones de desregulación inmunológica (Fuente: C. Garrison Fathman, et al. An array of possibilities for the study of autoimmunity, Nature 435, 605-611, 2 June 2005)

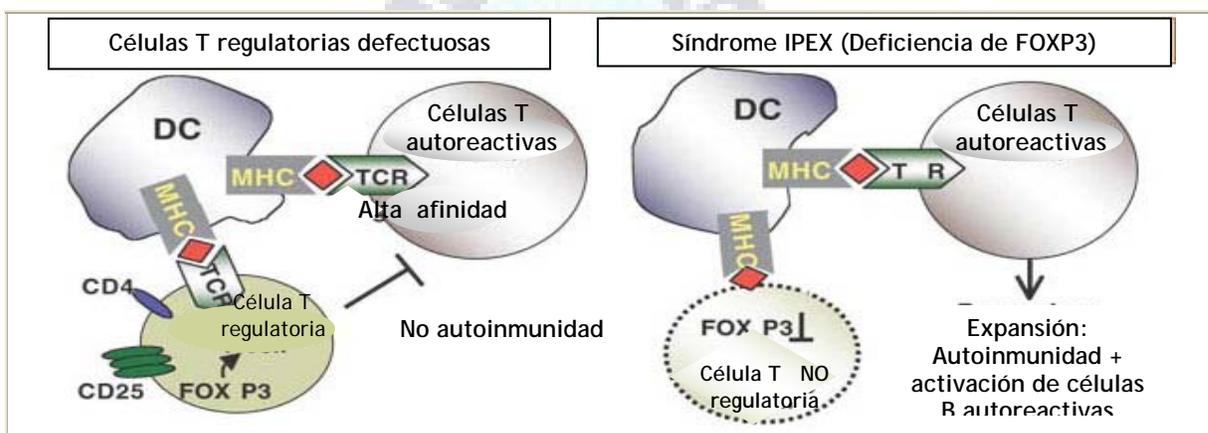
Una mutación en un solo gen puede causar autoinmunidad (procesos sin daño autoreactivo de estructuras propias como los anticuerpos anti-idiotipo<sup>3</sup>), mientras que las enfermedades autoinmunes son resultado de una compleja interacción de productos génicos<sup>101</sup>, a diferencia de las inmunodeficiencias, donde una sola característica de dominancia genética es a menudo la determinante de enfermedad<sup>29,32</sup>

Este fenómeno genético se debe a la heredabilidad polimórfica de dos características inmunogenéticas: El MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) que influencia fuertemente al desarrollo de autoinmunidad<sup>101</sup> y los receptores en Linfocitos T ( $\alpha\beta$ TCR) que teóricamente podrían generar  $1 \times 10^9$  moléculas incluyendo los que se unen específicamente a autoantígenos presentados en periferia<sup>223,229,38,45,213</sup>. Este factor genético puede asociarse también la capacidad de células para la expresión de moléculas regulatorias las que, en un estado de ausencia funcional de genes codificantes de estas moléculas, desembocan en autoinmunidad. En esta asociación molécula-autoinmunidad, existen genes mutados como en la Displasia ectodérmica en poliendocrinopatía autoinmune asociada a candidiasis (APECED) por mutación en genes reguladores de autoinmunidad (AIRE)<sup>160,22,7</sup>



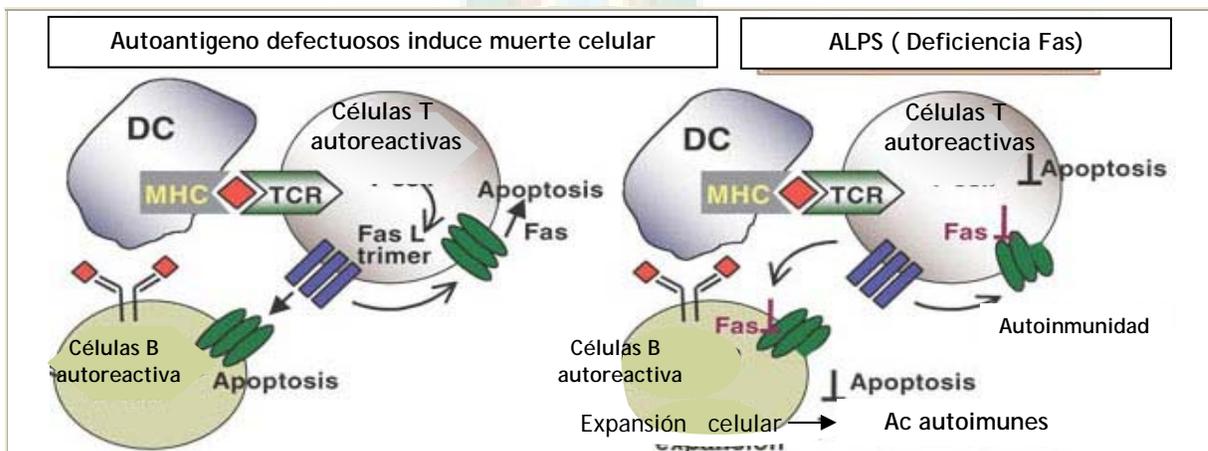
Autoinmunidad por Mutación en Genes AIRE (Fuente: Nature Immunol 5:23-30, 2004)

La ausencia de gen funcional FOXP3, también puede derivar en autoinmunidad <sup>160,88,67,112,18,149</sup>



Autoinmunidad por ausencia de Gen FOXP3 (Fuente: Nature Immunol 5:23-30, 2004)

Un ultimo ejemplo de esta asociación, involucra el rol de Fas mediando procesos importantes, durante la selección timica, como la apoptosis y delecion de clones autoreactivos. Una mutación en su gen codificante causa casos de autoinmunidad como el Síndrome linfoproliferativo (ALPS) <sup>160,66,65</sup>



Autoinmunidad por mutación en Gen Fas (Fuente: Nature Immunol 5:23-30, 2004)

Existen otras deficiencias génicas que codifican moléculas como CTLA-4<sup>234,226,244</sup> y la proteína C4 del complemento<sup>13</sup>. La asociación entre la expresión deficiente de los genes codificantes de las mencionadas moléculas regulatorias con desarrollo de autoinmunidad<sup>101</sup> se resume en:

<i>Gen</i>	<i>Enfermedad humana</i>	<i>Modelo animal</i>	<i>Mecanismo autoinmunidad</i>
AIRE	APS-1	Knockout	Disminuida expresión de autoantígenos en timo, resultando en defectuosa selección negativa de linfocitos T autoreactivos
<i>CTLA4</i>	Asociación con enfermedad de Graves, diabetes tipo I y otras	Knockout	Falla en anergia de linfocitos T y reducción de umbral de activación de linfocitos T autoreactivos
<i>FOXP3</i>	IPEX(costra, caspa)	Knockout y mutación	Disminuida generación de CD4+, CD25+ células regulatorias
<i>FAS, FASL</i>	ALPS	Lpr/lpr; gld/gld mutantes	Falla de muerte apoptótica de linfocitos T y B autoreactivos
<i>C4 proteína complemento</i>	Asociado con LES	Knockout	Defecto en nivel de inmunocomplejos y posible falla de tolerancia linfocitos B.

Asociación de cambios monogénicos con Autoinmunidad (Fuente: John D. Rioux y Abul K. Abbas, Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease *Nature* 435, 584-589, 2 June 2005)

Los estímulos celulares detectados por análisis de RNA m predicen el material proteico tras la inducción transcripcional de genes "activados" o "silenciados" en diferentes estirpes celulares específicas de tejido<sup>32,101</sup>.

Existe una asociación de enfermedades autoinmunes con reacciones de hipersensibilidad, por los diferentes mecanismos mediadores de reactividad autoinmune, que permiten clasificar los procesos autoinmunes en:

- Tipo I de Autoinmunidad en la que anticuerpos sintetizados contra estructuras extrañas (como proteínas virales) que tienen semejanza con autoantígenos.

- Tipo II Reactividad Autoinmune por Citotoxicidad: Los anticuerpos reaccionan contra antígenos de la superficie celular generalmente receptores, destruyendo la célula. Son ejemplos la enfermedad de Graves y la Miastenia Gravis.
- Tipo III Reactividad Autoinmune por Inmuno complejos que resultan de interacción de anticuerpos con varios tejidos propios formando depósitos tisulares de complejos antígeno anticuerpo. Ocurre por ejemplo en Lupus Eritematoso Sistémico(LES) y Artritis Reumatoide (AR).
- Tipo IV Reactividad Autoinmune Mediada por Células: Las estirpes autoreactivas de Linfocitos T atacan a estructuras propias como en Tiroiditis de Hashimoto y en Diabetes Mellitus Insulino dependiente.

Así como la clasificación puede basarse en el tipo de hipersensibilidad autoinmune también puede relacionarse las autoinmidades al tejido u órgano afectado. Así, la Gastritis experimental autoinmune, la diabetes insulino dependiente, la tiroiditis y la esclerosis múltiple son ejemplo de autoinmunopatías que desarrollan reactividad órgano específica<sup>191</sup>, donde el repertorio de Linfocitos T es dirigido a un solo péptido antigénico<sup>213</sup>. Estas células T a su vez en su maduración expresan determinados clusters de diferenciación que experimentalmente por timectomía en murinos resulta en varias autoinmidades órgano-específicas<sup>113</sup>, observadas también en moléculas de superficie (CD) de linfocitos B<sup>157</sup>.

Por otro lado la autoinmidad sistémica es muy relacionada a defectos intrínsecos de linfocitos T, genéticamente o bioquímicamente determinados<sup>121,181</sup> que permiten el desarrollo de efectivos test para el diagnóstico de afecciones sistémicas autoinmunes, detectando autoanticuerpos conocidos y otros de reciente estudio como Ac anti proteínas SM, complejos autoantigénicos en núcleo celular, Ac anti estructuras de aparato mitótico, Ac anti células endoteliales y Ac anti enzimas<sup>186,250</sup>.

El espectro de enfermedades autoinmunes opera según el órgano blanco, lo que permite su característica órgano específica o sistémica (no órgano específica), y los test diagnósticos específicos se resumen en la siguiente tabla:

	Enfermedad	Organo	Anticuerpo a	Test Diagnostico
ORGANO ESPECIFICO	Tiroiditis de Hashimoto	Tiroides	Tiroglobulina, tiroides peroxidasa (microsomal)	RIA, hemoaglutinación
	Mixederma Primario	Tiroides	Receptor Citoplasmatico TSH	Inmunofluorescencia (IF)
	Enfermedad de Graves	Tiroides		Bioensayo, Competición por receptor TSH
	Anemia Perniciosa	Glóbulos rojos	Factor Intrínseco (IF), parietal células gástricas	B-12 unido a IF inmunofluorescencia
	Enfermedad Addison	Adrenal	Células Adrenales	Inmunofluorescencia
	Infertilidad masculina	Esperma	Espermatozoides	Aglutinación, Inmunofluorescencia
	Diabetes juvenil Insulino dependiente	Páncreas	celulas beta de islotes Pancreaticos	
	Diabetes Insulino resistente	Sistémico	Receptor de Insulina	Competicion por receptor
	Myastenia graves	Músculo	Músculo, receptor de acetil colina	Inmunofluorescencia, competición por receptor
	Síndrome de Goodpasture	Riñón, pulmón	Membrana basal Renal y de pulmón	Inmunofluorescencia (marcación lineal)
SISTEMICO	Penfigo	Piel	Desmosomas	Inmunofluorescencia
	Penfigoide	Piel	membrana basal de piel	Inmunofluorescencia
	Colitis Ulcerativa	Colon	Lipopolisacaridos de Colon	Inmunofluorescencia
	Síndrome de Sjogren	Glándulas Secretorias	canales mitocondriales	Inmunofluorescencia
	Vitiligo	Piel	Melanocitos	Inmunofluorescencia
	Artritis Reumatoide	Articulaciones, piel, riñón	Fibras colágenas y cápsula articular, IgG(FR)	IgG-látex aglutinación
	Lupus eritematoso Sistémico	Articulaciones,piel, etc.	DNA, RNA, nucleoproteínas	RNA-, DNA-látex aglutinación, IF (granular en riñón)

## B MECANISMOS GENERALES DE AUTOINMUNIDAD

Existe considerable evidencia que implica a las infecciones como causas de desarrollo de enfermedades autoinmunes; tal es el caso de la esclerosis múltiple y la diabetes<sup>123</sup>

Alternativamente a los mecanismos mas estudiados de autoinmunidad derivados de infección como liberación de antígenos secuestrados<sup>148</sup>, activación de células T por superantígenos<sup>180</sup>, e inducción de citoquinas inflamatorias y moléculas coestimulatorias<sup>230,91,106,117,35</sup>, la similitud entre estructuras microbianas con autoantígenos constituye el mecanismo de Mimetismo Molecular, el cual puede ser clave en la activación de autoreactividad por células T<sup>70,4,223</sup>

Es así que células T cooperadoras activadas por antígenos microbianos permiten la activación de linfocitos B, los cuales o escapan a los mecanismos de tolerancia o adquieren suficiente autoreactividad por medio de mutación somática y selección guiada a la reacción cruzada con antígeno de secuencia aminoacídica de péptidos similar a epitope microbiano<sup>93,69,235,223</sup>

Sin embargo, las infecciones también pueden generar poblaciones celulares protectoras de autoinmunidad. Múltiples infecciones durante el primer año de vida son asociadas con la reducción en el riesgo de diabetes autoinmune<sup>73,223</sup>.

Muchos procesos infecciosos derivan en una respuesta inflamatoria en la que una respuesta inmune estimulada localmente es creada por citoquinas las cuales actúan quimiotácticamente sobre células presentadoras de antígeno profesionales, suministrando el soporte para su activación en lugar de anergia. Es así que células T autoreactivas, bajo anergia o ignorancia inmunológica, también pueden ser activadas. Ocurre cuando una pequeña molécula, por ejemplo una droga, se une a una proteína, conjunto que modifica a péptido de unión a MHC considerándose un neoantígeno reconocido por linfocitos T. Por medio de este reconocimiento, las células T generan mediadores Th2 para la producción de anticuerpos inespecíficos, los cuales no necesariamente están dirigidos contra el neoantígeno.

Las células linfoides, durante el proceso de diferenciación pueden no estar expuestas a algunas estructuras a causa de un desarrollo tardío o por que pueden estar confinadas en órganos especializados (Ej. Testículos, cerebro, ojos, etc).

Cuando un trauma o cualquier otro evento que cause destrucción de las barreras que protegen estos órganos permiten la liberación de varias estructuras desde estos sitios; estas constituyen nuevos autoantígenos a ser reconocidos como extraños resultando a lesión traumática del órgano producida por establecimiento de reactividad linfocitaria, e iniciando una enfermedad autoinmune. Uno de los mecanismos estudiados que convierte a una infección en autoinmunidad es la liberación de autoantígenos por daño tisular a causa de infección<sup>3,148</sup>

En el caso de la Oftalmia Simpática Autoinmune, se producen anticuerpos contra antígenos uveales estimulados por una lesión penetrante no quirúrgica del ojo, que a su vez originan una inflamación granulomatosa difusa en el ojo no dañado<sup>3</sup>.

## C MODELOS ANIMALES DE AUTOINMUNIDAD

Muchos aspectos clave en autoinmunidad pueden ser descubiertos con el uso de modelos animales de enfermedades autoinmunes. En general estos Modelos pueden dividirse en dos tipos muy relacionados a la manipulación genética de cepas murinas empleadas.

a) Los Modelos de Enfermedades Autoinmunes espontáneas que existen como resultado de cruces endogámicos de cepas de animales con particulares características incluyendo la alta incidencia de enfermedades autoinmunes. Tales cepas endogámicas son al mismo tiempo susceptibles genéticamente por lo que los individuos desarrollan la enfermedad espontáneamente. Ejemplos de estos Modelos son la cepa obesa de pollo (desarrolla tiroiditis) y la cepa NOD murina (desarrolla diabetes). Generalmente la incidencia de autoinmunidad es muy cercana al 100 %<sup>245</sup>.

b) Los Modelos de Enfermedades Autoinmunes Inducidas requiere algún tratamiento en el animal que desencadene la enfermedad. También requiere un nivel de susceptibilidad genética. Existen varios ejemplos de estos modelos, como la inyección con de MBP (proteína básica de mielina) y adyuvante induce en ratones encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), pero solo en ciertas cepas endogámicas. Esta enfermedad es muy similar a la esclerosis múltiple en humanos. Otro ejemplo es la artritis autoinmune experimental (CIA) inducida por extracto artrítico Colágeno II heterólogo, Modelo a reproducir en el presente estudio<sup>245</sup>.

Los mecanismos de estudio son virtualmente imposibles en humanos, siendo que el entendimiento actual de la autoinmunidad proviene de desarrollo de cepas por manipulación genética, su aplicación en modelos animales de autoinmunidad y análisis inmunológico, molecular, genético y otros pertinentes.

## D ACERCAMIENTO TERAPÉUTICO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los estudios realizados sobre terapias frecuentemente aportaron al entendimiento del rol de muchas moléculas en el inicio y desarrollo de patologías autoinmunes. Diferentes estrategias terapéuticas efectivas están aun en fase de estudio, considerando la multifactorialidad de los procesos autoinmunes y las características clínicas que involucran las enfermedades autoinmunes.

La terapia de artritis reumatoide por agentes biológicos incluye a la aplicación de anticuerpos monoclonales anti- citoquinas sobre expresadas o reemplazo de citoquinas deficientes<sup>100</sup>.

Existen drogas comúnmente usadas en tratamiento de autoinmunidad. Recientemente, medicación oral familiar, tal como bloqueadores de angiotensina, son a menudo usados en condiciones de enfermedad como hipercolesterolemia, hipertriglicerodemia, alergia e hipertensión, mostrando capacidad inhibitoria de algunos mecanismos bioquímicos que ocurren en inflamación de origen autoinmune. Estas drogas se mostraron prometedoras en modelos preclínicos de autoinmunidad, así como en ensayos clínicos en etapas tempranas de enfermedad<sup>208</sup>. La búsqueda de rutas de acción de ciertas drogas, condujeron al estudio de efecto sinérgico al evaluar otras aplicaciones.

Es interesante en caso de la estatina que mientras bloquean la actividad de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, reduciendo los niveles de colesterol, también inhiben la aparición de moléculas MHC-II inducidas<sup>238</sup>.

Las estatinas son reconociblemente potentes en reversión de enfermedad en modelos animales, induciendo cambio en la producción de citoquinas TH1 tipo pro inflamatorias a citoquinas tipo TH2<sup>72</sup>. Ensayos iniciales administrando estatina a pacientes con esclerosis múltiple y artritis reumatoide muestran moderada eficacia<sup>163,143</sup>. Las estatinas, drogas agonistas de receptor activado de proliferación de peroxisoma  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) son también usadas en diabetes tipo II, en la cual regulan la activación de adipocitos paralelamente al cambio de producción de citoquinas de TH1 a TH2<sup>254</sup>. Ensayos iniciales sugieren que bloqueadores de angiotensina hacen lo mismo<sup>127</sup>. La eficacia de estatina, PPAR- $\alpha$  agonista y bloqueadores de angiotensina pueden resultar de la habilidad de alterar un numero de procesos patológicos en la cascada inmunológica.

Quizá uno de los procedimientos mas estudiados en terapia de Artritis reumatoide es la aplicación Terapéutica de drogas anti-TNF<sup>137</sup>.

Estos estudios permitieron establecer las siguientes características:

### Mecanismo de acción

- Reducción de cascada de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo reducción de IL-6, IL-1, GM-CSF y Factor de crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF).
- Reducción en trafico intracelular en leucocitos decreciendo la expresión de moléculas de adhesión y quimoquinas.

- Reducción en tejido de enzimas destructivas, tales como metaloproteinasas de matriz (MMPs), pero los niveles de inhibidor de MMPs son mantenidos.
- Reducción de angiogenesis por medio de reducción en la producción de VEGF.
- Normalización de anormales valores hematológicos: hemoglobina restablecida, plaquetas y reducción de fibrinógeno.

### Beneficios clínicos

- Reducción de síntomas incluyendo dolor articular, rigidez y letargia.
- Reducción en signos de enfermedad activa incluyendo inflamación articular.
- Reducción en daño de cartílago y hueso.
- Inducción de reparación tisular.

### Potenciales efectos secundarios

- Incremento del riesgo de infección debido a reducción de TNF, por ejemplo incrementa el riesgo a TB y neumonía.
- Incrementados niveles de anticuerpos a DNA doble cadena; raros casos de drogas que inducen lupus pueden ocurrir.
- Incremento del riesgo a linfomas (no demostrado totalmente).
- Etanercept induce LES subagudo cutáneo<sup>71</sup>

### Diferencias entre drogas bloqueadoras de TNF

- Etanercept bloquea TNF y linfoxina a (LTa).
- Infliximab y adalimumab, pero no etanercept, son activos en Enfermedad de Cohn's .
- Diferencia más probable es debida a los diferentes regímenes de dosis.
- Sostener diferencias en citotoxicidad/apoptosis son controversiales.

La combinación de drogas terapéuticas en enfermedades autoinmunes, es probada en respuesta indirecta a la interrogante de cual es la causa de las autoinmidades crónicas, siendo poco probable que una terapia singular aminore o revierta las manifestaciones de estas enfermedades<sup>133</sup>.

Clínicamente, hay éxitos marcados en el tratamiento de artritis reumatoide combinando metotrexato que inhibe a varias estirpes celulares incluyendo a Linfocitos T, asociada con drogas inhibidoras de TNF<sup>132</sup>, con Ac anti IL-6R<sup>162</sup>, y proteína de fusión CTLA-4-Ig<sup>120</sup>. Sin embargo, estas combinaciones pueden resultar riesgosas, como vimos antes, por lo que es necesario evitar disminuir la relación beneficio / riesgo<sup>133</sup>.

El acercamiento a alternativas terapéuticas para Artritis reumatoide recurriendo a productos naturales se basa en estudios de dietas vegetarianas, analizando la variación fisiológica existente, y en cambios de flora microbiana saprofita y otros parámetros<sup>98,171,23</sup>.

Mas estrechamente a la artritis experimental o Modelo experimental CIA, el uso terapéutico de extractos vegetales, muestra en extracto acuoso de *Ulmus davidiana*, como anti-inflamatorio natural, con efecto protector de cartílago<sup>108</sup>.

Un extracto de fracción polifenolica de Té verde , demostró ser aplicable en la prevención de CIA en ratones, modulando la presencia de Ac antiCII IgG2a especifico, reduciendo la frecuencia de células TH1 autopatogenas, disminuyendo las concentraciones de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de inflamación como TNF-ALFA y COX-2<sup>216</sup>

Los antecedentes alentadores de la capacidad inmunomoduladora de Savia de *Musa paradisiaca*, guían este trabajo hacia la Valoración de la actividad inmunomoduladora de *SMP* en Collagen-Induced Arthritis (CIA),



#### **IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El incremento de manifestaciones clínicas de diversas enfermedades autoinmunes en nuestro país, principalmente la artritis reumatoide, impulsa a investigar y establecer Modelos preclínicos de esta enfermedad, sobre la cual sea posible estudiar virtudes medicamentosas de la variedad etnobotánica de Bolivia.

El desencadenamiento de la reactividad inmunológica en enfermedades Autoinmunes compromete la activación varias estirpes celulares, las que en tratamientos farmacológicos convencionales son eliminadas por mecanismos citotóxicos donde es importante notar por ejemplo la no creciente razón beneficio/riesgo para los tratamientos de artritis reumatoide con drogas anti inflamatorias, mientras que la terapia inmunológica busca darle especificidad al tratamiento de las enfermedades autoinmunes siendo procesos multifactoriales.

El tratamiento natural por Savia de *Musa paradisiaca* (SMP) pretende modular de forma específica la respuesta autoinmune experimental inducida y reactiva hacia el autoantígeno colágeno tipo II, sin destruir por toxicidad celular a poblaciones linfocitarias efectoras.

#### **V PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La reproducción del modelo experimental murino de autoinmunidad inducido por colágeno tipo II permite evaluar la actividad inmnomoduladora humoral y celular de Savia de *Musa paradisiaca* (SMP)?





## VI JUSTIFICACIÓN

El estudio de las diferentes propiedades terapéuticas heredadas como conocimiento ancestral y la necesidad de validar científicamente tales virtudes hace que la extensa variedad de ejemplares botánicos con elevada biodisponibilidad en el territorio nacional, y muchas de ellas con capacidad de modular la respuesta inmunológica a diferentes niveles, deban ser evaluados científicamente.

Para establecer el efecto de un producto natural como un compuesto para el tratamiento de enfermedades autoinmunes de amplia distribución en el mundo y con alta incidencia en Bolivia, es práctico aplicar modelos experimentales de autoinmunidad en animales que desarrollen manifestaciones inmunológicas y sean susceptibles a ruptura de tolerancia, ocasionada por variaciones fisiológicas, genéticas, anatómicas, infecciosas, y otras, con la mayor semejanza genética y clínica a la enfermedad humana.

Los bioensayos *in vitro* y *ex vivo* evaluando nuevos efectos farmacológicos atribuibles a los extractos naturales sobre estirpes inmunocompetentes, son procedimientos que exploran los mecanismos que ocurren *in vivo* a nivel celular y molecular.

El antecedente del uso empírico del extracto acuoso o Savia de *Musa paradisíaca* (*SMP*) en afecciones reumáticas hace pensar que esta relación humano-herbolaria nativa necesite respaldo científico, por lo que la validación científica de la *SMP* en prevención o terapia de artritis reumatoide por su actividad inmunomoduladora, reforzara su aplicación como fitofarmaco no modificado, no citotóxico y con la suficiente seguridad preclínica en Modelo experimental de Artritis (CIA) que permitan su uso en todo el espectro geográfico de la *Musa paradisíaca* en nuestro país.

Por lo anterior, el conjunto de conocimientos a generar en este trabajo donde se plantea evaluar el papel de la Savia de *Musa paradisíaca* administrada oralmente, para modificar la respuesta inmune humoral y celular a colágeno tipo II en ratones, pretenden aportar al indispensable estudio preclínico de extractos derivados de plantas medicinales, previo a su aplicación clínica en tratamiento de enfermedades autoinmunes humanas con manifestaciones inmunológicas y clínicas.

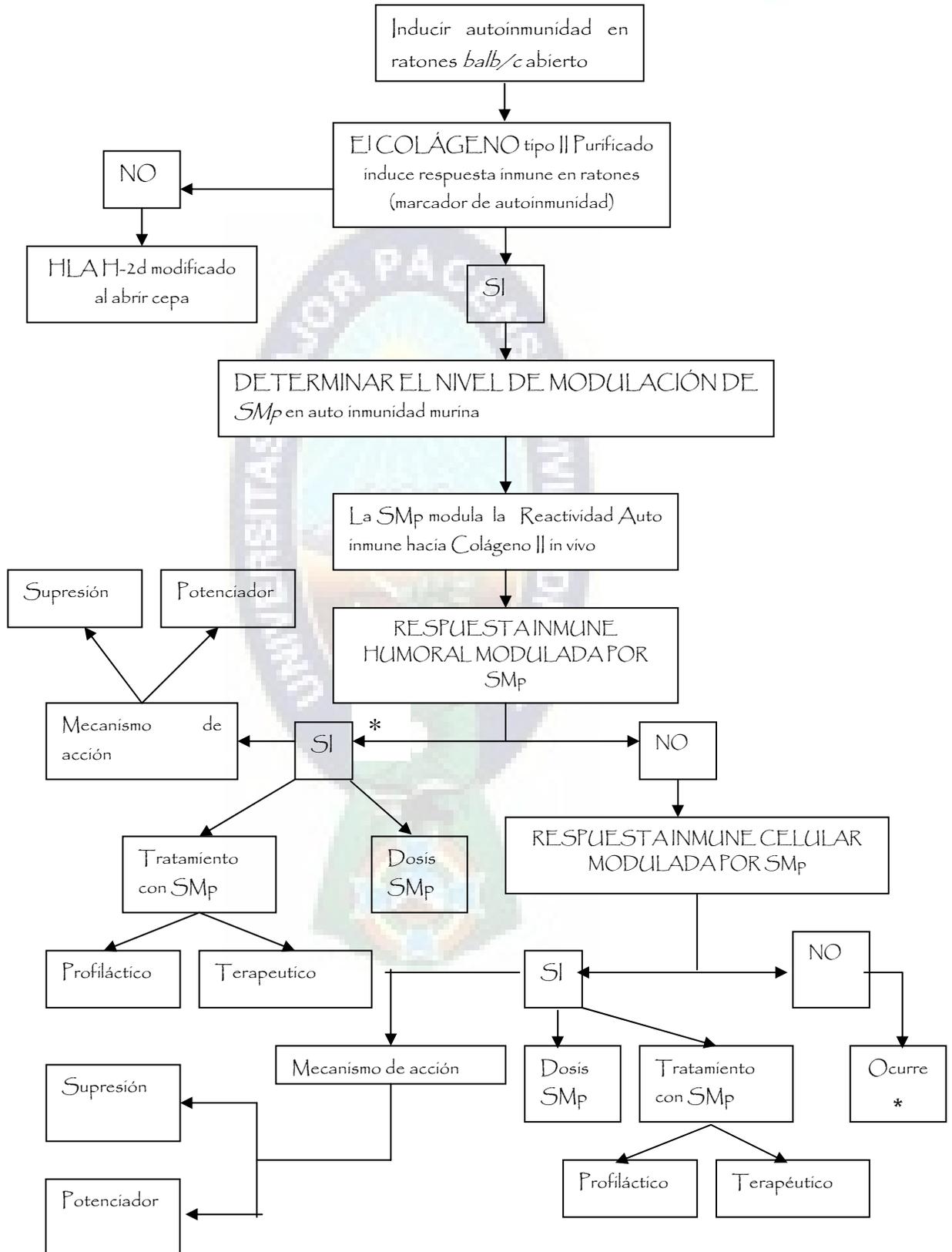
## VII PROPÓSITO DEL ESTUDIO



Establecer un modelo experimental de Autoinmunidad estandarizado que permita el estudio de propiedades inmunomoduladoras de Savia de *Musa paradisíaca* y alternativamente de ejemplares botánicos nativos de Bolivia.



## VIII RUTA CRITICA





## IX OBJETIVOS

### Objetivo general

- ◆ Evaluar la actividad inmunomoduladora humoral y celular, de savia de *Musa Paradisiaca* (SMP), en modelo experimental murino de autoinmunidad inducida por colágeno tipo II.

### Objetivos específicos

- ◆ Extraer y purificar colágeno tipo II de origen bovino para su uso como auto antígeno inductor de autoinmunidad experimental.
- ◆ Normalizar el procedimiento de inmunización en ratones, con colágeno tipo II cuantificado por monitoreo biológico.
- ◆ Estandarizar la Prueba de E.L.I.S.A. para Evaluar la Respuesta Inmune Humoral hacia autoantígeno colágeno tipo II (IgG Anti-colágeno).
- ◆ Estandarizar la Técnica MTT específica para evaluar la Respuesta Inmune Celular hacia colágeno Tipo II en cultivo primario de esplenocitos murinos.
- ◆ Valorar la capacidad inmunomoduladora de diferentes dosis de Savia de *Musa paradisiaca* (SMP) administrada a ratones sometidos a inducción de autoinmunidad por colágeno II, mediante técnicas previamente estandarizadas.



## X HIPÓTESIS

Basándose en el seguimiento de la Actividad inmunomoduladora de la Savia de *Musa Paradisiaca*, desde el conocimiento empírico generado por los saberes populares, postulando luego cualidades de la *SMP* como inmunomodulador que ya cuenta con evidencia científica ampliamente demostrada y buscando darle universalidad a la riqueza del producto en estudio en la resolución de enfermedades de elevada incidencia, se plantea lo siguiente:

**“La Savia de *Musa Paradisiaca* (*SMP*) tiene actividad inmunomoduladora en un modelo experimental de autoinmunidad inducida por Colágeno II como auto antígeno”.**

Por lo que la experiencia durante el trabajo conducirá a explorar si:

- El colágeno bovino tipo II induce una respuesta inmunológica por mecanismos de tipo auto inmune.
- La *SMP* según la DOSIS, ejerce un efecto supresor o potenciador de la reactividad auto inmune hacia el colágeno II, medida a través de la detección de la respuesta celular y la humoral.
- El tiempo de inicio de la administración oral de *SMP* con relación a la inducción de autoinmunidad por colágeno II, para postular su aplicación para la prevención, paralelo al proceso, o como tratamiento de autoinmunidad.

Durante la verificación de los anteriores postulados, se debe contar con:

- Protocolo de extracción y purificación de colágeno tipo II bovino optimizado.
- Protocolo de inducción de autoinmunidad en ratones cepa *balb/c abierta*, mediante inmunización subcutánea.
- Protocolo de administración de *SMP* según esquema de variables tiempo de administración, y dosis de *SMP*.
- Protocolo para la evaluación de Respuesta Inmune Humoral del modelo auto inmune, por técnica E.L.I.S.A. previamente estandarizada.
- Protocolo para la evaluación de Respuesta Inmune Celular del modelo auto inmune, por técnica de activación y proliferación MTT previamente estandarizada.



## XI MATERIAL Y METODOS

### A EXTRACTOS

#### Extracto de Savia de *Musa Paradisiaca*

Se realizó una identificación taxonómica de la especie *Musa paradisiaca* por caracterización macroscópica propia de la planta.

La Savia de Plátano Guayaquil (*Musa paradisiaca*), se recolectó en la Localidad Santa Fe, Provincia Caranavi del Departamento de La Paz.

- El corte del pseudotallo siguió con el fraccionamiento longitudinal del mismo, para luego exprimir cada trozo.
- El extracto acuoso fue filtrado tres veces en doble capa de gasa estéril, aplicando luego benzoato de sodio como conservante y vitamina C para evitar la oxidación. Se mantuvo en bidones de plástico envueltos en papel aluminio y conservados en hielo durante su traslado.
- En laboratorios de la Unidad de Biomedicina Experimental de Seladis se realizó filtraciones sucesivas en doble capa de gasa estéril y papel Whatman # 4 hasta eliminar residuos de tronco u otro material innecesario.
- El extracto acuoso fue caracterizado organolépticamente con relación al aspecto, olor, color, sabor, y determinando el Ph como propiedad fisicoquímica de la solución.
- Se conservó la preparación líquida en botellas plásticas a -20 °C hasta su uso. Esta constituyó la primera presentación farmacéutica del extracto líquido.
- Una segunda presentación fue el liofilizado de la Savia de *Musa paradisiaca*, el cual tras centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos, filtrado en gasa y alicuotado en 92 botellas de vidrio, previamente pesadas y llenadas a  $\frac{3}{4}$  de su capacidad, fueron congeladas por 2 días para finalmente ser liofilizadas utilizando liofilizador (Labconco Freeze Dry equipment and accessories) con y sin accesorios verificando cada fase del proceso de liofilización. La cantidad de extracto liofilizado se obtuvo por diferencia de peso inicial respecto al final después del liofilizado de botellas.

Ambas formas del extracto fueron utilizadas en otros estudios de propiedades de la Savia de *Musa paradisiaca*, siendo la mas aplicada la presentación en suspensión líquida tras congelación<sup>78,77,221,225,220,33,195,194,196,125,177,50,81,198,64</sup> mientras que la presentación liofilizada fue aplicada en estudios con análisis bromatológicos, fitoquímicos, y encapsulados en algunos estudios clínicos<sup>48</sup>.

Los procedimientos de Conservación aplicados al extracto de *SMP* obtenido en nuestro procedimiento fueron:

a. La congelación que constituyó el sistema de conservación a corto plazo, de transición o de transporte, por la presencia de elementos higroscópicos del extracto pueden causar pérdida de principios activos o contaminación biológica<sup>183</sup>. Las dosis de *SMP* administrada a ratones se prepararon a partir de esta forma fitofarmacologica.

b. La liofilización constituyó el proceso de secado por sublimación del extracto acuoso *SMP* previamente congelado. Se obtuvieron pastillas de polvo seco que debían tener las características de:

- ❖ Actividad biológica invariable al reconstituirse.
- ❖ Reconstitución inmediata y total del producto
- ❖ Pastilla compacta de color uniforme
- ❖ Forma y tamaño coherente al del extracto congelado (invariable)<sup>63</sup>.

Las pastillas de polvo seco obtenidas, fueron de color uniforme y forma no distorsionada a la Savia congelada previamente. La cantidad de botellas inicial de 92, disminuyó en el tiempo que se realizó el liofilizado, llegando a determinar el peso diferenciado de 81 botellas. La causa de la eliminación de 11 botellas fue el hinchamiento formando espuma y pastilla esponjosa además del resquebrajamiento del cristal.

### Extracción y purificación de colágeno tipo II bovino

El diseño de protocolos de extracción de colágeno busca aumentar la eficacia y especificidad de la proteína obtenida y purificada. El protocolo utilizado en el presente trabajo esta basado en una secuencia de etapas que ha demostrando excelentes resultados<sup>245</sup>

- ◆ Se obtuvo secciones de cartilago de tabique nasal de hocico bovino, el cual fue obtenido de cabeza fresca de res. Cada sección de cartilago fue cortada al escalpelo en direcciones perpendiculares hasta lograr trozos cúbicos pequeños.

- ◆ Para la pulverización de los trozos de cartílago se usó nitrógeno líquido (Carrera de Física- U.M.S.A.) en combinación con Hielo seco ( Praxair S.A.) logrando una temperatura entre -120 a - 150 °C. El estado fisicoquímico de cristalización del cartílago lo hizo fácilmente pulverizable en mortero de porcelana o crisol. Después de colocar el polvo en desecador por 2 días, se determinó el peso seco.
- ◆ Una fracción del polvo seco fue resuspendido en 5 volúmenes de clorhidrato de guanidina 4 M (p/v)(SIGMA Aldrich Corp.) en medio amortiguador de Tris 0.05 M pH 7.5 para eliminar los proteoglicanos<sup>46,249</sup>.
- ◆ Se incubó toda la noche a 4 °C en cuarto frío y con leve agitación y posteriormente se centrifugó a 20000 g ( 14000 rpm) por una hora a 4 °C.
- ◆ Descartado del sobrenadante se lavó con ácido acético 0.5 M en tres tiempos de centrifugación a 14000 rpm, para eliminar los residuos insolubles.
- ◆ Después de esto se sometió a digestión con pepsina (SIGMA Aldrich Corp.) relación 50:1 cartílago/pepsina en medio acidificado por acetato 0.5 M permitiendo una digestión por 24 a 48 horas a 4 °C con agitación magnética. Este paso permite digerir telopeptidos localizados en N- terminal y COOH terminal de la molécula de colágeno y solubiliza el colágeno de fibras colágenas diferentes al tipo II. La pepsina no digiere los enlaces intra e Intermoleculares del colágeno II<sup>249</sup>.
- ◆ Remoción del material insoluble fue realizado por centrifugación a 20000 g (14000 rpm ) por 3 periodos de 20 minutos, a 4°C en cuarto frío.
- ◆ Se recuperó el sobrenadante y se precipitó el colágeno por adición gradual de Na Cl, agitando hasta lograr una concentración final de 0.9 M de Na Cl. Posteriormente se centrifugó a 20000 g ( 14000 rpm) por 3 periodos de 20 minutos a 4 °C en cuarto frío y se resuspendió el precipitado en solución NaCl 0.5 M en tris 0.05 m pH 7.5. Se dejó en agitación leve durante toda la noche a 4 °C, para inactivar los residuos de pepsina. Los fragmentos de la digestión péptica se eliminaron por diálisis exhaustiva de la suspensión contra ácido acético 0.5 M y se conservó a -20 °C hasta su uso.

### Cuantificación proteica del extracto purificado

Fue utilizada la técnica del Rojo Ponceau que determina cuantitativamente proteínas totales. Para obtener la concentración de Colágeno tipo II, recientemente se demostró que el 8 % de la superficie de cartílago tiene capacidad de absorción por contener sitios ricos en colágeno tipo II que tiene una absorción cercana al 70 a 90 %.<sup>21</sup> por lo que no existe posibilidad de interferencia de otra proteína en la determinación.

Se construyó una curva estándar de concentraciones de BSA, mediante diluciones seriadas de la proteína:

Curva patrón de concentración proteica de Albúmina Sérica Bovina (BSA): Método Colorimétrico Rojo Ponceau

Concentración inicial : 80 mg/dl

Solvente : PBS 0.15 M ph 7,2 - 7,4

Diluciones : Serie 3X

Diluciones	Concentración (g/ml)	Ln [c]	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	PROM. Exp.
Inicial	$8 \times 10^{-4}$	6,68		0,404	0,471	0,604	0,420	0,475
↓ 3x	$2.67 \times 10^{-4}$	5,59	0,104	0,171	0,212	0,087	0,316	0,178
	$8.89 \times 10^{-5}$	4,49	0,071	0,075	0,068	0,053	0,022	0,058
	$2.96 \times 10^{-5}$	3,39	0,024	0,046	0,035	0,018	0,014	0,027
	$9.88 \times 10^{-6}$	2,3	0,010	0,073	0,027	0,011	0,004	0,025
	$3.29 \times 10^{-6}$	1,19	0,001	0,034	0,030	0,020	0,053	0,028

Tabla 1.- Modulo de dilución 3X para BSA, correspondientes a experimentos realizados para la construcción de Curva Estándar de Concentración BSA.

La técnica Rojo Ponceau aplicada en la construcción de Curva Estándar BSA, y en la determinación de colágeno, siguió el protocolo siguiente:

- Para preparar el reactivo Rojo Ponceau, se diluyó el colorante en agua a una concentración de 8 mg/dl
- Dos ml de este reactivo fue mezclado con 200 uL de muestra a cuantificar (diluciones BSA y Colágeno respectivamente). Se centrifugó a 3500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2,5 ml de NaOH 0.1N. Esta solución coloreada fue sometida a lectura en Espectrofotómetro (Hitachi) a 560 nm, con prueba de blanco PBS o NaOH 0.1 N por duplicado.

La lectura a una longitud de onda de 560 nm fue establecida por barrido espectrofotométrico para determinar la máxima absorción en la muestra estándar para la técnica Rojo Ponceau durante la construcción de la curva estándar de concentración BSA.

## **B MODELO ANIMAL**

Se emplearon 70 ratones machos cepa *Balb/c* abierto, con un peso inicial en el rango de 18 - 22 gramos, provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Se formaron 10 grupos de 6 animales, y un grupo de 10 animales para control negativo y pruebas previas durante estandarización de procedimientos detallados mas adelante.

Durante el periodo de adaptación de los diferentes grupos formados ( ver Diseño Experimental) estos consumieron agua *Ad libitum*, manteniendo temperatura ambiente de 20 +- 4 °C, fotoperiodo de 12 horas y control de humedad a 70+-5 %. Las unidades de Microbiología Clínica, Microbiología de Alimentos, y Parasitología de SELADIS, realizaron controles periódicos para evaluar el estado de salubridad de ambientes y alimento de los ratones. La optimización de las condiciones experimentales de los animales incluyeron el control periódico de posibles brotes de infecciones microbiológicas ( diarreas, micosis, principalmente).

### **Especificaciones de la Cepa *Balb/c***

En 1951 los Doctores W. Heston y H. Andervont de Jackson Laboratory incorporaron como colonia de ratones albinos a la cepa Balb al Instituto Nacional de Salud de U.S.A. Luego fue adicionada "c" a la cepa por el genotipo c/c del locus de color de cepa, la que posteriormente el Comité de Nomenclatura Estandarizada para Cepas Endogamicas de Ratones la designara como *Balb/c*<sup>52</sup>.

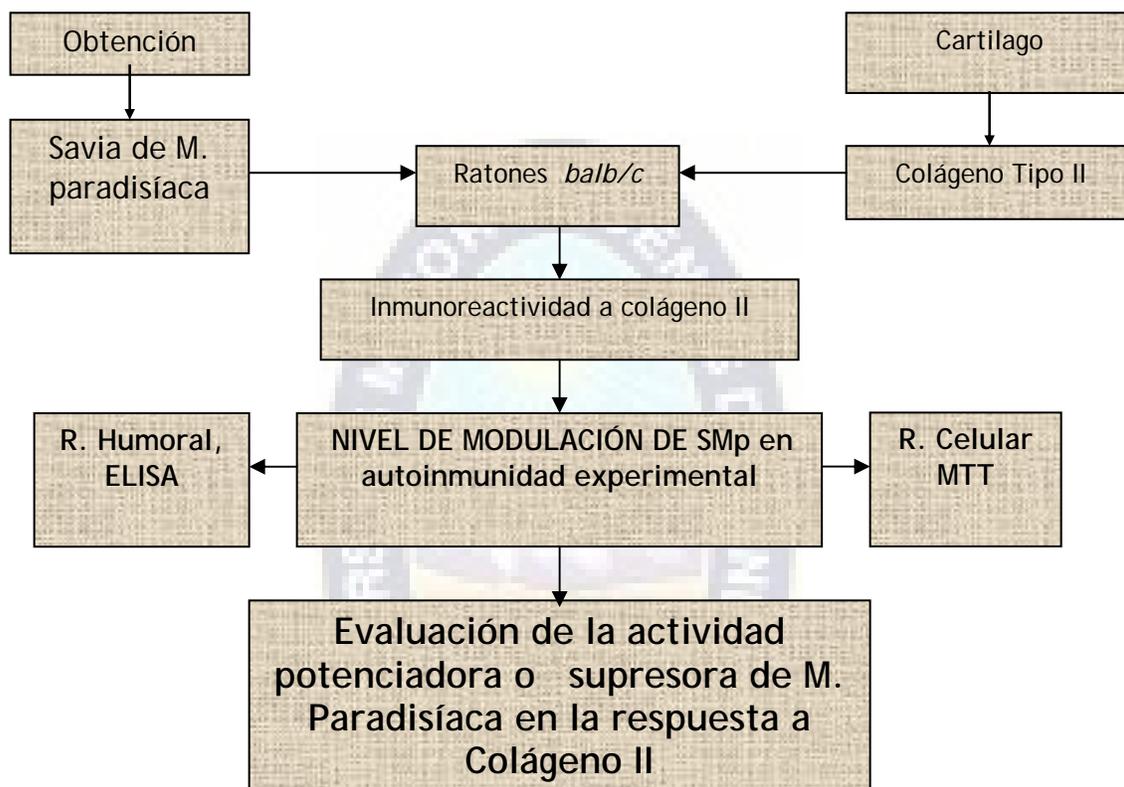
Esta cepa es conocida por estudios en la producción de plasmacitomas y presenta alta incidencia de tumores mamarios por infección viral usándose también como carrier de virus, mientras que en modelos de autoinmunidad presenta resistencia a Prostatitis y Tiroiditis<sup>90</sup>.

Esta cepa demuestra un 100 % de incidencia para el modelo de autoinmunidad inducida por proteoglicanos (PGIA) debido a la susceptibilidad genética definida por la expresión del haplotipo H2-d en su MHC <sup>76,147,74,75,239</sup> La dependencia estructural entre el colágeno tipo II con proteoglicanos en las articulaciones<sup>94</sup>, hace que se encuentre anticuerpos anti colágeno tipo II en aproximadamente 25 % de ratones artríticos, que no siguieron con degradación de cartílago<sup>90</sup>.

Reproductivamente, en *Balb/c* es importante mantener una alta consanguinidad, con lo que se garantizan filiales endogámicas de la cepa y disminuye la probabilidad de heredar un haplotipo distinto a H2-d y susceptibilidad<sup>90</sup>. Sin embargo en nuestro modelo, no se evaluó el proceso de daño sino solo la respuesta inmune humoral y celular a colágeno tipo II.

## C DISEÑO EXPERIMENTAL

El efecto de la Savia de *Musa paradisiaca* en el Modelo de Autoinmunidad reproducido en el presente estudio, desde su obtención hasta la evaluación de su capacidad inmunomoduladora, es esquematizado para su seguimiento, en la siguiente figura:



### Variables para Valoración de inmunomodulación por *SMp*

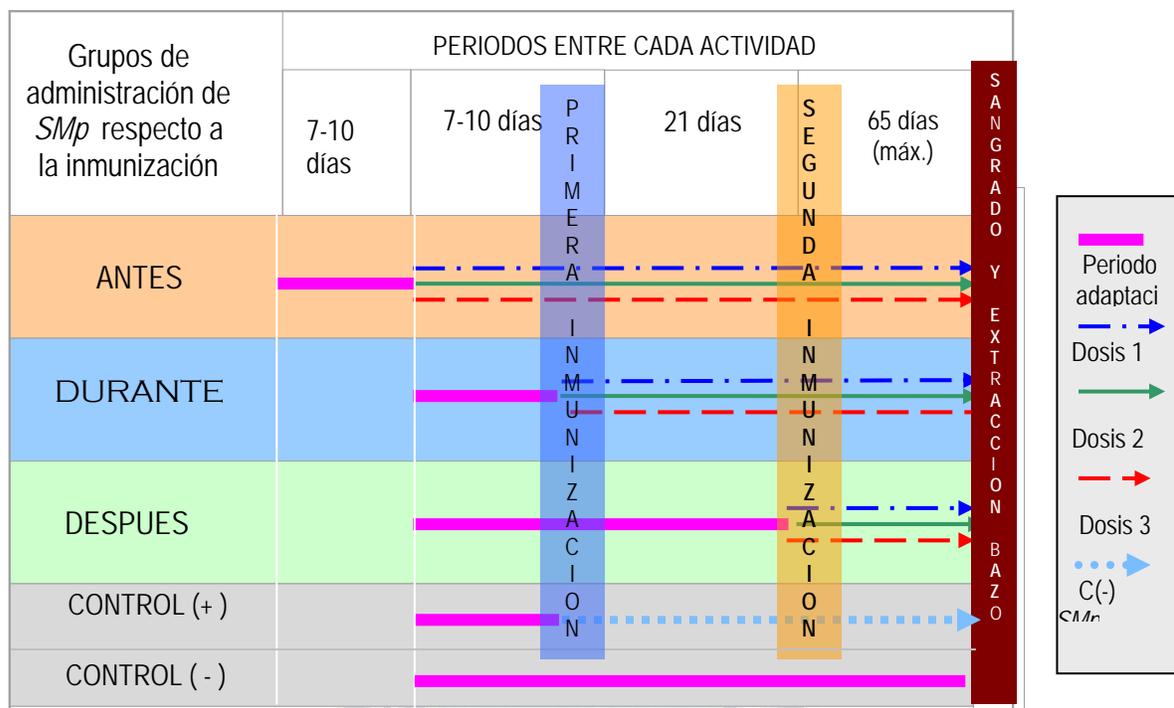
Se determinaron tres tiempos (Antes, Durante, Después) de la administración de *SMp* con relación a la inmunización con Colágeno II (tiempo). Para cada tiempo, se escogieron al azar a 3 grupos de 6 ratones de los 10 grupos formados y en periodo de adaptación. Cada grupo recibió 1 de 3 dosis de *SMp* calculadas de la siguiente manera:

Consumo tradicional de Savia de *M. paradisiaca*: 60 ml/ 60 Kg/día

Dosis con relación a consumo tradicional: 1ml /Kg/día

Dosis de trabajo:

- |              |                 |   |
|--------------|-----------------|---|
| a) Dosis 1 : | 1ml/Kg/día :    | 0.3 ml <i>SMp</i> + 9.7 ml Agua destilada |
| b) Dosis 2 : | 3.3 ml /Kg/día: | 1 ml <i>SMp</i> + 9.0 ml Agua destilada   |
| c) Dosis 3 : | 10 ml/Kg/día :  | 3 ml <i>SMp</i> + 7 ml Agua destilada     |



**Cuadro 1.-** Relación de variables tiempo de administración y dosis de Savia de *Musa paradisiaca* (*SMP*), respecto al calendario de inmunización con colágeno II, durante el periodo de experimentación. No se incluye el periodo de tiempo para las pruebas evaluatorias *ex vivo* para la valoración inmunomoduladora de *SMP*.

El trabajo paralelo al presente, realizado por la Lic. Ximena Subieta, demostró, en resultados aun no publicados, el margen de seguridad de la *SMP* respecto a su contenido de oligoelementos, los cuales se tomara en cuenta para el calculo de dosis respecto al Zinc.

Zn: Consumo limite para persona de 60 Kg como requerimiento nutricional = 15 mg/día -/+ 10

Dosis limite : 0,42 mg/día/Kg      Dosis toxica: 2,52 mg/Kg

Concentración Zn en *SMP* : 80 mg/dl

Para Dosis 1 : 0.8 mg Zn/Kg  
 Para dosis 2 : 2.67 mg Zn/Kg .  
 Para dosis 3 : 8 mg Zn/Kg .

La administración de las dosis de *SMP* se realizó después de retirar por 3 horas el agua *ad libitum*, garantizando el consumo estimado mínimo de 1 ml/día/ ratón.

El control negativo para administración con *SMP* lo constituyeron los grupos control (+ )y (-) para inmunización, los cuales ingirieron agua *Ad libitum* durante el proceso experimental.

## D DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Se planteó un estudio analítico de tipo observacional a nivel pre-clínico experimental en el que se observó y anotó los cambios fisiológicos de los animales expuestos a la inducción de autoinmunidad por colágeno tipo II, sin alterar el transcurso.

Sobre la base del calendario de inmunización se realizó un estudio de intervención mediante un ensayo clínico experimental o preclínico que involucró el tipo de ensayo terapéutico en grupo durante y después respecto a la primera inmunización, y un ensayo preventivo en grupo antes

Se usó agua administrada *ad libitum* como placebo siendo los grupos aleatorizados de un grupo inicial de ratones machos *balb/c* abierto, determinado por la mayor incidencia de autoinmunidad inducida por colágeno II en machos, pero indistinto para *Smp*.

Hubo una alta adherencia al estudio, no existiendo muerte de animales durante la experimentación, ni olvido en la administración de las dosis de *Smp* y placebo.

La aleatorización evito el riesgo de sesgo de selección, mientras que la nula pérdida de sujetos al estudio permitió que no exista sesgo de información.

Al tratarse de un estudio preclínico experimental no se presenta un efecto placebo.

Al ser un ensayo preclínico experimental no es posible generalizar, por lo que no existe una población de referencia en la que se vea directamente la magnitud del impacto del estudio.

## E ESTANDARIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS

### 1 INDUCCIÓN DE CIA

Existen múltiples factores que intervienen en el desarrollo de los procesos autoinmunes. La artritis reumatoide muestra que muchos pacientes desarrollan autoinmunidad dirigida a Colágeno II, en los que el test de hipótesis plantea que haplotipos humanos (HLA-DR1) identificados serológica y molecularmente pueden expresarse quiméricamente en ratones transgénicos, en los que se evidencia un severo proceso artrítico acompañado por especificidad T y B restringida hacia Colágeno II en animales inmunizados con colágeno II con reacción cruzada a colágeno murino<sup>47,207</sup>.

Estos estudios demuestran la importancia del colágeno tipo II en inducción de artritis experimental con extrapolación a humanos y como elemento de exploración de mecanismos inmunológicos del proceso autoinmune.

El proceso de inducción dependerá entonces del origen, calidad y dosis del colágeno extraído, de su eficacia artritogénica en inmunización, y de la cepa animal de experimentación.

### Dosis de Colágeno Tipo II ( CII)

El proceso de inmunización fue realizado en tres grupos de ratones según la administración de dosis de *SMP*, para los cuales se realizaron los cálculos de dosis de colágeno II para inmunización.

Grupo 1 Antes : 18 ratones inmunizados

Grupo 2 Durante : 18 ratones inmunizados

Grupo 3 Después + control : 24 ratones inmunizados

Concentración de Colágeno Tipo II en emulsión: 100-200 ug/ ratón

Volumen a inmunizar por ratón : 100 uL.

Peso promedio de ratones : 30 gramos

Concentración de colágeno purificado: 2,36 mg/ml

#### Para Grupos Antes y Durante:

Respecto a concentración en emulsión: 0.8 ml CII

2 ml emulsión ----- 1 ml Colágeno II (respecto a numero de ratones)  
----- 1 ml CFA o IFA

Concentración en la emulsión preparada: 131.1 ug CII / Ratón

#### Para Grupo Después y Control (+) de inmunización:

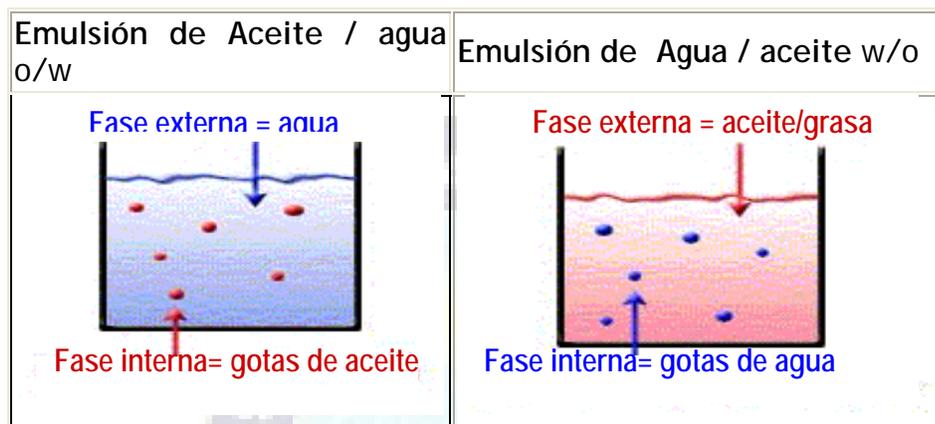
Respecto a concentración en emulsión: 0.8 ml CII

2.6 ml emulsión ----- 1.3 ml Colágeno II  
----- 1.3 ml CFA o IFA

Concentración en la emulsión preparada: 170.4 ug CII / Ratón

## Preparación de la emulsión

Las emulsiones se definen como la mezcla de por lo menos dos sustancias no miscibles, las que conforman una fase interna o dispersa y otra externa o continua. Su estabilidad depende de la estructura fundamental del emulsificante, balance hidrofílico / lipofílico, carga iónica, etc<sup>202</sup>.



Tipos de emulsión según balance hidrofílico/lipofílico<sup>202</sup>

Las emulsiones aceite / agua con Adyuvantes desarrollado por J. Freund y Colaboradores están compuestas por un volumen de Adyuvante Completo o Incompleto de Freund (IFA y CFA) con un volumen de Antígeno hidrosoluble, que en el humano promueven un aumento en la producción de anticuerpos al ser compuestos pertenecientes a la familia de Sustancias Inmunopotenciadoras utilizadas en producción de antisueros (vacunas)<sup>240,129,83,2</sup>. Tanto IFA y CFA son bien tolerados siendo controlada la toxicidad por el alto grado de aceites minerales no metabolizables, surfactantes purificados (Arlacel A) y micobacteria (M. tuberculosis o M. Butyricum) en CFA. Estos elementos también generan una potenciación no específica de macrófagos<sup>37,240,83</sup>.

El Colágeno II purificado y suspendido en solución polar de Ácido acético en mezcla con CFA y con IFA( boosted) serán los elementos que conformen la emulsión utilizada en esta investigación. La metodología normalizada para la obtención de emulsión estable se describe paso a paso a continuación.

- ◆ Se construyó un emulsificador por el método jeringa- jeringa unidos por las agujas, el cual utiliza jeringas plásticas de 5 ml unidas por las agujas. Este material fue descartado al presentar degradación del caucho del embolo de las jeringas por el aceite mineral del Adyuvante Completo de Freund (CFA), el cual contamina la emulsión y puede determinar la desnaturalización del colágeno perdiendo su inmunogenicidad.
- ◆ El método apropiado de emulsificador fue construido con jeringas de vidrio de 5 ml unidos a rosca a una llave de tres entradas para lograr emulsión.

- ◆ Una jeringa fue cargada con Colágeno II purificado según volumen calculado para el número de ratones a inmunizar, debiendo ser un volumen máximo de 2,5 ml.
- ◆ La otra jeringa se cargo con Adyuvante Completo de Freund (CFA) previamente resuspendiendo M. Tuberculosis por inversión y en un volumen igual al calculado anteriormente para el colágeno II (1:1)
- ◆ Se abrió la llave de tres entradas para las jeringas y por presión por turno de émbolos, se mezcló ambos componentes lentamente hasta lograr un producto lechoso.
- ◆ El test de estabilidad para la emulsión se realizó colocando una gota de la emulsión preparada en agua. La gota debe mantener la forma demostrando estabilidad. Si se dispersa la gota en el agua, es necesario continuar la mezcla hasta lograr estabilidad para inmunización.
- ◆ La emulsión estable se vació en un vial estéril del cual se llenó en jeringa de insulina para la inmunización. Se cambió la aguja para cada ratón a inmunizar.

### Inmunización y vía de administración

El sitio de inyección de una emulsión compuesta por CFA-Colágeno II, genera una respuesta inflamatoria local dependiendo de la calidad y cantidad de Adyuvante empleado. La vía de administración elegida fue la subcutánea en base de cola en la que existe migración por fístulas hacia la región ventral del animal, logrando el paso seguro por bazo y contacto con células plasmáticas en nodos linfáticos. Es la vía más utilizada en inducción con Colágeno II aunque existen protocolos de inducción por inmunización intradérmica, intramuscular y otros<sup>240</sup>.

Después de limpiar la región circundante a la base de cola con algodón embebido en alcohol yodado, se inyectó a cada ratón 0.1 ml de la emulsión estable conteniendo +/- 100 ug de colágeno II, colocando la aguja en posición paralela a la cola. La formación de la pápula en tejido subcutáneo confirmó la correcta inmunización vía subcutánea.

No se utilizó anestésicos inhalatorios para manipular a los animales, recurriendo simplemente a la sujeción correcta de los ratones. Tampoco se utilizó tubos con salida de cola empleados en inmunización en base de cola.

Se realizó una Segunda inmunización o Reinmunización (boosted) con Adyuvante Incompleto de Freund (IFA), a los 21 días de la primera inmunización según metodología experimental de inducción.

## 2 CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CII CIRCULANTES

Los Linfocitos B juegan un rol importante para desarrollar ataque y severidad durante la reactividad autóloga en enfermedades autoinmunes, especialmente las mediadas por formación de complejos inmunes o inmunocomplejos o hipersensibilidad III, y en la que se halla la artritis reumatoide.

Es en esta enfermedad, en la que Investigaciones recientes proponen un proceso de selección preinmune de Linfocitos B, fundamentado en la accesibilidad de epitopes determinantes de artritogenicidad en la superficie intacta de tejido cartilaginosa<sup>207,105</sup>. Por otro lado, es abundante el respaldo experimental sobre Linfocitos B en la síntesis de autoanticuerpos hacia epitopes artritogenicos de colágeno II y anticuerpos hacia segmentos aminoacídicos de IgG<sup>47,207,104,105,37,240,129,83</sup>.

El modelo autoinmune inducido por Colágeno II, reproducido en el presente trabajo, evalúa de forma fundamentada la reactividad humoral hacia autoantígeno artritogenico colágeno II, emulsionado (incluyendo boosted con IFA) con Adyuvantes de Freund, combinación que es la que determina la respuesta descrita anteriormente.

En animales susceptibles, los niveles de anticuerpos contra colágeno II (usado en inmunización), son muy altos. Esta inmunogenicidad viene determinada por el uso de Colágeno II heterólogo en la inmunización, que provoca fenómeno de reacción cruzada de anticuerpos a colágeno II de varias especies, induciendo respuesta contra el Colágeno II autólogo debido a la existencia de regiones aminoacídicas conservadas en las fibras<sup>151</sup>.

La repetibilidad de ensayos que detectaron anticuerpos anti colágeno II sintetizado, representa cualitativamente el éxito de reproducibilidad del Modelo Experimental, mientras que cuantitativamente determina su aplicación en la valoración de la capacidad moduladora de la reactividad autoinmune, por tratamientos biológicos, o farmacológicos propuestos.

### Prueba capilar e InmunoDifusión Doble (IDD)

La optimización de condiciones para hacer reproducible un Modelo Experimental aparte de los requisitos de Material y métodos estándar, es modificada por condiciones medioambientales y por variaciones de manipulación por los operadores. Por esto en el presente trabajo, la verificación de la presencia de linfocitos B secretores de Anticuerpos anti colágeno II es determinada por semicuantificación de dichos anticuerpos, lo que muestra la eficacia del Modelo para la evaluación de Reactividad autoinmune humoral inducida por el antígeno artritogenico Colágeno II.

La prueba **capilar** determina cualitativamente la formación de complejos inmunes Ag-Ac que para el caso esta formado por Colágeno II-Anticuerpos Anti colágeno II (es posible que exista interacción con fracciones de complemento similares a IgG anti IgM - IgM - Complemento o Factor reumatoide) los cuales son evidenciables como agregados o precipitados que se aprecian en los capilares.

Se realizó la prueba capilar para 10 sueros de ratones inmunizados, los cuales fueron diluidos 1/3 y 1/30 en PBS 0.15 M. Mientras el colágeno II se diluyo 1/10 en ácido acético 0.05 M.

Cada capilar fue cargado por un extremo, con dilución de suero de ratón inmunizado conteniendo Ac anti colágeno II, mientras que por el extremo opuesto con dilución colágeno II.

Los sueros fueron identificados como:

- |           |           |
|-----------|-----------|
| a) B p.i. | f) E b.i. |
| b) F Im   | g) D p.i. |
| c) C b.d. | h) K b.i. |
| d) G b.i. | l) K Im   |
| e) HIm/ce | j) Mx(sm) |

Se observo la intensidad de formación del Inmunocomplejo agregado en nubosidad al centro del capilar, en la interfase de contacto entre el suero y la solución con antígeno Colágeno II. Para verificar la presencia de anticuerpos en un suero en intensidad y reactividad, puede ser evaluada mediante la técnica de **Inmunodifusión doble u Ouchterlony (IDD)**, que utiliza la base general de las pruebas de inmunoprecipitación en la que un Antígeno largo y anticuerpo policlonales o una mezcla de monoclonales solubles, se enfrentan formando un inmunocomplejo insoluble pero lábil a cambios de concentración de alguno de los reactantes.

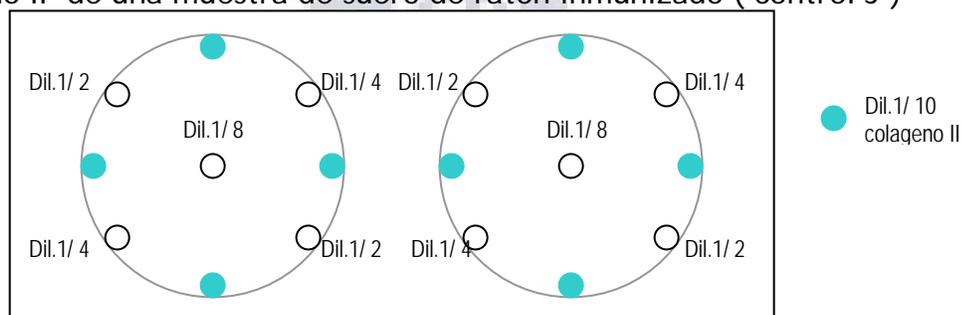
Durante la formación del inmunocomplejo, en solución se forman agregados de diferente tamaño que llegan a un valor critico donde precipitan. Los factores que determinan el coeficiente de precipitación molecular (S) son el volumen (V), y la diferencia de densidad del inmunocomplejo (r) respecto al solvente (t), y el campo gravitacional (g)  $S = V ( r - t ) g$ .

La reversibilidad del proceso, en la practica no ocurre, la muestra de ello es el Fenómeno Danysz utilizando toxina de difteria<sup>8</sup>.

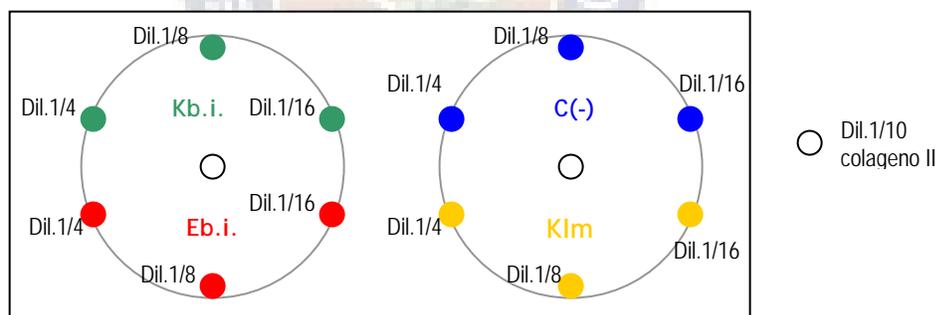
El ensayo de Inmunodifusión doble u Ouchterlony es realizado en medio semisólido preferentemente agar agarosa 1-3%, por lo que un factor importante en la difusión correcta de los reactantes en solución a través de los poros del gel, son el peso y estructura molecular además de los ya mencionados factores de precipitación. La estructura secundaria singular de las fibras de colágeno II y características moleculares antes descritas determinaran la aptitud de Ouchterlony en cuantificación de Anticuerpos anti Colágeno.

El seguimiento experimental fue desarrollado como sigue:

Se realizaron dos pruebas; La primera para determinar el Titulo de Ac anti Colágeno II de una muestra de suero de ratón inmunizado ( control J )



La segunda prueba se realizó para determinar el título de Ac anti colágeno II en cuatro sueros de animales inmunizados [ Kb.i., C(-), Eb.i., KIm]



El procedimiento utilizado para ambas pruebas fue el siguiente:

- Se prepararon de placas portaobjetos adicionando gel agarosa 1 % diluida por calentamiento y colocada en capa fina sobre las placas.
- Se realizaron horadaciones en el gel según esquema de diluciones de la prueba.
- Se incubó el gel por 48 horas a temperatura ambiente para la difusión.
- Se eliminó la carga de proteínas solubles lavando las placas 4 veces cada 6 horas en solución salina a concentración fisiológica 0.09 %
- Se secó en estufa por 24 horas a 37 °C.

Las placas fueron teñidas según la siguiente secuencia:

- o Solución Rojo Ponceau 1% por 10 minutos
- o Solución Ácido Acético 1% por 10 minutos
- o Solución Ácido Acético 2 % por 10 minutos

Se enjuagó las placas suavemente con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente.

### E.L.I.S.A. indirecto

Para la valoración de la Integridad Funcional de la Respuesta Humoral se puede utilizar el Ensayo de Células Formadoras de Placas (PFC); alternativamente la prueba E.L.I.S.A. (Ensayo Inmuno enzimático o Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Estos difieren básicamente en el nivel de evaluación de la respuesta humoral<sup>78,248</sup>.

La estandarización y validación de Sistemas ELISA requiere una secuencia Metodológica preparativa y analítica. La especificidad de los anticuerpos producidos y a cuantificar determina el tipo de sistema para evaluar. Es por lo anterior que la Técnica a Estandarizar constituye un Sistema ELISA indirecto, fundamentado en la cuantificación de anticuerpos en suero que reconocen específicamente a su antígeno específico adherido a una superficie sintética, complejo que es reconocido por un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado enzimáticamente para dar reacción de color al enfrentar a su sustrato.

La validación de un Sistema ELISA, evalúa la Exactitud mediante linealidad, el paralelismo y comparación con método de referencia. La precisión es validada según la repetibilidad y la reproducibilidad<sup>224</sup>. Los procedimientos de Sistemas ELISA aplicados en modelos de autoinmunidad, corresponden a protocolos ya analizados en exactitud y precisión, por lo que el ELISA Indirecto en el presente trabajo estandariza y valida la Especificidad determinada por las concentraciones experimentales óptimas para autoanticuerpos anti Colágeno en suero murino, y Conjugado anti IgG murino-HRP donde no demuestran reactividad cruzada, inespecificidad, o exceso de reactante.

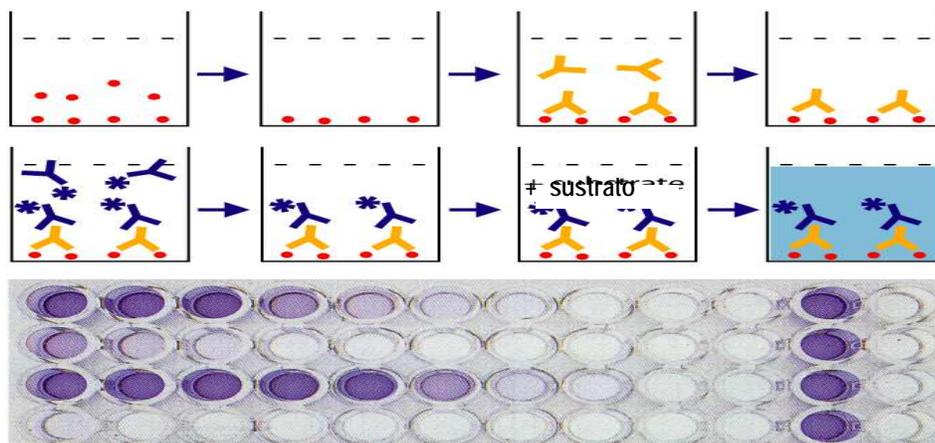
Los anticuerpos contra un antígeno no purificado presentarán un porcentaje variable de anticuerpos no específicos que pueden enmascarar el resultado esperado<sup>59,60</sup> por lo que también se evalúa la Precisión en el pegado o coating que determina el rango de concentración.

Finalmente, la Especificidad interferida por moléculas cromógenas aplicadas en fases del protocolo ELISA: TMB-Urea-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o como contaminantes de suero: Hemoglobina (Hb) son evaluadas por espectrofotometría.

El protocolo general de ELISA presentado a continuación, fue aplicado en la Validación de la capacidad Inmunomoduladora de *Smp* en CIA, y requiere la estandarización y normalización de los cuatro eventos en el Sistema ELISA (Coating, Formación de Inmunocomplejo Ag-Ac, Obtención y reconocimiento de Conjugado, Revelado de reacción enzimático)<sup>51</sup>

Se siguió el siguiente protocolo:

1. **COATING** o **pegado**: El colágeno II a concentración óptima en rango 2-5 ug/ml, se adicionó a placas multipozo en una solución de Tris-NaCl (Tris: 0.05M; NaCl: 0.2M) a pH 7.4 y se incubó por una noche a 4 °C .
2. Se lavó 3 veces con PBS 0.15 M pH 7,4 M
3. El área de la placa no pegada con antígeno se bloqueó con PBS/caseína 2% (p/v), (leche Morinaga con alto contenido en caseína) incubando 1 hora con leve movimiento a Temperatura ambiente, para luego lavar con PBS/Tween 20 a 0.05 % (v/v).
4. Se **INCUBÓ CON SUERO** en PBS/Tween 20 a dilución establecida, durante 2 horas a temperatura ambiente con leve movimiento.
5. Se lavó 3 veces con PBS /Tween 20
6. Se **INCUBÓ CON DILUCIÓN DE CONJUGADO** (IgG goat-HRP anti Fc -IgG mouse) , a 200 ul/pozo, por 2 horas a temperatura ambiente con leve movimiento.
7. Se lavó con 3 veces con PBS/Tween.
8. Se colocó 100 ul/pozo de sustrato TMB mas 50 ul/pozo de Solución Stop H2SO4 0.13 M y se **MIDIÓ LAS ABSORBANCIAS** en lector de placas multipozo E.L.I.S.A.(Hitachi).



Esquema de los diferentes pasos del protocolo general del Sistema ELISA indirecto<sup>8</sup>

## Coating

El proceso de adsorción de moléculas a superficie de poliestireno es denominado COATING o Pegado. La unión de Biomoléculas con superficie de poliestireno requiere la interacción hidrofóbica y polar simultánea para estabilizar la adsorción, y mejorar la unión<sup>146</sup>.

Los motivos por que el poliestireno es el principal material de Placas multipozo (microtiter plates) son:

- ✦ Adsorbe muchos componentes biológicos
- ✦ Presenta una excelente calidad óptica, es uniforme y limpia por baja absorbancia basal
- ✦ Es resistente a otros químicos<sup>146,9</sup>

Existen factores que pueden afectar el proceso de "coating", de los cuales depende el proceso:

- ✦ Calidad de la superficie de poliestireno determinada por la pureza de la materia prima.
- ✦ Propiedades de las biomoléculas como la estructura, polaridad, concentración, y otros
- ✦ Tiempo y temperatura de coating
- ✦ Fuerza iónica y pH de solución Buffer modificada por detergentes en la solución
- ✦ Bloqueo apropiado de sitios no saturados y posterior lavado<sup>146</sup>.

La cantidad de antígeno o anticuerpo unido a poliestireno es crítica en la sensibilidad del ensayo, motivo de cuidadoso control, que sin embargo no define la orientación molecular que es impredecible y puede reducir el potencial de sitios de unión para el analito. Para el pegado de anticuerpos, la máxima cantidad de Inmunoglobulina que puede ser adsorbida en monocapa es alrededor de 650 ng/cm<sup>2</sup>. La estabilidad por lo tanto determina la sensibilidad y precisión del ensayo<sup>146</sup>.

El proceso de pegado de antígeno en microplacas de poliestireno con fondo plano, se realizó determinando primeramente el Buffer apropiado para el coating. Los Buffer analizados fueron Tris Na Cl 0.05 M pH 7.2-7.4 y PBS 0.15 M pH 7.4.

El amortiguador seleccionado es Tris Na Cl 0.05 M el que permitió detectar anticuerpos anti colágeno II en suero hiperimune de ratón presensibilizado, lo que demuestra la interacción colágeno - poliestireno. Adicionalmente se verifico el rango de 2 - 5 ug/ml como concentración de colágeno II utilizado en protocolos de ELISA para el pegado de antígeno, los cuales son óptimos para la experimentación.

El tiempo incubación para el pegado de antígeno demostró que a mayor tiempo de incubación a 4 °C se obtienen mejores resultados de pegado del colágeno II.

### Dilución conjugado peroxidasa

Las peroxidasas son las enzimas con mayor resistencia a inactivación térmica, es así que se asume que si se destruye las peroxidasas no existe otra enzima en el medio<sup>189</sup>. Esta es una de las características para su uso en diversos ensayos que incluyen los inmunocitoquímicos<sup>42</sup>, la polimerización oxidativa de fenol<sup>138</sup>, y otros. Análisis de interferentes sobre la actividad enzimática, comprobaron la inhibición de HRP por hidrazidas, por lo que el uso de azida de sodio, afectaría los resultados<sup>210</sup>.

En el E.L.I.S.A. la dilución de los reactantes constituye un paso fundamental del proceso, para la obtención de conjugado formado por anticuerpo monoclonal obtenido en animales, hibridomas, o recombinantes, con Peroxidasa de Rábano Picante (HRP).

Este proceso se realiza en soluciones que favorecen e incrementan la unión HRP-Ac con el ácido fenildiborónico<sup>44</sup>, peryodato de sodio, borohidruro de sodio<sup>59,60</sup> u otros.

La presentación den polvo liofilizado de HRP conjugado a fracción de IgG de carnero anti Fc-IgG de ratón, presenta dos puntos importantes en su manipulación y son:

- ◆ La RECONSTITUCION que por razones descritas, esta exenta de azida, fue homogénea y rápida por su higroscopia. Se utilizó 2 ml de agua bidestilada.
- ◆ La DILUCIÓN de trabajo, se realiza por que la concentración de conjugado en la solución reconstituida es muy alta por lo que el titulo generalmente es también alto (concentración de 15,5 mg/ml con titulo de 1:192000 para nuestro conjugado HRP.Ac anti ratón)<sup>103</sup>. Para esto se realizó un ensayo multivariable del cual surgieron además los resultados para dilución de suero y longitud de Onda HRP cromógeno-TMB Urea H2O2, tal como se muestra en la tabla 2:

Diluciones Sueros	Diluciones conjugado			
	I. 1/1000	II. 1/10000	III. 1/100000	IV. 1/1000000
A 1/10 Suero ratón inmunizado	100 ul I. + 100 ul A	100 ul II + 100 ul A	100 ul III + 100 ul A	100 ul IV+ 100 ul A
B 1/30 Suero ratón inmunizado	100 ul I. + 100 ul B	100 ul II + 100 ul B	100 ul III + 100 ul B	100 ul IV+ 100 ul B
C 1/100 Suero ratón inmunizado	100 ul I. + 100 ul C	100 ul II + 100 ul C	100 ul III + 100 ul C	100 ul IV+ 100 ul C
D 1/10 suero ratón no inmunizado	100 ul I. + 100 ul D	100 ul II + 100 ul D	100 ul III + 100 ul D	100 ul IV+ 100 ul D
E 1/10 suero humano normal	100 ul I. + 100 ul E	100 ul II + 100 ul E	100 ul III + 100 ul E	100 ul IV + 100 ul E
F Conjugado HRP-Ac anti Raton	200 ul F	200 ul F	200 ul F	200 ul F

Tabla 2.- Diseño experimental multivariable para estandarización de Prueba ELISA

Evaluamos la concentración óptima de conjugado peroxidasa ( peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG Fc, ICN Pharmaceuticals, Inc.). El producto liofilizado fue resuspendido en 2 ml de agua destilada deionizada INTI, alicuotado a 0.4 ml en 5 viales estériles y guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se realizaron diluciones de la suspensión modulo 10X en  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  aplicadas al experimento según esquema general.

### Dilución suero

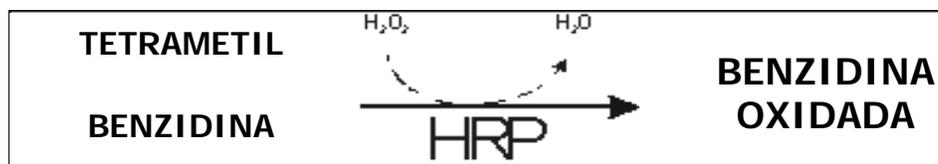
Varias especificaciones permiten obtener sueros aptos para un ELISA indirecto en los que la calidad y cantidad de anticuerpos debe ser mantenida.

La presencia de anticuerpos en sueros hiperinmunes de ratón, fue comprobada previamente por prueba capilar (formando banda de inmunocomplejo Ag-Ac visible macroscópicamente).

Según el diseño experimental, se ensayaron con tres diluciones de suero: 1/10, 1/30, 1/100 de las cuales se determinó la Dilución de sueros utilizada en el procedimiento experimental principal de Inmunomodulación.

### Longitud de Onda para HRP-cromógeno TMB Urea $\text{H}_2\text{O}_2$

El sustrato cromógeno más empleado en la actividad peroxidasa de HRP es la tetrametilbenzidina (TMB Microwell Peroxidase Substrate System) <sup>42,227,228</sup> análogo no carcinogénico de la benzidina <sup>228</sup>, en cuya reacción el agua oxigenada actúa como sustrato enzimático y TMB es el donante de electrones <sup>42</sup>.



Catálisis y Reacción enzimática de la Oxidación de TMB, donde actúa como donador de electrones durante la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  catalizada por Actividad Peroxidasa de HRP<sup>174</sup>

Durante esta reacción hasta la medición de absorbancia, se reconocen dos puntos donde se puede obtener Densidad Óptica por espectrofotometría.

El primero es el Factor Cinético donde se produce una coloración azul inmediatamente o simultánea a la reacción con peroxidasa. Se lee a 370 y a 620 - 650 nm<sup>227,228</sup>.

El segundo paso es Ensayo de Punto Final, donde el uso de Solución Stop Ácida  $H_2SO_4$  0.13 M en nuestros experimentos, causa el viraje del sustrato a color amarillo. Su lectura es a 450 nm. Su estabilidad es cerca de 30 minutos para lectura fotométrica<sup>227,228</sup>.

La relación directa cambio de coloración con el cambio de Longitud de Onda corresponde a leyes básicas de óptica aplicadas a espectrofotometría.

El ensayo para establecer en nuestras condiciones la longitud de onda óptima de lectura, se realizó en el Punto Final con sustrato virado a amarillo, y con lectura de micro placa del experimento (3) y (4) por duplicado a tres longitudes de onda distintas:

⊕ 450 nm.      ⊕ 405 nm.      ⊕ 545 nm.

### Interferencia espectrofotométrica de Hb.

La inexistencia de actividad peroxidasa endógena es necesario ser demostrada cuando se emplea HRP como marcador de anticuerpos. Las células sanguíneas que de alguna forma contaminan el suero obtenido, mantienen su actividad peroxidasa temporalmente<sup>179</sup>. Estos Glóbulos rojos, por otro lado determinan la variación del color normal de un suero por la presencia de Hemoglobina. Esta molécula metaloprotoporfirinica genera coloración roja al capturar oxígeno la que puede determinarse espectrofotométricamente a 560 nm. La interferencia básicamente se relaciona a la Hb residual presente en la reacción enzimática de HRP (estructura también protoporfirinica<sup>102</sup> con sus cosustratos TMB  $H_2O_2$ ).

Se seleccionaron 3 absorbancias máximas obtenidas de un ensayo previo ELISA. Estas absorbancias pertenecen a sueros de ratones sensibilizados con colágeno II. El contenido de cada pozo fue diluido en serie 1/4, 1/6, 1/8 en Tris NaCl 0.05 M-0.2M pH 7,4.

El barrido de longitud de onda, se realizó en el pool de muestras.

Paralelamente se realizaron diluciones de suero con alto contenido de hemoglobina (suero color vino) en modulo 2X: 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

Las diluciones permiten determinar el pico de máxima absorbancia para ambas muestras, y la interferencia de Hb en la lectura de reacción HRP-TMB-sustrato.

### 3 BIOENSAYO *IN VITRO* DE ACTIVACIÓN DE ESPLENOCITOS POR REDUCCIÓN DE SALES DE TETRAZOLIO

Los Ensayos para evaluar la Activación y Proliferación celular mediante Sales de Tetrazolio, usados para el screening de agentes citotóxicos o de inductores de activación linfocitaria, son métodos seguros, sensibles y cuantificables<sup>34</sup>.

El primero desarrollado fue el Bioensayo MTT que se describe molecular y bioquímicamente mas adelante, fue reportado en 1950 como técnica basada en la capacidad de células vivas metabólicamente activas y viables para reducir, por deshidrogenasas, la sal de tetrazolio que se convierte en un compuesto coloreado intracelular no soluble en agua denominado FORMAZAN, generando equivalentes reductores (NADH, NADPH) todo en respuesta a factores estimulantes externos<sup>34,153</sup>.

Existiendo otras técnicas se tomaron los siguientes criterios para seleccionar este procedimiento en el presente trabajo:

- Aplicación Sencilla: No requiere reactivos adicionales y/o procedimientos de lavado.
- Rapidez: Placa multipozo y lector de ELISA agilizan la obtención de la D.O. que determina la intensidad de color del Formazan disuelto.
- Sensibilidad: El ensayo puede realizarse con baja concentración celular que, para el cultivo de esplenocitos murinos, es 2.5 E+5 células/pozo.
- Exactitud y Precisión: La Absorbancia es proporcional al numero de células/pozo con actividad metabólica.

- Seguridad: No requiere de Isótopos radioactivos (3HTdR) o sustancias intercalantes de ADN (Mutágeno Brdu)<sup>34</sup>.

El estandarizado del Bioensayo MTT requiere la obtención óptima de cultivo primario de esplenocitos murinos y de especificaciones en el manejo de medios de cultivo, en determinar efectos citotóxicos, y otros referidos al Diseño experimental, detallados a continuación.

### Aislamiento y concentración de esplenocitos.

El análisis de células procedentes de cualquier tejido, puede tener importancia diagnóstica y en propósitos de investigación. En experimentos con animales las células inmunológicas pueden aislarse de diferentes órganos como timo, bazo, nodos linfáticos, de los cuales no se obtienen poblaciones celulares puras<sup>92</sup>.

Los métodos de separación de estirpes celulares inmunocompetentes están basados en parámetros físicos celulares (filtración, centrifugación), adherencia (algodón de nylon, lana de vidrio)<sup>92</sup>, en las diferencias morfológicas y en marcadores por moléculas de superficie entre las sub poblaciones son reveladas por diversas técnicas que desarrollaron desde la Técnica de Formación de Rosetas, la cromatografía de afinidad, hasta el scanning por Microscopía electrónica<sup>167,92,54</sup>.

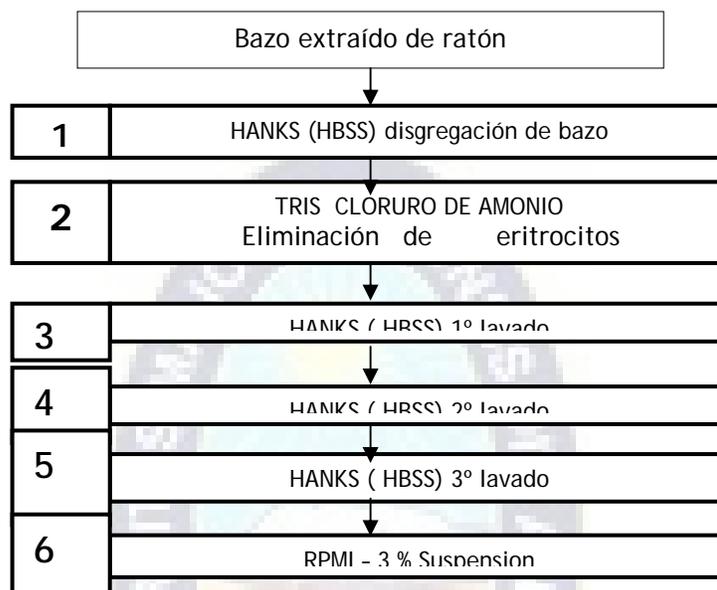
Procedimientos de aislamiento celular en Modelos experimentales incluyen a más de uno de los mecanismos de separación durante el desarrollo de estos protocolos<sup>165,188</sup>, en las que las poblaciones celulares se encuentran en mayor número en un determinado órgano, se genera ventajas, ya que pueden concentrarse en montos mayores al final del procedimiento de aislamiento celular.

El Sistema de Cultivos Primarios de Esplenocitos aplicado en los experimentos realizados en el Modelo Experimental de Autoinmunidad CIA que se llevó a cabo, corresponde a un Sistema estandarizado en el laboratorio y dispuesto para el estudio de la activación, proliferación y funcionalidad celular<sup>221</sup>. El mencionado Sistema establece parámetros esenciales durante cada fase del aislamiento estandarizado. Las modificaciones realizadas al Sistema, en este trabajo, se relacionan con el Material empleado, existiendo diferencias básicamente en los reactivos Buffer y medio de cultivo. Los parámetros esenciales, las fases del protocolo, y las modificaciones son presentadas a continuación en el protocolo de Aislamiento utilizado:

- ◆ Se obtuvo sangre (+/- 3 ml) por punción cardiaca y posteriormente se procedió al dislocamiento cervical de cada animal.
- ◆ Se roció de forma aséptica la región abdominal con alcohol 70 % para su manejo estéril en campana de flujo laminar y se realizó un ojal abdominal para extraer el bazo de la región superior izquierda del peritoneo, colocándolo de inmediato en caja Petri con 4-5 ml de medio HANKS (Hanks Balanced Salt's HBBS, Rojo Fenol (+) SIGMA-Aldrich Corp.) pH 7,4 +/- 0.2 atemperado a 4°C en baño de hielo.
- ◆ Se disgregó mecánicamente el bazo para eliminar el tejido de cápsula y tabiques de bazo, de constitución fibroelástica<sup>5</sup>, y liberar los esplenocitos al medio Hanks. Luego se dejó sedimentar los detritos y se traspasó el sobrenadante a tubo de vidrio estéril.
- ◆ Rescatando el sobrenadante, se repitió la sedimentación en tubo Fálcon plástico, tras lo cual se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos a 4 °C. para concentrar linfocitos y se resuspendió el pellet en 1 ml de Tris NH<sub>4</sub>Cl pH 7,2 - 7,4 0.17 M por 5 minutos a temperatura ambiente, paso en el que se eliminó los glóbulos rojos que interfieren en la determinación de la concentración celular.
- ◆ Se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se procedió a lavar el pellet en medio Hanks, eliminando el tejido esplénico con apariencia fibrosa. Se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. Se repitió el lavado tres veces, después de los cuales se resuspendió el pellet en 1 ml de medio RPMI (RPMI 1640, 3% Suero Fetal Bovino no de complementado, 1% pool de Antibióticos estreptomycin y penicilina, Rojo Fenol (+), mercaptoetanol (-))
- ◆ Se determinó la concentración celular mediante aplicación de Técnica de exclusión por Colorante vital Azul Tripan para lo que se mezcló 50 ul de la suspensión de esplenocitos aislados en RPMI con 50 ul de solución colorante vital Azul Tripan al 0.3 %<sup>221,78</sup>. Luego de 5 minutos la mezcla fue cargada en cámara de Neubauer, para el conteo de células.
- ◆ Las formulas para el cálculo de concentración fueron:
  - ◆ Recuento en cuadrantes de G. Rojos: N° células x 2 x 5 x 10000
  - ◆ Recuento en cuadrantes de G. Blancos: (N° células/4) x 2 x 10000
- ◆ A partir de la concentración calculada en la suspensión, se ajustó a la concentración optima de  $1 \times 10^6$  células/ml establecida en el Sistema Estándar revisado y aplicado a Cultivos Celulares Primarios.

Las principales modificaciones consisten en la aplicación de medio Hanks durante la experimentación; el procedimiento original utiliza RPMI 5% Beta-mercaptoetanol (Agente reductor utilizado en desnaturalización de oligómeros<sup>85</sup>, incluso para la resuspensión con concentración calculada.

Puntos clave de uso de reactivos y medios en el Protocolo modificado



En cada uno de los seis puntos se separan 50  $\mu$ l del homogeneizado de células a un tubo eppendorff estéril, para luego determinar la concentración y viabilidad celular por Técnica de Exclusión de Colorante Vital Azul Tripán.

### Toxicidad de CII

Ante la posibilidad de que el Antígeno con el que se enfrenta las células en cultivo tenga algún efecto deletéreo dependiente de la fracción proteica o de las moléculas acompañantes, se diseñó un ensayo de inocuidad del Extracto de Colágeno II suspendido en ácido acético 0.5 M pH 7,4, sobre células esplénicas. Esto condujo a definir condiciones (diluciones) en las que no exista ningún tipo de daño celular respecto al control

### Solubilidad de CII en ácido acético

Se realizaron varios experimentos para evaluar el grado de solubilidad del colágeno II en ácido acético 0.5 M en el que se halla suspendido, de los cuales se planteó un experimento que demostró ser reproducible. El experimento procedió con la dilución 1/10 de colágeno II (3340  $\mu$ g/ml) en ácido acético 0.5 M., homogeneizado por 15 minutos mediante agitación magnética a temperatura ambiente. Se aplicó el protocolo de cuantificación de proteínas por Rojo Ponceau y se determinó la concentración utilizando Curva Estándar de Concentración BSA.

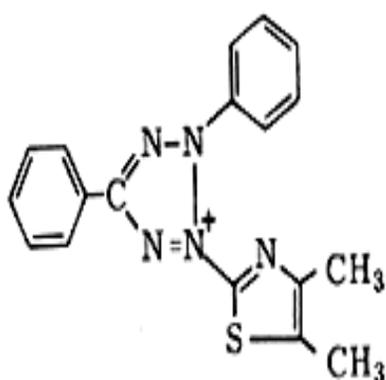
## Ensayo de Reducción de MTT

Las sales de tetrazolio debido a sus características son frecuentemente empleadas en investigación así como para aplicaciones diagnósticas (enzimología diagnóstica, bioquímica clínica y biología celular).

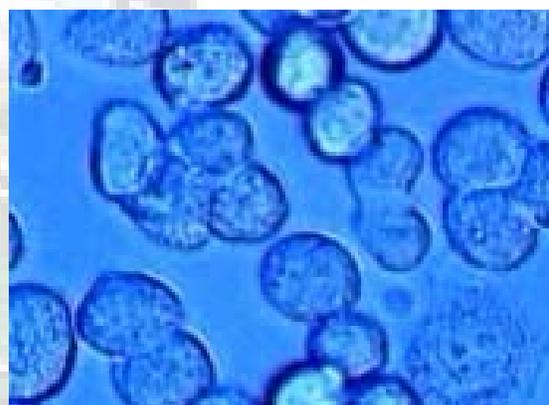
Son métodos con alta sensibilidad por tener un indicador colorimétrico para la detección de Sistemas Enzimáticos con reacciones Redox productoras de equivalentes reductores de la sal empleada.

El producto de la reducción de cualquier sal tetrazolica es denominado formazan, el cual para las sales monotetrazolicas como el MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil(-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) es escasamente hidrosoluble y vira del amarillo a azul oscuro<sup>222</sup>.

Los cristales de formazan se forman en células vivas con actividad enzimática y en células en apoptosis temprana. Las células muertas no producen cristales de formazan<sup>136</sup>.



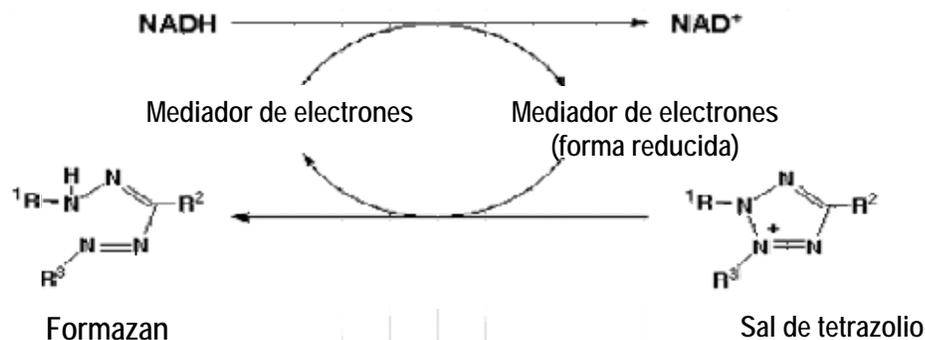
Estructura molecular de MTT  
(3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil  
(-2,5-difenil-2H -tetrazolio bromuro)<sup>222</sup>



Cristales de Formazan formados por Reducción de MTT en células vivas y apoptóticas pero no en células muertas<sup>136</sup>

Existen puntos de análisis para escoger y aplicar una sal de tetrazolio como la capacidad de captación de electrones por parte de los residuos unidos al anillo tetrazolico lo que coadyuva a la solubilidad, la absorbancia por la coloración generada al extenderse las moléculas después de la apertura del anillo tetrazolico (formazan), utilización de maquinaria enzimática para la reducción a formazan, utilización de co-factores como acarreadores de electrones de fuerte o débil (succinato, NAD, FAD) avidez hacia la oxido reducción con sales de tetrazolio<sup>222</sup>.

Estos puntos pueden identificarse en el siguiente esquema:



Esquema general de reducción a formazan considerando los puntos de análisis de la sal de tetrazolio aplicada a la experimentación<sup>154</sup>

La reacción 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio reducido a Formazan por enzimas microsomales que requieren nucleótidos pirimidicos reducidos<sup>145</sup>, establece por estudios previos que el aporte reductor de MTT por enzimas deshidrogenasas mitocondriales era mayoritario<sup>221</sup> sin embargo hoy se sabe que esta contribución es pequeña al total de MTT reducido por células, siendo además una reducción lenta y llevada a cabo por succinato deshidrogenasa, actuando como donador de electrones el succinato<sup>145</sup>.

Con respecto a las propiedades de MTT durante la experimentación, estas surgen del Método original estandarizado para cultivos primarios sometidos a activación con un mitógeno. De éste, se ensayó en este trabajo: la Solubilidad de MTT, el Espectro de Absorción de MTT, el Espectro de Absorción de Formazan, la Concentración de Esplenocitos Optima para proliferación, concentración de mitógeno PHA, y el Tiempo de Incubación de células en presencia de MTT<sup>221</sup>.

Los ensayos correspondientes a dosis de colágeno II y cinética de activación de esplenocitos surgen de un solo experimento multivariable especificado como sigue:

**Ratón A:** Animal Inmunizado y reinmunizado con Colágeno II con CFA e IFA

**Ratón B:** Animal Inmunizado y reinmunizado con Colágeno II con CFA e IFA

**Ratón C:** Animal no inmunizado en el rol de Control (-) de Inmunización

Se aplicó el Protocolo de Aislamiento de Linfocitos al bazo de cada ratón, obteniendo las respectivas suspensiones celulares de concentración medida en su viabilidad por Azul Tripán (descrito antes). Cada una de las suspensiones celulares calculadas se ajustó a la concentración de  $1 \times 10^6$  cel/ml, optima para cultivos celulares primarios

El colágeno II, previamente demostrada su inocuidad sobre células esplénicas, y su capacidad de homogenización en ácido acético 0.5M, se diluyó 3 veces en medio RPMI 3% siguiendo módulo de dilución 10 X a partir de la concentración inicial de 3340 ug/ml. El control (-) de activación no incluyó dosis de colágeno ni otro activador celular, mientras que el control (+) utilizó la Fitohemaglutinina (PHA concentración 5 mg/ml) el cual es un reconocido activador celular<sup>161</sup>.

Los volúmenes empleados y el orden experimental por triplicado para cada dosis ensayada y sus controles son detallados en el esquema general del experimento multivariable aplicado a las tres suspensiones celulares A,B, C.

DOSIS		Dosis de Colágeno II y controles de activación celular				
		1 1/100	2 1/1000	3 1/10000	Control (-)	Control (+)PHA
<i>Incubación 0 horas</i>	Triplicado 1	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 2	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 3	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
<i>Incubación 4 horas</i>	Triplicado 1	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 2	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 3	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
<i>Incubación 12 horas</i>	Triplicado 1	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 2	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 3	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
<i>Incubación 24 horas</i>	Triplicado 1	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 2	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 3	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
<i>Incubación 72 horas</i>	Triplicado 1	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 2	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA
	Triplicado 3	200 ul cel. +20 ul 1	200 ul cel. +20 ul 2	200 ul cel. +20ul 3	200ul cel	100 ul cel+ 100 ul PHA

**Tabla 3.-** Diseño esquemático de experimento general multivariable detallando las tres dosis de colágeno II ensayadas y sus controles (+) y (-) de activación, por triplicado para los 5 tiempos de incubación ( en horas 0, 4, 12, 24, 72). Cabe recordar que el esquema es aplicado a las suspensiones celulares A, B, C (control (-) de inmunización, en forma individual.

## Cinética de activación de esplenocitos por CII mediante reducción de MTT

La determinación *in vitro* del tiempo de enfrentamiento de una sub población de linfocitos con el antígeno específico hacia el cual son reactivos, establece la capacidad de los linfocitos de reaccionar en presencia del antígeno generando procesos de activación celular con características distintas a la proliferación celular.

El tiempo de incubación para la Técnica MTT varía con relación a la concentración de células/pozo y por el tipo de células en cultivo, por lo que previa a la aplicación, se realizó el test inicial de lecturas de absorbancia a varios lapsos de tiempo, tanto para MTT como para la activación y proliferación de esplenocitos<sup>34</sup>. Se ensayaron 5 tiempos de incubación de suspensión de células esplénicas en presencia de dosis de antígeno colágeno II, activador *in vivo* de linfocitos periféricos, y control (+) y (-) Después de aplicar el esquema general del experimento a las suspensiones celulares, se tomó en cuenta las siguientes especificaciones para el periodo de incubación, y para el Bioensayo por reducción de sal de tetrazolio MTT(modificado del Sistema estándar de Activación, proliferación y funcionalidad para este estudio), que revela el grado de activación celular.

- Las placas multipozo de poliestireno, fueron incubadas a 37°C 5% CO<sub>2</sub> 78,1% N<sub>2</sub> 20,9 % O<sub>2</sub> con 99.9 % humedad hasta cumplir con cada tiempo especificado y ensayado.
- A cada tiempo, por suspensión celular corresponden 15 pozos, que para A, B, C suman 45 pozos. El contenido de cada pozo al cumplirse el tiempo de incubación, fue conservado en tubo eppendorf al que se adicionó 200 ul de medio de Congelación RPMI-C ( 10 % DMSO, 20% SFB). Se etiquetó claramente especificando tiempo, dosis, y suspensión celular a la que pertenece.
- Los tubos eppendorf se colocaron en envases plásticos con glicerina líquida, y se congelaron en tanque de nitrógeno líquido (- 86°C) hasta su procesamiento el cual se realizó en un mismo día para el total de 225 eppendorff correspondientes a los 5 periodos de tiempo de activación ensayados.
- Después de descongelar a temperatura ambiente, las células fueron concentradas por centrifugación a 800 rpm por 10 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante para resuspender las células en 100 ul de solución MTT ( Dilución 1/5 de MTT 5 ug/ml en RPMI-RF(-) preparada 5 minutos antes) y se incubó por 4 horas a 37°C 5% CO<sub>2</sub> 78,1% N<sub>2</sub> 20,9 % O<sub>2</sub> con 99.9 % humedad

- Finalmente se trasladó el contenido de eppendorff a su correspondiente pozo en micro placa, con adición de 150 ul/pozo de alcohol isopropilico-HCl 0.04 N. Fue revelada una coloración azul violáceo por solubilización de cristales de formazan, de las cuales se obtuvo su absorbancia a 560 nm, con filtro diferencial de 630 nm.

## F EFECTOS DE *SMp* SOBRE MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOINMUNIDAD

La estrategia planteada en el Proyecto es “ La valoración del efecto inmunomodulador de Savia de *Musa paradisiaca* en la respuesta inmunogenica y artritogenica generada en el Modelo experimental de autoinmunidad CIA, mediante técnicas in vivo estandarizadas para el establecimiento del Modelo experimental y técnica *ex vivo* para los Ensayos evaluatorios de inmunomodulación humoral (ELISA estandarizado) y celular ( Bioensayo reducción MTT)”. En este estudio se valoró el efecto modulador del Colágeno II sobre la Respuesta Inmune Humoral y Celular *ex vivo*

El establecimiento del Modelo Experimental CIA, bajo condiciones normalizadas de trabajo y procedimientos estandarizados, permitió la valoración mediante estrategias de innumerables trabajos, del rol de citoquinas<sup>141,31,109</sup>, del sistema de complemento<sup>243,242</sup>, de receptores y moléculas de superficie no MHC<sup>144,116</sup>, de rutas de activación transcrpcional intracelular<sup>215,203</sup>, de caracterización molecular de epitopos en colágeno<sup>30,84</sup>, de otras estirpes celulares inmunocompetentes<sup>233</sup>, de cepas transgénicas o knockout<sup>246,214,15</sup>, de factores de crecimiento<sup>128</sup>, de ligamiento genético<sup>99</sup> y de haplotipos determinantes de susceptibilidad<sup>68,15</sup>, en modulación y/o regulación de la reactividad autoinmune y desarrollo de CIA. Las nuevas estrategias terapéuticas que utilizan Agentes biológicos, y Fitofarmacos con capacidad inmunomoduladora para artritis reumatoide también utilizan el modelo animal CIA.

Tanto el Modelo experimental C.I.A. reproducido como la Artritis reumatoide, se caracterizan por fenómenos autoinmunes humorales y celulares asociados a la progresión de la enfermedad<sup>43,232</sup>.

El Bioensayo de reducción de MTT puede medir el grado de división celular correlativo a la actividad mitocondrial de Linfocitos estimulados por antígeno, que pueden dividirse cada 18 - 24 horas. En este Bioensayo, cada tipo de célula establece una relación lineal entre el numero de células y la señal producida, en la que solamente la cuantificación de los cambios en la linealidad estándar indica el grado de activación o proliferación<sup>153</sup>.

Durante este proceso existen cambios tempranos (desde 4 horas post-activación) que demuestran ACTIVACION en la que se expresan moléculas denominadas Moléculas Inducidas por Activación (AIM) o Early Activation Antigen (EA-1), como la expresión de CD 69 a las 8 horas del estímulo (en Linfocitos T, B y células NK en diferentes proporciones), mientras que marcadores tardíos de activación son la expresión de CD 25 ( Receptor IL-2), CD 71 ( receptor de transferrina), distinguibles por citometria de flujo.

La expresión de estos marcadores tempranos de Activación condiciona a las células a progresar por diferenciación en células efectoras o células anérgicas; la cinética de su expresión se mantiene mientras este presente el estímulo antigenico o mitogénico<sup>236</sup>.

El parámetro que denota PROLIFERACIÓN es la síntesis de ADN, la que llega a su máximo a las 72 - 150 horas después del estímulo. La expresión de HLA-DR y de CD 38 se mantiene constante<sup>236</sup>.

La valoración de los efectos de *SMP* en el modelo de autoinmunidad reproducido esta regido por lo tanto a la capacidad regulatoria y efectora de células inmunocompetentes, a las características fitoquímicas de *SMP*, y a varios parámetros experimentales estandarizados.



## XII RESULTADOS

Se establecieron tres tipos principales de manipulación en el presente trabajo, desarrollados a distintos tiempos a lo largo de la experimentación, los que a su vez incluyen otras formas de manipulación. El primero incluye la Manipulación de la Respuesta Inmune de acuerdo al tipo de respuesta a modificar, la que de forma específica plantea el objetivo de lograr en ratones cepa *balb/c*, un proceso de reactividad autoinmune hacia moléculas heterólogas de colágeno II de origen bovino ( Manipulación de acuerdo al procedimiento de inmunización antigenica) mediante reproducción de modelo experimental C.I.A. descrito ampliamente.

El segundo nivel de inmunomanipulación esta con relación al Efecto Investigado, directamente atribuido a las dosis administradas de *Smp* estableciendo variaciones cuantitativas potenciadoras o supresoras de la respuesta autoinmune en CIA.

El tercer nivel esta en relación con la finalidad Diagnostica de inmunomanipulación por *Smp*, en la que se evalúa ex - vivo la capacidad generada in vivo, de reactividad de células T y B hacia antígeno autólogo colágeno II. Las técnicas ex - vivo E.L.I.S.A. y Bioensayo MTT, fueron minuciosamente explicadas en su estandarización<sup>33</sup>.

La valoración de variaciones en la reactividad inmuno y artritogenica hacia colágeno, estuvo en relación con el estricto seguimiento del Modelo Experimental planteado, el cual permitirá discutir sobre la actividad de *Smp* sobre Modelo CIA y su homologo humano Artritis Reumatoide autoinmune.

## A EXTRACTOS

### 1 SAVIA DE MUSA PARADISIACA

#### a. ESPECIFICACIONES ORGANOLÉPTICAS

La descripción organoléptica de extractos, hojas o plantas enteras, es un procedimiento incluido en las características Macroscópicas de los Ensayos Botánicos durante el Control de Identidad de cualquier especie botánica<sup>183</sup>. Para el extracto de *Musa paradisiaca* obtenido, fueron determinadas las especificaciones organolépticas, que son presentadas y descritas en la Tabla 4:

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
Apariencia	Líquido viscoso turbio con precipitado
Color	Caramelo claro-naranja durazno
Olor	Dulce característicos
Sabor	Dulce amargo
Especificación fisicoquímica	pH de Savia 5,2- 6,1

Tabla 4.- Especificaciones organolépticas determinadas por Ensayo Botánico de Caracterización Macroscópica *Musa paradisiaca*. Cada característica es común en al menos tres de las muestras sometidas al Ensayo.

Para posteriores muestras de *Musa paradisiaca*, se tomó en cuenta las especificaciones normalizadas en la Tabla 4, antes de incluirlos en pruebas en ratones *balb/c*.

#### b. PREPARACIÓN Y CONSERVACION

La tabla 5, indica los datos cuantificables de extracto acuoso y seco durante el proceso de liofilizado.

DETERMINACIÓN	CANTIDAD
Volumen de <i>SMP</i> liofilizada	2910 ml
Peso total polvo seco	24,95 gramos
Promedio peso polvo obtenido de 30 ml de <i>SMP</i> liofilizada	0,27 gramos
Rendimiento	8,57 mg polvo /ml liof.

Tabla 5.- Conservación de Savia o Extracto Acuoso de *Musa paradisiaca* (*SMP*) por Liofilización. Se liofilizaron envases de vidrio conteniendo 30,50, y 70 ml. de *SMP*. El rendimiento representa el peso (mg) / ml obtenido del promedio en peso de pastillas secas de envases con 30 ml de Extracto Acuoso tras liofilizado.

Las pruebas de reconstitución del liofilizado en agua destilada demostraron la formación de agregados de partículas no disueltas, causando turbidez, la que se solucionó calentando la suspensión a 37 °C con agitación magnética por 1 hora.

La liofilización aumentó la vigencia del material, permitiendo su posterior uso en diversas determinaciones analíticas del extracto.

## 2 EXTRACTO ANTIGÉNICO.

### CONCENTRACIÓN COLÁGENO PURIFICADO DETERMINADO APLICANDO CURVA ESTÁNDAR BSA

La Albúmina Sérica Bovina BSA es una mezcla proteica ampliamente estudiada y utilizada en investigación<sup>14,25,26</sup>. Su actual estudio la incluye en cultivos de estirpes celulares de tipo embrionario como blastocistos en ensayos de fertilización *in vitro*<sup>152</sup> mientras que en nuestro estudio estableció el Patrón de concentraciones por dilución, determinado por Método espectrofotométrico Rojo Ponceau. Para esto primeramente se determinó la curva de absorción de este reactivo (Figura 1) que fue establecida a 560 nm después de un barrido espectrofotométrico (Hitachi)

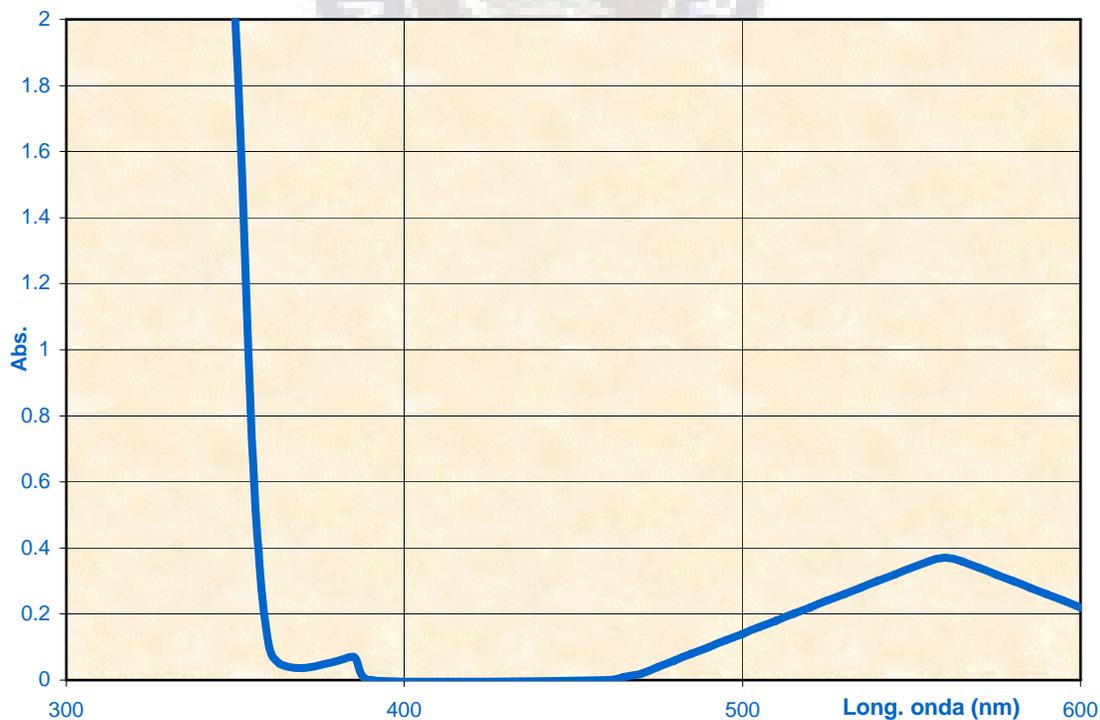


Figura 1.- Establecimiento de la Longitud de onda para Rojo Ponceau por barrido espectrofotométrico entre 300 - 600 nm. Se utilizó Patrón de Concentración BSA (8,0 mg/ml) dilución 1:100 en Buffer Salino Fosfatos (PBS) 0.15 M, pH 7.4.

Los resultados de 5 ensayos de dilución de concentración inicial BSA 80 mg/dl , durante la construcción de Curva estándar de Concentración se muestran en la figura 2 construida con los cálculos en la tabla 1.

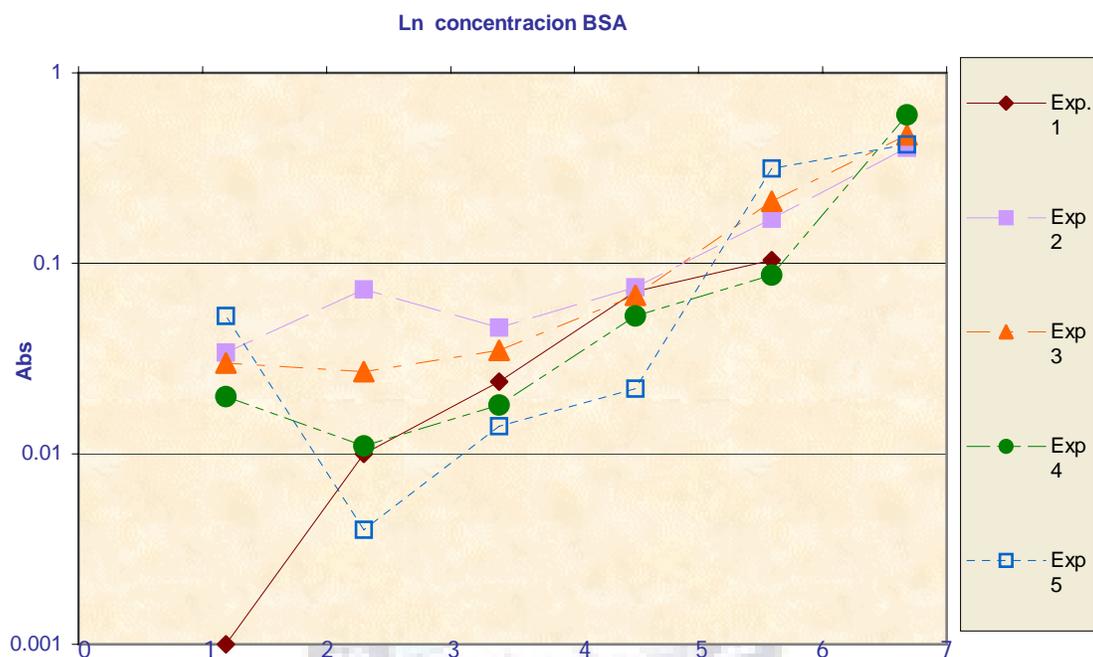


Figura 2.- Figura semilogarítmica ( Absorbancia vs. Ln de concentraciones por dilución) correspondientes a experimentos realizados para la construcción de Curva Estándar de Concentración BSA.

Los promedios de cada dilución permitieron determinar la reproducibilidad del experimento mediante la precisión obtenida en la figura 2.

<i>Ln [C]</i>	6,680	5,590	4,490	3,390	2,300	1,190
<i>Experim.</i>						
1°		0,104	0,071	0,024	0,010	0,001
2°	0,404	0,171	0,075	0,046	0,073	0,034
3°	0,471	0,212	0,068	0,035	0,027	0,030
4°	0,604	0,087	0,053	0,018	0,011	0,020
5°	0,420	0,316	0,022	0,014	0,004	0,053
<i>Prom</i>	0,475	0,178	0,058	0,027	0,025	0,028
<i>DS</i>	0,079	0,082	0,019	0,012	0,025	0,017
<i>C.V.</i>	16%	46.1%	32.7%	40.7%	112%	60.71%

En la Curva Estándar fue construida en base a promedios de las 5 pruebas de dilución de BSA, y se estableció la linealidad, la cual es posible observar en la Figura 2, donde la concentración inicial y las concentraciones correspondientes a las primeras tres diluciones de BSA establecen el segmento utilizable en la Curva para la intrapolación de Densidad Óptica.

La aplicación de la Curva Patrón BSA para Cuantificar los Extractos de Colágeno II fue realizada por:

- Intrapolación directa en la curva patrón utilizando las Absorbancias obtenidas.
- Cálculo utilizando ecuación de recta para el segmento lineal y reproducible en la Curva Estándar.

De los dos extractos obtenidos, las concentraciones determinadas por intrapolación y ecuación de recta son las siguientes:

Ecuación de recta para segmento lineal:

$$Y = aX + b$$

a: 0.18062

b: -0,2384

r: 0,8999

a.- Extracto I

Dil. 1/3	Dil. 1/10	Dil. 1/30	Dil. 1/3	Dil. 1/10	Dil. 1/30	Dil. 1/3	Dil. 1/10	Dil. 1/30	Prom. [c]
ABSORBANCIAS			Ln [c] por intrapolación			[ c ] = $e^{\ln [c]} \times$ Dilución (ug/ml)			2366.9 ug/ml
0.575	0.156	0.049	6.85	5.43	4.15	2831,6	2281,5	1903	
0.579	0.160	0.049	6.87	5.45	4.15	2888,8	2327,6	1903	

b.- Extracto II

Dil. 1/3	Dil. 1/10	Dil. 1/30	Dil. 1/3	Dil. 1/10	Dil. 1/30	Dil. 1/3	Dil. 1/10	Dil. 1/30	Prom. [c]
ABSORBANCIAS			Ln [c] por intrapolación			[ c ] = $e^{\ln [c]} \times$ Dilución (ug/ml)			3343.8 ug/ml
0.813	0.227	0.070	7.2	5.83	4.55	4018.3	3403.6	2838.9	
0.765	0.229	0.063	7.15	5.85	4.43	3822	3472.3	2517.9	

Tabla 6.- Determinación de la Concentración de Colágeno tipo II purificado, mediante Técnica Rojo Ponceau. Se realizaron tres diluciones de los extractos purificados. Las Absorbancias obtenidas fueron intrapoladas en Curva Estándar BSA para el cálculo de las concentraciones. a. Primer extracto CII purificado b. Segundo extracto de Colágeno II purificado. Ambas concentraciones finales representan el promedio de las concentraciones calculadas de las Diluciones por duplicado.

El extracto I de colágeno tipo II a concentración 2,36 mg/ml fue aplicado en el proceso de Inducción de CIA, con el que se preparó la emulsión con igual volumen de CFA e IFA (boosted).

El segundo extracto de colágeno II con concentración 3,34 mg fue utilizado en los procedimientos de estandarización de ELISA y en el procedimiento experimental para evaluar la modulación por *Smp* en el modelo autoinmune ya establecido.

## B ESTANDARIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS

### 1 INDUCCIÓN C.I.A. EN RATONES BALB/C

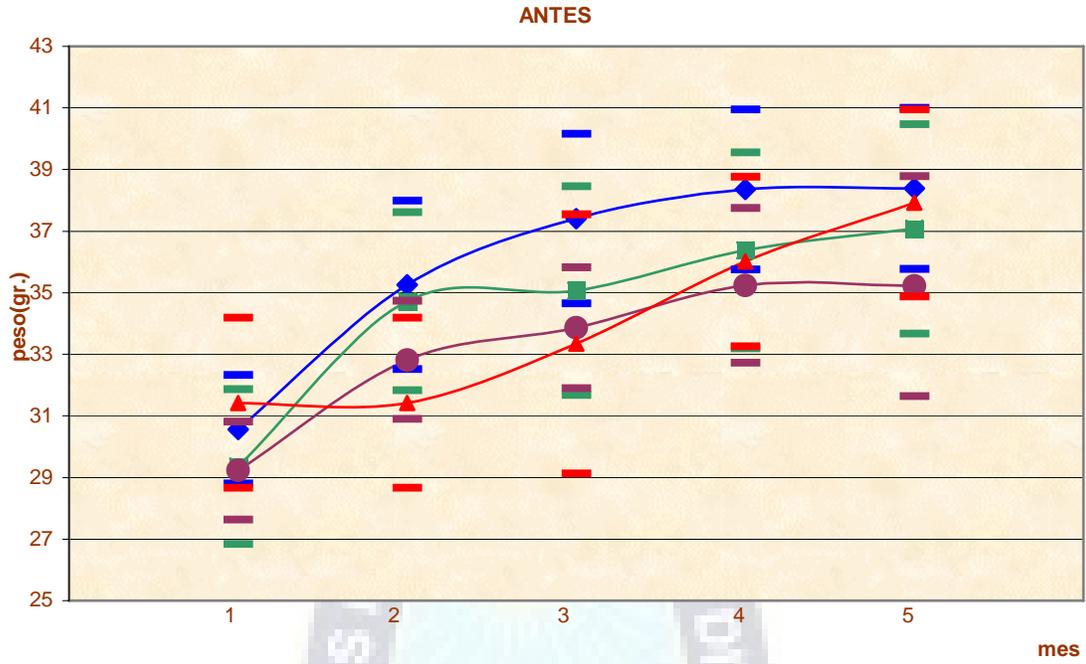
#### Especificaciones de monitoreo post-inmunización

Una vez inmunizados los animales según protocolo ya descrito se realizó el seguimiento post- inmunización de los siguientes comportamientos fisiológicos que reflejen el estado nutricional de los animales en experimentación:

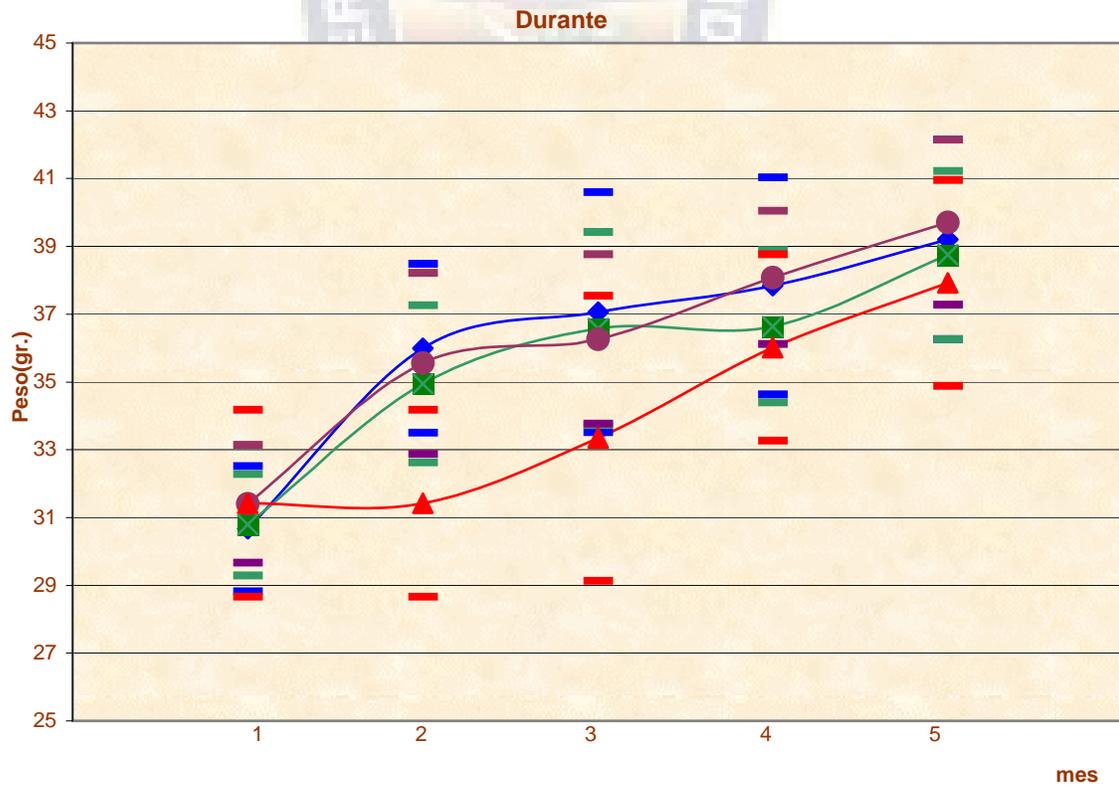
- Peso corporal de ratones
- Consumo de alimento
- Consumo de agua
- Consumo de dosis

El mantenimiento de peso corporal de los ratones, esta determinado por el consumo de alimento y agua, por lo que durante en el periodo de inmunización se obtuvo los pesos corporales, datos que fueron luego promediados por ratón y luego se presentaron por grupos dosis administrada de *Smp* en los tres tiempos estudiados. La Figura 3 permite observar el cambio en el tiempo, del peso corporal de ratones sometidos al esquema de inmunización, donde los grupos de dosis de *Smp* son relacionados con el grupo control (-). Esto permite evaluar el efecto de *Smp* con diferentes dosis, mediante la variación del peso corporal, a los tres periodos de administración de *Smp* estudiados. La Figura 3a.- muestra la variación de peso corporal en el tiempo de experimentación para los grupos de dosis de *Smp* administrada ANTES (Dosis 1,2,3 *Smp* adm. 7 días antes de 1ª inmunización) donde el grupo dosis 1 *Smp* (1 ml *Smp*/Kg) demuestra mejor ganancia de peso que dosis 2 (3.3 ml *Smp*/Kg) y 3 (10 ml *Smp*/Kg) sin embargo el peso se estabiliza al tercer de los cinco meses monitoreados. El grupo control (-) *Smp* que es utilizado permite la comparación con los tres tiempos (ANTES, DURANTE Y DESPUÉS) no incrementa el peso hasta el segundo mes estudiado después del cual aumenta sin llegar a una meseta de peso constante observada para dosis *Smp* ANTES. Como se evidencia, las dosis 2, 3 presentan valores inferiores a los de grupo control(-) *Smp* en los últimos meses. Según los resultados de la Figura 3b en los grupos DURANTE (Dosis *Smp* adm. Paralela a 1ª inmunización) el comportamiento en peso de dosis 1(1 ml *Smp*/Kg), 2(3.3 ml *Smp*/Kg), 3(10 ml *Smp*/Kg), respecto a Control (-) *Smp* , es creciente en comparación a la de grupo Control (-).

Lo expuesto en la Figura 3c para los grupos DESPUÉS (dosis 1,2,3 adm. Paralela a 2ª inmunización) permite observar en la dosis 3(10 ml *Smp*/Kg) una escasa ganancia de peso, inferior a Control(-) durante todo el periodo monitoreado, mientras que para dosis 1,y 2 de *Smp* no llegan a una ganancia de peso claramente superior a control(-) durante los meses monitoreados, por sus comportamientos diferentes.



a.-



b.-

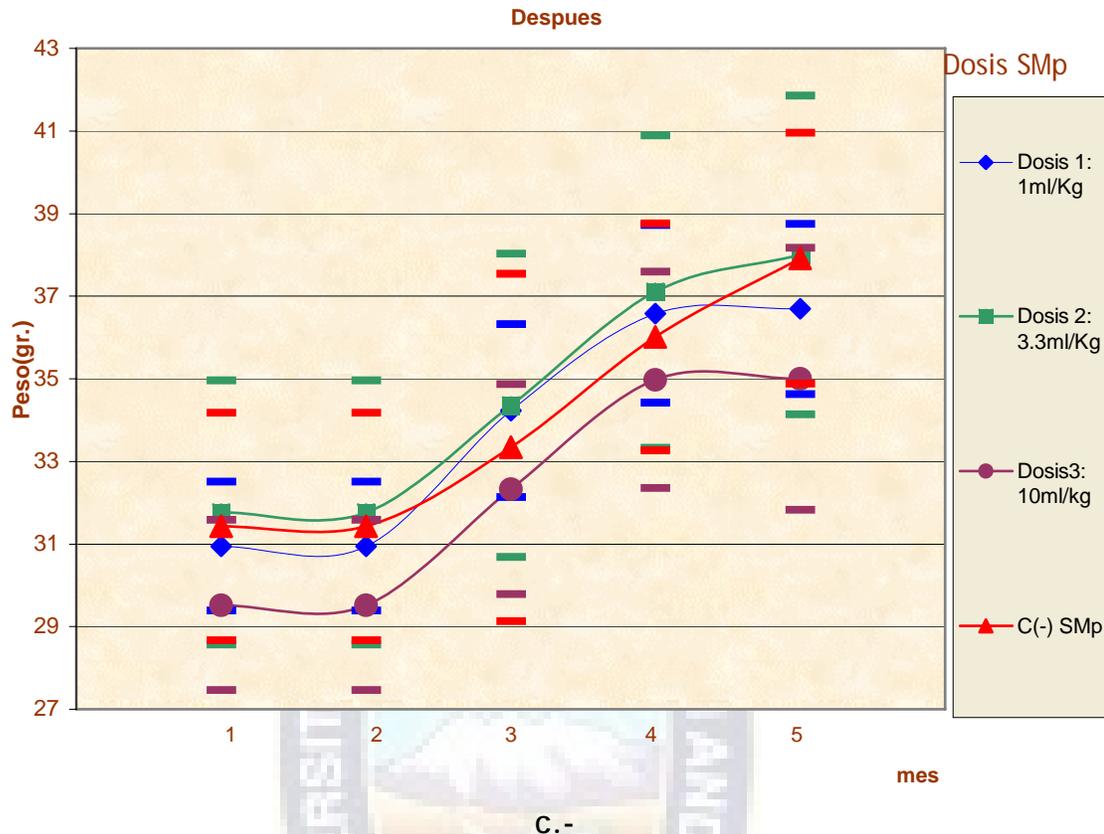
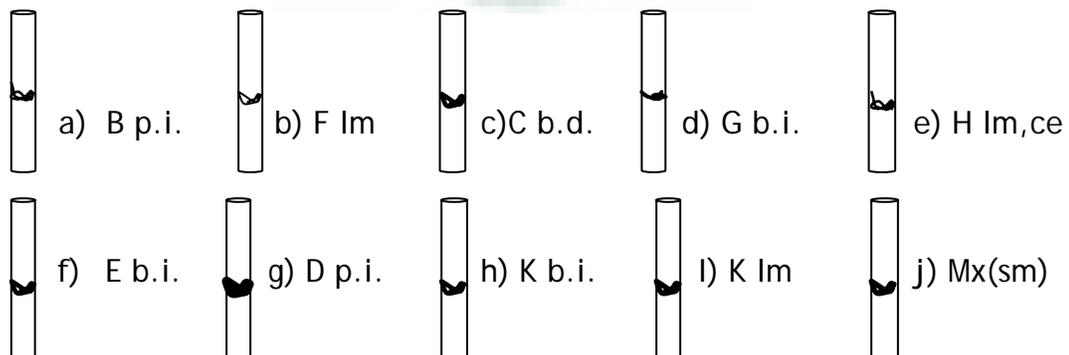


Figura 3 .- Cinética de incremento de peso corporal de ratones inmunizados con CII-CFA, CII-IFA, con administración oral de diferentes dosis de *Smp* iniciadas en función al Diseño Experimental. a.- Ratones sometidos a 3 dosis de *Smp* durante 7 días antes de 1ª inmunización ( ANTES ) b.- Ratones sometidos a 3 dosis de *Smp* desde el día de 1ª inmunización ( DURANTE ) c.- Ratones sometidos a 3 dosis de *Smp* desde el día de 2ª inmunización ( DESPUES ). Las dosis administradas para los tres tiempos fueron: 1 ml *Smp*/Kg (dosis 1), 3,3 ml *Smp*/Kg ( dosis 2), y 10 ml *Smp*/Kg (dosis 3). Cada punto representa el promedio +/- DS de los promedios de peso de 6 ratones.

## 2 CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- COLÁGENO II

### Prueba Capilar

Basada en la intensidad de formación de floculos en la interfase suero-Antígeno en los 10 sueros de ratones inmunizados con Colágeno II, se observó:



El suero con código de identificación D p.i. demostró una marcada diferencia en el área de floculación que genera el inmunocomplejo, respecto a los demás sueros, por lo que es apto en la determinación de la dilución óptima de suero hiperinmune.

### Outchterlony o inmunodifusión doble

Las pruebas de precipitación básicamente forman complejos Antígeno - anticuerpo insolubles, identificados por avidéz entre antígenos solubles y sus anticuerpos respectivos, por lo que son ampliamente aplicadas en pruebas para determinar Título de Anticuerpos y de Antígenos. La capacidad de formación y estabilidad del inmunocomplejo depende de diversos factores y características moleculares. En el presente caso no se pudo establecer la presencia de bandas de precipitado entre los sueros y el antígeno a ninguna concentración, por este método.

### E.L.I.S.A INDIRECTO

#### Coating o Pegado de Antígeno

Durante el proceso de estandarización, se obtuvieron sueros de animales pre-inmunizados con colágeno II. Mediante varias pruebas ELISA indirecto, utilizando dichos sueros positivos, se buscó determinar la concentración óptima de colágeno en pegado de antígeno o coating, dentro del rango de referencia ( 2-5 ug/ml), y aplicar aquella concentración que demuestre menos elementos interferentes relacionados con la inespecificidad de pegado, baja interacción molecular con la superficie de poliestireno, distribución distante de fibras de colágeno II en fondo plano de microplacas, y otros.

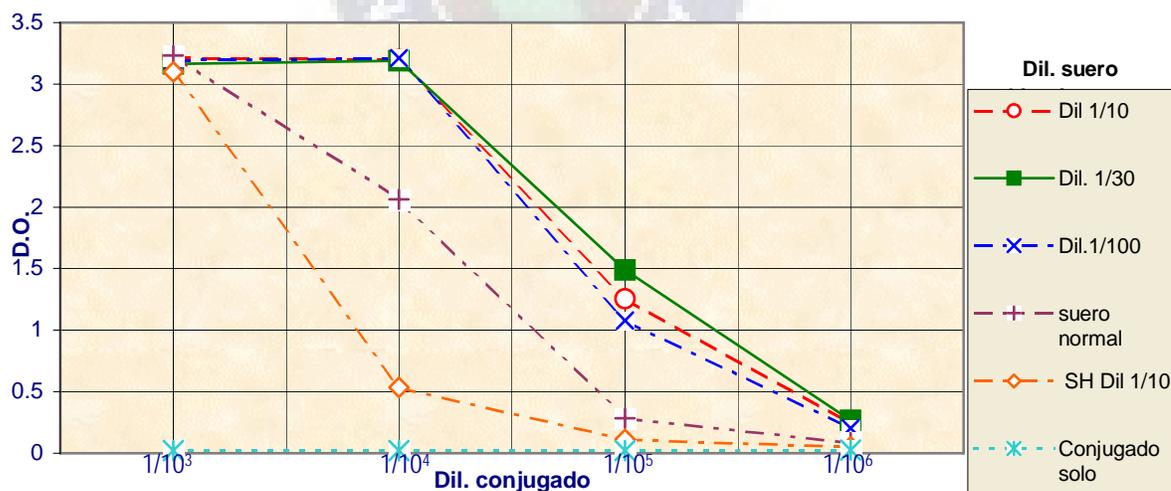
Después de revisar las absorbancias obtenidas para los sueros a diferentes concentraciones dentro del rango sugerido ( 2 - 5 ug/ml ), estas no demostraron en ningún caso algún elemento interferente de los mencionados u otro posible.

Existieron cambios en absorbancia en resultados de ELISA con concentraciones estudiadas, modificaciones que se debieron únicamente a las variables que se emplearon en pruebas ELISA durante la estandarización y que se describen a continuación.

## Determinación de las diluciones óptimas de los reactantes

El proceso de obtención de Ac monoclonales conjugados con HRP (Horseradish Peroxidase) finaliza en un producto liofilizado altamente concentrado que amerita ciertas consideraciones analíticas para su reconstitución total. El proceso de sucesivos lavados durante un ELISA indirecto, no garantiza resultados libres de interacciones inespecíficas cuando se trabaja a elevadas concentraciones de conjugado. Para eludir tal inespecificidad en el experimento central de valoración del efecto inmunomodulador de *Smp* por ELISA indirecto, se analizaron previamente diluciones 10 X de conjugado peroxidasa (preoxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG Fc, SIGMA; Aldrich), en búsqueda de dilución óptima del mismo. Por su parte, siguiendo el experimento anterior, es posible determinar una dilución óptima del suero hiperinmune y que demuestre clara diferencia respecto a sueros normales (no inmunizados) murino y humano.

La Figura 4 muestra una relación de proporcionalidad entre la concentración de conjugado y la absorbancia obtenida. Se evidencia también la interacción inespecífica a las diluciones 1/1000 y 1/10000, resolución gradualmente mejorada a mayor dilución. Como se mencionaba, dichas diluciones no permiten distinguir absorbancias de las diluciones de suero hiperinmune. A dilución 1/100000 se tiene valores de absorbancia medios a la escala presentada, mientras que a dilución 1/1000000 las absorbancias son casi insignificantes sin diferencia para diluciones de suero hiperinmune esta vez por la baja concentración del conjugado Ac-m HRP.

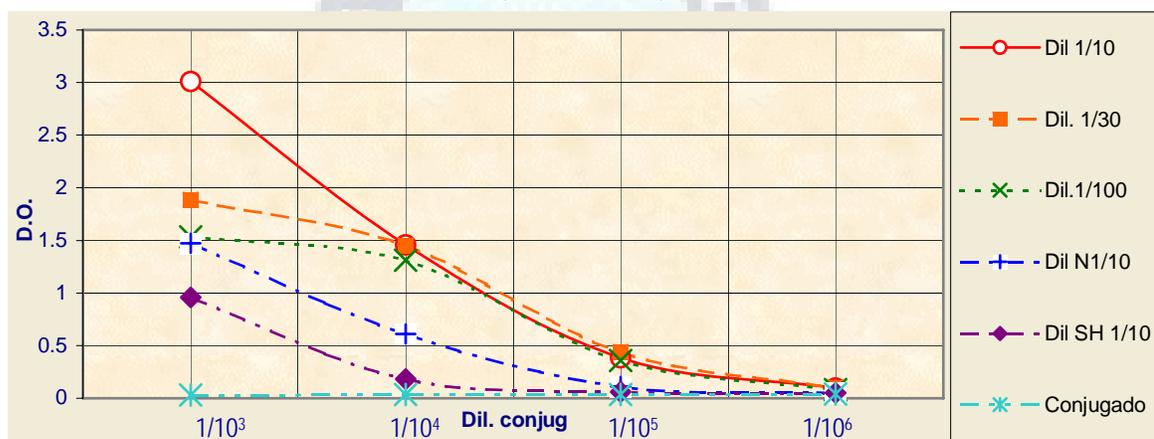


**Figura 4.-** Relación de Dilución de Conjugado HRP Ac anti Fc de ratón, para la determinación de la resolución óptima: Dilución Suero murino hiperinmune - suero murino y humano normal (Controles (-) dil. 1/10) . Las diluciones de suero murino hiperinmune ensayadas fueron 1/10, 1/30, 1/100. La interacción Ac séricos- conjugado HRP Ac anti Fc ratón se detectó por ELISA indirecto cuantificado en Lector de microplacas multipozo a 450 nm. Se observa una resolución de suero murino y controles (-) inversamente proporcional a la concentración de conjugado, pero proporcional a la especificidad del conjugado-Ac murino. Cada punto representa el promedio una variable por triplicado.

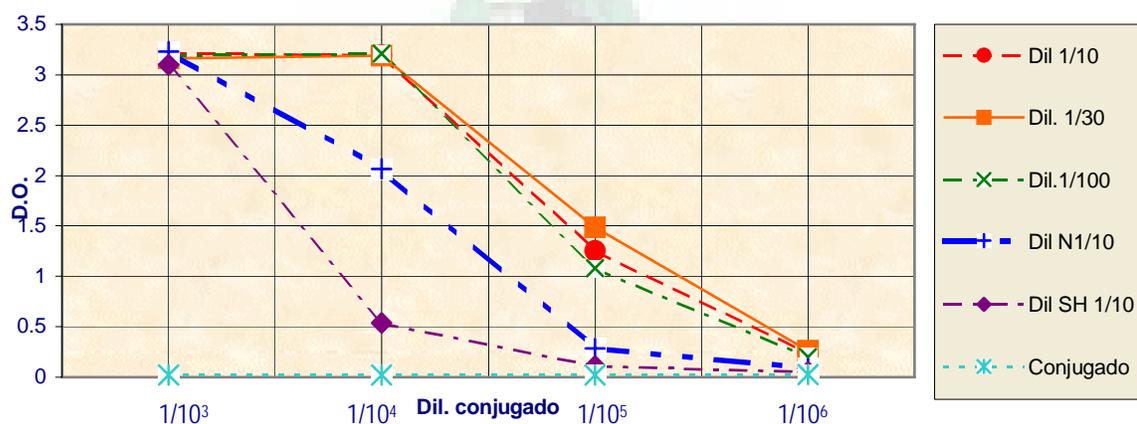
## Longitud de onda HRP-cromógeno TMB Urea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Los cromógenos molecularmente permiten hacer evidenciable una reacción química y enzimático, cuantificable por métodos espectrofotométricos UV-Visible. Cada cromógeno por su estructura electrónica reactiva define una determinada longitud de onda para su identificación y cuantificación correcta. En este sentido el cromógeno reactivo a la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por HRP, emite coloración amarilla, cuantificable en su variación a diferentes longitudes de onda. Ante la posibilidad de que la longitud de onda reportada por el protocolo tuviera interferencia de lectura determinada por la existencia de hemólisis en algunos sueros, se examinó las mediciones anteriores a 3 diferentes longitudes de onda, reportados por el color de emisión de este cromógeno.

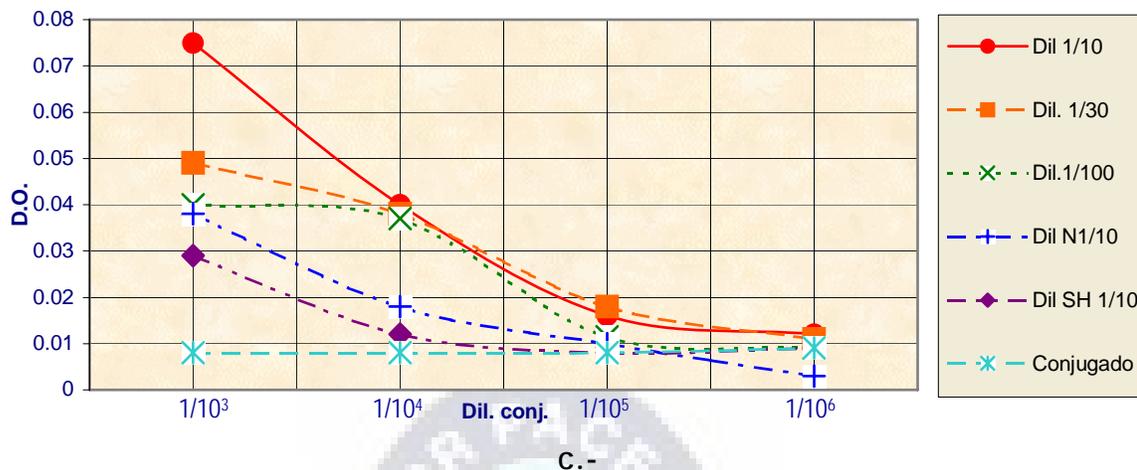
En la Figura 5, observamos que a una longitud a 450 nm (Figura 5 b.-) se observa las características de inespecificidad y diferencia de diluciones de suero hiperinmune, mientras que a 405 y 550 nm no es posible interpretar lo planteado para el experimento. (Figura 5 a.-, y 5 c.-)



a.-



b.-



**Figura 5 .-** Determinación, establecimiento y verificación de longitud de onda específica de máxima absorción y resolución para la reacción conjugado HRP Ac anti Fc ratón - cromógeno TMB Urea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a diluciones de suero de murinos presensibilizados in vivo (1/10, 1/30, 1/100) y diluciones de sueros murino y humano no inmunizados in vivo (1/10 c/u). a.- Ensayo de longitud de onda a 405 nm (Fd. 630 nm) b.- Ensayo de longitud de onda a 450 nm (Fd. 630 nm) c.- Ensayo de longitud de onda a 550 nm (Fd. 630 nm). La evaluación se realizó en Lector espectrofotométrico de microplacas ELISA. Cada puntuación representa el promedio de la variable por triplicado.

### Interferencia espectrofotométrica de Hb.

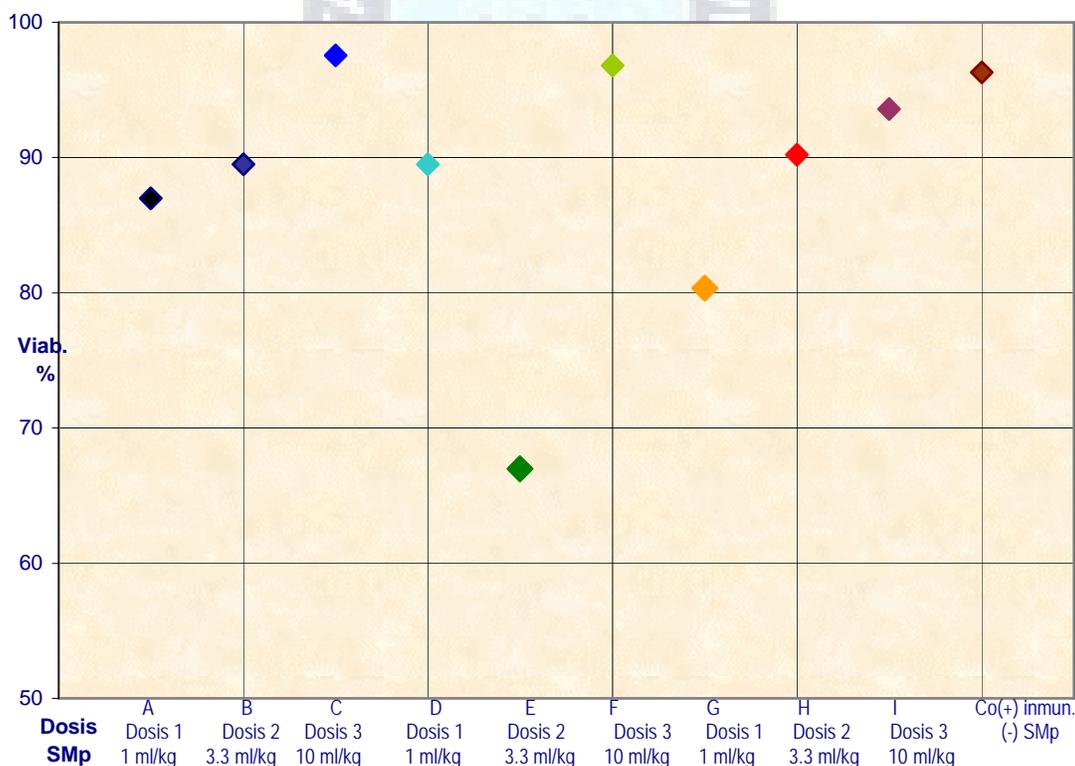
En conocimiento de que, en caso de que un suero contenga hemoglobina por hemólisis en el proceso de extracción, se determinó la necesidad de contar con un procedimiento que discrimine la absorción entre el TMB y este pigmento orgánico para evitar interferencias. Se sabe que la determinación práctica de la D.O. de máxima absorción correspondiente a hemoglobina es realizada a una longitud de onda de 550 nm, procedimiento empleado en el proceso de determinación de actividad del Sistema de Complemento (Complemento Hemolítico 50 %).

La longitud de onda para la lectura espectrofotométrica de TMB luego de la adición de sustrato de peroxidasa en el procedimiento de E.L.I.S.A., se efectúa a 450 nm. Por tanto la posibilidad de que el contenido en Hb "contamine" las muestras de suero, se realizó un experimento espectrofotométrico entre el resultado de ELISA de una muestra carente de Hb por lo tanto con alta absorbancia para TMB, frente a una muestra de suero con elevado contenido de eritrocitos. Se demostró y corroboró la longitud de onda para lectura de TMB a 450 nm, no detectó montos significantes de Hemoglobina.

### 3 BIOENSAYO *IN VITRO* DE ACTIVACIÓN DE ESPLENOCITOS POR SALES DE TETRAZOLIO

#### Cultivo Primario de Esplenocitos

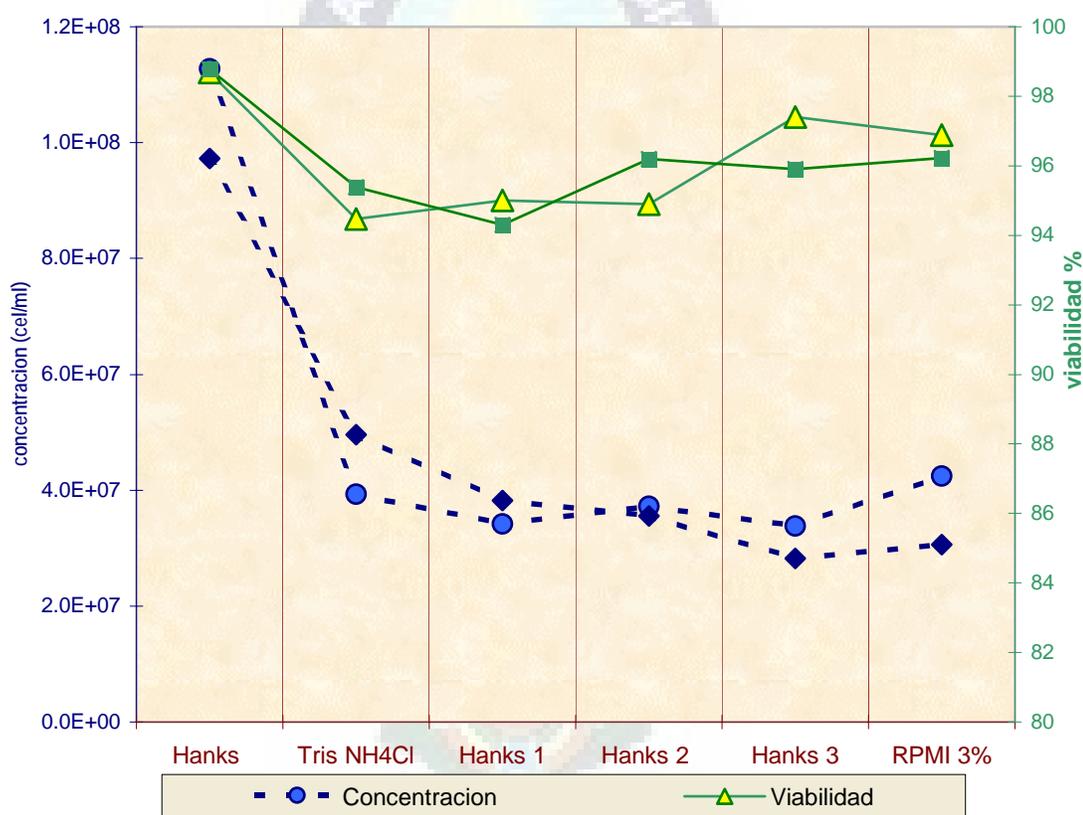
El proceso de aislamiento de células esplénicas, debe permitir obtener una concentración óptima a la que las células puedan interactuar físicamente y por señalización entre ellas, además de utilizar el medio de suspensión adecuado para establecer un tiempo de vida metabólica aceptable para los fines experimentales. La aplicación de un Método estándar de Aislamiento de esplenocitos murinos, modificado en algunos medios y reactivos, fue apto para avalar una concentración y viabilidad óptimas, en muestras de esplenocitos correspondientes al experimento central para la valoración del efecto inmunomodulador de *SMP* sobre respuesta celular autoinmune. La Figura 6, expone resultados de viabilidad de cada muestra, con una mayoría de suspensiones con 90% de sobrevivencia.



**Figura 6.-** Sobrevivencia o viabilidad de esplenocitos tras la aplicación de secuencia final de reactivos de Aislamiento celular. El Método por Colorante vital Azul Tripán fue aplicado a suspensión de esplenocitos en Medio final RPMI 3%. (RPMI 1640, 3% Suero Fetal Bovino no deplementado, 1% pool de Antibióticos estreptomycin y penicilina, Rojo Fenol (+), mercaptoetanol (-)) Cada punto representa el promedio de 6 muestras de las suspensiones celulares previa a la Valoración Inmunomoduladora de *SMP* en Respuesta celular.

## Toxicidad de Reactivos

La obtención de una concentración elevada de células esplénicas en suspensión ( $10^6 - 10^7-10^8$ ) y una viabilidad alta ( $> 90\%$ ) muestra la correcta selección de la secuencia de Medios de cultivo y reactivos durante el Aislamiento de esplenocitos a partir de bazo. Esta secuencia debe simular lo mejor posible las condiciones fisiológicas posibilitando la adaptación de esplenocitos y su supervivencia, se concluyó que en la secuencia de Aislamiento celular expuesta en la Figura 7, se produce una caída en el número de células como efecto de la actividad del CINH4 sobre células con poca capacidad de adaptación al medio y las condiciones *in vitro*, por lo que este procedimiento permite contar la población adecuada para el manejo de cultivo celular.



**Figura 7.-** Evaluación del efecto de los Buffer y reactivos en la secuencia final aplicada en Aislamiento de Esplenocitos, sobre esplenocitos murinos. Al inicio se suspendieron las células en Medio Hanks, luego en la Sol. Eritrolítica Tris NH4Cl, después 3 resuspensiones de lavado en Hank's para resuspender al final en Medio RPMI 3%. Fue evaluada la viabilidad y concentración celular mediante Método Azul Tripan. Para cada variable se realizó una prueba doble ciego representada en la grafica.

## Efecto de Colágeno II sobre células esplénicas

La aplicación de extracto purificado de Colágeno II, en el Modelo animal de autoinmunidad replicado, ya sea para promover mecanismos de inducción de respuesta *in vivo* o para establecer su capacidad de activación celular por bioensayo *in vitro*, requirió explorar si existe algún efecto del extracto sobre esplenocitos murinos, que evalúan el Modelo Experimental, en vista de que dicho extracto frío fue suspendido en Ácido acético 0.5 M. Se prepararon diluciones 10X del extracto CII concentrado (3340 ug/ml) 1/10, 1/100, 1/1000, y 1/10000 y se adicionó a la suspensión celular. Los valores de viabilidad de las células esplénicas en presencia de las diferentes diluciones son presentados en la Figura 8. No se observó una significativa disminución de la viabilidad en la concentración explorada.

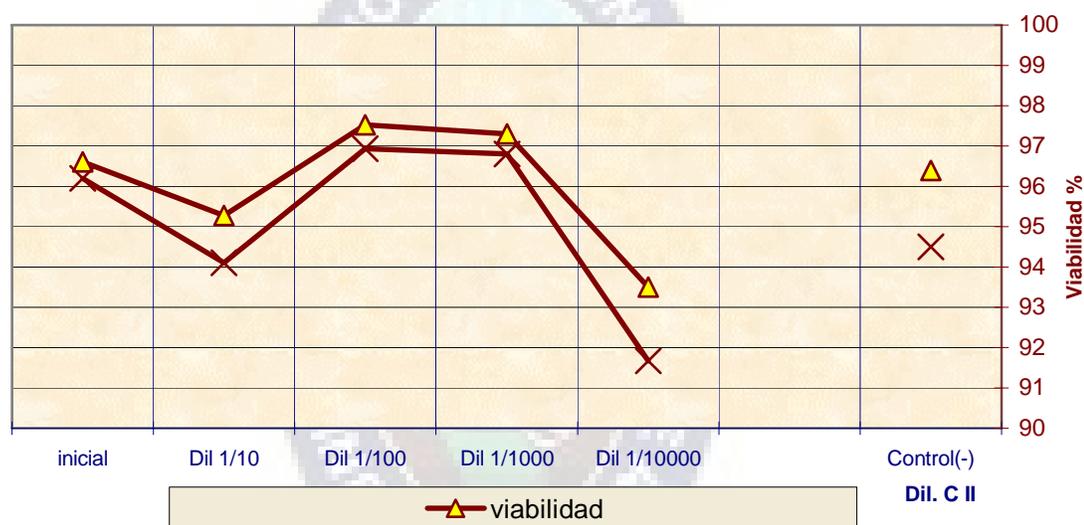


Figura 8. - Evaluación del efecto del Extracto Purificado de Colágeno II sobre la viabilidad de esplenocitos murinos. Se ensayaron concentraciones de CII 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 respecto a control (-). Fue evaluada la viabilidad por Método Azul Tripan.

## Solubilidad de Colágeno II en Ácido Acético

La capacidad de solubilización de un extracto conservado y la reproducibilidad de las mediciones de la concentración equivalente a la determinada inicialmente tras su obtención, son características que muestran que el proceso de conservación y el uso del disolvente fue el adecuado.

Para el ensayo, se planteó explorar la solubilidad de extracto purificado colágeno II con concentración conocida comparándola con el extracto conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en solución ácido acético 0.5 M pH 7,4 en la que se halla suspendido.

La concentración inicial de 3340 ug /ml de colágeno II condujo a esperar una concentración de 334,0 ug/ml para la dilución 1/10.

El resultado permite observar la absorbancia obtenida de la dilución y del cálculo de la concentración:

#### DILUCIÓN 1/10 de colágeno II en Solución Ácido Acético 0.5 M

Absorbancia: 0.213

Intrapolacion en curva estándar BSA: 5.86

Concentración teórica para dilución 1/10 de colágeno:

334,0 ug/ml

Calculo de Concentración para dilución 1/10 de colágeno II:

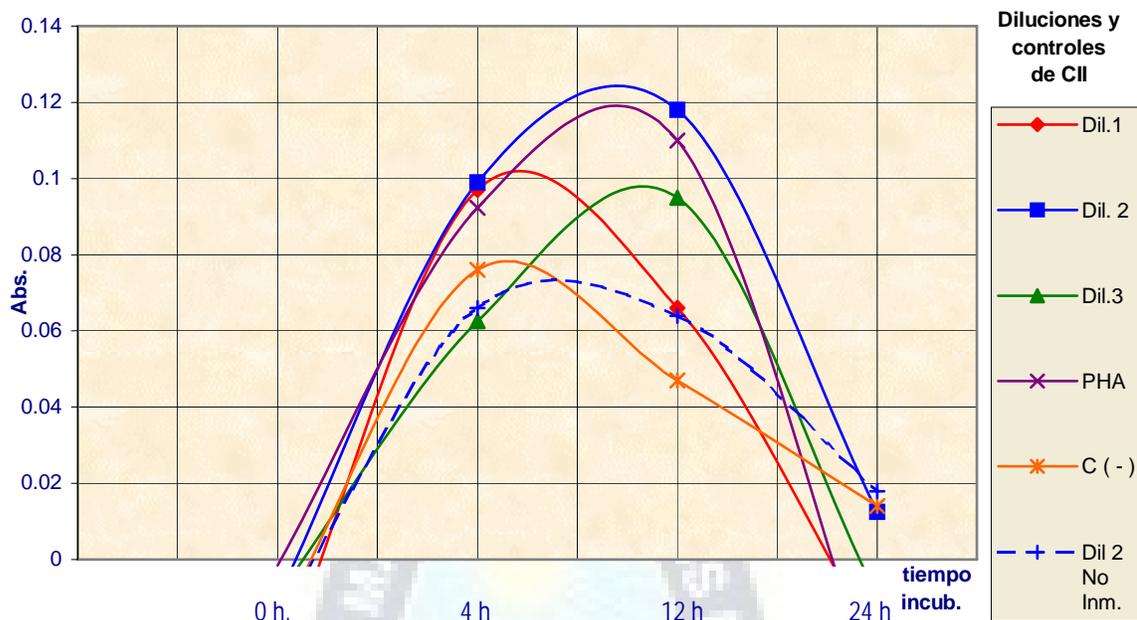
$$C = e^{5.86}$$

$$C = 350,7 \text{ ug/ml}$$

La concentración práctica de colágeno soluble en ácido acético, difiere de la concentración teórica esperada en solo 4.76% (16,7 ug), por lo tanto; la conservación de colágeno de condición de solubilidad (sin precipitados) está prácticamente demostrada.

#### Determinación de la dosis de Colágeno II para la activación de esplenocitos de animales pre-sensibilizados.

La capacidad de activación de células efectoras en presencia de antígeno *in vitro*, es la expresión de la reactividad celular que ocurre en animales presensibilizados, cuando sus linfocitos efectoras se enfrentan al antígeno estimulante. El bioensayo MTT permitió establecer *in vitro*, el grado de respuesta de esplenocitos murinos hacia el autoantígeno artrítico y inmunogénico colágeno II heterólogo, el cual a diferentes diluciones analizadas estimuló en distinta magnitud la reactividad de esplenocitos. Para valorar este hecho se ensayaron diluciones 1/100, 1/1000, y 1/10000 que se adicionaron sobre cultivo primario de esplenocitos de murinos presensibilizados *in vivo*. La Figura 9 muestra los resultados de este experimento, en el que también se estudio el tiempo de activación (ver material y métodos). Se observa el nivel de activación de las diluciones de colágeno II respecto a control (+)PHA, y Control (-) de activación, evidenciando que la dosis 2 (dilución 1/1000) promueve una activación de esplenocitos efectoras mayor incluso al control PHA, manteniéndose superior a varios tiempos de cuantificación de la reducción de MTT. Esta dilución, es comparada con el nivel de activación a la misma dilución de colágeno (1/1000) pero sobre esplenocitos de ratones no inmunizados, confirmando claramente la diferencia de activación al estímulo con el control negativo. No se compararon las otras diluciones de colágeno (1/100, 1/10000) respecto a sus pares no inmunizados, por no significar un grado de activación importante para nuestros propósitos.



**Figura 9.-** Cinética de activación de cultivo primario de esplenocitos murinos presensibilizados in vivo, para determinar la concentración de Colágeno II óptima respecto a PHA (Control (+)) y sin CII (Control (-)) a diferentes tiempos de incubación (células+Antígeno). La concentración celular fue  $1 \times 10^6$  cel / ml, y se analizaron las diluciones 1/100, 1/1000, y 1/10000 de CII. Se midió la reducción de MTT por técnica espectrofotométrica. Cabe destacar la dilución 2(1/1000) de CII con valor superior a C(+)/PHA durante la cinética, la única comparada con el nivel de activación de esplenocitos murinos NO presensibilizados *in vivo* con CII, también incubados a 1/1000 CII. Cada valor representa el promedio de dos muestras cada cual ensayada por triplicado para cultivo esplenocitos presensibilizados, y promedio de una muestra por triplicado en NO inmunizados in vivo.

## C VALORACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE SAVIA DE *MUSA PARADISIACA* (SMP) SOBRE EL MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOINMUNIDAD ANTICOLAGENO II, APLICANDO TÉCNICAS EX - VIVO ESTANDARIZADAS.

### 1. EFECTO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR

El ensayo de activación celular se basa en la Respuesta de esplenocitos de animales presensibilizados in vivo, cuando son enfrentados, en Bioensayo ex - vivo, al antígeno inductor ( colágeno II). La variación de esta Respuesta celular ex - vivo depende de la capacidad de la *Savia de Musa paradisiaca* de modular la reactividad celular contra colágeno II in vivo una vez que fue administrada a distintos tiempos antes o después de la inmunización.

Para el análisis de resultados registrados para la valoración de la modulación de la respuesta autoinmune celular por *SMP*, se consideró el siguiente concepto general: " Los valores inferiores que el control (+) celular indican una reducción en grado de activación ( o proliferación); al contrario, un valor de Absorbancia superior al control (+) indica incremento en la activación celular, la cual también puede inferirse por cambios morfológicos" <sup>153,34</sup>

La variación en los cultivos de esplenocitos de ratones inmunizados, a los que se administró *Smp* v.o. in - vivo a diferentes dosis, y que en el Bioensayo evaluó en su grado de activación en presencia de Colágeno II, se muestra en las figuras 10, 11, 12.

La Figura 10 muestra la capacidad inmunomoduladora de *Smp* in - vivo administrada 7 días ANTES de inducir el proceso autoinmune por Colágeno II, y valorando ex - vivo el grado de reactividad celular. El C(+) PHA a las tres dosis de *Smp* presento mayor reducción metabólica de MTT, en tanto las células enfrentadas a Colágeno II así como el C(-):PHA(-)CII(-) presentan un grado de reducción de MTT según la dosis de *Smp*.

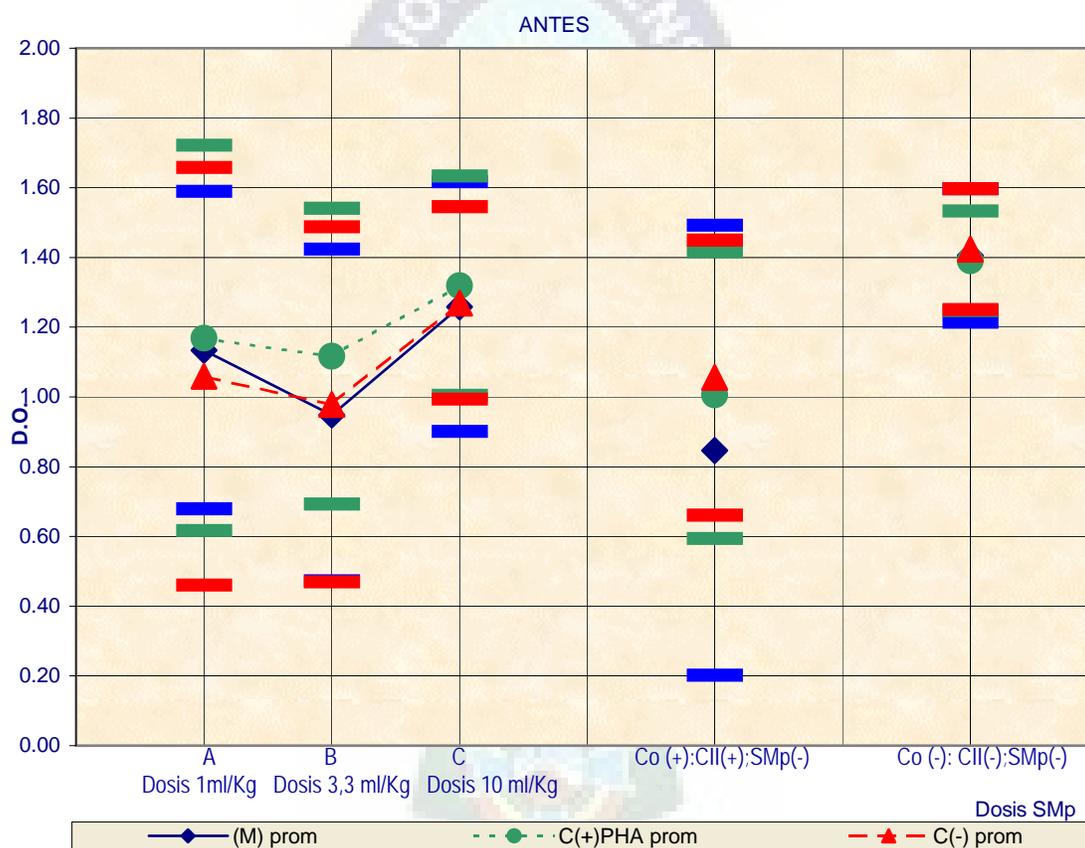
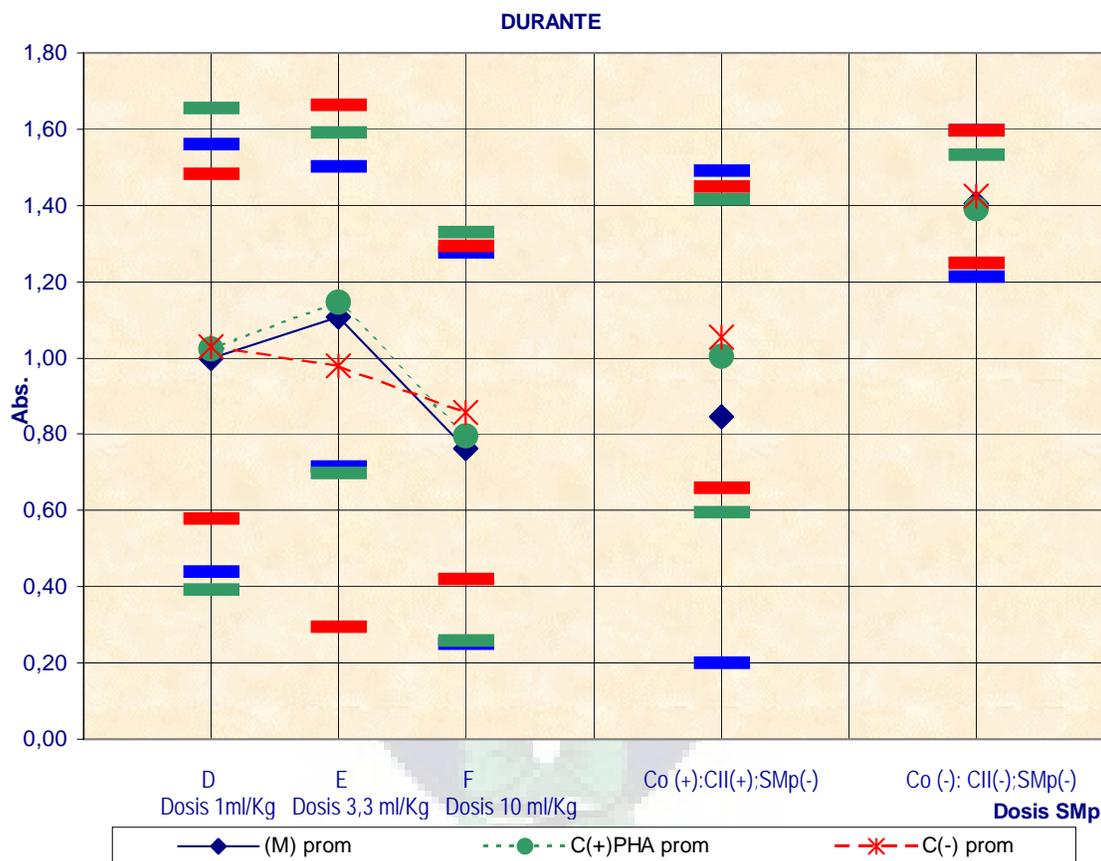


Figura 10.- Evaluación de la activación de esplenocitos murinos mediante Bioensayo MTT para la Valoración de la Actividad Inmunomoduladora de *Smp*, a 3 dosis del Extracto Acuoso en grupos ANTES (administración v.o. 7 días antes de 1ª inmunización CFA-CII). Los esplenocitos a concentración 1E+6 cel/ml fueron cultivados por 12 horas en presencia de PHA(5 ug/ml Control +), Colágeno II (Dilución 1:100), y suspensión celular (PHA(-)CII(-) Control (-)). Se evaluó la reactividad celular autoinmune a Colágeno II mediante Control (+) y (-) de inmunización. Cada punto representa el Promedio +/- ES de 6 muestras por triplicado.

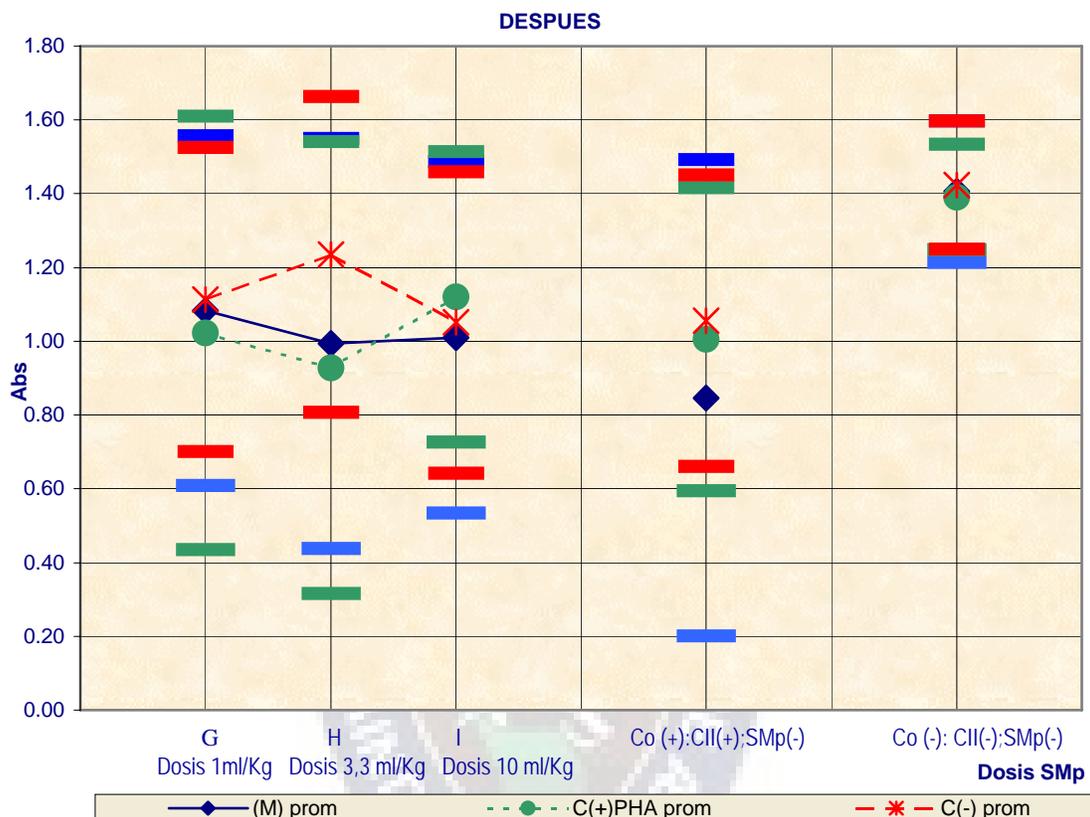
La Figura 11 evalúa la *Smp* administrada desde el mismo día de la Primera inmunización CFA-CII, denominándose DURANTE. Nótese que en las dosis 1 ml/kg y 10 ml/Kg no existe lógica en las puntuaciones, ya que el C(+) PHA es inferior que los valores de dosis Colágeno II e incluso menor que C(-)PHA(-)CII(-). La dosis 3.3 ml/Kg demuestra coherencia en la activación con Dosis de Colágeno II en función a sus controles de activación (+) y (-). Cabe observar que los valores de D.O. a dosis 10 ml/kg *Smp*, son inferiores que los controles de inmunización (+) y (-).



**Figura 11.-** Evaluación de la activación de esplenocitos murinos mediante Bioensayo MTT para la Valoración de la Actividad Inmunomoduladora de *Smp*, a 3 dosis del Extracto Acuoso en grupos DURANTE (administración v.o. desde el día de 1ª inmunización CFA-CII). Los esplenocitos a concentración 1E+6 cel/ml fueron cultivados por 12 horas en presencia de PHA(5 ug/ml Control +), Colágeno II (Dilución 1:100), y suspensión celular (PHA(-)CII(-) Control (-)). Se evaluó la reactividad celular autoinmune a Colágeno II mediante Control (+) y (-) de inmunización. Cada punto representa el Promedio +/- ES de 6 muestras por triplicado.

La Figura 12 permite observar una incongruencia de valores similar a Figura 10. Para este caso las dosis de *Smp* se comenzaron a administrar a 21 días de la primera inmunización, es decir a tiempo de la segunda inmunización según Diseño experimental.

La reducción metabólica de MTT a Formazan, como señalamos y contrariamente a lo esperado, presenta puntuaciones para C(+) PHA inferiores a dosis de Colágeno II y C(-)PHA(-)CII(-) en dosis 1 ml/Kg y 3.3 ml/Kg *SMP*. A dosis 10 ml/Kg *SMP* se reportaron resultados según lo previsto: C(+) > Dosis Colágeno II > C(-)PHA(-)CII(-)



**Figura 12.-** Evaluación de la activación de esplenocitos murinos mediante Bioensayo MTT para la Valoración de la Actividad Inmunomoduladora de *SMP*, a 3 dosis del Extracto Acuoso en grupos **DESPUES** (administración v.o. desde el día de 2ª inmunización IFA-CII). Los esplenocitos a concentración 1E+6 cel/ml fueron cultivados por 12 horas en presencia de PHA(5 ug/ml Control +), Colágeno II (Dilución 1:100), y suspensión celular (PHA(-)CII(-) Control (-)). Se evaluó la reactividad celular autoinmune a Colágeno II mediante Control (+) y (-) de inmunización. Cada punto representa el Promedio +/- ES de 6 muestras por triplicado.

## 2. EFECTO SOBRE LA RESPUESTA HUMORAL

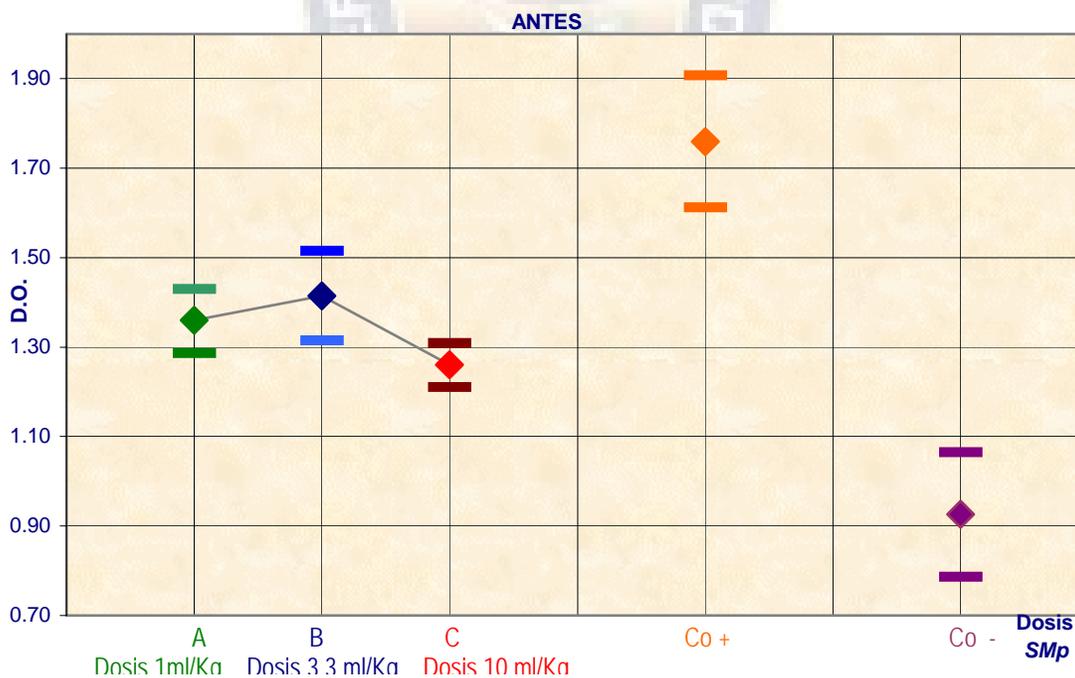
La estandarización de un inmunoensayo es un proceso dinámico, en el que las fronteras de su aplicación en procedimientos de Validación Científica pueden ser ilimitadas. Las características de especificidad, sensibilidad, precisión y exactitud de la técnica son argumentos que requieren ser normalizados para su aplicación en estudios que involucran gran número de muestras de procesamiento simultáneo.

En el presente estudio el ensayo Inmunoenzimático (E.L.I.S.A.) permitió evaluar y validar el grado de potenciación o supresión de respuesta humoral por *SMP* que ocurrió in vivo en animales inmunizados con colágeno II.

La reactividad humoral en procesos autoinmunes experimentales es identificada por la formación de Anticuerpos de alta afinidad contra el autoantígeno, como consecuencia de la aplicación del esquema de doble inmunización y por la extracción específica que permitió obtener elevada pureza del autoantígeno colágeno II inoculado.

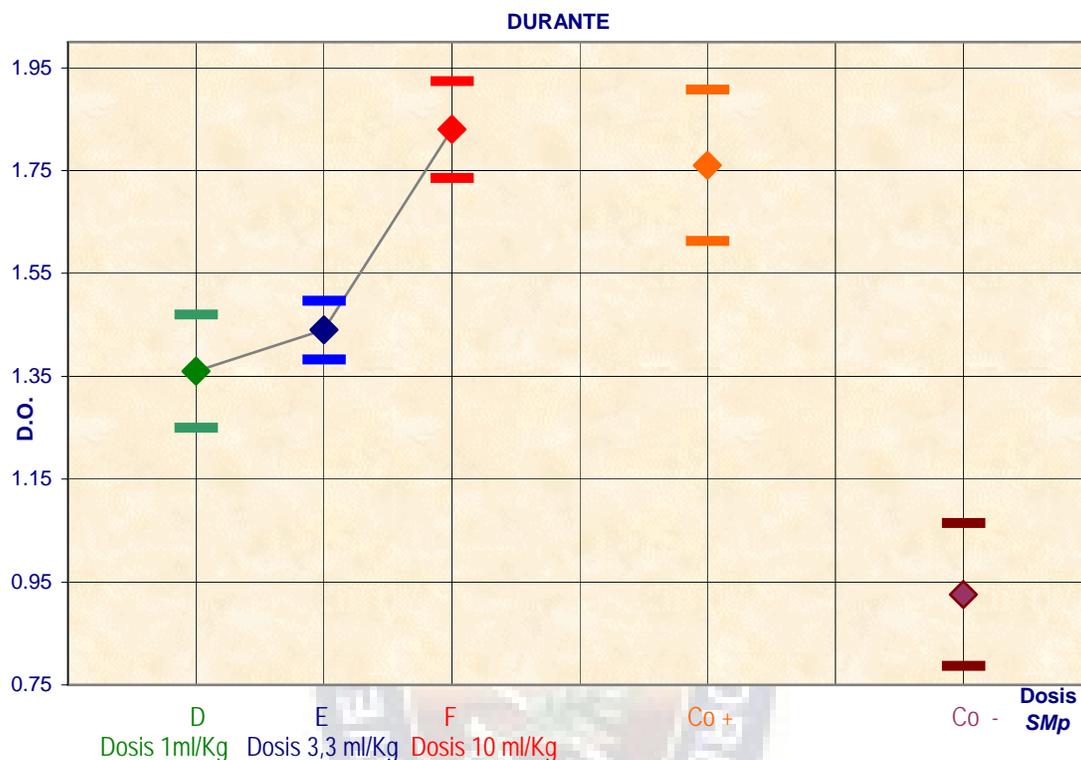
La cuantificación de anticuerpos anti-colágeno II circulantes o séricos fue determinada mediante ensayo inmunoenzimático bajo condiciones previamente estandarizadas de Coating o pegado de antígeno (2-5 ug/ml), dilución del suero (1:30), dilución del conjugado HRP-Ac anti IgG ratón (1:1E+5) y longitud de onda para lectura de placas HRP-TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (450 nm.) lo que garantiza que los valores obtenidos por la técnica sean muy confiables al momento de evaluar la variación inmunológica humoral por *SMP* in - vivo, a 3 dosis utilizando los controles (+) y (-) de Inmunización.

En la Figura 13, se pone de manifiesto la actividad inmunomoduladora de *SMP*, administrada 7 días ANTES de la primera inmunización inductora de reactividad autoinmune por colágeno II-CFA. No se observó una dosis de *SMP* particularmente potenciadora o supresora, siendo levemente significativa la disminución de la producción de Ac-anti-CII en las diferentes dosis en comparación con el control (+), aunque la dosis mayor tuvo efecto mas significativo.



**Figura 13.-** Inmunoensayo E.L.I.S.A. indirecto empleado en la Valoración Inmunomoduladora Humoral de *SMP*, administrada ANTES (7 días previos) a la inmunización con CFA-CII. Se evaluaron 3 dosis de *SMP* respecto a Controles (+) y (-) de Inmunización, evidenciando una leve supresión humoral dosis dependiente. Cada punto representa el Promedio +/- ES de 6 muestras por triplicado.

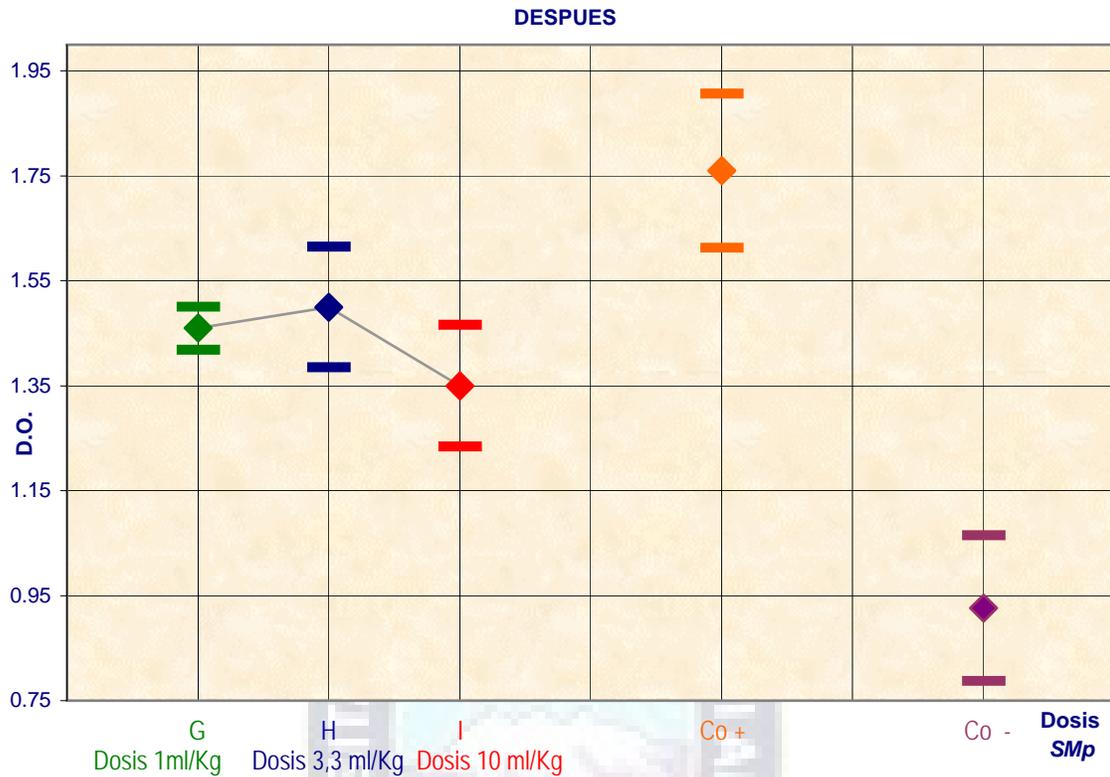
La administración de *Smp* a ratones el mismo día de la inmunización Colágeno II-CFA, denominado como DURANTE muestra un efecto inhibitor solo a las dosis menores (Figura 14).



**Figura 14.-** Inmunoensayo E.L.I.S.A. indirecto empleado en la Valoración Inmuomoduladora Humoral de *Smp*, en grupos DURANTE (administración de dosis a partir de 1ª inmunización CFA-CII). Se evaluaron 3 dosis de *Smp* respecto a Controles (+) y (-) de Inmunización, evidenciando un significativo efecto potenciador humoral dosis dependiente y de relación proporcional a la concentración de *Smp*. Cada punto representa el Promedio +/- ES de 6 muestras por triplicado.

La Figura 15 evalúa el efecto inmunomodulador de *Smp* administrada DESPUÉS, es decir después la segunda inmunización (boosted) utilizando Colágeno II-IFA.

El comportamiento para la dosis 1 ml/kg y 3.3 ml/kg *Smp* es prácticamente el mismo, mientras que a 10 ml/kg se observa un leve incremento en el efecto supresor humoral por *Smp*.



**Figura 15.-** Inmunoensayo E.L.I.S.A. indirecto empleado en la Valoración Inmunomoduladora Humoral de *Smp*, administrada a grupos DESPUÉS (paralela a la segunda inmunización con IFA-CII). Se evaluaron 3 dosis de *Smp* respecto a Controles (+) y (-) de Inmunización, evidenciando una leve supresión humoral dependiente de dosis de *Smp*. Cada punto representa el Promedio  $\pm$  ES de 6 muestras por triplicado.



### XIII DISCUSIÓN

La validación científica de propiedades inmunomoduladoras, del Extracto Acuoso o Savia de *Musa Paradisiaca* (*Smp*) sobre el Sistema Inmunológico, es parte de un proceso que incluye diversas pruebas en Etapa preclínica entre las que se citan:

- La comprobación de su actividad inmunomoduladora in vivo, diseñando aplicaciones técnicas y metodológicas in vitro con los que se evaluaron muchos mecanismos de acción planteados.
- La evaluación del potencial toxicológico por Ensayos Agudos y Crónicos en Cultivos Celulares, así como in vivo sobre distintos órganos y tejidos determinados por pruebas hematológicas, bioquímicas y anatómo-patológicas.

En estricto cumplimiento del proceso de Validación preclínica relacionada con la capacidad inmunomoduladora de *Smp*, se propuso la exploración de dichas propiedades sobre Modelos in vivo de procesos patológicos que involucran el rompimiento regulatorio del Sistema Inmunológico de Animales de Experimentación; la llamada Autoinmunidad Experimental.

El Modelo Experimental reproducido y estandarizado en sus etapas preparativas de inducción es la Artritis Experimental inducida por Colágeno (Collagen Induced Arthritis). Dicho Modelo constituye el homólogo animal con mayor similitud a la artritis autoinmune humana sobre el cual se realizaron innumerables investigaciones, ya que permite manipular mecanismos inmunológicos in vivo los que pueden ser evaluados patológicamente a nivel macroscópico, histológico, citológico in vitro, molecular, e inmunopatológico. En este trabajo se establecieron tres eventos fundamentales para evaluar el efecto inmunomodulador de *Smp* en procesos autoinmunes:

- a) La reproducción de la Autoreactividad Humoral y Celular inducida por colágeno tipo II como parte inicial del modelo de C.I.A.(Collagen Induced Arthritis).
- b) Estandarización del Bioensayo celular in vitro y del Inmunoensayo enzimático específico para este Modelo Experimental que permite evaluar la autoreactividad ya citada.
- c) Valoración del efecto inmunomodulador de *Smp* sobre autoinmunidad experimental aplicando los ensayos estandarizados.

Para la implementación de ambos procesos y buscando su interacción, fueron definidas especificaciones experimentales y de procedimiento en cada etapa, para esto se enfatizó en:

- El seguimiento de procedimientos de estandarización que demostraron en cada prueba eficacia, especificidad, y sensibilidad en la determinación.
- El seguimiento de condiciones singulares y optimas para la obtención de extractos.
- La modificación de procedimientos que demuestren igual o mejor resultado que el protocolo original.
- El mantenimiento de condiciones éticas de manejo de animales de experimentación.
- El mantenimiento de condiciones estériles en fases de estandarización de cada Bioensayo y de la prueba Inmunoenzimatica.

El análisis de los resultados presentados, esta relacionado con todas las puntualizaciones anteriores y con sus bases teóricas descritas ampliamente.

Los resultados de la Tabla 4, demuestra las características organolépticas de extracto acuoso de *M. Paradisiaca* que condicionan su aplicación en animales de experimentación o en ensayos *in vitro*. Aun realizado el control de identidad para los extractos obtenidos, estos fueron sometidos a purificación con el fin de eliminar formaciones apolares o residuos precipitados. El Extracto acuoso resultante fue apto para las diluciones posteriores.

El proceso de conservación aplicado a *SMP* esta directamente relacionado el modo de utilización del extracto. Se encontró que tanto la congelación (-20°C) como la forma liofilizada fueron útiles para este propósito y sirvieron para su fraccionamiento ya que se demostró que mantenían su actividad biológica invariable una vez reconstituido.

Al no existir datos previos del rendimiento de polvo seco liofilizado de *SMP*, ponemos a consideración los datos obtenidos en Tabla 5, ya que el liofilizado permitió obtener pastillas de forma no distorsionada, compactas y de color uniforme, y reconstitución total tras agitación magnética por 1 hora a 37 °C.

El extracto antigénico, fue obtenido aplicando un protocolo estandarizado que incluye la purificación en la que se emplean degradaciones oxidativas, enzimáticos, micro centrifugación, temperatura a 4°C, precipitación salina, y diálisis.

El procedimiento permite obtener una forma altamente purificada, Colágeno tipo II bovino <sup>249,159</sup>, lo que además favoreció la determinación de la concentración de la proteína por la Técnica Rojo Ponceau para proteínas, que permitió la construcción de Curva Estándar de Concentración BSA para determinar la concentración de Colágeno II purificado.

El establecer la linealidad para una curva estándar condujo a delimitar los valores hasta los cuales se puede calcular la concentración de otras proteínas resultantes de intrapolación de absorbancias experimentales con un Coeficiente de Variación (< 50 % en 5 repeticiones) que refleja la precisión experimental necesaria en el segmento lineal.

El monitoreo con relación a la variación del peso en animales inmunizados (Figura 3a, 3b, 3c) permitió plantear que:

- El efecto e la *SMP*, es compatible con las actividades de un suplemento nutricional ya que favorece un mejor peso, con implicancia en un fortalecimiento del sistema inmunológico de los ratones. El incremento del peso vario según el tiempo de administración y dosis de *SMP*, en función a la primera inmunización.
- La generación de reactividad autoinmune por si misma no causa perdida de peso corporal.

El diseño experimental para producir auto anticuerpos anti CII de alta afinidad, permitió que en este trabajo al igual que en otros, referentes al modelo experimental CIA, se genera inmunoreactantes aptos para su cuantificación mediante el sistema estandarizado ELISA indirecto, con condiciones analíticas específicas para las muestras séricas obtenidas y para los reactivos empleados, previos a la aplicación en la valoración inmunomoduladora de *SMP* sobre los niveles de producción de autoanticuerpos a dosis y tiempo de administración como variables. Es por eso que la estandarización del inmunoensayo fue determinante en la evaluación del Modelo Autoinmune reproducido para la validación preclínica del extracto acuoso de *SMP*.

Previo a las pruebas estandarizadas, se realizaron pruebas de cuantificación de anticuerpos anti Colágeno II, mediante técnicas aplicadas en algunos estudios preliminares utilizando la proteína fibrilar. Así, por análisis de resultados, la prueba capilar que solo permite identificar la presencia de complejo Ag-Ac ( cualitativo) y pudo ser semi-cuantitativa al asignar a la interacción visible Ag-Ac en capilar una calificación por sistema de cruces al fenómeno de complejos inmunes observado.

Por otro lado, en la Inmunodifusión doble u Ouchterlony no pudo observarse la presencia de bandas de precipitado, lo cual puede explicarse si se recuerda la placa preparada con agarosa 3% forma poros donde los Ac anti CII de suero difunden sin obstáculos, siendo las moléculas de colágeno II las que no rotan libremente (Radio de Stokes) impidiendo la formación de agregados precipitantes a valor crítico.

Por las observaciones anteriores, fue la técnica capilar semicuantitativa de formación de complejos inmunes la que permitió seleccionar los sueros hiperinmunes empleados en el proceso de estandarización.

Los sistemas ELISA están estandarizados en la parte analítica y preparativa no así en pasos donde intervienen los componentes específicos a identificar. Son precisamente estos pasos del Sistema ELISA Indirecto, los que fueron estandarizados.

El proceso óptimo de pegado de antígeno o Coating fue logrado a concentraciones de CII en el rango [2-5]  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . lo cual se respalda por lo expuesto en la metodología de coating, y también por:

- La molécula de colágeno por su estructura fibrosa secundaria tiene mayor superficie para la formación de enlaces hidrófobos e hidrófilos con polímeros de poliestireno
- Considerando la superficie del fondo de pozos, una mayor concentración de colágeno "saturaría" la superficie innecesariamente, con implicancias como:
  - Interacciones inespecíficas con paredes de pozos
  - Colágeno excedente reconocido por Ac anti CII séricos, que en lavados sucesivos con detergente, serían desprendidos, determinando concentraciones de Ac anti CII inferiores a las reales.

La determinación de la dilución de trabajo óptima de conjugado HRP-IgG carnero anti Fc-IgG murino fue lograda mediante un experimento doble en el que, a la vez, se ensayaron diluciones de suero hiperinmune. La existencia de Títulos elevados aun en los pozos con bajas concentraciones de suero específico, muestran que existen interacciones inespecíficas debidas a la elevada concentración de conjugado (Figura 4) estableciendo que:

- Las concentraciones altas de conjugado, no son discriminadas tras lavados con solución detergente.
- Los valores de absorbancia elevados ( $>3.00$ ) son proporcionales a mayor inespecificidad de unión y por lo tanto a la concentración de conjugado.

- Las uniones inespecíficas no permiten diferenciar el comportamiento del conjugado en la cuantificación de Ac anti CII a diferentes diluciones de suero hiperimmune.

Por tanto se estableció una concentración óptima a dilución 1/100000 (Figura 4) correspondiente a 0.155 ug/ml, con la que se obtuvo valores de absorbancia intermedios, análisis de diferencias entre diluciones de suero hiperimmune, y eliminación de uniones inespecíficas por solución detergente.

El esquema de inmunización utilizado, basado en un amplio respaldo bibliográfico<sup>110,237,190,82,99,144,252,80,239,199,89</sup> permite obtener la producción de AutoAnticuerpos con alta afinidad hacia su epítipo en Colágeno II. Sin embargo fue necesario establecer la dilución óptima de suero hiperimmune para valorar su distribución respecto a controles negativos (Figura 4)

Finalmente, las condiciones teóricas experimentales de análisis de resultados para las concentraciones de Conjugado y suero sirvieron de parámetros para verificar que la longitud de onda óptima de lectura a 450 nm (Figura 5 a-c) para el cromógeno TMB.

Considerando que la existencia de otro cromógeno en el medio podría generar interferencia en la lectura con consiguiente variación de los valores de absorbancia, se estableció el espectro de máxima absorción para la Hemoglobina, presente como "contaminante" de ciertas muestras séricas.

Fue establecido así experimentalmente que la Hb presenta un pico de máxima absorción a 550 nm y mientras la verificada máxima absorción de TMB es a 450 nm; por tanto, no existe entre ellos interferencia de longitud de onda, sin descartar un posible efecto Hiperocrómico

En múltiples repeticiones de Modelos experimentales de autoinmunidad, incluyendo el reproducido en este estudio, el modelo experimental de artritis autoinmune CIA, se evalúa la respuesta celular inducida en función al objetivo investigativo y el diseño experimental desarrollado en cada caso. En este sentido, las valoraciones pueden ser: histopatológicas, de depleción de células mononucleares, de niveles de citoquinas pro inflamatorias th1 presentes en suero y sinovia, de proliferación medida por incorporación de  $[^3\text{H}]\text{TdR}^{236}$ , de transferencia pasiva de autoinmunidad por CD8+, marcadores CD4+, CD8+ por citometría de flujo, y otros.

La determinación de los niveles de activación de esplenocitos con el Antígeno CII fue realizada a través de bioensayos con sales de tetrazolio, en particular para MTT, que es una técnica con amplia espectro de aplicación biológica a nivel del estudio de estirpes celulares y su expresión metabólica bajo condiciones citotóxicas, proliferativas, activadoras, enzimáticas, bacteriológicas, y otras situaciones de activación celular aplicables a la técnica.

Los parámetros que se establecieron durante la estandarización jugaron un papel trascendental para garantizar los resultados del segundo objetivo planteado anteriormente.

Los primeros resultados expuestos en estandarización del Bioensayo MTT demuestran la eficacia de procedimientos modificados y estandarizados de aislamiento celular. Esto se demuestra en viabilidad  $> 90 \pm 2 \%$  en 41 de 50 muestras de bazo (82 %) correspondientes al experimento final de valoración de *Smp*, con animales sometidos a esquema de inmunización y dosis de *Smp* (Figura 6). Las 9 muestras con viabilidad  $< 90 \pm 2 \%$ , son de bazos procesados en un mismo día.

Tanto la viabilidad analizada y la concentración, corresponden a las muestras murinas del experimento final para la valoración inmunomoduladora de *Smp*, y surgen de haber determinado primeramente la secuencia de uso de reactivos disponibles adecuada para el cultivo primario de esplenocitos tras varios experimentos modificados de una serie de procedimientos estándares recopilados de un Sistema de Cultivo celular establecido en el que también se evaluó la activación celular por reducción de MTT<sup>221</sup>.

El efecto deletéreo drástico evidenciado en la concentración celular después de utilizar Tris NH<sub>4</sub>Cl, se explica por la actividad osmótica que modifica la permeabilidad de membrana eritrocitaria causando lisis de estos. Los esplenocitos ya libres de glóbulos rojos siguieron una serie de lavados en medio Hanks y final suspensión en medio RPMI-3% en pasos donde se pudo garantizar la obtención de  $3E+7$  cel/ml límite inferior y 94% viabilidad (Figura 7).

Un segundo punto de estandarización incluye el comportamiento del extracto purificado de colágeno II en cultivo primario de esplenocitos. En este sentido, se excluyó un posible efecto deletéreo sobre esplenocitos murinos

Examinando el comportamiento de los esplenocitos, al ser enfrentados *in vitro* con diferentes dosis de su autoantígeno activador, se pudo establecer que la dilución 1/100 de CII, es potencialmente activadora respecto a las demás dosis y al control (+) de activación PHA. Sin embargo las absorbancias observadas no reflejan los niveles de reducción de MTT frecuentemente determinados en el Bioensayo<sup>153</sup> (Figura 9). El tiempo de incubación necesario para una óptima activación, sobre el mismo experimento, se estableció a las, 4 y 12 horas

El estudio del evento central de este trabajo referido al Bioensayo de reducción metabólica de MTT y a Ensayo Inmunoenzimático ELISA indirecto (ambos estandarizados) aplicados en la Valoración de *SMP* como inmunomodulador in vivo de la reactividad celular y humoral hacia Colágeno II muestra que la respuesta inmunológica modulada, como observamos en los resultados para la valoración inmunomoduladora de respuesta humoral, y relacionándolos con lo expuesto para la respuesta celular hacia colágeno II, establece que los esplenocitos efectivamente desarrollaron una respuesta humoral superior e inversamente proporcional a la reactividad celular no solo a nivel del tiempo de administración de *SMP*, sino también a las dosis y controles evaluados; la ausencia del proceso inflamatorio, la escasa respuesta de esplenocitos enfrentados a CII *ex vivo*, y la potenciada reactividad humoral constituye un mecanismo de tolerancia oral, en otros experimentos logrados con el mismo antígeno CII.

La diferencia de proceso autoinmune y enfermedad autoinmune, cuya diferencia fundamental es el desarrollo patológico desencadenado por mecanismos inflamatorios, deberá considerar que la respuesta esta en función al tipo de célula presentadora de antígeno activando CD4+, siendo las células esplénicas adherentes como los macrófagos determinantes de reactividad TH1, mientras que linfocitos B en función de presentadores de antígeno van a generar reactividad humoral TH2, mecanismos celulares muy relacionados a la variedad inmunogenética de MHC, TCR, moléculas coestimuladoras respecto al autoantígeno Colágeno II. Se debe considerar además la gran cantidad de linfocitos B en órganos linfoides secundarios y < 5 % en sangre por lo que la producción de anticuerpos anti CII es magnificada<sup>111</sup>, y restando importancia como determinante de respuesta inmune a la señalización celular, preestableciendo el grado secretor de citoquinas independiente del balance TH1/TH2

Siendo el objetivo determinar un nivel de inmunomodulación de *SMP*, se estableció que el tiempo de administración de *SMP* paralelo a inmunización CII-CFA (DURANTE), modifico la capacidad de respuesta humoral y celular, estableciendo en este tiempo que la dosis 3 (10 ml/Kg) presentó actividad potenciadora de respuesta humoral (Figura 14) mientras que lo hallado en respuesta celular (Figura 11) será analizado mas a detalle. Entonces, para la Valoración inmunomoduladora de *SMP* en reactividad humoral se establece que:

- Existe un tiempo de administración de *SMP* efectivo, al cual existe un efecto potenciador humoral en respuesta a autoantígeno Colágeno II.
- Es posible establecer una Dosis de *SMP* efectiva, con inmunomodulación potenciadora
- El efecto potenciador humoral de *SMP* no determina un cuadro patológico, el cual esta fundamentado en formación de complejos inmunes y procesos inflamatorios relacionados.

La Valoración de *SMP* como inmunomodulador celular, inicialmente basado en los resultados expuestos, muestra valores inferiores para esplenocitos de animales inmunizados sometidos a las dosis de *SMP* y para esplenocitos control positivo ( de animales inmunizados sin tratamiento de *SMP*) respecto a valores de control negativo ( esplenocitos no inmunizados y sin tratamiento con *SMP*). Estos constituyen en el bioensayo, que la actividad metabólica determinada por la activación celular de esplenocitos de animales inmunizados es menor que la actividad metabólica de esplenocitos de murinos no inmunizados, comportamiento que puede explicarse de dos formas:

Primeramente, si los mecanismos de inhibición de respuesta celular planteados, así como el inexistente proceso inflamatorio, derivarían en una disminución del número inicial de células reactivas a colágeno II constitutivamente existentes, por lo tanto posible pensar que el valor para control negativo ( esplenocitos no inmunizados y sin tratamiento con *SMP*) corresponda a un nivel basal de mínima respuesta metabólica de células "normalmente " reactivas a CII, las cuales tras el proceso de inducción con CII disminuirían en cantidad aun más. Aquí las dosis de *SMP* jugarían un rol importante mediante el efecto dual visto en anteriores trabajos con *SMP in vitro*. Se observa a dosis 3 (10 ml/Kg de *SMP*) administrada paralela a primera inmunización (DURANTE), que la actividad metabólica es excepcionalmente baja, siendo inferior al nivel basal, ( Figura 11) al de las otras dos dosis ensayadas, y al valor de reducción de MTT por células control positivo.

En segundo lugar existiría un efecto dosis dependiente que causaría inducción hacia el complejo mecanismo apoptótico con células con actividad metabólica reducida, siendo además una propiedad fundamental de este mecanismo la remoción de células apoptóticas por macrófagos sin generar inflamación y puede transcurrir hacia anergia o deleción clonal.

Todas estas aptitudes de la Savia de *Musa paradisíaca*, en el presente Modelo experimental, pueden considerarse como favorables, dentro del contexto de que la mayoría de los estados patológicos de autoinmunidad se encuentran en las células T autopatogenas derivadas de clonas TH1 activadas por citoquinas pro inflamatorias

Los efectos encontrados permiten por lo tanto buscar alternativas terapéuticas al modelo experimental CIA reproducido con éxito, con posibilidades de aumentar la similitud de la patogenia experimental preclínica a la clínica humana aplicando cepas murinas endogámicas, y abriendo el panorama para estudios de *SMP* a niveles más complejos. Una vez mas el indagar en capacidades fitoterapéuticas de nuestra abundante biodiversidad botánica, nos induce apoyar la investigación etnofarmacológica y etnomédica en resolución de patologías de notable incidencia en nuestro país.



## XIV CONCLUSIONES

Los Modelos Experimentales de Autoinmunidad permiten ser reproducidos bajo optimización, y normalización de procedimientos de acuerdo a ciertas condiciones de laboratorio. El éxito en la reproducción del Modelo Experimental de Autoinmunidad CIA, permite la Valoración de Savia de *Musa paradisíaca* (SMp) como modulador de reactividad inmunológica humoral y celular de tipo autoinmune, concluyendo que:

“La Savia de *Musa paradisíaca* tiene actividad inmunomoduladora sobre el Modelo Experimental CIA reproducido y estandarizado”

Esta conclusión surge de:

- El colágeno bovino tipo II purificado y cuantificado (3340 ug/ml por curva estándar BSA) induce reactividad autoinmune al inmunizar entre 100-200 ug de CII/0.1 ml emulsión CII-CFA (IFA)
- El Sistema Inmunoenzimático ELISA indirecto estandarizó la evaluación humoral del modelo CIA, mediante el pegado de antígeno en microplacas a concentración de CII 2-5 ug/ml, la dilución 1/10E+5 de conjugado HRP-Anti Fc-IgG murino, la dilución 1/30 de suero hiperinmune, determinando absorbancia en lector ELISA a 450 nm específica para la reacción Redox de cromógeno TMB y sin interferencia de absorbancia por Hb.
- La estandarización del Bioensayo de reducción de MTT por maquinaria enzimática para la evaluación celular del Modelo Experimental CIA, permitió optimizar la secuencia de medios de cultivo y reactivos para el aislamiento celular (Hanks, Tris NH<sub>4</sub>Cl, 3 xHanks, RPMI 3%), aplicar colágeno II para activación óptima de esplenocitos a dosis 1/1000, e incubar el cultivo primario de esplenocitos en presencia de colágeno II diluido 1/1000 por 8 horas a 37 °C (promedio de los tiempos óptimos de incubación hallados en experimento de 4 - 12 horas de incubación para la activación celular)
- El monitoreo de la ganancia de peso determina la respuesta específica hacia CII.

La valoración inmunomoduladora de *Smp* administrada a murinos sometidos a esquema de inmunización, y aplicando las técnicas estandarizadas, concluyó que:

- La autoreactividad humoral es potenciada a dosis 10 ml/Kg de *Smp* y su ventaja respecto a la reactividad celular inhibe un cuadro inflamatorio local, y consiguiente inhibición de patología característica.
- La autoreactividad celular es suprimida en equilibrio TH1/TH2 a dosis 10 ml/Kg de *Smp* induciendo mecanismos apoptóticos o anergicos de clonas LTh1 reactivas a CII innatas.
- El efecto inmunomodulador humoral y celular eficiente para las dosis de *Smp* se produce al administrar el extracto acuoso paralelamente a la primera inmunización CII.CFA ( DURANTE), en forma experimental.





## XV RECOMENDACIONES

En relación a los extractos:

- ▶ La variación de la composición de sustancias presentes en la Savia de *Musa paradisiaca* (SMp) por tanto de sus propiedades organolépticas está en relación a la procedencia geográfica de la planta, por lo que la reproducibilidad de los resultados del presente estudio depende de la recolección del extracto en iguales condiciones de localización geográfica.
- ▶ El cartílago nasal bovino como fuente para la extracción de colágeno tipo II siguió un protocolo muy eficaz demostrado en varios experimentos. Sin embargo existen varios tejidos como el esternon de pollo o el condrosarcoma de Schwarm ricos en colágeno tipo II. La variación en el origen histológico del colágeno II debe considerar protocolos modificados los cuales están estandarizados según en el contenido de proteoglicanos, fibras colágenas y condrocitos presentes.
- ▶ La aplicación del método Rojo ponceau para proteínas totales elegido en la cuantificación de colágeno II extraído, está fundamentado en el protocolo de extracción altamente específico para esta proteína, por lo que se recomienda que cualquier modificación a dicho protocolo involucraría la construcción de una nueva curva estándar de concentración además de un método más específico que detecte el colágeno II tomando en cuenta su elevado contenido de prolina y lisina.
- ▶ La determinación de haplotipos de susceptibilidad en cepas murinas permite obtener una respuesta inmunológica específica, por tanto el desencadenamiento del proceso autoinmune inducido por colágeno II estuvo determinado la cepa *balb/c* abierto. Estudios reproduciendo este modelo experimental en cepa *balb/c* endogámica permitiría observar las manifestaciones histopatológicas por degradación del cartílago articular.

En relación a los procedimientos estandarizados:

- ▶ Las características moleculares y físicas de las fibras de colágeno tipo II hacen que la técnica de inmunodifusión doble o Ouchterlony no sea aplicable cuando se trabaja con esta proteína.

En relación a lo concluido , se plantea la posibilidad de investigar en:

- ▶ Aplicar modelos de autoinmunidad experimental que utilizan colágeno II o sus productos como por ejemplo C.A.I.A (collagen antibody-induced arthritis) que utiliza anticuerpos anti colágeno para la inducción, o LPS-mAb CII que combina lipopolisacarido bacteriano a C.A.I.A. . Ambos modelos reducen el tiempo de desencadenamiento del proceso de artritis autoinmune experimental.
- ▶ Realizar ensayos pre-clinicos que permitan comparar el efecto inmunomodulador de *SMP* respecto a fármacos empleados en artritis reumatoide humana como etanercept.
- ▶ Basándonos en el modelo experimental de autoinmunidad inducida por colágeno II , el cual fue optimizado en su protocolo y reproducido en el proceso autoinmune , fue posible valorar las propiedades inmunomoduladoras de *SMP* , por lo que es posible estudiar otros ejemplares botánicos nativos de Bolivia con capacidad inmunomoduladora de procesos autoinmunes artritogenicos .

En relación a la series de investigaciones realizadas sobre *SMP*:

- ▶ Aplicar la *SMP* en un ensayo clinico de Tuberculosis como el siguiente nivel de investigación habiéndose demostrado su actividad inmunomoduladora y sus margenes de seguridad preclínica.



## XVI BIBLIOGRAFÍA

1. Adarichev, V. A., T. Bárdos, S. Christodoulou, M. T. Phillips, K. Mikecz, T. T. Glant. 2002. Major histocompatibility complex controls susceptibility and dominant inheritance, but not the severity of the disease in murine models of rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 54:184.
2. A. Billiau and P. Matthys "Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases" *J. Leukoc. Biol.*, December 1, 2001; 70(6): 849 - 860.
3. Abdul Ghaffar; Roitt, Brostoff *Immunology*, 4th ed., Chapt. 112 and 27. Tolerance and Autoimmunity.2000
4. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 1999;341:2068-2074.
5. Alzola Ricardo, Curso de Histología, Embriología y Teratología: Tejido Hemocitopoyetico Linfoide, UNCPBA; Buenos Aires - Argentina, 2002.
6. Anderson, I. The properties of hyaluronan and its role in wound healing. *Prof Nurse*, 2001, 17:232-35.
7. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401 (2002).
8. Antibody-antigen interactions. Review 2002
9. Antonio Augusto Gorni. INTRODUÇÃO AOS PLÁSTICOS. *Revista Plástico Industrial*. 2003
10. Arend, W. P. The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 40: 595-597, 1997
11. Arthritis Inducing Monoclonal Antibody Cocktail. Arthrogen - CIA. CHEMICON, International. California, USA.
12. Arthritogenic Monoclonal Antibody Cocktail. Catalog # 2001 - 2005. *For Research Use Only*. CHONDREX, inc. U.S.A.
13. Atkinson, J. P. Complement deficiency: predisposing factor to autoimmune syndromes. *Clin. Exp. Rheumatol.* 7, (Suppl. 3) S95-S101 (1989).
14. B.S.A.:Fraction V. Proliant,inc.
15. Bäcklund, J., Nandakumar, K. S., Bockermann, R., Mori, L., Holmdahl R.. 2003. Genetic Control of Tolerance to Type II Collagen and Development of Arthritis in an Autologous Collagen-Induced Arthritis Model. *J. Immunol.* 171: 3493-3499.
16. Bendich A., *J Nutr*, 119: 112-5; Jan 1989.
17. Bennett, B. C., M. A. Baker, and P. Gomez. n.d. Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador. *Advances in Economic Botany* 14 (in press )
18. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nature Genet.* 27, 20-21 (2001).
19. Bensky, D. and A. Gamble. 1993. *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica* (revised edition). Eastland Press Inc., Seattle.
20. Berg LJ, et al. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell.* 1989;58:1035-1046.
21. BioCell Collagen II. Catalog. 1998-2003. Springboard Prod., inc.
22. Bjorses, P. , Aaltonen, J. , Horelli-Kuitunen, N. , Yaspo, M. L. & Peltonen, L. Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1547-1553 (1998).
23. Bock SA, Atkins FM. Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *J Pediatr* 1990;117:561-7
24. Bohinski, Robert C.1991.Bioquímica.Cap.10.Quinta edición.Edit. Addison-Wesley Iberoamericana.pp 411
25. BOVINE SERUM ALBUMIN. CAS No.: 9048-46-8.Material Safety Data Sheet.Mallinckrodt Chemicals,inc.
26. Bovine Serum Albumin. Proliant, inc.
27. BRADLEY C. BENNETT AND GHILLEAN T. P RANCE. "INTRODUCED PLANTS IN THE INDIGENOUS PHARMACOPOEIA OF NORTHERN SOUTH AMERICA" *Economic Botany* 54(1):90-102, 2000.U.S.A.-U.K.

28. Bruhn y Holmstedt, 1981
29. Buckner, J. & Nepom, G. Genetics of rheumatoid arthritis: is there a scientific explanation for the human leukocyte antigen association? *Curr. Opin. Rheumatol.* 14, 254-259 (2002).
30. Burkhardt, H., T. Koller, A. Engstrom, K. S. Nandakumar, J. Turnay, H. G. Kraetsch, J. R. Kalden, R. Holmdahl. 2002. Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum.* 46:2339.
31. Butler, D. M., A. M. Malfait, R. N. Maini, F. M. Brennan, M. Feldmann. 1999. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 29:2205.
32. C. Garrison Fathman, Luis Soares, Steven M. Chan and Paul J. Utz. "An array of possibilities for the study of autoimmunity" *Nature* 435, 605-611 (2 June 2005)
33. Carvajal, Roger Phd "Manipulación de la Respuesta Inmune ." Trabajo de año sabático, U.M.S.A.: 196, 2004
34. Cell Proliferation Assay Kit XTT Reagent. Israel Beit Haemek LTD., Partida 20-300-1000
35. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999;189:821-829
36. Champe, P. & Harvey, R. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994:147-55.
37. Chang, J.C.C., Diveley, J.P., Savary, J.R., Jensen, F.C., "Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant" *Advanced Drug Delivery Reviews.* 32: 3, 173-186 (1998)
38. Chien YH, Gascoigne NR, Kavalier J, Lee NE, Davis MM. Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* 1984;309:322-326.
39. Chiocchia, G., M. C. Boissier, C. Fournier. 1991. Therapy against murine collagen-induced arthritis with T cell receptor V $\beta$ -specific antibodies. *Eur. J. Immunol.* 21:2899.
40. Christopher C. Goodnow, Jonathon Sprent, Barbara Fazekas de St Groth and Carola G. Vinuesa · Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435, 590-597 (2 June 2005) | doi: 10.1038/nature03724
41. Chu, C. Q., M. Londei. 1996. Induction of Th2 cytokines and control of collagen-induced arthritis by non-depleting anti-CD4 Abs. *J. Immunol.* 157:2685.
42. Conceptos de inmunocitoquímica. Esquema de un proceso inmunocitoquímico. Review. 2001
43. Courtney, J. S., M. J. Dallman, A. D. Dayan, A. Marten, B. Mosedale. 1980. Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283:666.
44. Davidson College. Horseradish Peroxidase. VersalinxDetection.org.
45. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
46. Donald, Handbook of Experimental Immunology, 4<sup>a</sup> ed., 1986.
47. Dr. Edward F. Rosloniec, et al. "An HLA-DR1 Transgene Confers Susceptibility to Collagen-induced Arthritis Elicited with Human Type II Collagen" Department of Molecular Immunology, *J. Immunol.* 159: 2818-2827, 1996, Memphis, TN
48. Dra. A. Z. Martínez, Dra. R. González Á., Dra. S. Garriga R. "Ensayo clínico con polvo de *Musa paradisiaca* en el tratamiento intercrisis del asma bronquial en adultos" *Rev Cubana Invest Biomed* 1998;17(3):208-13
49. Duarte, A. The Collagen Type II Cure for Arthritis and Heart Disease. 1997:39.
50. Duke, J. & Vásquez. M. R (1994). *Amazonian ethnobotanical dictionary*, Boca Raton, Fla, EEUU. CRC Press. 215p
51. E.L.I.S.A. Métodos en Biología Celular. Review.2000
52. E.P. Les, Ph.D., Senior Staff Scientist "A Brief History of the Two Substrains of BALB/c, BALB/c J, and BALB/cBy J Available from Animal Resources" No. 443 Fall 1990  
JAX|NOTES.jaxmice.jax.org
53. Elaine Bell and Lucy Bird. "Autoimmunity" *Nature* 435, 583 (2 June 2005)
54. El-Awar N, Terasaki PI, Perdue S, Cicciarelli J, Mickey MR. "Discrimination of T, B, and null lymphocytes by electronic sizing." *Tissue Antigens.* 1980 Apr;15(4):346-60.

55. Elisabetski, 1988; Etkin, 1988)
56. Enrique Cadenas "Sustancias flavonoides" Revisión temática. *Department of Molecular Pharmacology & Toxicology. School of Pharmacy. University of Southern California, Los Angeles.* 2000
57. Ermann, J. & Fathman, C. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nature Immunol.* 2, 759-766 (2002).
58. ESTRELLA, Eduardo. Plantas medicinales amazónicas: Realidad y perspectivas. Lima, Tratado de Cooperación Amazónica, Secretaría Pro Tempore, febrero 1995, p. 63.
59. Eulises Díaz Día, col. "Metodología preparativa y analítica para estandarizar y validar un sistema Elisa para cuantificar IgG de ratón" Técnicas Instituto Nacional de Endocrinología Departamento de Diabetes Grupo de Metodología Diagnóstica
60. Eulises Díaz Día, col. "Procesamiento de datos y reporte de resultados de inmunoensayos enzimáticos" Técnicas Instituto Nacional de Endocrinología Departamento de Diabetes Grupo de Metodología Diagnóstica
61. F. Nelson, L. Dahlberg, et al. "Evidence for Altered Synthesis of Type II Collagen in Patients with Osteoarthritis" *J. Clin. Invest.* Vol. 102, # 12, December 1998, 2115-2125
62. Farnsworth, N.R., and R.W. Morris. 1976. Higher plants: the sleeping giant of drug development. *Am. J. Pharm.* March/April:46.
63. Fernández, Benjamín. "Liofilización de Productos Farmacéuticos" Ed. LIMUSA S.A. 1998, ISBN 968 18 5593 0, México, D.F.
64. Fernández, F.; Rodríguez T., R.; y col. "CARACTERÍSTICAS QUÍMICO FARMACEUTICAS Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRACTOS DE *Musa sp ABB* (Plátano Burro). *Rev. Cubana Plant Med.* 1997:2(2-3); 40-44
65. Fischer, A. , Rieux-Laucat, F. & Le Deist, F. Autoimmune lymphoproliferative syndromes (ALPS): models for the study of peripheral tolerance. *Rev. Immunogenet.* 2, 52-60 (2000).
66. Fisher, G. H. *et al.* Dominant interfering *Fas* gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946 (1995).
67. Fontenot, J. D. , Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunol.* 4, 330-336 (2003).
68. Fugger, L., A. Svejgaard. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. *Arthritis Res.* 2:208.
69. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985;230:1043-1045.
70. Fujinami RS, Oldstone MBA, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2346-2350.
71. G. S. Bleumink, E. J. ter Borg, C. G. Ramselaar and B. H. Ch. Stricker. Etanercept-induced subacute cutaneous lupus erythematosus *Rheumatology* 2001; 40: 1317-1319
72. Garren, H. *et al.* Combination of gene delivery and DNA vaccination to protect from and reverse Th1 autoimmune disease via deviation to the Th2 pathway. *Immunity* 15, 15-22 (2001).
73. Gibbon C, Smith T, Egger P, Betts P, Phillips D. Early infection and subsequent insulin dependent diabetes. *Arch Dis Child* 1997;77:384-385
74. Glant, T. T., E. I. Buzás, A. Finnegan, G. Negroiu, G. Cs-Szabó, K. Mikecz. 1998. Critical role of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation. *J. Immunol.* 160:3812.
75. Glant, T. T., G. Cs-Szabó, H. Nagase, J. J. Jacobs, K. Mikecz. 1998. Progressive polyarthritis induced in *BALB/c* mice by aggrecan from human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 41:1007.
76. Glant, T. T., K. Mikecz, A. Arzoumanian, A. R. Poole. 1987. Proteoglycan-induced arthritis in *BALB/c* mice: clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum.* 30:201.
77. Gomez P., Terrazas K., Sánchez L., Carvajal R., "Estudio de plantas medicamentosas locales en la modificación de la Respuesta Inmune: Efecto inmunomodulador de *Musa ssp.*" BIOFARBO. Año 2. Nº 2. 1993.

78. Gómez, Patricia., “Actividad inmunomoduladora de savia de *Musa Paradisiaca*: Establecimiento de un monitor biológico en la respuesta inmune experimental”. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Bioquímica. SELADIS - U.M.S.A. 1992
79. Greco, R. et al. Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix. *J Cell Physiol*, 1998, 177:465-73
80. Griffiths, M. M., J. Wang, B. Joe, S. Dracheva, Y. Kawahito, J. S. Shepard, V. R. Reese, S. McCall-Vining, A. Hashiramoto, G. W. Cannon, et al 2000. Identification of four new quantitative trait loci regulating arthritis severity and one new quantitative trait locus regulating autoantibody production in rats with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 1278.
81. Guevara O. I, Rodríguez C. Ensayo de Toxicidad Aguda Oral de un Fitofármaco obtenido a partir del Pseudotallo de *Musa Paradisiaca* L. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 22: 57-9 (2003).
82. Gulko, P. S., Y. Kawahito, E. F. Remmers, V. R. Reese, J. P. Wang, S. V. Dracheva, L. Ge, R. E. Longman, J. S. Shepard, G. W. Cannon, et al 1998. Identification of a new non-major histocompatibility complex genetic locus on chromosome 2 that controls disease severity in collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Rheum.* 41:2122.
83. H. J. Morris Q., R. T. Abdala D. e Ing. D. Campos O. “Adyuvantes inmunológicos”. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999;18(2):130-7 Centro de Investigaciones de Energía Solar. Santiago de Cuba
84. H.-G. Zhang, P. Yang, J. Xie, Z. Liu, D. Liu, L. Xiu, T. Zhou, Y. Wang, H.-C. Hsu, and J. D. Mountz, 2002. Depletion of Collagen II-Reactive T Cells and Blocking of B Cell Activation Prevents Collagen II-Induced Arthritis in DBA/1j Mice. *J. Immunol.*; 168(8): 4164 - 4172.
85. Harvey Lodish, Arnold Berk, *Molecular Cell Biology*, 4th edition. 2001
86. Hertog, M.G., et al. *Lancet*, 342: 1007-11, Oct. 23, 1993..
87. Hollander, A., T. Heathfield, C. Webber, Y. Iwata, R. Bourne, C. Rorabeck, and A.R. Poole (1994) Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J. Clin. Invest.* 93: 1722-1732
88. Hori, S. , Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061 (2003).
89. Immunization Grade Type II Collagen and Adjuvant. Catalog # 2001 - 2005. *For Research Use Only. CHONDREX, inc. U.S.A.*
90. Inbred Strains of Mice: BALB. Jaxmice Data Sheet. Stock Number 000651.jaxmice.jax.org
91. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000;165:6107-6115.
92. Isolation of lymphocytes. *Methods of Cell cultures.* Review 1998
93. Jahnke U, Fischer EH, Alvord EC Jr. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* 1985;229:282-284.
94. James South, M.A. “Collagen Type II™ Shown to Reverse Skin and Joint Aging” Vitamin Research Products. Carson City, NV.
95. Jansson, Å. M., L. Jacobsson, H. Luthman, J. C. Lorentzen. 1999. Susceptibility to oil-induced arthritis is linked to *Oia2* on chromosome 4 in a DA(DA x PVG.1AV1) backcross. *Transplant. Proc.* 31: 1597.
96. JEAN-FRANÇOIS BACH “Autoimmune Diseases as the Loss of Active “Self-Control””. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 998: 161-177 (2003).
97. Jennifer Jacobs, M.D., Michael Balick, Ph.D. “HERBAL MEDICINE” Review. 2003
98. Jens Kjeldsen-Kragh. Rheumatoid arthritis treated with vegetarian diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 70, No. 3, 594S-600S, September 1999
99. Jirholt, J., Cook, A., Emahazion, T., Sundvall, M., Jansson, L., Nordquist, N., Pettersson, U., Holmdahl, R. 1998. Genetic linkage analysis of collagen-induced arthritis in the mouse. *Eur. J. Immunol.* 28: 3321-3328
100. Joan M. Von Feldt, M.D., Michael Maldonado, M.D., Peter E. Callegari, M.D., and William V. Williams, M.D. *Biological Agents in the Treatment of Rheumatoid Arthritis Volume 11* Spring 1998 Pages 79-86 Department of Medicine, Rheumatology Division, University of Pennsylvania School of Medicine.

101. John D. Rioux and Abul K. Abbas. "Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease" *Nature* 435, 584-589 (2 June 2005)
102. John R Lindsay Smith. "Mechanistic studies of organic and bio-organic oxidations" *J. Chem. Soc.*, 2001 28, 201.
103. Joseph Dietz, Ph.D. Proxidase Conjugated goat IgG Fraction to mouse IgG Fc. Direction Quality Control. ICN pharmaceuticals, Inc
104. K. S. Nandakumar, J. Bäcklund, M. Vestberg and R. Holmdahl. "Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells" Lund University, Sweden., *Arthritis Res Ther* 2004, 6:R544-R550
105. K. S. Nandakumar, L. Svensson and R. Holmdahl. "Collagen Type II-Specific Monoclonal Antibody-Induced Arthritis in Mice: Description of the Disease and the Influence of Age, Sex, and Genes" Lund University, Lund, Sweden., *American Journal of Pathology*. 2003;163:1827-1837.
106. Kamradt T, Soloway PD, Perkins DL, Geftter ML. Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J Immunol* 1991;147:3296-3302.
107. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987;49:273-280.
108. Kap-Sung Kim, Seung-Duk Lee, Kyung-Ho Kim, Sang-Yong Kil. Suppressive effects of a water extract of *Ulmus davidiana* Planch (Ulmaceae) on collagen-induced arthritis in mice *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 97, Issue 1, 10 February 2005, Pages 65-71
109. Kasama, T., J. Yamazaki, R. Hanaoka, Y. Miwa, Y. Hatano, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide, M. Adachi. 1999. Biphasic regulation of the development of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin-12: possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* 42:100.
110. Kawahito, Y., G. W. Cannon, P. S. Gulko, E. F. Remmers, R. E. Longman, V. R. Reese, J. P. Wang, M. M. Griffiths, R. L. Wilder. 1998. Localization of quantitative trait loci regulating adjuvant-induced arthritis in rats: evidence for genetic factors common to multiple autoimmune diseases. *J. Immunol.* 161:4411.
111. Kelly GE, Nockolds CE. "Morphological differences between sub-populations of human lymphocytes revealed by scanning electron microscopy". *J. Leukocyte Biol* 80: 121-127
112. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nature Immunol.* 4, 337-342 (2003).
113. Kimito Kawahata, Yoshikata Misak, et al. "Generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells from Autoreactive T Cells Simultaneously with Their Negative Selection in the Thymus and from Nonautoreactive T Cells by Endogenous TCR Expression" *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 4399-4405.
114. Kisielow P, Blüthman H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes. *Nature*. 1988;333:742-746.
115. Kisielow P, Teh HS, Blüthman H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature*. 1988;335:730-733.
116. Kleinau, S., P. Martinsson, B. Heyman. 2000. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fc-receptors. *J. Exp. Med.* 191:1611
117. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2879-2883.
118. Kohn (1992), Davis y Yost (1983) Prance (1972a, 1972b).
119. Koshte V.L. & M. Albeus (1992) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 97: 17-24.
120. Kremer, J. M. et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4lg. *N. Engl. J. Med.* 349, 1907-1915 (2003).
121. Krishnan, M. P. Nambiar, V. G. Warke, C. U. Fisher, J. Mitchell, N. Delaney, and G. C. Tsokos. Alterations in Lipid Raft Composition and Dynamics Contribute to Abnormal T Cell Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.*, June 15, 2004; 172(12): 7821 - 7831.

122. Kuivaniemi, H.; Tromp, G.; Prockop, D. J. : Mutations in fibrillar collagen s (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum. Mutat.* 9: 300-315, 1997.
123. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:382-427.
124. Lapa 1993
125. Lee SK, Lee SI. Experiment with Banana Trunk Juice as a neuromuscular blocker. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1980;58:591-4)
126. Lee, E.R., and A.R. Poole (1996) Ultrastructural localization of the C-propeptide released from type II procollagen in fetal bovine growth plate cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 44: 433-443
127. Lovett-Racke, A. E. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J. Immunol.* 172, 5790–5798 (2004).
128. Lu, J., Kasama, T., Kobayashi, K., Yoda Y. 2000. Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Regulation of Murine Collagen-Induced Arthritis Cell. *Immunol.* 342:529
129. Lynn R. Jackson and James G. Fox Adjuvants and Antibody Production Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production *ILAR Journal, volume 37, number 3, 1995*
130. Lynton Dove White. The "Canoe Plants" of Ancient Hawai`i. Hana, Maui. 2005
131. Miller SD, Vanderlugt CL, Smith-Begolka WS, et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 1997;3:1133-1136.
132. Maini, R. N. *et al.* Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 1552–1563 (1998).
133. Marc Feldmann and Lawrence Steinman. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity *Nature* 435, 612-619 (2 June 2005)
134. Marcia Zimmerman C.N. "Phytochemicals: Nutrients Of The Future" Review.2002
135. MARINA FLEETON, NIKHAT CONTRACTOR, FRANCISCO LEON, JIANPING HE, DENISE WETZEL, TERENCE DERMODY, AKIKO IWASAKI<sup>c</sup> and BRIAN KELSALL. Involvement of Dendritic Cell Subsets in the Induction of Oral Tolerance and Immunity *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1029: 60-65 (2004)
136. Marshall, N. J., Goodwin, C.J. and Holt, S.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assay to measure cell growth and function.[Review]. *Growth regulation* 5:69-84
137. Márta BENCsÁTH et al Biomolecular Cytokine Therapy , National Institute of Pharmacy, Budapest, Hungary Vol 9, No 1, 2003
138. Masaru AKITA, et al. "Structural Change and Catalytic Activity of Horseradish Peroxidase in Oxidative Polymerization of Phenol" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* Vol. 65 (2001) , No. 7 pp.1581-1588
139. Massó Lago, 1992.
140. Massó Lago. op.cit.
141. Mauri, C., W. R. O. , M. Walmsley, M. Feldmann. 1996. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 26:1511.
142. Mayne, R. (1989) Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease. *Arthritis Rheum.* 32: 241-246
143. McCarey, D. W. *et al.* Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 363, 2015–2021 (2004).
144. McIndoe, R. A., B. Bohlman, E. Chi, E. Schuster, M. Lindhardt, L. Hood. 1999. Localization of non-MHC collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/1j mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2210.
145. Michael V.Berridge, An S. Tan, Kathy McCoy, and Rui Wang. *The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assay That Use Tetrazolium Salts". Biochemica.* 2004:4,14-19
146. Microtiter Plate Guide. Thermo Electron Corporation. Catalog. 2005

147. Mikecz, K., T. T. Glant, A. R. Poole. 1987. Immunity to cartilage proteoglycans in *BALB/c* mice with progressive polyarthritis and ankylosing spondylitis induced by injection of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum.* 30:306.
148. Miller SD, Vanderlugt CL, Smith-Begolka WS, et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 1997;3:1133-1136
149. Mitchell Kronenberg<sup>1</sup> and Alexander Rudensky<sup>2</sup> Regulation of immunity by self-reactive T cells *Nature* 435, 598-604 (2 June 2005) | doi: 10.1038/nature03725
150. Moerman, D. E. 1994. North American food and drug plants. Pages 166-181 in N. L. Etkin, ed., *Eating on the wild side: the pharmacologic, ecologic, and community of Mexico*. M.S. thesis, Florida International University, Miami, FL)
151. MouseIgGAnti-Type I and Type II Collagen Antibody Assay Kit . Catalog # 1011, 1012, 1013, 1015, 1016, 2031, 2032, 2033, 2035, 2036. *For Research Use Only*. CHONDREX, inc. U.S.A.
152. MT Kane and DR Headon. "The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts" *Journal of Reproduction and Fertility* (1980) 60 469-475
153. MTT cell proliferation assay Instructions, ATCC; Partida 30-1010K
154. Munetaka Ishiyama. A Novel Reagent for Clinical Assays of Dehydrogenases and Their Related Substrates" 1990. *Research section in Dojindo Labs*.
155. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR $\alpha$ 0 thymocytes in vivo. *Science*. 1990;250:1720-1723.
156. Murray, R.K., et al. *Harper's Biochemistry*, 23 ed.: 196. New York; Appleton & Lange, 1994
157. N. A. Mitchison\* and L. R. Wedderburn "Commentary: B cells in autoimmunity" *PNAS* 2000, 97:16, 8750-8751
158. National Genetic Resources Program (ARS, USDA). Germplasm Resources Information Network (GRIN).
159. Native Type II Collagen Detection Kit. Catalog # 6009. *For research use only - not for human or drug use*. CHONDREX, inc. U.S.A.
160. *Nature Immunol* 5:23-30, 2004
161. Ninnemann JL. Immunosuppression following thermal injury through B cell activation of suppressor T cells. *J Trauma*. 1994 Oct;37(4):687.
162. Nishimoto, N. & Kishimoto, T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 386-391 (2004).
163. Nishimoto, N. *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 50, 1761-1769 (2004).
164. Northrup, C. *Women's Bodies, Women's Wisdom*: 305. New York; Bantam Books, 1994
165. Nylon Wool Fiber Columns. Technical Data Sheet 425A. Polysciences, Inc. 1-3
166. Oesser, S. & Seifert, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res*, 2003, 311:393-99.
167. Otten GR, Loken MR., "Two color light scattering identifies physical differences between lymphocyte subpopulations. 1997. *J. Leukocyte Biol* 73: 311-317
168. Otto, J. M., G. Cs-Szabó, J. Gallagher, S. Velins, K. Mikecz, E. I. Buzás, J. T. Enders, Y. Li, B. R. Olsen, T. T. Glant. 1999. Identification of multiple loci linked to inflammation and autoantibody production by a genome scan of a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42:2524.
169. Otto, J. M., R. Chandrasekaran, C. Vermes, K. Mikecz, A. Finnegan, S. E. Rickert, J. T. Enders, T. T. Glant. 2000. A genome scan using a novel genetic cross identifies new susceptibility loci and traits in a mouse model of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 165:5278.
170. Palenzuela, T. & M. Fernández ( 1995 ) " Determinación de taninos condensados hidrolizables y totales en PSP y Tabletas de ACITAN. X Forum de Ciencia y Técnica. LABIOFAM. La Habana, Cuba
171. Panush R. Does food cause or cure arthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 1991;17:259-72

172. Parker R.S., *J Nutr*, 119: 101-4; Jan 1989
173. Patricia Hernández Díaz, Odalys Martín González, Yoryelín Rodríguez de Pablos Vélez y Dr. C. Félix A. Ganem Báez Aplicaciones de las lectinas Rev. Cubana Hemat. Inmunol. Hemoter. 1999; 15(2):91-5
174. Paul Held Ph D. Determination of Horseradish Peroxidase (HRP) Using Amplex Red and the Synergy HT Microplate Reader. 2003 Applications Department. Bio-Tek Instruments. Winooski, VT
175. Pavón (1982).
176. Peltonen, L., R. Halila, and L. Ryhänen (1985) Enzymes converting procollagens to collagens. *J. Cell. Biochem.* 28: 15-21
177. Pereira JR, Bustos RE, Zyngier Z. Some pharmacological properties of the Banana Plant. *Arch Int Pharmacodyn* 1963;144:144-50.
178. Pérez Cornelio, Mirna. 1999. Identificación de lectinas en frutas medicinales, su participación en la Hemaglutinación de la cepa E. coli enterohemorrágica 0157: H7. pp 11-15 (tesis)
179. Peroxidase model systems: *J. Mol. Catal. A.*, 1996, 113, 131.
180. Perron H, Garson JA, Bedin F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7583-7588
181. PHILIP L. KONG, JARED M. ODEGARD. "Intrinsic T Cell Defects in Systemic Autoimmunity" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 987: 60-67 (2003).
182. Poole, A.R. 1993. Cartilage in health and disease. *In Arthritis and Allied Conditions. A Textbook in Rheumatology*, 12th ed. D. McCarthy and W. Koopman, editors. Lea and Febiger, Philadelphia. 279-333
183. Primer Curso Teórico Practico "Bases del Control de Identidad y Calidad de Plantas Medicinales según la Real Farmacopea Española". Universidad Complutense de Madrid- U.M.S.A. Octubre, 2005. La Paz Bolivia.
184. Prockop, D.J., K.I. Kivirikko, L. Tuderman, and N.A. Guzman (1979) The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Eng. J. Med.* 301: 13-23
185. Protocol for the Successful Induction of Collagen-Induced Arthritis (CIA) and Collagen Antibody- Induced Arthritis (CAIA) in Mice. Catalog # 2001 - 2005. *For Research Use Only.* CHONDREX, inc. U.S.A.
186. R. LYONS, S. NARAIN, C. NICHOLS, M. SATOH and W. H. REEVES. "Effective Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis of Systemic Autoimmune Disease" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1050: 217-228 (2005).
187. R.M.Schultz, M.N. Liebman: Proteínas: Composition and structure. En: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Ed. T.M.Devlin, 1992 pág 26-77
188. Ralf M. Zwacka, et al. "CD4<sup>+</sup> T-Lymphocytes Mediate Ischemia/Reperfusion-induced Inflammatory Responses in Mouse Liver" *J. Clin. Invest.* Volume 100, Number 2, July 1997, 279-289
189. Reed, G. ENZYMES IN FOOD PROCESSING. 6 ed. Academic Press. Inglaterra (1999) 573p.p.
190. Remmers, E. F., R. E. Longman, Y. Du, A. O'Hare, G. W. Cannon, M. M. Griffiths, R. L. Wilder. 1996. A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen- induced arthritis in rats. *Nat. Genet.* 14:82
191. Research. ORGAN SPECIFIC AUTOIMMUNITY. Monash University, Au.2004
192. Richard Evans Schultes (1990) en el Catálogo del Museo de Etnobotánica de Córdoba
193. Robineau, L., and D. D. Soejarto. 1996. TRAMIL: a research project on the medicinal plant resources of the Caribbean. Pages 317-325 in M. J. Balick, E. Elisabetsky, and S.A. Laird, eds., *Medicinal re-sources of the tropical forest*. Columbia University
194. Rodríguez R. Efecto de savia de Musa paradisíaca y miel de abejas sobre el tejido hematopoyético y el sistema endocrino. *Boletín Técnico Divulgativo de las Brigadas Técnicas Juveniles*. La Habana: Ediciones UJC, 1985:9.
195. Rodríguez R. Estudio del efecto analgésico de savia de Musa paradisíaca en ratas. *Rev. Cubana de Invest. Biomed.* 1991(esp):137.
196. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988:1125.

197. Ronca, F. et al. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis & Cartilage*, 1998, 6 (Suppl A):14-21.
198. Saez, G.; Alvado, E.; Alvarado, D.; La Torre, M.; Bazán, H. y Castillo, Y. "EFECTO *in Vitro* E *in vivo* DEL LATEX DE *Musa paradisiaca* SOBRE *Trypanosoma cruzi*" 1996. En libro de Resúmenes. XII Congreso Peruano de Biología. Ayacucho, Perú.
199. Sakaguchi, S. (2000). [Cause and etiological mechanism of rheumatic arthritis using animal models]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 23, 497-8.
200. Sardi, B. Restoring youth with hyaluronic acid. *Total Health for Longevity*, 2002, 23(6).
201. Saroj K. Mondal, Bimalendu Ray, Swapnadip Thakur and Pradyot K. Ghosal. "Isolation, purification and some structural features of the mucilaginous exudate from *Musa paradisiaca*" 2001 Elsevier Science. doi:10.1016/S0367-326X(00)00295-1
202. Scott Hegenbart. *Aplicaciones de Emulsificantes* (Abril 1991-Julio 1996)
203. Seetharaman, R., Mora, A. L., Nabozny, G., Boothby M., Chen J. 1999. Essential Role of T Cell NF- $\kappa$ B Activation in Collagen-Induced Arthritis *J. Exp. Med.* 215:1376.
204. Silva, D H. & García, R A. (1995). *Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Instituto de medicina Tradicional del Instituto peruano de seguridad Social.* Iquito -Perú, 281p.).
205. Solecki, R.S. 1975. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial of northern Iraq. *Science* 190:880)
206. SOPHIE HILLION, CAROLINE ROCHAS, PIERRE YOUINOU and CHRISTOPHE JAMIN Expression and Reexpression of Recombination Activating Genes: Relevance to the Development of Autoimmune States *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1050: 10-18 (2005). doi: 10.1196/annals.1313.002
207. Stefan Schulte, Christine Unger, et al., "Arthritis-related B Cell Epitopes in Collagen II Are Conformation-dependent and Sterically Privileged in Accessible Sites of Cartilage Collagen Fibrils" 2000. *J. Immunol.* 292: 488-492
208. Steinman, L. Immune therapy for autoimmune diseases. *Science* 305, 212-216 (2004).
209. Stover, R. H.; Simmonds, N. W. (1987), *Bananas*, Harlow, Longman Scientific & Technical. ISBN 0-582-46357-2
210. Susan M. AITKEN, et al "Mechanism of horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides as peroxidase inhibitors" *Biochem. J.* (2003) 375 (613-621)
211. Svensson, L., J. Jirholt, R. Holmdahl, L. Jansson. 1998. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.* 111:521.
212. T. Shantha Raju, Ramaswamykanive L. Jagadish and Yernool V. Anjaneyalu. "Characterization of EDTA-soluble polysaccharides from the scape of *Musa paradisiaca* (banana)" *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2001) 33, (53-59) *Mysore, India*
213. Takamasa Oono, Yoshinori Fukui, et al. "Organ-specific autoimmunity in mice whose T cell repertoire is shaped by a single antigenic peptide" *J Clin Invest.* 2001 December 1; 108(11): 1589-1596.
214. Taneja, V., C. S. David. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis: regulatory role of HLA class II molecules in animal models of RA: studies on transgenic/knockout mice. *Arthritis Res.* 2:205.
215. Tang, B., L. Myers, K. Whittington, E. Rosloniec, J. Stuart, A. Kang. 1998. Characterization of signal transduction through the TCR zeta chain following T cell stimulation with analog peptides of CII 260-267. *J. Immunol.* 160:3135.
216. Tariq M. Haqqi, Donald D. Anthony, Sanjay Gupta, Nihal Ahmad, M.-S. Lee, Ganesh K. Kumar, and Hasan Mukhtar Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea Vol. 96, Issue 8, 4524-4529, April 13, 1999 Case Western Reserve University, Cleveland.
217. T-Cell Proliferation Grade Type I and Type II Collagen. Catalog # 1051 - 1056, 2021 - 2027. *For Research Use Only. CHONDREX, inc. U.S.A.*
218. Teh H-S, et al. Thymic major histocompatibility complex antigens and the  $\alpha\beta$  T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature.* 1988;335:119-233.
219. Terato, K., Hasty, K. A., Cremer, M. A., Stuart, J. M., Town, A. S., Kang, A. H. Collagen-induced arthritis in mice. Localization of an arthritogenic determinant to a fragment of the type II collagen molecule (1985) *J. Exp. Med.* 162, 637-646

220. Terrazas G., Sánchez L., Carvajal R., “ Estudio *in Vitro* sobre la actividad inmunomoduladora de la savia de Musa paradisíaca SMP. BIOFARBO. Año 6. Vol. V. 73- 79 .1997
221. Terrazas, Katty. “Efectos inmunobiologicos de Musa Paradisiaca sobre el sistema inmunitario, establecimiento de sistemas de cultivo celular primario y medición de la activación, proliferación y funcionalidad celular “. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Bioquímica. SELADIS - U.M.S.A.1993
222. Tetrazolium Salts. *Enzimology* 65:55-64
223. Thomas Kamradt, M.D., and N. Avrion Mitchison, Ph.D. Tolerance and Autoimmunity March 1, 2001 N Engl J Med Volume 344:655-664 Number 9
224. Tijssen P. Production of antibodies. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam, Netherland: Elsevier Science Publishers BV, 1993;15:43-59.
225. Tirado N., Romero L.M., Carvajal R., Antigenotoxic activity of Musa Paradisiaca and C. Draconoides. 1995. Proceedings of the 3º international Congress on Genetics (Abst) p.35, 1994. México.
226. Tivol, E. A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547 (1995).
227. TMB Microwell Peroxidase Substrate System. Catalog No. 50-76-00. KPL, co. Gaithersburg MD • USA
228. TMB Solution for ELISA. Catalog No X1189S. Exalpha Biologicals, Inc. Watertown, MA
229. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
230. Tough DF, Sun S, Sprent J. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* 1997;185:2089-2094.
231. Trease, G. E.; Evans , W. CH. (1996). *Tratado de Farmacognosia*. 14 Ed. Madrid, España. Interamericana. 846 p).
232. Trentham, D. E., Townes, A. S., and Kang, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis (1977) *J. Exp. Med.* 146, 857-867
233. Tsark, E. C., W. Wang, Y. C. Teng, D. Arkfeld, G. R. Dodge, S. Kovats. 2002. Differential MHC class II-mediated presentation of rheumatoid arthritis autoantigens by human dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 169:6625.
234. Ueda, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene *CTLA4* with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423, 506-511 (2003).
235. Van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5117-5120.
236. Vernon C. Maino, Ph.D. Fast Immune Assay Ssystem Becton Dickinson Research. Part 23-3030-00
237. Vingsbo-Lundberg, C., N. Nordquist, P. Olofsson, M. Sundvall, T. Saxne, U. Pettersson, R. Holmdahl. 1998. Genetic control of arthritis onset, severity and chronicity in a model for rheumatoid arthritis in rats. *Nat. Genet.* 20:401
238. Vollmer, T. *et al.* Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363, 1607-1608 (2004).
239. Vyacheslav A. Adarichev, Juan C. Valdez, *et al.* “Combined Autoimmune Models of Arthritis Reveal Shared and Independent Qualitative (Binary) and Quantitative Trait Loci” *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 2283-2292.
240. W. C. Hanly, Ph.D.,*et al.* OVERVIEW OF ADJUVANTS. *BRL Bulletin.* 1994
241. Walter F Galindo, M. Rosales, E. Murgueitio y J. E. Larrahondo. “Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón” *Livestock Research for Rural Development.* Vol. 1, Nº 1, Nov. 1989.  *Cali, Colombia*
242. Wang, Y., J. Kristan, L. Hao, C. S. Lenkoski, Y. Shen, L. A. Matis. 2000. A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 164:4340.

243. Wang, Y., S. A. Rollins, J. A. Madri, L. A. Matis. 1995. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8955
244. Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 270, 985-988 (1995).
245. Weir M. Donald, Handbook of Experimental Immunology, 4<sup>a</sup> ed., 1986, ISBN 3 volume set
246. Weyand, C. M., J. J. Goronzy. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis: HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2:212.
247. Wilder, R. L., M. M. Griffiths, E. F. Remmers, G. W. Cannon, R. R. Caspi, Y. Kawahito, P. S. Gulko, R. E. Longman, S. V. Dracheva, Y. Du, *et al* 1999. Localization in rats of genetic loci regulating susceptibility to experimental erosive arthritis and related autoimmune diseases. *Transplant. Proc.* 31:1585
248. Wilson Susan D., *et all.* Assesment of the Functional Integrity of the Humoral Inmune Response:The Plaque Forming Cell Assay and the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Methods* 19, 3-7; 1999.
249. www.chondrex.com "Native Type II Collagen Detection Kit"
250. Y. Shoenfeld, Tel-Hashomer; K. Conrad, Dresden. "Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity" Report on the 5th Dresden Symposium on Autoantibodies Held in Dresden October, 2000
251. Y.V Anjaneyalu, R.L Jagadish, T Shantha Raju. "Polysaccharide components from the scape of *Musa paradisiaca*: main structural features of water-soluble polysaccharide component" *Glycoconjugate Journal* 14 (4): 507-512, 1997
252. Yang, H.-T., J. Jirholt, L. Svensson, M. Sundvall, L. Jansson, U. Pettersson, R. Holmdahl. 1999. Identification of genes controlling collagen-induced arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat. *J. Immunol.* 163:2916.
253. Yi Wang, Jane Kristan, *et al.* "A Role for Complement in Antibody-Mediated Inflammation: C5-Deficient DBA/1 Mice Are Resistant to Collagen-Induced Arthritis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8563.
254. Youssef, S. *et al.* The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420, 78-84 (2002).