

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO EN DIAGNÓSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD



OPTIMIZACIÓN DEL MTT COMO MÉTODO DE
CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR
DE ESPLENOCITOS MURINOS

(Tesis de Especialidad para la obtención del Grado de Especialidad)

ELABORADO POR:
Lic. LISE AMPARO OPORTO VELASCO
ASESORA:
Msc., PhD. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS

La Paz - Bolivia
2016

DEDICATORIA

A mi amada Familia, quienes con su sola presencia inundan mi vida de alegría...

A mis amados padres Prudencio Mallku e Inés Oporto, por su amor, esfuerzo, comprensión y apoyo infinito.

A mi amado esposo Jorge, quien acompaña mi vida y apoya todos mis proyectos.

A mis hijitos Jorge y Leonardo quienes son mi motivo y mi motor diario.

A mi amada familia; Néstor, Otilia, Lilian, Lui, Alejandra, Chacho y Mili por permanecer a mi lado a cada momento.

A mis bellos niños; Agustina, Matías y Fabricio, quienes alegran y refrescan mis días con su alegría.

Y una dedicación especial a mi mentora y guía la Dra. Jacqueline Calla por todo su apoyo, confianza, paciencia, dedicación y por ser un ejemplo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por cada instante de vida que me das y por toda la felicidad, salud y amor que tengo en mis manos.

Gracias a mi amada familia por todo el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi asesora la Dra Jacqueline Calla a quien admiro profundamente por su calidad humana y por ser un ejemplo profesional.

Al Dr. Teddy Quispe por todo su tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por motivar la conclusión del mismo.

A la Dra. Gladys Pérez por su tiempo, su apoyo y sus consejos.

A la Dra. Karina Delgado por su apoyo, tiempo y principalmente por su amistad.

A mis amigas Jenny, Magui, Olguita y Raquel, por su amistad, motivación; por su apoyo para culminar el presente trabajo y por ser un ejemplo de superación en mi carrera.

Y un agradecimiento especial al Instituto SELADIS y a todos los docentes del mismo, por haberme permitido reforzar mi formación académica y de quienes me llevo sus enseñanzas y su cariño.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
I. INTRODUCCION.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
1. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES DE INTERÉS.....	3
1.1 MONOCITOS Y MACRÓFAGOS.....	3
1.2 LINFOCITOS	4
1.2.1 LINFOCITOS B.....	5
1.2.2 LINFOCITOS T.....	5
1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	7
2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE EXPERIMENTACIÓN	7
2.1 ESTRUCTURA DEL BAZO	8
2.2 CONCEPTOS DE CULTIVO CELULAR	9
2.3 REQUERIMIENTOS DEL CRECIMIENTO CELULAR	10
2.3.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES.....	10
2.3.1.1 MEDIOS DE CULTIVO	10
2.3.1.2 SUERO	10
3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	11
4. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LINFOCITOS.....	11
5. ESTUDIOS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	14
6. ESTUDIOS DE PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS Y CAMBIOS DE FENOTIPO.....	14
7. INDUCCIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	15

7.1 CONCANAVALINA A (Con A).....	17
7.2 LIPOPOLISACÁRIDO (LPS).....	18
8. EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR POR EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL MTT.....	18
9. EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA (GALIPEA LONGIFLORA).....	21
9.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA.....	21
9.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	22
9.2.1 EXTRACCIÓN CONTINUA.....	22
9.2.2 MACERACIÓN.....	22
9.2.3 OBTENCIÓN DE ALCALOIDES TOTALES.....	22
9.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LA CORTEZA.....	22
9.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LAS HOJAS.....	23
10. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IFN-γ).....	23
III. ANTECEDENTES	25
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
V. JUSTIFICACIÓN.....	30
VI. OBJETIVOS.....	31
1. OBJETIVO GENERAL	31
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	32
1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	32
2. DESCRIPCIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA	32
3. CONTEXTO Y LUGAR	32
4. ASPECTOS ÉTICOS	32
VIII. DISEÑO DEL ESTUDIO	33
IX. MATERIAL Y MÉTODOS	34

1. MATERIALES	34
2. REACTIVOS.....	34
3. EQUIPOS	35
4. PROCEDIMIENTOS	35
4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	35
4.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS ESPLÉNICAS	36
4.2.1. PROCEDIMIENTO	36
4.3 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	37
4.3.1 PROCEDIMIENTO	37
4.4 AJUSTE CELULAR	38
4.4.1 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR ÓPTIMA PARA EXPERIMENTACIÓN	39
4.5 ENSAYO DE PROLIFERACION	40
4.6 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR POR EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL MTT (C₁₈H₁₆N₅SBR)	41
4.6.1 PROCEDIMIENTO	41
4.7 EVALUCACIÓN DEL EXTRACTO DE EVANTA SOBRE LOS ESPLENOCITOS MURINOS.....	42
4.8 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IFN-γ) EN ESPLENOCITOS MURINOS TRATADOS CON EAE	43
4.8.1 PROCEDIMIENTO	44
X. RESULTADOS	47
1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN ESPLENOCITOS MURINOS TRATADOS CON CANAVALINA A (ConA) Y LIPOPOLISACÁRIDO (LPS).....	47
2. EFECTO DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA SOBRE LA PROLIFERACION DE ESPLENOCITOS MURINOS	50

3. EVALUACIÓN DE EAE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMA (IFN- γ).....	52
XI.DISCUSIÓN.....	56
XII. CONCLUSIONES	59
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
XIV. ANEXOS.....	64
ANEXO 1.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Células Inmunocompetentes. Inmunidad Innata y adaptativa.....	3
Figura 2. Tipos de linfocitos.....	4
Figura 3. Sección y estructura del Bazo	9
Figura 4. Esquema de la estimulación blástica o blastogénesis.....	13
Figura 5. Reducción mitocondrial del MTT a formazán (compuesto azulado).....	20
Figura 6. Estructura química de las diferentes sales de tetrazóleo	20
Figura 7. <i>Galipea longiflora</i> (Rutaceae) evanta	21
Figura 8. Selección de animales de experimentación	35
Figura 9. Disección del ratón y extirpación del bazo.....	37
Figura 10. Cálculo para ajuste celular. Cámara de Neubauer y retículos para conteo y celular.....	38
Figura 11 Esquema de reacción del ELISA sandwich para la cuantificación de IFN-γ de Ratón.....	44
Figura 12 Esplenocitos Murinos, observación al microscopio invertido 20X. Laboratorio de Inmunología - SELADIS 2007	47
Figura 13. Evaluación de la Proliferación de esplenocitos murinos tratados con Concanavalina A (Con A) a las 48 Hrs. de cultivo.....	48
Figura 14. Evaluación de la Proliferación de esplenocitos murinos tratados con Lipopolisacárido (LPS) a las 48 Hrs. de cultivo.....	49
Figura 15. Inhibición dosis-dependiente del EAE sobre la proliferación inducida por Con A en esplenocitos murinos para una concentración de 1×10^7 cels/m ...	50

Figura 16. Inhibición dosis-dependiente del EAE sobre la proliferación inducida por Con A en esplenocitos murinos, para una concentración de 2×10^7 cels/mL	51
Figura 17. Curva para cuantificación de IFN-γ realizada mediante la titulación del estándar de Interferón gamma recombinante de ratón - 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (BD Pharmingen).....	52
Figura18. Evaluación del EAE sobre la producción de IFN-γ inducido por Con A. Los esplenocitos murinos a una concentración 1×10^7 cels/mL fueron sembrados pretratados con Con A y posteriormente con varias concentraciones de EAE.....	53
Figura19. Evaluación del EAE sobre la producción de IFN-γ inducido por Con A. Los esplenocitos murinos a una concentración 2×10^7 cels/mL fueron sembrados pretratados con Con A y posteriormente con varias concentraciones de EAE.....	54

RESUMEN

La inmunidad de tipo celular constituye un mecanismo fundamental para la defensa del organismo. Esta respuesta, mediada por linfocitos T, es esencial para la protección contra patógenos intracelulares, como por ejemplo infecciones por parásitos intracelulares como es el caso de la leishmaniasis, toxoplasmosis, etc. Es por eso que se han desarrollado pruebas inmunológicas que permiten evaluar su funcionalidad, siendo la proliferación de linfocitos *in vitro* inducida por mitógenos, una prueba ampliamente utilizada.

En la actualidad en nuestro medio, el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB), de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), forma parte de un equipo multidisciplinario internacional que está llevando adelante estudios sobre la eficacia de formulaciones farmacéuticas a base de los principios activos de Evanta, frente a la leishmaniasis cutánea y continua en sus trabajos de investigación junto con el Instituto SELADIS (Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas-UMSA) sobre nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis a partir de extractos vegetales.

En el presente trabajo se optimizó el método del MTT para evaluación del efecto del Extracto de Alcaloides de Evanta (EAE) sobre la proliferación inducida por Lipopolisacárido (LPS) y Concanavalina A (Con A) en sistemas de cultivo celular primario (esplenocitos murinos) y a la vez se evaluó el efecto sobre la producción de interferón gamma detectable en los sobrenadantes de los cultivos inducidos con Concanavalina A.

Se obtuvieron curvas de proliferación celular similares al inducir la proliferación con Con A y LPS, logrando determinar una concentración celular óptima para las pruebas siguientes, basándonos en la proliferación observada con controles de crecimiento sin mitógenos y con Tamoxifén como control de inhibición de proliferación.

Al someter las células a distintas concentraciones del Extracto de Alcaloides de Evanta (EAE) se observó un efecto dosis-dependiente con una reducción de la

proliferación celular de 35 % para una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de evanta. Las células respondieron menos a la estimulación de Con A, comparados con el control no tratado y con el control de inhibición de la proliferación (tamoxifén). Los porcentajes de inhibición del crecimiento celular obtenidos fueron de 16%, 35% y 78% a concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. La inhibición de la producción de IFN- γ en los cultivos de esplenocitos murinos inducidos con Con A, es notable a partir de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estando más marcada a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se logró optimizar la técnica del MTT como método de cuantificación de proliferación celular en esplenocitos murinos, lo que nos permitió identificar la concentración celular óptima recomendable para los siguientes experimentos. Observamos un efecto inhibitorio de la proliferación (Porcentaje de inhibición = 35% para 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) proporcional a la concentración del EAE, por lo que podemos decir que afecta la funcionalidad celular a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por lo tanto los resultados muestran un efecto específico inhibitorio del EAE sobre células T, afectando principalmente su funcionalidad; hecho evidenciado con el porcentaje de inhibición alto en cultivos inducidos por Con A y sobre la producción de Interferón gamma (INF- γ).

I. INTRODUCCIÓN

La proliferación celular es una respuesta crucial de la respuesta inmune para poder hacer frente a las agresiones externas, aunque en algunos casos esta misma reacción puede ser adversa para el organismo.

Con fines de investigación siempre es requerido disponer de métodos confiables y accesibles que puedan evaluar la respuesta inmune a distintos niveles y poderlos aplicar en diferentes tipos celulares, permitiendo de esta manera una adecuada evaluación del efecto como pruebas piloto. (3,4)

En el presente trabajo, planteamos utilizar herramientas fiables para evaluar la respuesta inmune, por lo que realizamos pruebas con esplenocitos murinos ya que estos son los más estudiados hasta el momento cuando se trata de evaluación de la respuesta inmune celular en varios tipos de enfermedades. Estas células serán estudiadas induciendo (mediante el uso de mitógenos como la Concanavalina A y el lipopolisacárido) su proliferación celular y evaluándola a través del método del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazóleo).

Dentro el marco del Proyecto Enfermedades infecciosas, es necesario conocer los efectos *in vitro* del EAE y así evaluar sus efectos sobre la respuesta inmune a diversos niveles. Por estudios previos sabemos que tienen actividad antiparasitaria contra leishmania y a la vez tiene efectos sobre algunos componentes de la respuesta inmune. (1,2)

Se incorporó también la evaluación de la producción de IFN- γ mediante la técnica del ELISA evaluando de esta manera el efecto del EAE sobre los linfocitos.

II. MARCO TEÓRICO

La acción del sistema inmune es posible gracias a la participación e interrelación de diferentes poblaciones celulares, conocidas como células inmunocompetentes. Estas células son fundamentalmente los linfocitos T y B, las células NK, células dendríticas, macrófagos y polimorfonucleares. Las células inmunocompetentes se encuentran distribuidas por todo el organismo, como epitelios y mucosas, pero su concentración máxima está en los ganglios linfáticos y bazo. En estos tejidos se dan las condiciones óptimas para su estimulación antigénica gracias a que a ellos afluyen con facilidad las sustancias extrañas (antígenos) a través de los vasos linfáticos y es posible la interrelación celular óptima para que se pueda iniciar y desarrollar la respuesta inmune. (5-7,10)

La respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* inicia con la respuesta innata. Los receptores TLR2 (Toll-like receptor 2), presentes en macrófagos, células dendríticas (CD) y células asesinas naturales (NK) reconocen moléculas en la superficie del parásito, tales como el lipofosfoglicano (LPG) y una glicoproteína de 63kDa (gp36) e inducen la producción de citocinas proinflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), IFN- γ e Interleucina 12 (IL-12), así como de moléculas coestimuladoras. (8,9,11)

El macrófago cubre un papel triple en la enfermedad: es la célula hospedera, célula presentadora de antígenos que activan las células T específicas, y célula efectora cuya eficacia leishmanicida depende de la activación por parte de las citocinas IFN- γ y TNF- α . (11,13,18)

La respuesta principal a la leishmaniasis es de tipo celular. El progreso de la infección, demostrado en el modelo *Leishmania*-ratón, depende de la dicotomía en el desarrollo de las células T CD4+ hacia las vías Th1 (protección) o Th2 (exacerbación). La IL-12 induce la expansión de clones Th1, con la elaboración de diferentes perfiles de citocinas, como IFN- γ y TNF- α , que inducen la producción de óxido nítrico (NO) en el macrófago. IL-4 e IL-10 determinan la diferenciación hacia clones Th2 (activación policlonal de células B), y la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y Factor de Crecimiento Tumoral beta (TGF- β). (12,14,15)

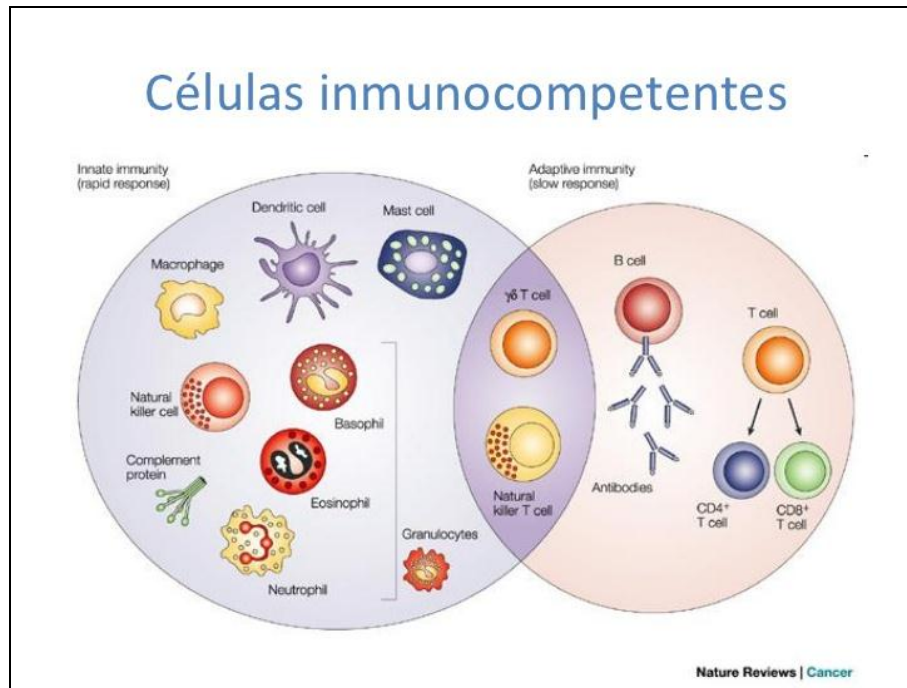


Fig. 1 Células Inmunocompetentes. Inmunidad Innata y adaptativa.

Fuente: Mauricio Quezada, Nature Reviews, 2011.

4. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES DE INTERÉS

4.1 MONOCITOS Y MACRÓFAGOS

Con el término de monocitos se engloban a las células con características y funciones similares, presentes en la sangre y también distribuidas en varios lugares del organismo. Los monocitos son células grandes con un solo núcleo, un aparato de golgi muy desarrollado, gran cantidad de lisosomas y muy ricos en enzimas de diferentes tipos, entre los que destacan proteasas, peroxidasa y lipasas. Cuando los monocitos se encuentran en los tejidos, sufren ciertas modificaciones ligeras y se le conoce como macrófagos.^(5,6,7) Tanto los monocitos como los macrófagos poseen, además de la capacidad fagocítica ya indicada, capacidad de adherencia a los tejidos, al vidrio y al plástico, así como una gran movilidad en estas superficies (quimiotaxis). Los macrófagos tienen una vida media de varios meses. Poseen también gran actividad metabólica, sobre todo en lo que se refiere a síntesis de proteínas, incluso cuando se encuentran en reposo.^(16,17)

La función principal de los macrófagos es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo como las bacterias y sustancias de desecho de los tejidos así como en ciertas circunstancias actuar como célula presentadora de antígenos y la de producir las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 cuando son activados adecuadamente. (12,13)

Tanto los monocitos como los macrófagos proceden de un precursor común, la CFU-GM o unidad formadora de colonias granulocítico-macrofágicas, de la médula ósea. En una primera instancia aparecen como monocitos circulantes durante un período corto de tiempo caracterizándose entonces por la expresar CD14, para después instalarse en diferentes tejidos y diferenciarse a macrófagos. Dependiendo del tejido donde se ubiquen tienen un nombre distinto. (18)

4.2 LINFOCITOS

Los linfocitos son células que poseen un núcleo muy voluminoso y en el organismo sufren un proceso muy complejo de maduración, bien en el timo o bien en médula ósea en humanos o en la bolsa de Fabricio en las aves. Debido a ello se los clasificó en linfocitos B y linfocitos T, porque originariamente se vio que maduraba en la bolsa de Fabricio y timo respectivamente de las aves. También se ha visto que en los mamíferos los linfocitos B maduran en la propia médula ósea. (10)

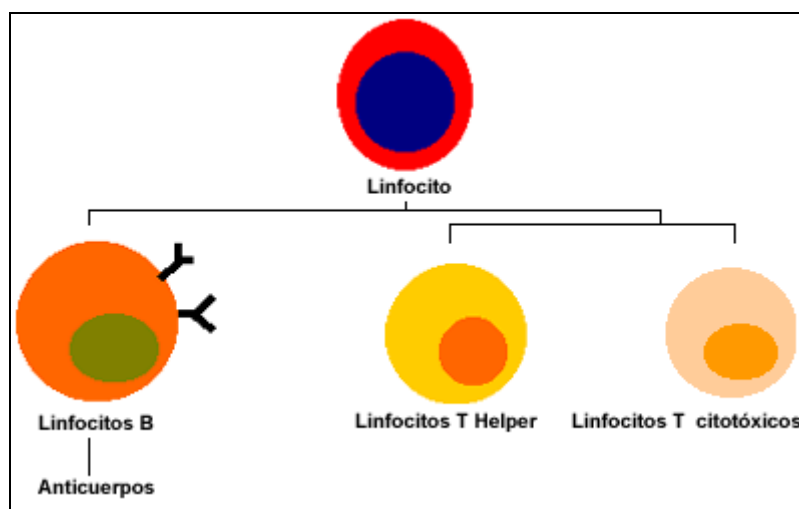


Fig. 2 Tipos de linfocitos

Fuente: <http://inmunidadgabri.blogia.com>

1.2.1 LINFOCITOS B

Morfológicamente los linfocitos B son indistinguibles de los linfocitos T, sin embargo existen enormes diferencias de tipo molecular que justifican su distinta función. Como se ha dicho antes, en los mamíferos el proceso de diferenciación de los linfocitos B se realiza en la médula ósea y es independiente de todo estímulo antigénico y se regula por factores presentes en el microambiente de los órganos linfoides primarios. Fenotípicamente los linfocitos B se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas en su membrana, el marcador CD19 además de los marcadores de membrana CD35, MHC II y CD21. La molécula CD21 puede actuar como receptor del virus Epstein-Barr (EBV); precisamente el tratamiento de linfocitos con EBV es el procedimiento de elección para la preparación de líneas celulares de tipo B. (19)

Cuando los linfocitos B se activan se transforman en células memoria y en células plasmáticas. Éstas son células más grandes que los linfocitos, muy ricas en retículo endoplásmico, y especializadas en la síntesis y secreción de grandes cantidades de inmunoglobulinas. (19)

1.2.2 LINFOCITOS T

Los linfocitos T se caracterizan por poseer receptores específicos para los antígenos, denominados receptores de células T o TCR (con cadenas $\alpha\beta$) los cuales reconocen péptidos antigénicos unidos a proteínas codificadas por los genes del MHC. Fenotípicamente se caracterizan por expresar la molécula CD3 asociada al TCR además de otros marcadores de membrana como CD2 y CD7. Los linfocitos T son los responsables de la respuesta inmune celular, jugando un papel fundamental en controlar y desarrollar la respuesta inmune adquirida mediante la producción de citocinas solubles y el desarrollo de linfocitos T citotóxicos (Tc) con una actividad lítica importante de células infectadas por virus o células tumorales. (10,14)

Los linfocitos T maduran en el timo, durante dicho proceso, los timocitos adquieren una serie de moléculas nuevas en su superficie que después tendrán aspectos funcionales de relevancia. En el proceso de diferenciación de timocitos a linfocitos maduros se destruyen un gran número de células (aproximadamente el 97% de

los timocitos), que son precisamente aquellas que presenta mayor capacidad autorreactiva. Esto se lleva a cabo por un proceso de selección tímica que se realiza en dos fases y está condicionado por el grado de afinidad del TCR con las moléculas del MHC de las células epiteliales del timo. Los linfocitos T son una población celular muy heterogénea formada por diferentes tipos de células y representan alrededor de 40-60% de los linfocitos periféricos. (15)

Hay cuatro tipos de linfocitos T funcionalmente diferentes:

- Linfocitos T de colaboración (Th). Se caracterizan por su capacidad de producir citocinas. En consecuencia participan en la iniciación y el desarrollo de la respuesta inmune. Pueden ser de dos tipos Th1 y Th2. El tipo Th1 promueve la respuesta celular (IFN- γ , IL-2 e IL-12). El tipo Th2 promueven la respuesta humoral, (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Fenotípicamente son CD3+ y CD4+ y reconocen MHC de tipo II.
- Linfocitos T citotóxicas (Tc): Principales responsables de la citotoxicidad de la respuesta inmune celular. Destruyen células infectadas por virus y células tumorales. Fenotípicamente son CD3 + y CD8+, reconocen MHC de tipo I. También se les conoce como CTLs. (18)
- Linfocitos T reguladoras (Tr): Su función principal es terminar la inmunidad mediada por células T y suprimir las células T autoreactivas. Pueden ser de varios tipos, siendo las más comunes CD4+, CD25+ FoxP3+. Estas células presentan una potente acción reguladora de la respuesta Inmune y tienen gran relevancia en los procesos de tolerancia y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. (20)
- Los linfocitos tratados hasta el momento son aquellos que poseen como TCR las cadenas α y β , pero sin embargo existe otra población minoritaria de Linfocitos T que poseen como TCR las cadenas $\gamma\delta$ (Gamma, Delta). Estos son conocidos como linfocitos gd que se piensa que tienen una función importante en el reconocimiento de los antígenos lipídicos y se pueden encontrar en abundancia en la mucosa del intestino. (21)

1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígenos (APCs) más potentes. Comprenden una serie de leucocitos que está ampliamente distribuido por todos los tejidos especialmente en aquellos que están situados en la interfase de distintos medios. Las células dendríticas derivan de progenitores de la médula ósea y circulan por la sangre como precursores inmaduros hasta que migran a los tejidos donde maduran y se diferencian activándose, capturando y presentando antígenos mediante moléculas MHC. Con una adecuada estimulación migran a los tejidos linfoides secundarios donde presentan los antígenos a las células T e inducen una respuesta inmune.

Las CD se dividen en dos tipos según su origen: DC mieloides (CD11+, CD123+ CD33+) provocan respuestas T de tipo Th1 y requieren GM-CSF para sobrevivir; las CD del plasma (CD11+, CD123+) inducen respuestas T de tipo Th2 y al contrario que las mieloides requieren IL-3 para sobrevivir. Las CD regulan los mecanismos involucrados tanto en la respuesta innata como en la adquirida por lo que son foco de interés debido a su papel clave en las respuestas anti-cáncer, anti-virus de ahí su uso potencial en el desarrollo de vacunas así como por su participación en los mecanismos tanto de tolerancia inmunológica como en el desarrollo de enfermedades por autoinmunidad. (22)

5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE EXPERIMENTACIÓN.

Los modelos experimentales en particular el modelo murino, ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de la respuesta inmune como también en el estudio del potencial inmunotóxico de fármacos, especialidad hoy en día conocida como inmunotoxicología. La caracterización de los componentes, su función, sus interacciones y sus mecanismos efectores, es fundamental al momento de estudiar la capacidad inmunomoduladora de cualquier molécula. Dentro de los elementos celulares responsables de la función efectora adaptativa y asociados con buena parte de los efectos adversos que sobre el sistema inmune pueden inducir los fármacos están los linfocitos T cooperadores, los linfocitos T citotóxicos

y los linfocitos B, al igual que los monocitos, los cuales pueden ser monitoreados respectivamente. (15,21,22)

Por lo tanto dentro de los modelos animales el más estudiado por las ventajas que ofrece es el murino, siendo más accesible la obtención de células esplénicas ya que entre ellas tenemos una gran gama de células participantes en la Respuesta inmune, y un alto porcentaje de células mononucleares. (10,13)

2.1 ESTRUCTURA DEL BAZO.

En general, en la estructura del bazo podemos distinguir la pulpa blanca, constituida por tejido linfoideo, repartido en: un tejido más denso alrededor de las arteriolas, llamado vaina linfoide periarteriolar (PALS), que constituye la zona T del bazo; por fuera del PALS, una zona más difusa llamada zona marginal, rica en linfocitos B y macrófagos. La pulpa roja es una red de sinusoides venosos que contienen macrófagos residentes especializados (macrófagos de los senos esplénicos), que se encargan de destruir eritrocitos y plaquetas viejas (proceso de hematocatóresis).

Este órgano linfoideo secundario está especializado en capturar antígenos transportados por la sangre. En la zona T del bazo (PALS) las células dendríticas interdigitantes captan y procesan el antígeno, presentándolo en sus MHC de clase II a los TH en reposo, activándolos. A su vez, los TH activados activan a las células B, las cuales, junto con algunos linfocitos T migran a la zona marginal, convirtiendo los folículos linfoides primarios en folículos secundarios, con sus centros germinales poblados de centroblastos en multiplicación. Por tanto en su estructura contiene células mononucleares; células T(50%), células B(40%), células NK (10%) y además células reticulares dendríticas y macrófagos fagocíticos. (20)

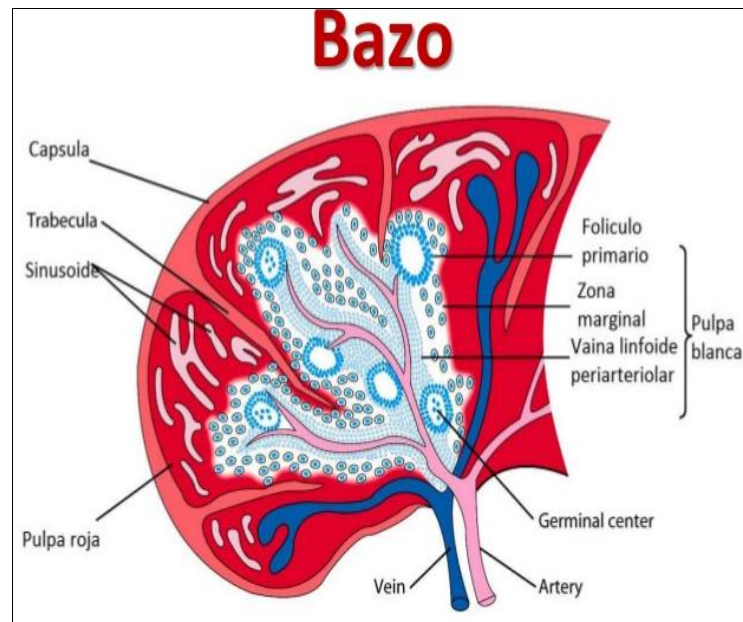


Fig. 3. Sección y estructura del Bazo

Fuente: <http://image.slidesharecdn.com/histologadelsistemaimune>

2.2 CONCEPTOS DE CULTIVO CELULAR.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios, etc. Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular. (2,3,16,17,23,)

- Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ej. Transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, etc. (25)

- Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ej. Ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del RNA: núcleo-citoplasma, movimiento de proteínas.

- Ecología celular. Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación, como por ej. Estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular.

- Interacciones celulares. Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

(2,3,32,33)

2.3 REQUERIMIENTOS DEL CRECIMIENTO CELULAR

2.3.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

2.3.1.1 MEDIOS DE CULTIVO: composición de nutrientes esenciales balanceados cuantitativamente.

Aminoácidos: síntesis de proteínas y ácidos nucleicos

Hidratos de carbono: fuente de energía

Iones inorgánicos,

Vitaminas, etc.

2.3.1.2 SUERO: composición no cuantitativa de diferentes componentes con actividad promotora del crecimiento celular.

Requerimientos fisiológicos

- Temperatura (generalmente 37° C)
- pH óptimo (generalmente 7.2-7.4)
- CO₂ (generalmente 5%)
- Presión osmótica
- Humedad cercana a saturación

Tipos de medio de cultivo

Definidos (sin suero): compuesto por elementos cuya composición química y concentración están perfectamente determinados. Medio solo o con agregados de formulaciones especiales:

Ejemplos:

- MEM: medio esencial mínimo, 27 factores esenciales para el crecimiento celular.
- DMEM: medio esencial mínimo modificado.
- HamF12: MEM + albúmina, transferrina, insulina y piruvato de sodio.

No definidos (con suero o hidrolizados proteicos): tienen componentes cuya composición química y concentración no están determinados.

Ejemplos:

- Medios de mantenimiento: células con metabolismo basal (MEM + 2% de suero)
- Medios de crecimiento: activación del ciclo celular (MEM + 10% de suero)

(32,33)

3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos mediante dos principios:

- 1) La incorporación y retención, por parte de las células viables, de colorantes fluorescentes como la diacetil fluoresceína, la eosina o de isótopos radiactivos como el Cromo ⁵¹.
- 2) La exclusión por células vivas de colorantes vitales como el azul tripán, la eritrosina o la nigrosina; método basado en la propiedad de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática. La pérdida de esta propiedad por parte de las células muertas permite la difusión del colorante al citoplasma, así las células muertas son fácilmente diferenciables de las vivas, ya que al mantener la integridad funcional de sus membranas, al microscopio permanecen incoloras, translúcidas y refringentes. (2,3)

4. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LINFOCITOS

Los estudios *in vitro* de los linfocitos, se realizan sobre células aisladas ó cultivos celulares, produciendo su activación y analizando los fenómenos que se producen tras ésta. La activación de los linfocitos T se la esquematiza a través del TCR-CD3 y de la señal coestimuladora CD28.

La activación del TCR con el antígeno y de las moléculas coestimuladoras con sus ligandos en la célula presentadora (CD4/HLA-II, CD28/B7, CD2/LFA-3) activa una serie de señales intracelulares que desencadenan la producción intracelular de moléculas intermedias como proteínas fosforiladas, fosfolípidos (Mioinositol trifosfato, IP_3 y Diacetilglicerol, DAG) y calcio. Estos metabolitos intermedios activan a nuevas enzimas como la calcineurina (calcio), la proteína quinasa C (DAG), las enzimas de la cascada de la MAP-Cinasa (Protein cinasa activada por mitógenos) o la Jun-cinasa que inician la síntesis y activación de los factores de transcripción. Los factores de transcripción producidos (Fos, Jun, factor nuclear de células T activadas o NFAT, NF- κ B) desencadenan la transcripción de los genes de IL-2 y otras citocinas. La activación de linfocitos B es muy similar, salvo en la fase de inicio de la señal ya que en lugar del TCR, posee la inmunoglobulina de superficie, sus señales coestimuladoras son distintas (por ejemplo, el C3d del complemento), en lugar de la lck son más importantes otras cinasas de la misma familia (fyn, Lyn y Blk) y carece de ZAP-70 que es sustituida por Syk. (7)

Todos los estudios se basan en activar a los linfocitos y analizar posteriormente los cambios producidos tras la activación. Para activar los linfocitos se emplean distintos estímulos que pueden actuar a dos niveles, utilizando las rutas fisiológicas de activación actuando sobre moléculas de la membrana celular o activando directamente las vías metabólicas intracitoplásmicas. Una combinación adecuada de estas señales permite la exploración de todos los eventos de la activación y la localización del defecto. Entre los fenómenos observables que se producen tras la activación destacan la proliferación celular o transformación blástica, cambios en los marcadores de la membrana celular, secreción de citocinas y otras moléculas, cambios en los metabolitos intracelulares y realización de una función efectora. (26,27)

ACTIVADORES DE LOS LINFOCITOS: Los más importantes son:

- Activadores policlonales o mitógenos como las lectinas vegetales.
- Anticuerpos Monoclonales dirigidos contra receptores de membrana.

- Antígenos de recuerdo como PPD, *Cándida*, Estreptocinasa, tétanos o difteria.
- Células halogénicas como el cultivo mixto con linfocitos de donante con distinto HLA.
- Interleucinas.

A medida que se descubren otros metabolitos intermedios es posible conseguir análogos que actúen como activadores intracitoplásmicos y permiten mapear otras vías. (4,19,34)

La estimulación blástica o blastogénesis es actualmente una de las técnicas más precisas y difundidas para el estudio de la capacidad de estimulación específica y no específica de los linfocitos *in vitro*. Esta técnica se basa en la capacidad que los linfocitos tienen para responder frente a un antígeno (respuesta específica) que por vacunación o por sufrir una infección, ha inducido linfocitos memoria. Estos linfocitos al estar de nuevo en contacto con el antígeno inducen una transformación blástica. Esta estimulación blástica también puede ser inducida de forma no específica gracias a la capacidad de los linfocitos de reaccionar con diferentes tipos de lectinas o mitógenos. Las lectinas inducen una estimulación blástica de tipo inespecífico tanto en los linfocitos B como en los T.

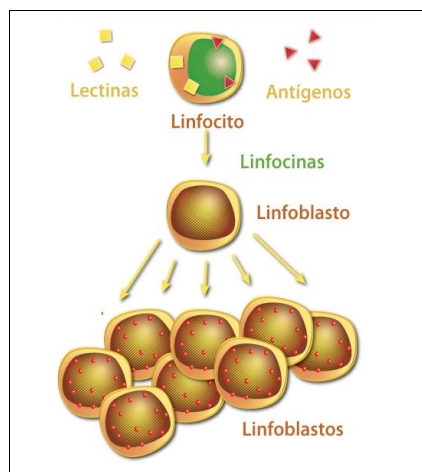


Fig. 4. Esquema de la estimulación blástica o blastogénesis.

Fuente: http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/images/imagen_024_350.png

5. ESTUDIOS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La activación de un linfocito *in vitro* lleva, en la mayoría de los casos a la transformación blástica del linfocito y a la proliferación celular. Esta última podría estudiarse examinando microscópicamente las células para ver su transformación (test de transformación linfocitaria) y contando las células antes y después del estímulo. Esta técnica es muy laboriosa y en la práctica se prefiere demostrar el aumento en la síntesis de ADN tras el estímulo. Para demostrar la síntesis de ADN pueden emplearse dos técnicas; la citometría de flujo, utilizando un marcador fluorescente para ADN, o la incorporación de timidina tritiada, método en el cual los linfocitos estimulados se incuban con timidina (un precursor de la síntesis del ADN) marcada con tritio (H3). La cantidad de timidina que se incorpora a las células es proporcional a la síntesis de ADN. Para cuantificarla se utiliza un contador de centelleo que expresa los resultados en CPM (Cuentas Por Minuto). El resultado se compara con cultivos control que no han sido estimulados. Los resultados pueden también expresarse por medio del índice de estimulación que es igual a CPM de cultivos estimulados dividido por CPM de cultivos control. En estos estudios son importantes las curvas dosis-respuesta (proliferación en respuesta a distintas concentraciones del mitógeno) y tiempo-respuesta (proliferación a lo largo de los días de cultivo).

Los ensayos de proliferación pueden tener gran variabilidad, ya que están influenciados por distintos factores como edad y características étnicas, abuso de alcohol y drogas, algunos fármacos, situaciones de stress y aflicción, forma de preparación de la muestra (concentración de células, dosis del estimulante, etc.), influencias reguladoras del propio cultivo (por ejemplo linfocitos T supresores), etc. Los estudios de proliferación se emplean sobre todo para linfocitos T. (1-4,23,34)

6. ESTUDIOS DE PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS Y CAMBIOS DE FENOTIPO

Tras su activación los linfocitos producen sustancias bioactivas y pueden cambiar de fenotipo, lo cual se manifiesta por cambios en los marcadores de membrana apareciendo unos y desapareciendo otros:

- Cambios en los linfocitos T: para los linfocitos T, la sustancia más importante producida tras la activación es la IL-2, aunque también pueden medirse otras citocinas como la IL-4 o el IFN- γ . Para medir estas sustancias en los sobrenadantes de los cultivos se utilizan técnicas de ELISA o ensayos biológicos (por ejemplo capacidad del sobrenadante para hacer proliferar otras células dependientes de IL-2). La activación también produce cambios en los marcadores de membrana. El más importante es un aumento de la expresión del receptor de IL-2 que puede detectarse incubando las células con AcMo anti-IL-2R y analizándolas posteriormente por citometría de flujo. En condiciones normales, sólo el 2% de los linfocitos T expresan el receptor, pero se eleva al 40-75% tras la estimulación.
- Cambio en los linfocitos B: en el caso de los linfocitos B, las sustancias más importantes producidas tras su activación son las inmunoglobulinas. La presencia de inmunoglobulinas en los sobrenadantes de los cultivos se detecta por técnicas directas inmunoenzimáticas o técnicas indirectas (ensayos biológicos) como su capacidad para producir en presencia de complemento, la hemólisis de hematíes de un determinado antígeno. Un ejemplo de cambio de fenotipo es la modificación del isotipo de inmunoglobulinas de superficie.
Si esta cambia de IgM a IgG tras la activación, indica que se ha experimentado el *switch* y se han producido linfocitos B de memoria. (7)

7. INDUCCIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La inmunidad de tipo celular constituye un mecanismo fundamental para la defensa del organismo. Esta respuesta, mediada por linfocitos T, es esencial para la protección contra patógenos intracelulares.

Debido a la importancia que tiene la acción de los linfocitos T en la defensa del organismo, se han desarrollado pruebas inmunológicas que permiten evaluar su funcionalidad. (1,24)

Mitógenos se denomina a aquellos agentes capaces de inducir la proliferación de una gran cantidad de clones de linfocitos T y/o B, de modo inespecífico, debido a

esto se los conoce como activadores policlonales. Las lectinas o lecitinas son las más empleadas; estas conllevan la aglutinación de células y activación policlonal de células T, B, o ambas, un ejemplo de ellas es la concanavalina A “ConA”, fitohemaglutinina “PHA”, mitógeno de fitolaca “PWM” y lipopolisacáridos “LPS” de bacterias gram negativas cuya actividad como mitógeno reside en la porción de lípido A. (33)

Las lectinas mitógenas son sustancias derivadas de plantas y bacterias que se unen, formando enlaces cruzados, con residuos hidrocarbonados específicos de Rc de superficie de linfocitos.

Algunas lectinas son:

- Fitohemaglutinina , concavalamina A: mitógenos de células T.
- Mitógeno de fitolaca o mitógeno pokeweed: mitógenos de células T y B
- Lipopolisacárido: mitógeno de células B

La proliferación de linfocitos *in vitro* inducida por mitógenos es la prueba más ampliamente utilizada en laboratorio. Se basa en que estas lectinas, como la Concanavalina A, se unen a residuos hidrocarbonados de glucoproteínas de superficie de los linfocitos T, estimulando su proliferación policlonal. (23,24)

Esta técnica constituye una herramienta para el diagnóstico de las inmunodeficiencias de tipo celular, tanto primarias como secundarias. En inmunología clínica experimental, resulta de gran utilidad para el estudio del efecto que los fármacos, productos biológicos (vacunas, inmunomoduladores) y agentes patógenos provocan sobre la respuesta inmune celular. (15,25)

El método tradicional para la prueba de linfoproliferación utiliza linfocitos purificados por gradiente de centrifugación como fuente de células para el cultivo y la captación de timidina tritiada como método de medición de la proliferación. Se fundamenta en que las células en proceso proliferativo inducido por el mitógeno, incorporan la timidina marcada radioactivamente con tritio (3H) como base para la síntesis del nuevo ADN; por lo tanto estima el número de células que están proliferando. El nivel de proliferación se evalúa en función del nivel de radioactividad alcanzado por las células en cultivo.

Una variante de esta técnica la constituye el uso de sangre entera como fuente de linfocitos para el cultivo, con revelado de proliferación por ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio). Se fundamenta en la transformación de esta sal de tetrazolio, de color amarillo, en cristales de formazán de color azul por parte de enzimas mitocondriales de las células activas; mide, por lo tanto, el número total de células vivas. (34,37)

Cada uno de los procedimientos descritos presenta diferencias en lo que se refiere a la complejidad operativa, al tiempo que se obtienen los resultados, al costo y al requerimiento de equipamiento. El revelado por ensayo colorimétrico evita el uso de sustancias radioactivas y requiere de un lector de placas, equipo más accesible que un contador de centelleo.

Los resultados y las conclusiones acerca de la idoneidad de estas dos metodologías para evaluar la proliferación linfocitaria en comparación con el método tradicional, varían entre las diferentes publicaciones. (1,37,41,42)

7.1 CONCANAVALINA A (Con A)

Es una excelente inductora de mitosis en linfocitos T y se emplea también en la preparación de reactivos para identificar glicoproteínas y polisacáridos. Es una proteína globular de origen vegetal, que se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*, cuyo contenido varía entre 1 y 3 % en peso. Debido a sus propiedades bioquímicas, la Con A fue clasificada por Sumner y Howell en 1936 como una lectina. Los estudios realizados demuestran que la Con A es un excelente inductor de mitosis en los linfocitos T que, junto a la fitohemaglutinina (FHA), conforman un arsenal importante en los estudios cromosómicos y en la detección de sus anomalías. Las lectinas en general, son proteínas o glicoproteínas naturales de origen no inmune que pueden aglutinar células y son capaces de un reconocimiento específico para un determinado carbohidrato uniéndose reversiblemente, sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos. (1,3,34-36)

Las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos o no, uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15

monosacáridos residuales, que pueden estar constituidos principalmente por dos o más azúcares entre ellas glicoproteínas y glicolípidos como: D-Manosa, D-galactosa, D-Glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-Dgalactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina. Se une específicamente a ciertas estructuras que se encuentran en diversos azúcares, glicoproteínas y glicolípidos, principalmente en grupos alfa- manosilo. (24,34-36)

7.2 LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

Entre los mitógenos de origen microbiano se encuentra el lipopolisacárido (LPS) que es un componente integral de la membrana externa de la pared celular de las bacterias gram negativas, que fue utilizado en los experimentos de este estudio puesto que estimula exclusivamente células B. El LPS está formado por un fosfoglicolípido anclado a la membrana bacteriana, lípido A, unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, que le confiere la actividad biológica a la molécula. (19,23)

Los cambios que se producen en la célula cuando ocurre la activación linfocitaria mediada por antígenos o mitógenos, incluyen síntesis de proteínas, ARN y ADN, además de cambios morfológicos como el aumento del citoplasma.

De esta forma, evaluando alguna de estas actividades es posible medir la capacidad funcional de linfocitos B para proliferar en respuesta al estímulo al que ha sido expuesto. (19, 34,35,36)

8. EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR POR EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL MTT.

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento.

La mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple,

rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de que la población celular sea viable y, que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar.⁽⁴⁴⁾

Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Primero, el uso de colorantes tales como cristal violeta y sulforrodamina B, que colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado. Segundo, los detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, que miden la actividad de enzimas tales como lactato deshidrogenasa, y finalmente, aquellos que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio: bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio(MTT));(3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) y (23-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido)(XTT), los cuales al ser reducidos a formazán producen una intensa coloración. El método más empleado es la reducción metabólica de MTT, basado en la reducción del bromuro de 3-(4.5-dimeltitiazol-2-ilo)-2.5-difeniltetrazóleo (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células. ^(36,44).

La proliferación por ensayo colorimétrico con MTT se fundamenta por tanto en la transformación de esta sal de tetrazolio, de color amarillo, en cristales de formazán de color azul por parte de enzimas mitocondriales de las células activas; mide, por lo tanto, y es proporcional al número total de células vivas. ^(1,2,35,36)

$$IE = \frac{\text{Promedio de la densidad óptica (DO) de los cultivos estimulados}}{\text{Promedio de la densidad óptica (DO) de los cultivos no estimulados}}$$

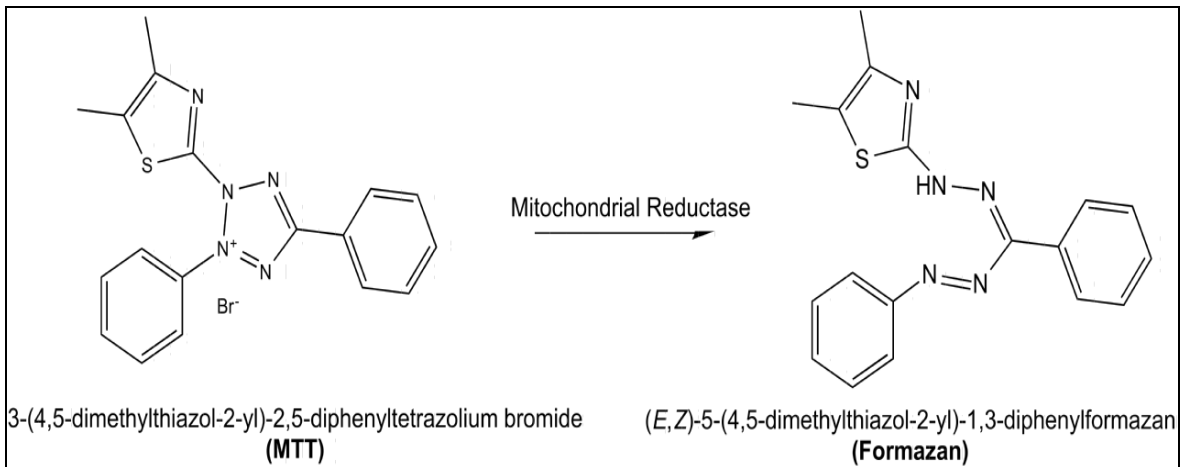


Fig. 5 Reducción mitocondrial del MTT a formazán (compuesto azulado)

Fuente. Berridge, 2005.

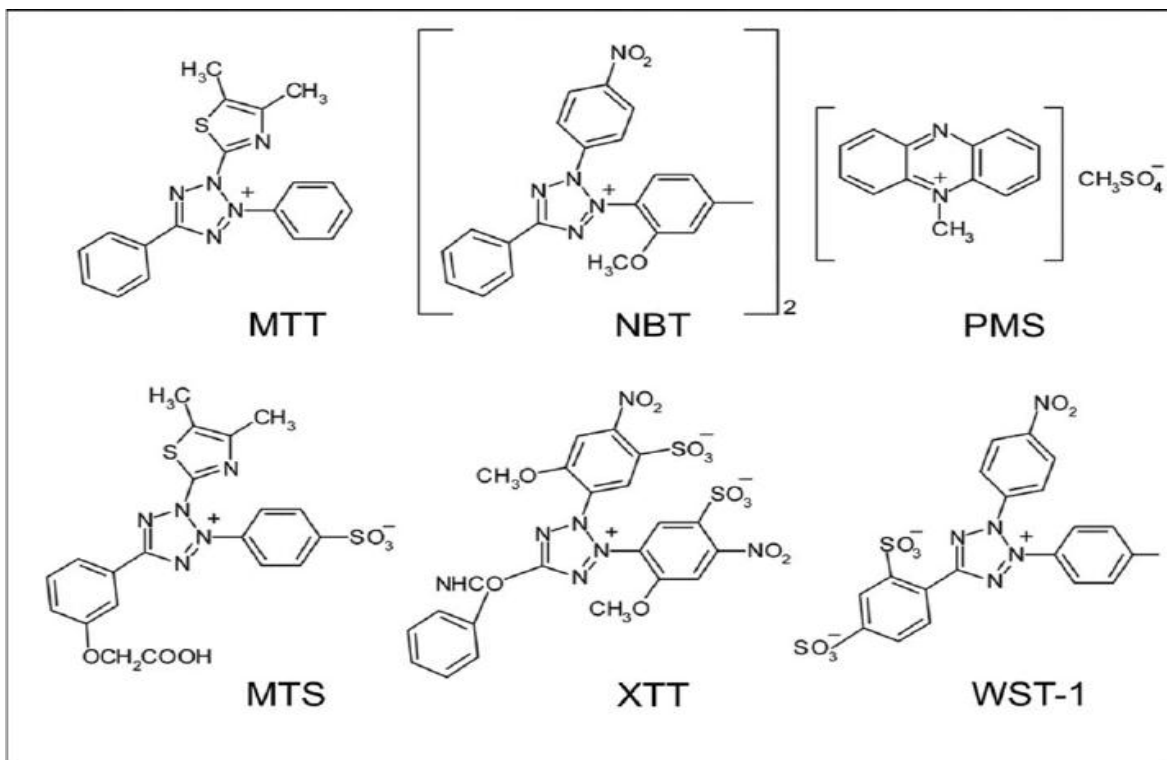


Fig. 6 Estructura química de las diferentes sales de tetrazóleo

Fuente: Berridge, 2005.

9. EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA (GALIPEA LONGIFLORA)

Planta medicinal que en Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales en los departamentos del Beni y La Paz. El uso tradicional más frecuente es como en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales. Para el tratamiento de la leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras, además de beber infusiones durante varios días. Sobre la base de información científica y medicinal acumulada hasta la fecha sobre la especie Evanta (*Galipea longiflora*) se han realizado estudios en el Instituto de investigaciones Fármaco Bioquímicas de La Paz - Bolivia, realizando la optimización de la forma de extracción de alcaloides, determinándose su actividad antiparasitaria *in vitro* de la corteza de esta planta tradicionalmente empleada por la etnia Tacana con el objetivo de dar un aporte importante para el estudio de la búsqueda de fármacos menos tóxicos y naturales que se utilicen como tratamiento alternativo. (1,28-30)



Fig. 7 *Galipea longiflora* (Rutaceae) evanta : planta utilizada para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. Bolivia © IRD/Alain Fournet.

Fuente: <http://www.suds-en-ligne.ird.fr/fr/plantes/richeesse/images/13025.jpg>

9.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA. La colecta de árboles de *Galipea longiflora* fue realizada por el Dr. Alberto Giménez y el equipo del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), alrededor de la Comunidad Tacana de Santa Rosa de Maravilla, Provincia Abel Iturralde, La Paz, Bolivia, habiéndose identificado taxonómicamente por comparación con las muestras (AS49 y SD17) depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia. (28)

9.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

9.2.1 EXTRACCIÓN CONTINUA

Mediante dos equipos de extracción continua, molieron finamente cantidades iguales de corteza (25g) y hojas (25g), estos fueron extraídos con 250mL de diclorometano (CH_2Cl_2) por 2,5 horas. Los extractos obtenidos por rotaevaporación (120rpm y 40°C), fueron secados con bomba de alto vacío, hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 3.7% (corteza) y 3.1% (hojas), con relación al peso seco de la planta.

9.2.2 MACERACIÓN

El material vegetal seco finamente molido obtenido fue macerado por 3 días en CH_2Cl_2 (10L x 3veces), en percoladores cónicos de acero inoxidable. El extracto fue filtrado y concentrado a 40°C y secado con una bomba de alto vacío hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 4.6% (corteza) y 3.9% (hojas), con relación al peso seco de la planta.

9.2.3 OBTENCIÓN DE ALCALOIDES TOTALES :

El extracto crudo (50g) fue disuelto en 100 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) y sometido a lavados sucesivos con HCl 1N (100mL x 3veces, cada uno por 30 minutos sobre agitador magnético). Los lavados ácidos fueron controlados con un espectrofotómetro UV, combinados y llevados a precipitación completa con NaOH 2N. El sólido formado fue extraído con CH_2Cl_2 (100 mL x 3 veces). La solución orgánica fue deshidratada con NaSO_4 , filtrada, evaporada al vacío y secada con una bomba de alto vacío hasta peso constante. Los rendimientos fueron del 2.0%(corteza) y 0.57%(hojas). (1,28,47)

9.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LA CORTEZA

Los alcaloides totales (17.6g) fueron disueltos en CH_2Cl_2 (70mL) y se adicionó Sílica gel (65g). La muestra fue secada utilizando rotaevaporador y sometida a alto vacío por 30 minutos. Este material fue utilizado como cabeza en la columna VLC (10 cm diámetro x 10 cm alto), con Sílica gel (275g). La columna fue eluída (bajo

vacío) con Tolueno (2 L, Fracción 1,4.5g); Tolueno-dietil éter (80:20; 0.50L, Fracción 2, 4.7g); Tolueno-dietil éter (80:20; 0.75L, Fracción 3, 4.1g) y Tolueno-metanol (80:20, 0.50L, Fracción 4, 3.5g). Todas las fracciones obtenidas de la corteza, confirmaron la presencia de los alcaloides 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 identificados por TLC-MS. (1,30,47)

9.2.5 PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LAS HOJAS

Se purificaron los principios activos de los extractos de hojas de la misma manera que con la corteza, la Fracción 1, se obtuvo mediante cristalización con n-hexano caliente, la 2-fenil-quinolina (30%, con relación al peso de alcaloides totales). Las Fracciones de las hojas también se analizaron por TLC-MS , encontrando como alcaloides mayoritarios a las moléculas 1, 3, 4, 8, 9 y 10 como alcaloides minoritarios los compuestos 7 y 11 detectados por MS de alta resolución. (1,28,30,47)

10. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ)

En general el interferón gamma (IFN- γ), es una citocina pro inflamatoria producida por los Linfocitos T y las células NK, y por tanto, la evaluación de la producción de la misma es un indicador indirecto de la funcionalidad de los linfocitos T y las células NK asociando los niveles altos de producción generalmente con una efectiva respuesta del huésped en defensa contra patógenos intracelulares.

También llamado interferón inmunitario o de tipo II, tiene como función más importante, la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas celulares adaptativas, previamente interviene en la reclutación de monocitos de la circulación.

Otra de sus funciones es dirigir la diferenciación de los Linfocitos T CD4+ en linfocitos Th1, la cual ocurre en respuesta a los microorganismos y que también activa a las células dendríticas, los macrófagos y los Linfocitos "natural killer" (NK); para inducir mayor secreción de IL-12, la cual promueve más diferenciación a Th1, amplificando fuertemente la reacción.

Por ejemplo en el caso de la leishmaniasis, la resistencia del huésped al parásito depende del desarrollo de la respuesta inmune celular, en la cual participan activamente los linfocitos CD4, mediante la síntesis y liberación de linfocinas solubles como la interleucina-2 (IL-2) y el interferón gamma (IFN- γ) necesarios para la activación macrofágica, la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos y la actividad citotóxica de las Células Natural Killer (NK), que dan lugar a la destrucción del parásito. (11,12,18)

III. ANTECEDENTES

Para el estudio de toxicidad *in vitro* de sustancias, se consideró importante la evaluación de la actividad del producto sobre células obtenidas y aisladas a partir de un huésped vivo; esto porque células de estas características son altamente susceptibles y sensibles a cualquier componente tóxico que pudiera estar presente en el medio de cultivo. (2,4,19,25)

El estudio de la viabilidad y la proliferación celular es un factor importante para evaluar las respuestas de una población celular a factores externos como factores de crecimiento, medicamentos, etc. Para el estudio de la proliferación, uno de los primeros métodos fue el ensayo del MTT que fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. (2-4,34)

El ensayo de proliferación celular por MTT permite un conteo simple, preciso y altamente reproducible de las células metabólicamente activas, basándose en la reducción metabólica del ensayo de la reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazóleo (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa convirtiéndose en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán) permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. (1,28-30)

La utilización de análogos de MTT como son el XTT (2,3-bis(2-metoxi-4--nitro-5-sulfofenil)-5[(fenilamino)carbonil]-2H) hidróxido de tetrazóleo y recientemente el MTS(3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazoleo) están siendo empleados para ensayos de este tipo, donde a diferencia del primero la forma reducida de estos agentes (formazán) es soluble en agua, lo que permite realizar el ensayo en un solo paso, una ventaja adicional es el tiempo más corto de incubación el cual es resultado de la adición de un agente acoplador de electrones como es el Fenasin Metosulfato (PMS) y/o el Fenasin Etosulfato (PES) el cual acelera la reducción del sustrato.

Y finalmente el método WSTS (sales de tetrazolio solubles en agua) son una serie de otros colorantes solubles en agua para MTT ensayos, desarrollado para dar diferentes espectros de absorción de los formazanos formados. WST-1 y, en particular, WST-8 (2- (2- metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) -2H-tetrazolio), son ventajosos sobre MTT en que se reducen fuera de las células, en combinación con el mediador de electrones PMS, y el rendimiento un formazán soluble en agua. Finalmente, los ensayos de WST, se pueden leer directamente (a diferencia de MTT que necesita una etapa de solubilización), dar una señal más eficaz que el MTT, y disminuir la toxicidad a las células (a diferencia de MTT de las células permeable, y su insoluble formazán que se acumulan dentro de las células). (46)

Otro ensayo de proliferación alternativo es la marcación con timidina tritiada, este método está basado en la capacidad de que tienen las células de incorporar un marcador de ADN solamente durante la fase S. La técnica consiste en dar un pulso corto de timidina tritiada a un cultivo en el que hay células en los periodos G1, S, G2, M (mitosis), marcándose solo aquellas células que se encuentran en S. Una vez terminado el tratamiento se incuban las células en su medio y se toman muestras a intervalos regulares para observar la proporción de células en mitosis que aparecen marcadas. (1)

El Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB), de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, forma parte de un equipo multidisciplinario que está llevando adelante estudios sobre la eficacia de formulaciones farmacéuticas, a base de los principios activos de Evanta, frente a la leishmaniasis cutánea y continúa en sus trabajos de investigación sobre nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis a partir de extractos vegetales.

(28-30)

Estudios previos muestran que las investigaciones etnofarmacológicas son una opción para encontrar la actividad de nuevos componentes contra la leishmaniasis

u otras enfermedades protozoicas, y por lo tanto EAE puede ser considerado un tratamiento potencial alternativo como tratamiento para la leishmaniasis. (37-39)

Hasta el momento, tras la recolección de una variedad de plantas que usan los Chimanos en la zona subtropical de Bolivia para curar la leishmaniasis, tres mostraron actividad *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania spp.* : *Ampelocera edentula* Kuhl (Ulmaceae), *Perabenensis* Rusby (euphorbiaceae) y *Galipea longiflora* (rutaceae). Esta experimentación fue realizada en ratones infectados con diferentes cepas de *Leishmania* entre ellas *L. amazoensis*, *L. brazilensis*; *L. donovani* e inclusive *T. cruzi* (epimastigotes). (38-40)

En estos estudios a partir de un extracto crudo de *Galipea longiflora* (evanta), se obtuvieron por cromatografía doce componentes activos identificados como alcaloides quinolínicos sustituidos en la posición de carbono 2, con actividad leishmanicida comprobada con estudios *in vivo* en ratones infectados con el parásito tratados con el Extracto de Alcaloides de Evanta, 24 horas después de la infección. Entre las moléculas con actividad antiparasitaria más representativa se encuentra la 2-fenilquinolina y la 2-n-pentilquinolina. Los resultados fueron comparados con medicamentos como el glucantime y la anfotericina B, los cuales no son accesibles principalmente por su costo, por los pobladores de las zonas endémicas de nuestro país. (38-40)

La respuesta celular contra leishmania se inicia con la participación de las células presentadoras de antígeno (CPA), generalmente macrófagos que han fagocitado de forma inespecífica al parásito y que presentan péptidos parasitarios asociados a las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de su membrana externa. Dependiendo de la subpoblación de linfocitos que resulte activada se desarrollará un tipo de respuesta u otro. Un cambio del patrón de respuesta linfocitaria del patrón Th1 (con predominio de la liberación de interferón gamma e interleucina 2) al Th2 (con predominio de la liberación de las interleucinas 4 y 10). (5-7,9)

En general los interferones ejercen efectos inmunoreguladores como el aumento de la actividad de células NK, activación del sistema de complemento, modulación de la respuesta primaria y secundaria de anticuerpos. Además recientemente se ha reportado un papel crítico para el IFN- γ como la principal linfocina que media la activación macrofágica, lo cual permite la destrucción de *Leishmania in vitro*.

Por lo tanto en el presente trabajo decidimos evaluar los efectos del IFN- γ en la respuesta linfoproliferativa frente a mitógenos como la Concanavalina A a partir de la evaluación de la producción de interferón gamma en sobrenadantes de células estimuladas con Con A.

De acuerdo a estudios previos *in vitro*, diremos que el EAE interfiere con la activación de células T (humanas y murinas), reduce o inhibe la proliferación en varios tipos celulares (J774, SP2/0, esplenocitos), promueve la reducción de la producción de IFN- γ y además tiene un posible efecto paralelo sobre la respuesta inmune del huésped. (1,37,41-43)

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos alternativos útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. Para ello planteamos una alternativa accesible evitando a la vez el alto costo de los estudios *in vitro* y la experimentación *in vivo*, como es el caso del método del MTT. A la vez buscamos una aplicación viable en nuestro medio como es el caso de los estudios en leishmaniasis, enfermedad que representa un problema de salud por su alto índice epidemiológico que a la vez constituye un problema social y económico debido al alto costo del tratamiento con medicamentos específicos como el glucantime, por lo tanto es prioritario brindar a la población una opción más natural y más accesible especialmente en lo que respecta a lo económico. Para esto, es necesario un estudio exhaustivo *in vitro* de técnicas de estudio celular por medio de las cuales se pueda conocer los efectos sobre cultivos celulares tanto en la proliferación, inhibición de los mismos y los efectos, ante el EAE y la producción de citocinas. Por esto es imprescindible una técnica específica para evaluar estos diversos efectos sobre un modelo celular *in vitro*, esta experimentación servirá como antecedente que nos permitirá describir ciertos efectos a nivel celular producidos por el EAE como pruebas piloto para poder posteriormente aplicarlo en el modelo *in vivo*.

V. JUSTIFICACIÓN

Para poder evaluar los diversos efectos sobre las células *in vitro* como la toxicidad, inducción o inhibición de la proliferación, etc., es necesario contar con métodos fiables para reconocer los mismos y poder cuantificarlos. Por lo tanto recurrimos a la técnica colorimétrica del MTT (técnica ampliamente utilizada en varios estudios celulares) para poder evaluar en una primera etapa los efectos de mitógenos, utilizando Concanavalina A y Lipopolisacárido, sobre la proliferación celular y posteriormente para observar los efectos de EAE traducidos en una inhibición de la misma, y finalmente relacionarlos con la producción de citocinas proinflamatorias como el interferón gamma.

La inmunidad mediada por célula T, juega un rol central en la respuesta contra patógenos intracelulares. Por ejemplo en la leishmaniasis la polarización Th1 es decisiva, con la producción de IFN- γ , TNF y Óxido nítrico. Por lo tanto es de nuestro interés conocer si el EAE tiene efecto sobre la producción celular de estas citocinas.

Cabe mencionar que la técnica del MTT que utilizamos para evaluar la proliferación celular, es la más versátil siendo un método por demás inocuo, relativamente económico, rápido, de fácil ejecución, que no requiere de equipos costosos, ni del uso de radioisótopos, comparado con los métodos tradicionales de evaluación de proliferación.

VI. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Optimizar el MTT como método de cuantificación de proliferación celular de esplenocitos murinos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la proliferación celular en esplenocitos murinos tratados con Concanavalina A (Con A), a través del método MTT.
- Evaluar la proliferación celular en esplenocitos murinos tratados con Lipopolisacárido (LPS), a través del método MTT.
- Evaluar los efectos de EAE sobre la proliferación celular inducida con Con A en los cultivos celulares de esplenocitos murinos y también sobre la producción de Interferón γ .

VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Esplenocitos murinos.

2. DESCRIPCIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se trabajó con 30 ratones hembras albinas de la cepa Balb/c de 8 a 10 semanas de edad, de 20 a 25 g de peso.

3. CONTEXTO Y LUGAR

Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Los ensayos para la obtención, proliferación y cuantificación de células, se realizaron en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Servicios de Laboratorio en Diagnóstico e Investigación en Salud (FCFB – UMSA).

4. ASPECTOS ÉTICOS

El modelo murino, se utilizó como fuente donante de órganos y células. Por lo tanto fueron primordiales las buenas condiciones de vida en cautiverio de los mismos, tomando en cuenta aspectos como su alimentación, condiciones ambientales e inclusive la cantidad de animales por jaula. Estos aspectos fueron controlados gracias a una infraestructura adecuada en el bioterio y al personal experimentado encargado del mismo.

Se realizaron buenas prácticas de sujeción y eutanasia, para evitar cualquier tipo de dolor al momento de sacrificar al animal.

VIII. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de tipo experimental: En el cual se optimizó el ensayo del MTT como método de cuantificación de proliferación celular en esplenocitos murinos, estimulando los mismos con mitógenos (concanavalina A y lipopolisacárido). Como control negativo de inhibición de la proliferación, utilizamos el tamoxifén a una concentración de 5 mg/mL y a la vez un control de proliferación sin mitógenos para poder conocer la diferencia con la proliferación regular de los esplenocitos.

Posteriormente realizamos las pruebas para observar el efecto del extracto de evanta sobre los esplenocitos a las concentraciones de 1×10^7 y 2×10^7 cels/mL. Las concentraciones del extracto fueron de 50, 25, 10 y 1 ug/mL y sin evanta (control negativo) y control negativo de proliferación con tamoxifén.

Cada estudio se realizó por triplicado en cada etapa de la optimización del ensayo,

Finalmente, para la cuantificación de interferón gamma (IFN- γ), primero realizamos una curva de estandarización por medio de diluciones seriadas del estándar de IFN- γ , luego utilizando la misma, cuantificamos el interferón gamma de los sobrenadantes obtenidos previamente.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

- Tubos Falcon estériles de 15 y 50 mL
- Placas de cultivo de 96 pozos
- Placas de ELISA de 96 pozos
- Micropipetas
- Jeringa de 10 ml con aguja No. 18
- Equipo de disección
- Cajas petri estériles
- Cámara de Neubauer

2. REACTIVOS

- Ficoll Hipaque d= 1.077
- Solución de PBS celular 0.15 M, pH 7,2
- Solución de PBS - tween 0.1 M, pH 7,2
- Extracto total de alcaloides de evanta obtenido por extracción con diclorometano provisto por el IIFB.
- Lipopolisacárido (LPS)
- Concanavalina A (ConA)
- Tamoxifén
- MTT (C₁₈H₁₆N₅SBr) Sigma Chemical Co.
- Medio de cultivo RPMI - 1640 (GIBCO)
- Suplementos para RPMI: Hapes, penicilina, bicarbonato de sodio, Suero Fetal Bovino)
- Azul tripán 0.2% (Sigma – Aldich)
- Etanol p.a.
- Estándar de Interferón gamma recombinante de ratón - BD Pharmingen
- Kit de ELISA para la determinación de Interferón IFN- γ (MABTECH)

3. EQUIPOS

- Centrífuga para placas
- Centrífuga para tubos
- Microscopio óptico
- Microscopio invertido
- Lector de ELISA (Awareness Technology Inc)
- Estufa de incubación a 37 grados centígrados.

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Utilizamos ratones albinos hembras de la cepa Balb/c de 8 a 10 semanas de edad y de 20 a 25 g de peso. Estos fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Los animales fueron alimentados con pellets constituidos de alimento balanceado y agua a requerimiento.

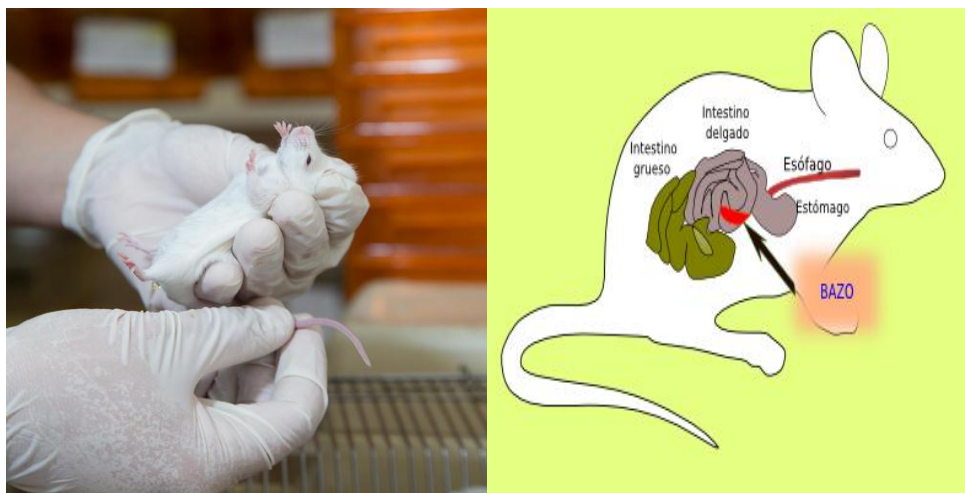


Fig. 8 Selección de animales de experimentación

Fuente: <http://revistaanfibia.com/wp-content/uploads/2014>

<https://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/imagenes-esq/raton-bazo.pngd>

4.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS ESPLÉNICAS

4.2.1. PROCEDIMIENTO

- Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.
- Luego de realizar la sepsis del animal con etanol al 70%, y utilizando material estéril, se extrajo el bazo desprendiéndolo cuidadosamente del mesenterio, el bazo se encuentra en la cavidad abdominal en el hipocondrio izquierdo y para su extracción abrimos el peritoneo del ratón, donde se observó el hígado, intestinos y bazo, este último de color rojo vino, de forma plana y alargada.
- Colocamos el bazo recién extraído inmediatamente sobre una caja Petri con medio de cultivo RPMI-1640, (GIBCO TM) con L-glutamina 2 mM y bicarbonato de sodio 2% y rojo de fenol como indicador de pH atemperado a 4°C.
- Resuspendimos varias veces y muy cuidadosamente con una jeringa aguja No.18 hasta obtener una suspensión homogénea, la cual trasvasamos la suspensión a un tubo con 5 mL de Ficoll Hpaque d=1.077
- Centrifugamos por 20 minutos a 1500 rpm.
- Se obtuvieron los esplenocitos y la fracción de células fue trasvasada a tubos de centrifugación de poliestireno de 15 mL (Falcon) nuevos.
- Los detritos celulares fueron eliminados de la suspensión mediante 3 lavados con medio de cultivo RPMI-1640 por centrifugación a 800 rpm por 10 minutos.
- Después del último lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO) con L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio al 2% y rojo de fenol al 0.053% como indicador de pH y suero Fetal Bovino (SIGMA) al 5%, N-2-hidroxietil piperazina N-2 ácido etano sulfonato (HEPES) 15mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µ/mL. A esta mezcla se denominó medio suplementado el cual es indispensable para simular el medio biológico natural en el que las células pueden proliferar.

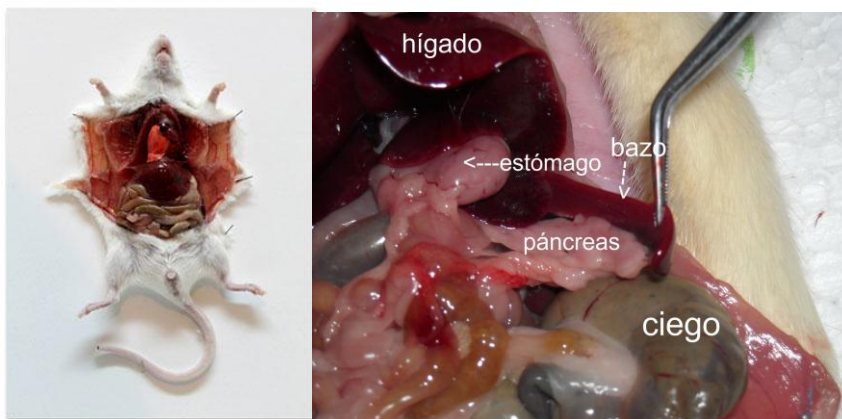


Fig. 9 Disección del ratón y extirpación del bazo

Fuente: <http://2.bp.blogspot.com> <http://67.media.tumblr.com>

4.3 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.

Para determinar la viabilidad celular se empleó el método de la exclusión por células vivas de colorantes vitales como el azul tripán, método basado en la propiedad de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática.

Este método fue utilizado en el presente trabajo para diferenciar entre células viables (refringentes) y no viables (teñidas con azul tripán).

4.3.1 PROCEDIMIENTO

- Previamente se realizó una dilución 1:10 de azul de tripán 0.2% en Tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, con el fin de evitar muerte celular por toxicidad del colorante.
- Luego, colocamos en un tubo colocamos 90 μ L de células y 10 μ L del colorante diluido y homogenizamos con la ayuda de un vórtex, para cargar las dos cámaras del hemocitómetro.
- Realizamos el recuento de las células viables y muertas en los retículos de conteo de blancos en la cámara de Neubauer para inferir el porcentaje de Viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}} \right) \times 100$$

- El recuento de células una vez cargado el hemocitómetro, debe realizarse en el menor tiempo posible (10 minutos como máximo) esto debido al

constante proceso de deshidratación por el desecamiento que sufre la muestra lo que implica cambios en las condiciones osmóticas del medio con efecto directo sobre la viabilidad celular.

- Se trabajó únicamente con aquellas suspensiones celulares en las que se obtuvo como promedio mínimo el 95% de viabilidad celular.

4.4 AJUSTE CELULAR

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio óptico y también microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Cada cuadrante es de 1mm x 1mm (1 mm^2), la profundidad o altura de la cámara es 0.1 mm, si contamos un área de 1mm por 0.1mm de profundidad, el volumen es de 0.1 mm^3 , ó 10^4 . Por lo tanto el número de células por mililitro es igual al número de células de los cuadros de las esquinas por 10^4 . Con los datos obtenidos se realizó el ajuste de la población celular requerida para cada experimento.

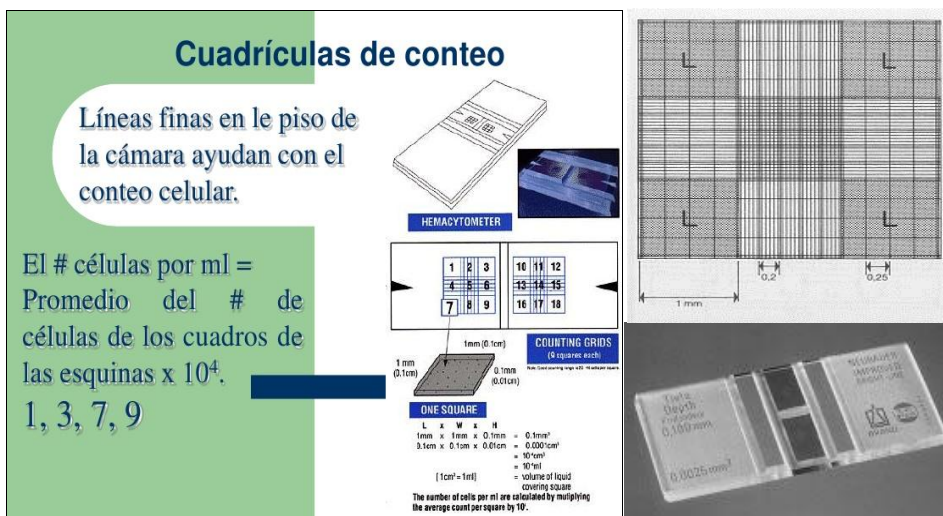


Fig. 10 Cálculo para ajuste celular. Cámara de Neubauer y retículos para conteo y celular.

Fuente: Rivera Michael. 2012

4.4.1 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR ÓPTIMA PARA EXPERIMENTACIÓN

Poblaciones relativamente grandes de células pueden frecuentemente multiplicarse *in vitro* bajo condiciones en las que células únicas aisladas no pueden hacerlo. Esto fue comprobado aislando células en tubos capilares con pequeños volúmenes de medio de cultivo y demostraron que la variable crítica es el volumen de medio por célula y que el crecimiento es dado por el “condicionamiento” del medio.

Esto está relacionado con:

- la difusión de intermediarios metabólicos de bajo peso molecular fuera de las células, estas sustancias pueden ser suministradas,
- las macromoléculas sintetizadas por las células, deben alcanzar niveles extracelulares determinados antes de que ocurra la proliferación celular. Cuando el volumen del medio de cultivo es grande, la concentración de estas se diluye y el crecimiento celular se bloquea.
- La presencia de suero en los medios de cultivo aporta los suplementos necesarios para el mantenimiento y crecimiento celular y también con diversos factores inhibidores de la proliferación celular como proteínas, hormonas y también lípidos. (2)

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, y de acuerdo a pruebas previas realizadas en el instituto SELADIS(2) puede oscilar entre 1×10^6 cels/mL y 2×10^6 cels/mL para cultivos de 150 a 220 horas; datos obtenidos y respaldados principalmente en la viabilidad de los cultivos celulares.

Por lo tanto, para determinar la concentración celular óptima de esplenocitos murinos para cultivos de 48 horas, preparamos diferentes concentraciones esplenocitos murinos ($2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 y 4×10^7 células/mL) y las distribuimos en placas de cultivo de acuerdo al esquema diseñado para la experimentación.

4.5 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Luego de preparar las diferentes concentraciones celulares de esplenocitos, los sometemos a la acción de dos diferentes mitógenos o estimulantes de proliferación; la Concanavalina A (Con A) a una concentración de 4 µg/mL y el Lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 1 mg/mL. Realizamos la inducción de la proliferación con ambos mitógenos para las diferentes concentraciones de esplenocitos murinos como se describe en el esquema a continuación. Como control negativo utilizamos tamoxifén a una concentración de 5 mg/mL. El Tamoxifén, es el inhibidor de la proliferación celular ya que es un isómero del trifenilileno, análogo estructural del estradiol, cuya actividad antitumoral se ejerce a nivel de los receptores citoplasmáticos estrogénicos por mecanismo competitivo, dicho complejo impide la transcripción genética, síntesis de DNA, el crecimiento celular y el aumento de polipéptidos autócrinos (EGF, IGF-11) y otros factores de crecimiento implicados en la proliferación celular.

Realizamos nuestra experimentación según el siguiente esquema:

	CONCANAVALINA 4 µg/mL					LIPOPOLISÁCARIDO 1 mg/mL						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,5X10 ⁶ Cels/mL	5X10 ⁶ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2X10 ⁷ Cels/mL	4X10 ⁷ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2,5X10 ⁶ Cels/mL	5X10 ⁶ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2X10 ⁷ Cels/mL	4X10 ⁷ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL
B	2,5X10 ⁶ Cels/mL	5X10 ⁶ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2X10 ⁷ Cels/mL	4X10 ⁷ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2,5X10 ⁶ Cels/mL	5X10 ⁶ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2X10 ⁷ Cels/mL	4X10 ⁷ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL
C	2,5X10 ⁶ Cels/mL	5X10 ⁶ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2X10 ⁷ Cels/mL	4X10 ⁷ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2,5X10 ⁶ Cels/mL	5X10 ⁶ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL	2X10 ⁷ Cels/mL	4X10 ⁷ Cels/mL	1X10 ⁷ Cels/mL
D						TAM + Con A						CNT
E												
F												
G												
H												

4.6 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR POR EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL MTT (C₁₈H₁₆N₅SBR)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazóleo), (MTT 98% - SIGMA CHEMICAL CO.), por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

4.6.1 PROCEDIMIENTO

- Utilizando placas de cultivo de 96 pozos, dispusimos 200 µL de las diferentes concentraciones de células ($2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 y 4×10^7 células/mL) sometiénolas a la vez a la acción de los mitógenos (Con A y LPS) y los controles no tratados y control con el inhibidor de la proliferación, según es esquema ya descrito.
- Incubamos la placa de cultivo a 37°C, con 5% de CO₂ durante 48 horas.
- A las 48 horas de proliferación de los esplenocitos murinos, centrifugamos la placa de cultivo a 1000 rpm durante 10 minutos, luego eliminamos el sobrenadante por inversión muy cuidadosamente.
- Preparamos el MTT a una concentración de 0,5 mg por mL en RPMI-1640 suplementado y agregamos 200 µL por pozo.
- Resuspendimos levemente e incubamos durante 4 horas a 37°C, centrifugamos a 2000 rpm durante 10 minutos y decantamos por inversión el sobrenadante cuidadosamente.
- Para poder solubilizar las sales de tetrazóleo, agregamos 200 µL de etanol absoluto a cada pozo y resuspendimos evitando formar espuma.
- Finalmente leemos las absorvancias con el lector de ELISA a 545 nm de longitud de onda con filtro diferencial de 630nm.

4.7 EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE EVANTA SOBRE LOS ESPLENOCITOS MURINOS.

Para determinar el efecto del extracto de Evanta sobre la proliferación de esplenocitos inducida por Con A, realizamos los cálculos correspondientes para inducir proliferación las primeras 24 horas, posteriormente agregamos el extracto de evanta según el esquema, utilizando como control negativo de proliferación el tamoxifén. Incubamos por 24 horas más. Cabe mencionar que utilizamos solo concanavalina A a una concentración de 4 ug/mL, ya que a partir de ahora enfocaremos nuestro estudio a la respuesta de Linfocitos T.

Finalmente evaluamos los resultados aplicando el método del MTT.

- A las 48 horas de proliferación de los esplenocitos murinos, centrifugamos la placa de cultivo a 1000 rpm durante 10 minutos, luego eliminamos el sobrenadante por inversión muy cuidadosamente.
- Preparamos el MTT a una concentración de 0,5 mg por mL en RPMI-1640 suplementado y agregamos 200 µL por pozo.
- Resuspendimos levemente e incubamos durante 4 horas a 37°C, centrifugamos a 2000 rpm durante 10 minutos y decantamos por inversión el sobrenadante cuidadosamente.
- Para poder solubilizar las sales de tetrazóleo, agregamos 200 µL de etanol absoluto a cada pozo y resuspendimos evitando formar espuma.
- Finalmente leemos las absorvancias con el lector de ELISA a 545 nm de longitud de onda con filtro diferencial de 630nm.

		EXTRACTO DE EVANTA $\mu\text{g/mL}$											
		0	1	10	25	50	C(-) TAM						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1x10 ⁷ cels/mL	A	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷		1x10 ⁷					
	B	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷		1x10 ⁷					
	C	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷		1x10 ⁷					
	D												
2x10 ⁷ cels/mL	E	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷		2x10 ⁷					
	F	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷		2x10 ⁷					
	G	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷		2x10 ⁷					
	H												

4.8 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ) EN ESPLENOCITOS MURINOS TRATADOS CON EAE

Inicialmente, realizamos una curva de calibración, titulando el estándar de IFN- γ (Interferón gamma recombinante de ratón - BD Pharmingen) el cual tiene una concentración inicial de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Realizamos diluciones para cambiar las unidades a pg/mL , esto con el fin de obtener los resultados y poderlos comparar con estudios similares.

Tras hacer diluciones logramos llegar a una concentración de 1000 pg/mL , a la misma por medio de diluciones 2X, lograremos una curva hasta los 15 pg/mL . (ANEXO 1).

Por interpolación de los datos obtenidos en esta curva de titulación es que logramos evaluar los resultados finales.

Primeramente, sembramos en placas de cultivo de 96 pozos los esplenocitos murinos a dos concentraciones de células: 1x10⁷ cels/mL y 2x10⁷ cels/mL, utilizando Con A como mitógeno e incubamos 24 horas 37 °C en 5% CO₂

Luego agregamos las distintas concentraciones del extracto de Evanta, para poder evaluar a partir de cual existe un efecto de la misma en la proliferación celular. Luego fueron incubadas a 37 °C en 5% CO₂ durante 24 horas.

A este tiempo de incubación, la placa fue centrifugada a 1000 rpm durante 8 minutos y recuperamos todos los sobrenadantes en tubos eppendorf bien identificados.

La producción de interferón gamma fue evaluada utilizando un kit comercial de ELISA (Mouse IFN- γ ELISA - MABTECH).

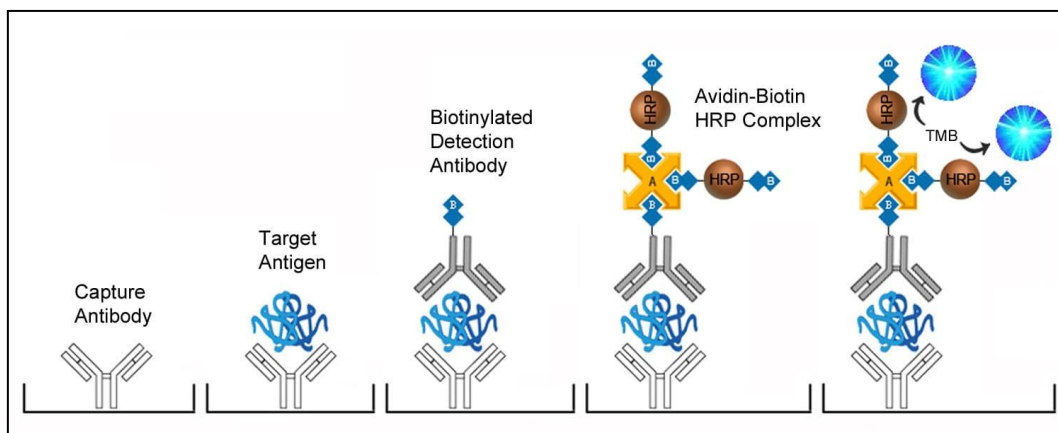


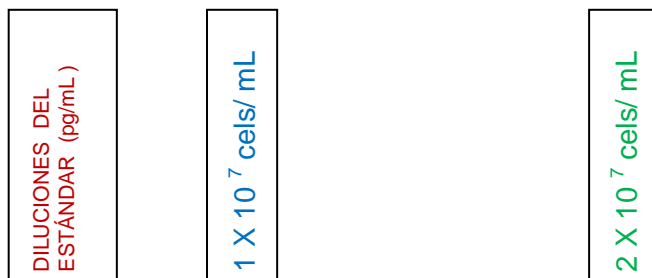
Fig. 11 Esquema de reacción del ELISA sandwich para la cuantificación de IFN- γ de ratón

Fuente: <https://www.lsbio.com/image2/mouse-ifn-gamma-interferon-gamma-elisa-kit-sandwich-elisa.jpg>

4.8.1 PROCEDIMIENTO

- Sensibilizamos solo los pozos necesarios de una placa de cultivo celular de 96 pozos con el anticuerpo Anti-IFN- γ a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dosificando 100 μL por pozo.
- Incubamos toda la noche entre 4 y 8 °C.
- Lavamos una sola vez con PBS 0,1 M, pH 7.2, aproximadamente con 250 μL por pozo.
- Bloqueamos cada pozo con 200 μL de PBS 0.1 pH 7.2 con 1% de BSA.
- Incubamos 1 hora temperatura ambiente.

- Lavamos tres veces con PBS 0.1 pH 7.2 – Tween, utilizando 250 µL por pozo por lavado.
- Prepararnos la cantidad suficiente para los pozos del estándar a una concentración de 10 ug/mL.
- Agregamos 100 µL de las muestras (pool de sobrenadantes y sus diluciones identificados) y las diluciones correspondientes al estándar.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	7,81	7,81	O POOL	TAM POOL	O POOL	TAM POOL	O POOL	10 1/20	O POOL	10 1/20		
B	15,6	15,6	O 1/10	TAM 1/10	O 1/10	TAM 1/10	O 1/10	25 POOL	O 1/10	25 POOL		
C	31,2	31,2	1 POOL		1 POOL		O 1/20	25 1/10	O 1/20	25 1/10		
D	62,5	62,5	1 1/10		1 1/10		1 POOL	25 1/20	1 POOL	25 1/20		
E	125	125	10 POOL		10 POOL		1 1/10	TAM POOL	1 1/10	TAM POOL		
F	250	250	10 1/10		10 1/10		1 1/20	TAM 1/10	1 1/20	TAM 1/10		
G	500	500	25 POOL		25 POOL		10 POOL		10 POOL			
H	1000	1000	25 1/10		25 1/10		10 1/10		10 1/10			

- Incubamos 2 horas a temperatura ambiente.
- Lavamos tres veces con PBS –Tween
- Agregamos 100 uL del conjugado biotina (R4 – 6 A 2) diluido a una concentración de 0,5 ug/mL en PBS – Tween.
- Incubamos 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavamos 3 veces

- Agregamos 100 μ L de streptavidina – ALP, haciendo una previa dilución de 1/1000.
- Incubamos 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavamos tres veces.
- Preparamos el sustrato: 1 pastilla de p – nitrofenil fosfato (PNPP) en 5 mL de agua.
- Añadir 100 μ L a cada pozo.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Leer la absorvancia a 405 nm de longitud de onda.

X. RESULTADOS

En todos los casos, expresamos los resultados como el promedio de un triplicado +/- Desviación Estándar.

Se muestra un experimento representativo de tres similares.

Obtuvimos esplenocitos murinos en suspensión a los cuales inicialmente realizamos pruebas de viabilidad y ajustamos a diferentes concentraciones celulares para poder proceder en paralelo para la elección de las concentraciones óptimas para las subsecuentes pruebas.

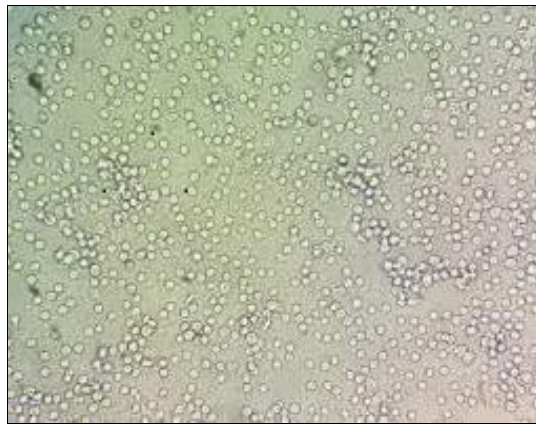


Fig. 12 Esplenocitos Murinos, observación al microscopio invertido 20X. Laboratorio de Inmunología - SELADIS 2007

1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN ESLENOCITOS MURINOS TRATADOS CON CONCANAVALINA A (ConA) Y LIPOPOLISACÁRIDO (LPS).

Utilizamos el método del MTT como método de cuantificación de proliferación celular en esplenocitos murinos utilizando a la vez dos estimulantes de la proliferación (Con A, LPS) con los cuales las curvas de proliferación celular obtenidas son similares.

Identificamos las concentraciones celulares más adecuadas para las pruebas subsecuentes, basándonos en la proliferación resultante observada en las diferentes concentraciones celulares, la proliferación de los controles no tratados (sin mitógenos) y del control negativo con inhibidor de proliferación (Tamoxifén).

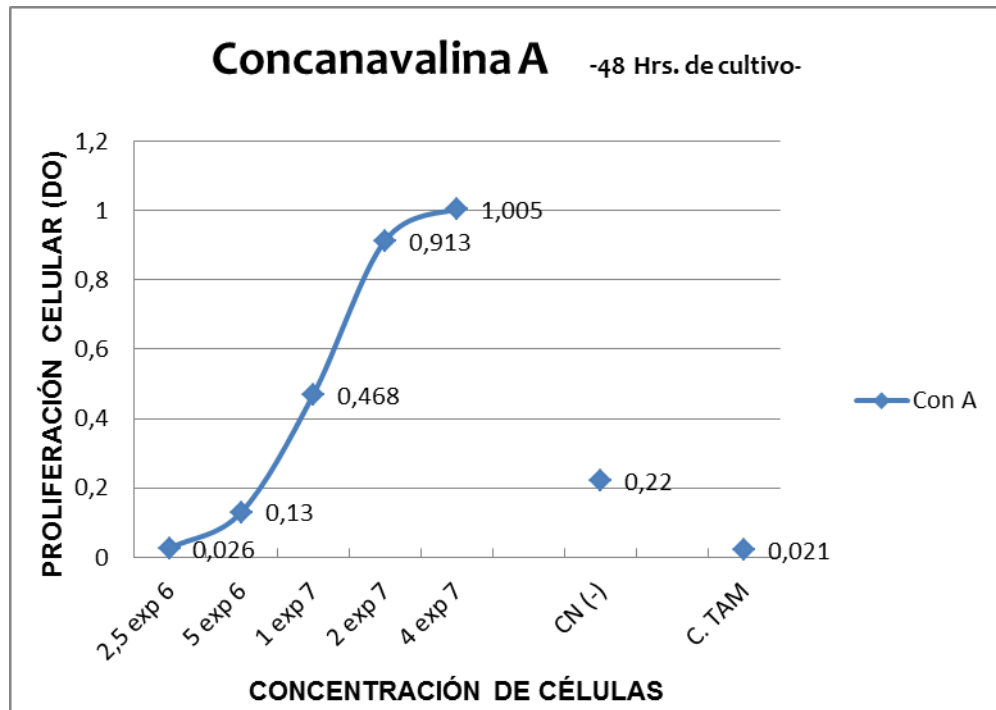


Fig.13. Evaluación de la Proliferación de esplenocitos murinos tratados con Concanavalina A (Con A) a las 48 Hrs. de cultivo.

Las concentraciones celulares que seleccionamos son: 1×10^7 cels/mL y 2×10^7 cels/mL, en razón de que ambas están en un asenso logarítmico de proliferación celular, hecho evidenciado por la absorbancia obtenida.

La absorbancia del control no tratado, o sea sin la participación de Concanavalina A, es de 0.220; por tanto, las absorbancias mayores a este valor, son las que correlacionan con el uso de inductores de la proliferación.

El control de inhibición de la proliferación (tamoxifén) presenta una absorbancia de 0.021 valor que representa la ausencia total de proliferación celular.

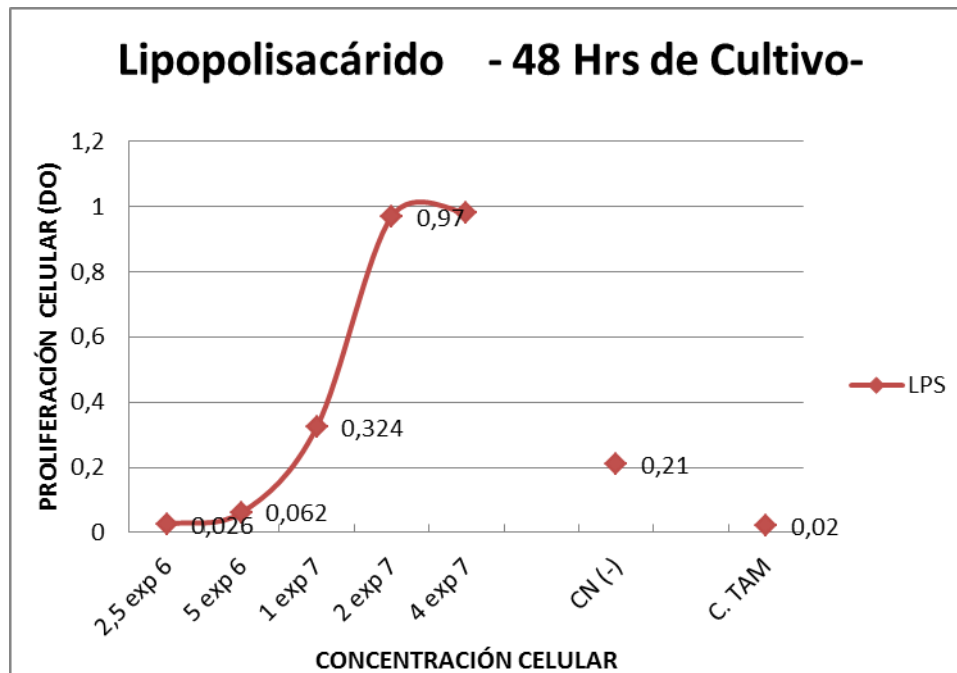


Fig.14. Evaluación de la Proliferación de esplenocitos murinos tratados con Lipopolisacárido (LPS) a las 48 Hrs. de cultivo.

Las concentraciones celulares que seleccionamos son: 1×10^7 cels/mL y 2×10^7 cels/mL, en razón de que ambas están en un asenso logarítmico de proliferación celular, hecho evidenciado por la absorvancia obtenida.

La absorvancia del control no tratado, o sea sin la participación de Lipopolisacárido (LPS), es de 0.210 ; por tanto, las absorvancias mayores a este valor, son las que correlacionan con el uso de inductores de la proliferación.

El control de inhibición de la proliferación (tamoxifén) presenta una absorvancia de 0.020 valor que representa la ausencia total de proliferación celular.

2. EFECTO DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS MURINOS.

Para evaluar el efecto del extracto de evanta sobre la proliferación de los esplenocitos murinos inducida por Concanavalina A, sometimos a la acción del EAE dos concentraciones celulares 1×10^7 cels/mL y 2×10^7 cels/mL.

Las células fueron tratadas con distintas concentraciones del EAE) y se observó un efecto dosis-dependiente con una reducción de la proliferación celular para ambas concentraciones celulares.

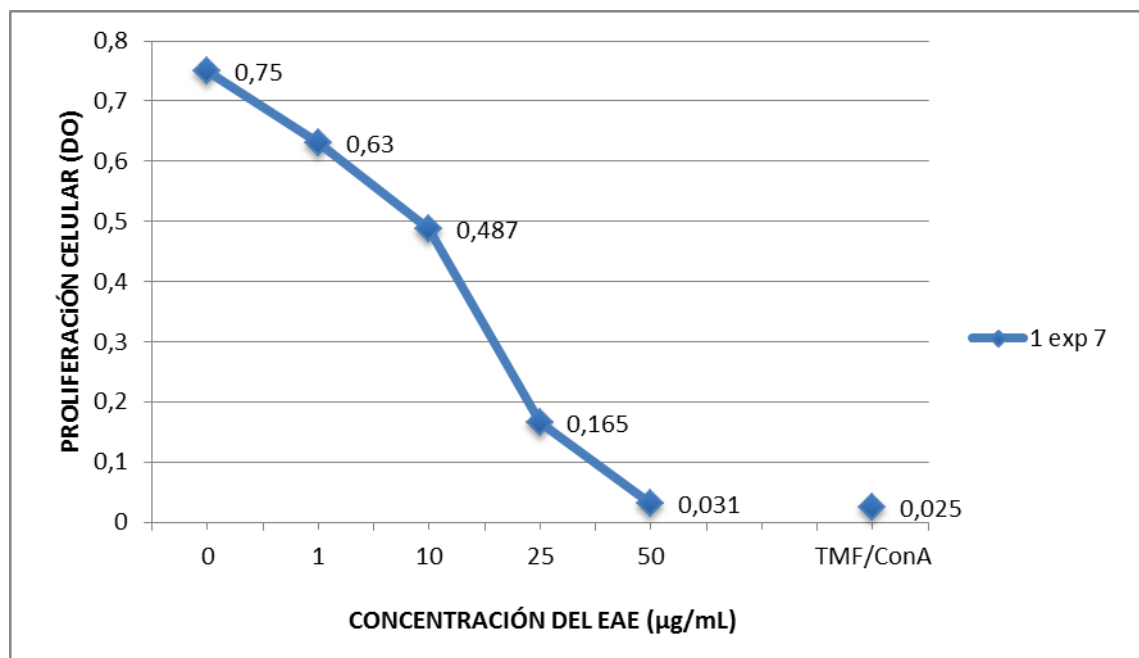


Fig. 15. Inhibición dosis-dependiente del EAE sobre la proliferación inducida por Con A en esplenocitos murinos para una concentración de 1×10^7 cels/mL

Las células respondieron menos a la estimulación de Con A comparados con el control no tratado (0 µg/mL) y con el control de inhibición de la proliferación (tamoxifén).

Los porcentajes de reducción del crecimiento celular obtenidos fueron de 16%, 35% y 78% a concentraciones de 1, 10 y 25 µg/mL respectivamente.

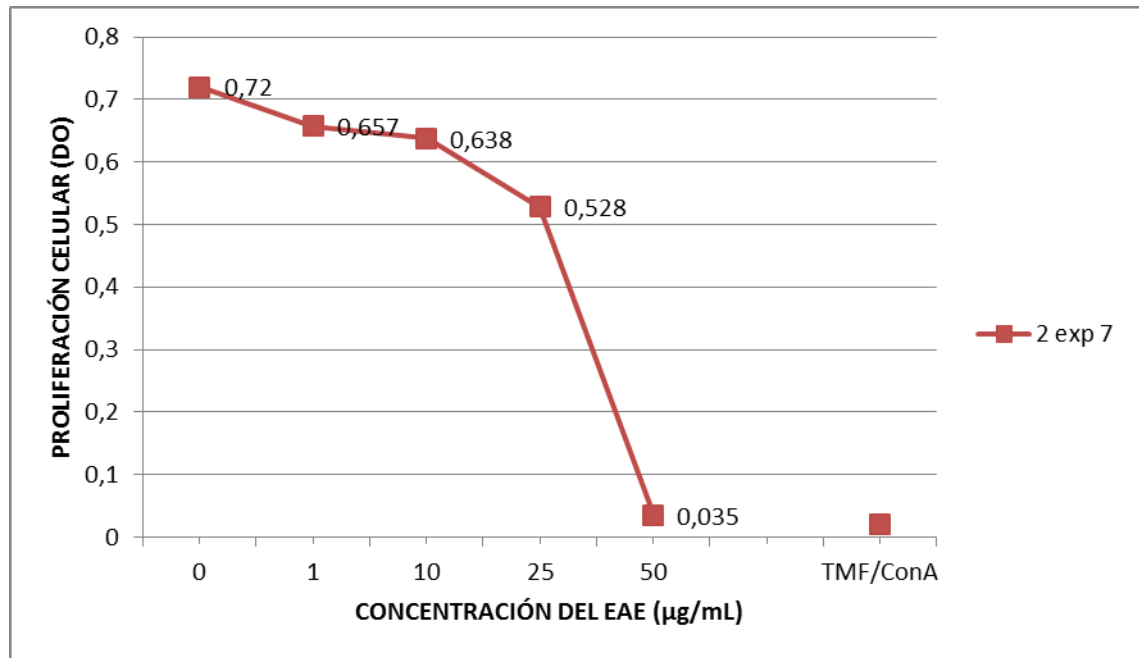


Fig. 16. Inhibición dosis-dependiente del EAE sobre la proliferación inducida por Con A en esplenocitos murinos, para una concentración de 2×10^7 cels/mL

Los resultados obtenidos con una concentración de 2×10^7 cels/mL nos indican que los valores de absorvancia se mantienen hasta una concentración de 10 µg/mL, siendo más evidente su descenso a partir de 25 y 50 µg/mL. Por esta razón solo obtuvimos los porcentajes de reducción del crecimiento celular para los resultados obtenidos con 1×10^7 cels/mL.

3. EVALUACIÓN DE EAE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ)

Inicialmente, realizamos una curva de cuantificación, titulando el estándar de IFN- γ (Interferón gamma recombinante de ratón - BD Pharmingen) de una concentración inicial de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mediante diluciones 2X, logrando una curva hasta 1000 pg/mL .

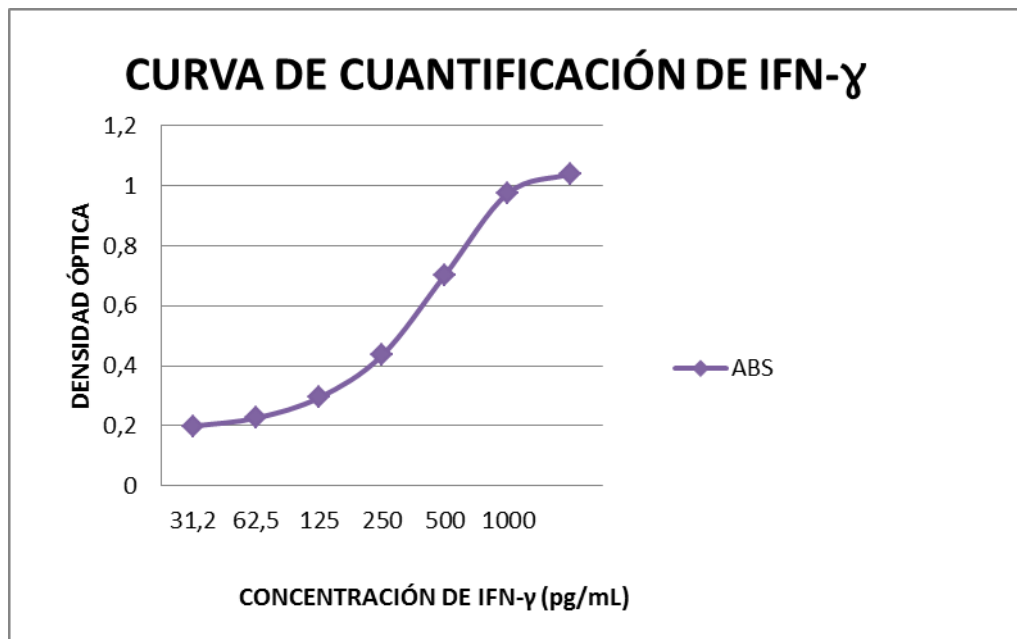


Fig.17. Curva para cuantificación de IFN- γ realizada mediante la titulación del estándar de Interferón gamma recombinante de ratón - 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (BD Pharmingen)

La producción de IFN- γ fue cuantificada utilizando el kit comercial de ELISA para Interferón de ratón (MABTECH) evaluando los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos murinos estimulados previamente con Con A y a diferentes concentraciones de EAE.

En este caso, expresamos los resultados mediante evaluación del pool de los sobrenadantes de cada triplicado, luego los evaluamos como el promedio de un duplicado.

Para determinar el efecto del extracto de evanta en la producción de IFN- γ inducida por Con A, los esplenocitos - a una concentración celular de 1×10^7 cels/mL- fueron tratados con el extracto de evanta 24 horas después de la estimulación con Con A. El IFN- γ inducido por Con A fue evidentemente disminuido a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de inhibición fue 79,2 %, comparado con el control no tratado.

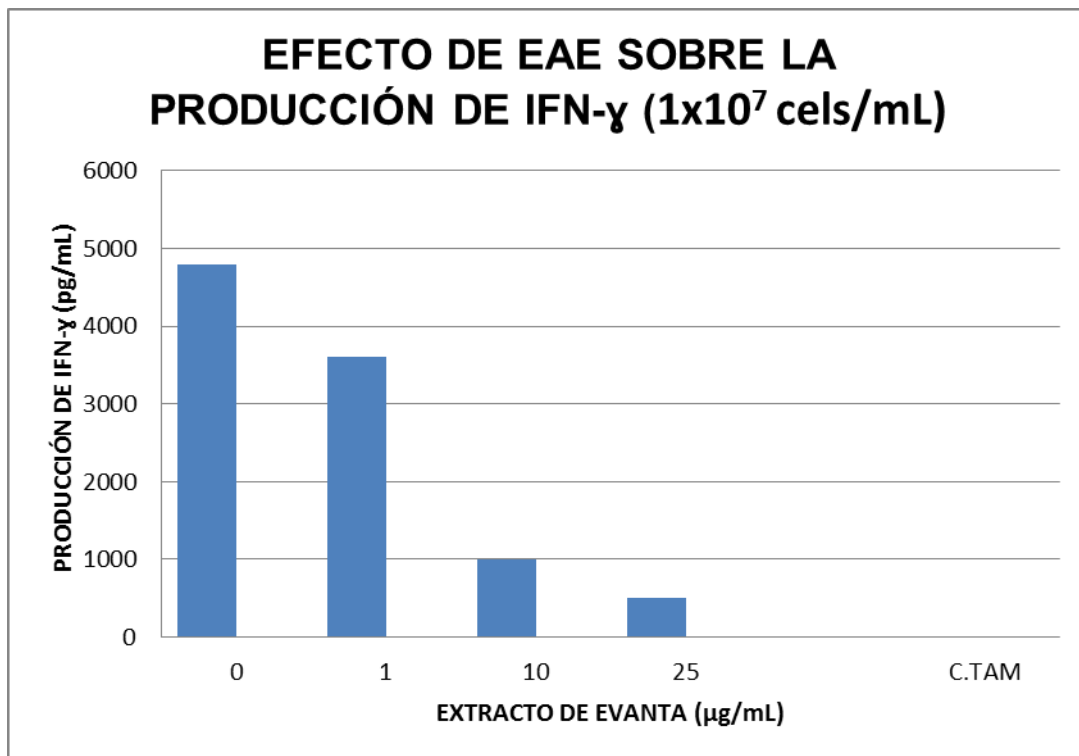


Fig.18. Evaluación del EAE sobre la producción de IFN- γ inducido por Con A. Los esplenocitos murinos a una concentración 1×10^7 cels/mL fueron sembrados pretratados con Con A y posteriormente con varias concentraciones de EAE.

Para determinar el efecto del extracto de evanta en la producción de IFN- γ inducida por Con A, los esplenocitos - a una concentración celular de 2×10^7 cels/mL- fueron tratados con el extracto de evanta 24 horas después de la estimulación con Con A. El IFN- γ inducido por Con A fue evidentemente disminuido a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de inhibición fue 91,2 %, comparado con el control no tratado.

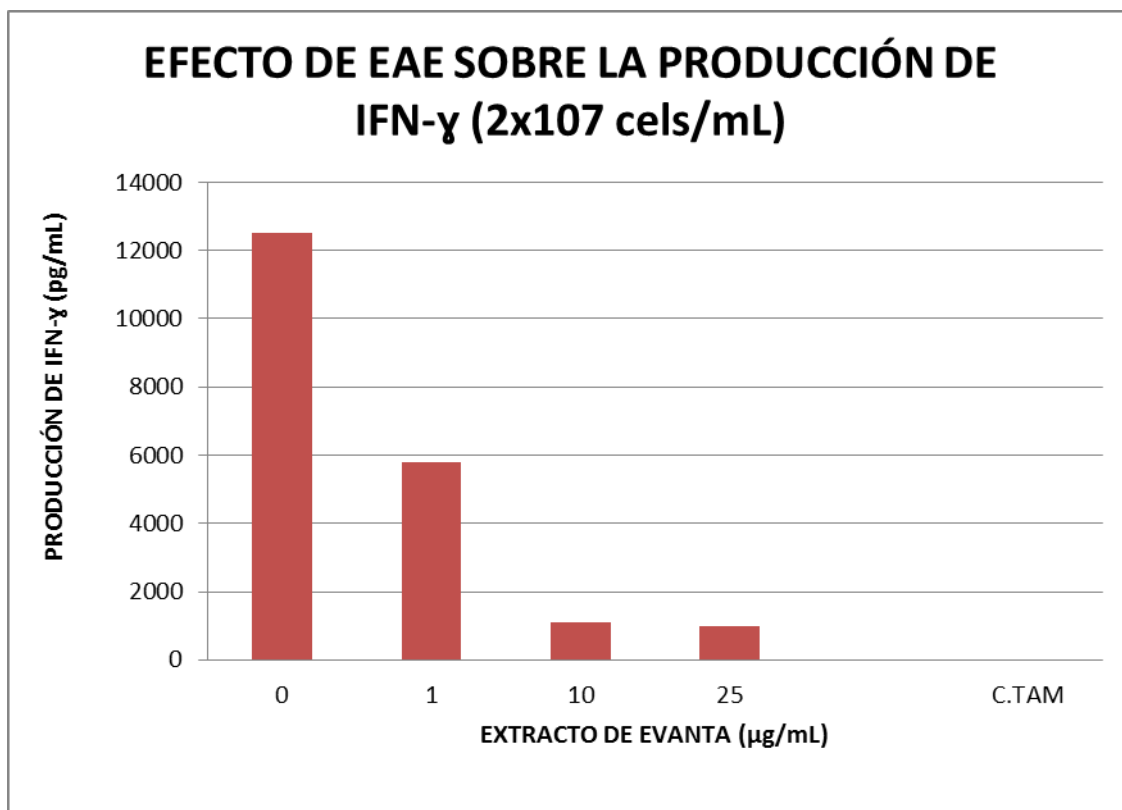


Fig.19. Evaluación del EAE sobre la producción de IFN- γ inducido por Con A. Los esplenocitos murinos a una concentración 2×10^7 cels/mL fueron sembrados pretratados con Con A y posteriormente con varias concentraciones de EAE.

La inhibición de la producción de IFN- γ por el EAE, en los cultivos de esplenocitos murinos inducidos con Con A, es evidente estando más marcada a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ para ambas concentraciones celulares (1×10^7 cels/mL y 2×10^7 cels/mL). Los porcentajes de inhibición obtenidos son 79,2% y 91,2% respectivamente lo que correlaciona a trabajos previos. Para la obtención de los mismos relacionamos la concentración de interferón- γ obtenida en los cultivos sin EAE siendo esta la concentración de proliferación al 100 %, sacando la diferencia con las concentraciones obtenidas a las diferentes concentraciones de EAE. El control de tamoxifén nos ayudo a establecer los valores en caso de ausencia de la proliferación.

XI. DISCUSIÓN

La citotoxicidad celular es una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. La técnica o ensayo del MTT que nos permitió evaluar citotoxicidad, activación y proliferación celular a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

Para la evaluación de la proliferación y citotoxicidad, la técnica inicial descrita por Mossman, tenía varias limitaciones, entre ellas la baja sensibilidad, resultados variables debido a la precipitación de proteínas en el momento de la adición del solvente orgánico para disolver el producto formazán azul, y una baja solubilidad del producto. Al respecto, los autores señalan que la aplicación directa del procedimiento tenía una sensibilidad menor que el ensayo con timidina tritiada debido a la precipitación de las proteínas. (44-46)

En nuestro caso, el suero fetal bobino y el rojo fenol del medio de cultivo, no representaron interferencia hora a la de la lectura en el espectrofotómetro, como describen algunos autores, pero podemos incluir estas variantes en una posterior experimentación para poder aumentar la sensibilidad de este método colorimétrico.

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.

La proliferación celular de los esplenocitos murinos fue evaluada con el método del MTT, observando un efecto inhibitorio de la proliferación, lo cual sugiere que el extracto de evanta tiene efecto a partir de 10 µg/mL. Por lo tanto podemos decir

que el EAE podría modificar la proliferación de células T *in vitro*, resultados similares a otros estudios previos.

Los controles de proliferación que utilizamos fueron dos, uno fue el control de células no tratadas, en el que no utilizamos ningún mitógeno, gracias al cual podemos saber cuál es la relación entre la proliferación inducida y la proliferación natural que sucede en el cultivo. Mientras que, el control negativo con Tamoxifén nos orienta a una comparación con la inhibición o ausencia total de proliferación. Los resultados de proliferación celular obtenidos con Con A, fueron primordiales ya que, a pesar de que ambas gráficas siguen el mismo patrón, elegimos el uso de la Concanavalina A para las experimentaciones subsecuentes, debido a que a continuación realizaremos pruebas de producción de interferón gamma, el cual es producido por los linfocitos T.

La producción de Interferón- γ fue inhibida en los cultivos de esplenocitos murinos tratados con Con A,

Con la finalidad de descartar posibles efectos adversos del producto vegetal, EAE (Extracto de Alcaloides de Evanta) sobre los sistemas celulares; evaluamos diferentes concentraciones del mismo. Se observó un efecto dosis-dependiente con una reducción de la proliferación celular evidente.

El porcentaje de inhibición de la proliferación de esplenocitos murinos tratados con Con A tratados con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EAE en publicaciones previas es de 41,9% \pm 9,2 (1). El porcentaje de inhibición obtenido en el presente trabajo es de 35% y por lo tanto al corresponder a este rango, correlaciona con investigaciones previas.

Por lo tanto, la técnica del MTT se optimizó como alternativa relativamente económica y fácil ejecución con el propósito de evaluar la proliferación de linfocitos en diferentes enfermedades, en respuesta a antígenos específicos.

Los resultados muestran un efecto específico inhibitorio del EAE sobre células T, afectando principalmente su funcionalidad; hecho evidenciado con el porcentaje de inhibición alto en cultivos inducidos por Con A y sobre la producción de IFN- γ .

En el caso de la leishmaniasis, algunos estudios muestran que el control y la cura de la enfermedad, no está en la completa eliminación del parásito, por esto la alta producción de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ , TNF y el NO (óxido nítrico). (37)

En el caso del IFN- γ es una citocina con un rol importante como mediador de la respuesta inmune de tipo Th1, por ello la importancia de determinar si el extracto de evanta puede inducir o inhibir la producción de citocinas como el IFN- γ , ya que la polarización de una respuesta Th1 promueve la producción de citocinas proinflamatorias. Esta inducción en la producción de estas citocinas, desencadena un aumento de la sintomatología incrementando la respuesta inflamatoria proliferativa, lo cual conlleva a un daño tisular importante junto con la disfunción inmunológica debido al síndrome inflamatorio crónico producido. Esto sugiere que para un control efectivo de la enfermedad, se debe buscar un balance entre la respuesta inmune inflamatoria y la antiinflamatoria contra leishmania. Nuestros resultados muestran que EAE inhibe la producción de IFN- γ , pero tiene un intenso efecto inhibitorio en la producción de esta citocina en células estimuladas con Con A, lo cual sugiere el efecto inhibitorio específico del EAE sobre células T. (42) Este efecto puede estar mediado por la inhibición del factor de la transcripción por la alteración de la señalización del calcio u otros componentes. Pero, el mecanismo involucrado todavía no está dilucidado. (37)

Finalmente sugerimos que la evanta controlaría o evitaría la respuesta inflamatoria (efecto anti-inflamatorio) y permitiría la eliminación del parásito (actividad leishmanicida) efectos ya descritos en investigaciones previas. (1,37)

Para poder dar más datos acerca del mecanismo y efecto de fármacos o extractos sobre efectores de la respuesta inmune, se podría realizar experimentos similares para otros tipos celulares como los Linfocitos B, macrófagos y para otros efectores de la respuesta inmune como citocinas importantes como la IL-2 e IL-10.

XII. CONCLUSIONES

Logramos optimizar la técnica del MTT como método de cuantificación de proliferación celular en esplenocitos murinos, destacando como ventaja principal la accesibilidad en cuanto a equipos y reactivos.

Evaluamos la estimulación de la proliferación celular en esplenocitos murinos tratados con Concanavalina A (Con A) y lipopolisacárido (LPS) utilizando el método del MTT y obtuvimos curvas de proliferación celular similares, logrando identificar a la vez las concentraciones celulares más adecuadas para las pruebas subsecuentes, basándonos en la proliferación observada y los controles no tratados (sin mitógenos) y con el control de inhibición de proliferación (Tamoxifén)

Evaluamos los efectos de EAE sobre la proliferación inducida por Con A en cultivos de esplenocitos. Observamos un efecto inhibitorio de la proliferación proporcional a la concentración del EAE, por lo que podemos decir que afecta la funcionalidad celular a partir de 10 ug/mL. Por lo tanto los resultados muestran un efecto específico inhibitorio del EAE sobre células T, afectando principalmente su funcionalidad; hecho evidenciado con el porcentaje de inhibición alto en cultivos inducidos por Con A y sobre la producción de Interferón gamma (INF- γ).

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calla Carrasco J., Troye Blomberg M., Fernandez C. El extracto de alcaloides de *Galipea longiflora* (evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas Proinflamatorias: factor de necrosis tumoral e interferón- γ in vitro. *BIOFARBO*. 2006. 14:57-66.
2. Terrazas Aranda Katty Irma. Efectos biológicos de la *Musa Paradisiaca* sobre el sistema inmunitario: establecimiento de sistemas de Cultivo Celular primario y medición de la activación, proliferación y funcionalidad celular. Tesis de Licenciatura. La Paz Bolivia. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas – Universidad Mayor de San Andrés. 1993.
3. Ramayo, L. G., Soba, M.G., Mundo, S.L. Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos *in vitro*. *InVet*. 2005. 7(1): 63-70.
4. Arias J., Melean E., Valero N., Et al.. Efecto de la Melatonina en la proliferación linfocitaria y la producción de Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 1 beta (IL-1 β) en esplenocitos de ratones. *Investigación Clínica*. 2003; 44 (1): 115 -126.
5. Stites Daniel. Inmunología básica y clínica, 9^o ed. Editorial el Manual Moderno. 1999.
6. Margni, R A. Inmunología e inmunoquímica. 5^o ed. Editorial medica Panamericana. 1996.
7. Brazó Aznar José V., Jorro Martinez Gemma, Manual de alergia clínica. Editorial Masson México. 2003.
8. Macías Abraham Consuelo, Robles Ninoska, Palacios Xiomara, Respuesta inmune celular en enfermos con Leishmaniasis cutánea atípica. *Revista Cubana. Hematol Inmunol Hemoter*. 1999. 15(1):25-29.
9. Martínez-Moreno A., Acosta I., Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. and Immunopathol*. 1995. 48: 209-220.
10. Borrego F., Frías M., Aguado R. y Peña J. Células y órganos del sistema inmune. 2005; 5:465-74.
11. Agudelo Sonia del Pilar, Robledo Sara. Revisión de tema: Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp., 2000, *IATREIA*, 13(3): 165-173.
12. Castés M, Trujillo D, Cabrera M, Limonta M., Estudio del interferón en pacientes con leishmaniasis cutánea americana. *Interferón y biotecnología*. 1988. 5 (2): 133-140
13. Wolfram M., Fuchs M., Wiese M., Et al. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. *Eur J Immunol*. 1996; 26(12):3153-62.
14. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*. 2004; 114:198-208.

15. Almeida A., Rocha B., Freitas A., Tanchot C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2005. 17:239-49.
16. Amich Olveiras A. Laboratorio de inmunología, 1º ed. Editorial interamericana McGraw-Hill. 1994.
17. Sánchez Pérez Miguel. Inmunología aplicada y técnicas inmunológicas. 1º ed. Editorial Síntesis. 1998.
18. Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2007; 29(12): 671–678.
19. Schwenke Hoffman Evelin Rosemarie. Evaluación del efecto de los principios activos andrografolido y 14-deoxiandrografolido en la estimulación de linfocitos B por lipopolisacárido de *Salmonella enteritidis*. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Escuela de Química y Farmacia. Chile. 2006.
20. González Parias J.L., Duque Giraldo V., Velásquez Lopera M. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología* 2010, 29(2):74-84.
21. Salguero Érica, Plaza David, Mariño Angélica, Delgado Gabriela. Cuantificación por citometría de flujo de esplenocitos CD4+, CD8+, CD19+ y CD14+ obtenidos de cuatro especies murinas empleadas en estudios de inmunotoxicología, Jun 2007, 36(1):44-54.
22. Sierra Vázquez B., Pérez S. A., Vázquez Villasuso L., Et al.. Evaluación de la respuesta inmune celular inducida en ratones Balb/C por la proteína de envoltura del virus dengue 2. *Rev Cubana Med Trop.* 1999; 51 (2): 25-36.
23. Mosmann, T., análisis colorimétrico rápido para el crecimiento celular y supervivencia: Uso a los análisis de la proliferación y de la citotoxicidad. *J. Immunol. Meth.* 1983, 65; 55-63.
24. Wagner U., Burkhardt E., Failing K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. *Vet. Immunol. and Immunopatho.* 1999. 70: 151-159.
25. Flores Orozco Raquel, Carvajal Roger, Terrazas Aranda Katty, Evaluación de la Toxicidad del extracto de Surucuina, un nuevo inhibidor de la Fosfolipasa A2, en Sistemas de Cultivo Celular. *BIOFARBO.* 2003. 11:15-20.
26. Espinoza Lila, Gómez Patricia, Calla Jacqueline. Ensayo alternativo para la medición de la activación de Neutrófilos Humanos. *BIOFARBO.* 1996. 6: 93-97.
27. Gregory, C. R., Silva H. T., Pratz J.D., Et al.. Comparative effects of malonitriloamide analogs of leflunomide on whole blood lymphocyte stimulation in humans, rhesus macaques, cats, dogs and rats. *Transplant Proc.* 1998. 30: 1047-1048.
28. Alberto Giménez. Et al.. Estudios Químicos, Biológicos y Farmacológicos de *Galipea longiflora*. *Revista Boliviana De Química.* La Paz Bolivia. 2005. 22(1):94-107.
29. Ruiz Pinell Grace, Actividad Citotóxica In Vitro en Líneas Celulares y células de Sangre Periférica Humana de los alcaloides totales de corteza de

- Galipea Longiflora (Evanta). Revista Boliviana De Química. La Paz Bolivia. 2009. 26(2):96-100.
30. Llanos Medina F., Espinoza Cruz B., Salamanca Capusiri E., Et al.. Extracción acuosa de corteza de Galipea longiflora y su actividad leishmanicida. BIOFARBO 2009. 17(2): 32-38.
 31. San Miguel Corrales Flor de María. Evaluación por ultrasonido del endometrio en pacientes con cáncer de mama tratadas con tamoxifén. Instituto de enfermedades neoplásicas. Perú. 2000. 4(12): 56-74.
 32. Soluciones y cultivos celulares. Protocolos y técnicas. <http://www.cultec.com>. 2006. 1-19.
 33. Hurtado Obregón Kristel Julhie. Respuesta de células T cocultivadas con células mesenquimales frente a mitógenos y aloantígenos en pacientes colombianos con esclerodermia. Trabajo de Grado. Bogotá Colombia. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. 2009.
 34. Bautista G.C., Acosta G.E., Toledo G.I. Et al.. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados. Vet. Mex. 2000; 31 (2): 101-106.
 35. Leiva Arjona María Magdalena. Modificación de la Respuesta Biológica por Telitromicina. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. 2008.
 36. Ganem Báez Félix Antonio, Martin Gonzales Odalys. Lectina concanavalina A: Obtención y Purificación. Universo Diagnóstico. 2000. 1(1): 1-41.
 37. Calla-Magariños J., Gimenez A., Troye-Blomberg M., Fernandez C. An Alkaloid Extract of Evanta, Traditionally Used as Anti-leishmania Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon- γ Production in Polyclonally Activated cells. Scandinavian Journal of Immunology. 2009. 69:251-258.
 38. Fournet A., Angelo Barrios A., Muñoz V., Et al.. 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993. 37(4):859-863.
 39. Fournet A., Angelo Barrios A., Muñoz V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 1994. 41:19-37
 40. Fournet A., Angelo Barrios A., Muñoz V., Hocquemiller R. Et. al.. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from Galipea Longiflora a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. Phytotherapy Research. 1994. 8:174-178.
 41. Calla-Magariños Jacqueline, Bioactive leishmanicidal alkaloid molecules from *Galipea longiflora* Krause with immunomodulatory activity. Academic dissertation for the degree of doctor of philosophy in Immunology at Stockholm University. 22 november 2012.
 42. Calla-Magariños J, Quispe Teddy, Gimenez A, Freysdotiir J. Troye-Blomberg M, Fernandez C. Quinolinic alkaloids from *Galipea longiflora* Krause suppress production of proinflammatory cytokines *in vitro* and control inflammation in vivo upon *Leishmania* infection in mice. Scand Journal immunol. 2012. Accepted

43. Calla-Magariños J., Fernandez C., Troye-Blomberg M., Freysdottir J. Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause modify the maturation of human dendritic cells and their ability to stimulate allogeneic CD4+ T cells. *International Immunopharmacology*. 2013. 16 (1): 79-84.
44. Escobar M. L.; Rivera A.; Aristazabal F., Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*. 2010. 17 (1): 67-74.
45. Bonilla J., Mesón M, Cartin W., Modificación de un método colorimétrico que usa XTT, para la determinación de linfoproliferación. *Revista Costaricense de Ciencias Médicas*. 2014. 14 (1): 19 -25.
46. Salamanca E., Ruiz G., Ticona J., Gimenez A., Método colorimétrico – XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *Biofarbo*. 2008. 16 1) : 21 – 27.
47. Perez Cocarico Gladys Elsa, Evaluación in vivo del efecto del extracto de alcaloides de evanta sobre la actividad de neutrófilos en modelo murino. Tesis de especialidad para la obtención del grado de especialidad, UMSA, FCFB, SELADIS 2014.

XIV. ANEXOS

ANEXO 1.

CÁLCULOS PARA DILUCIÓN DEL ESTÁNDAR DE INTERFERÓN GAMMA

Concentración Inicial = 2 µg/µL

- Cambiamos las unidades a µg/mL:

$$2 \text{ µg/µL} \times 1 \times 10^6 \text{ µL/ 1L} \times 1\text{L}/1000 \text{ mL} = 2000 \text{ µg/mL}$$

- Realizamos una dilución de 1/200 a 2000 µg/mL y obtenemos una concentración de 10 µg/mL
- Realizamos la conversión de µg/mL a pg/mL

$$10 \text{ µg/mL} \times 1\text{g}/1 \times 10^6 \text{ µg} \times 1 \times 10^{12} \text{ pg/1g} = 1 \times 10^7 \text{ pg/mL}$$

- Realizamos dos diluciones 1/100 y luego ½ módulo 2X con PBS, de la siguiente forma para obtener diferentes concentraciones y lograr los puntos de la curva de estandarización del interferón gamma.

1/100	↪	1x10 ⁷ pg/mL	
1/100	↪	1x10 ⁵ pg/mL	
1/2	↪	1000 pg/mL	H
1/2	↪	500 pg/mL	G
1/2	↪	250 pg/mL	F
1/2	↪	125 pg/mL	E
1/2	↪	62,5 pg/mL	D
1/2	↪	31,25 pg/mL	C
1/2	↪	15,6 pg/mL	B
1/2	↪	7,81 pg/mL	A