

TESIS DEFENDIDA POR

Mayra Fabiola López de la Torre

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Ana Denisse Re Araujo

Director del Comité

Dr. Miguel Avalos Borja

Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del programa de posgrado en
Ciencias*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

3 de Diciembre de 2010

RESUMEN de la tesis de Mayra Fabiola López de la Torre, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada Baja California. Diciembre 2010.

Estudio de la respuesta inmunológica celular obtenida al exponer células de ratones Balb/c a extractos del alga parda *Macrocystis pyrifera*

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Denise Re Araujo

Directora de Tesis

Algunos los polisacáridos extraídos de plantas, como las algas marinas, tienen propiedades terapéuticas que ofrecen una alternativa como tratamiento profiláctico. Los inmunomoduladores actúan en diferentes niveles del sistema inmune, por esto la necesidad de desarrollar agentes que puedan inhibir o intensificar selectivamente células para la respuesta inmunológica ó producir mediadores como las citocinas. *Macrocystis pyrifera* es una alga parda gigante que habita en la costa oeste de Norteamérica. Su disponibilidad en la región la distingue como una buena opción de investigación y un buen recurso para su estudio y explotación. Se determinó si las fracciones de *M. pyrifera* (MpA, MpB y MpAC) tienen funciones de inmunoestimulante inmunológico al inyectarlos con rESAT-6 en ratones Balb/c y si inducen la producción de algunos factores inmunológicos (TNF- α , IL-6, ON, proliferación) en la línea celular RAW 264.7.

Se determinó que MpA, MpB y MpAC tienen efecto inmunoestimulante. La disminución en la densidad celular en el ensayo *in vivo-in vitro*, puede deberse a que rESAT-6 promueve la apoptosis de macrófagos por la activación de las caspasas. Sin embargo, considerando lo reportado por Soltys y Quinn (1998), el efecto de MpB al disminuir la densidad celular, puede indicar que ésta fracción reprime la producción de citocinas proinflamatorias, sugiriendo pueden modular la inducción de citocinas durante la sepsis. MpA, MpB y MpAC indujeron la producción de TNF- α , IL-6 y de óxido nítrico por RAW 264.7. Las tres fracciones presentaron citotoxicidad.

Palabras clave: *Macrocystis pyrifera*, polisacáridos, inmunomodulación, inmunoestimulante, ESAT-6, Fucoidán, Laminarián, TNF- α , IL-6, citotoxicidad, macrófagos, RAW 264.7.

ABSTRACT of the thesis presented by Mayra Fabiola López de la Torre as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Life Science with orientation on Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México December, 2010.

Abstract:

Study of the cellular immune response obtained when Balb/c mouse cells are exposed to extracts from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera*

Some polysaccharides extracted from plants, such as seaweeds, have therapeutic properties that offer an alternative as prophylactic treatment. Immunomodulators act in different levels in the immune system, this is why the necessity of developing agents capable to inhibit or selectively intensify certain cells to have a proper immune response or to produce mediators such as cytokines.

Macrocystis pyrifera is a giant brown seaweed that lives in North America's west coast. Its availability in this region is a distinctive to take this plant as a good choice to research and as a good source of study and to exploit.

In this thesis we studied if the *M. pyrifera* fractions (MpA, MpB y MpAC) have function as immunological adjuvant when they are injected with rESAT-6 in to Balb/c mice. We also studied if they induce RAW 264.7 to proliferate or to produce some immunological factors such as TNF- α , IL-6 and ON.

MpA and MpB had immunostimulant properties. The decrease in the cellular density observed in the *in vivo*-*in vitro* assay, could be due to the presence of rESAT-6, since this protein induce apoptosis in macrophages by activating caspasas. Nevertheless, considering what Soltys and Quinn (1998) reported, MpB's decreasing cell density effect, could indicate that is repressing proinflammatory cytokine production, suggesting that this fraction could be acting as a cytokine modulator during sepsis. MpA, MpB and MpAC induced RAW 264.7 to produced TNF- α , IL-6 and nitric oxide. All three fractions have cytotoxicity regarding this cell line.

Keywords: *Macrocystis pyrifera*, polysaccharides, immunomodulation, adjuvant, ESAT-6, fucoidan, laminaran, TNF- α , IL-6, cytotoxicity, macrophages, RAW 264.7.

A mi familia por su apoyo,
y principalmente, a mi esposo Gustavo.

A mi familia no sanguínea de CICESE y la UMA.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada durante los estudios de maestría y por el apoyo económico durante la estancia en Málaga, España.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada CICESE; al programa de posgrado en ciencias, a los departamentos de Biotecnología Marina, Acuicultura y Microbiología, así como también a servicios escolares por su continuo apoyo.

A la Universidad de Málaga UMA, por el apoyo en la realización de una estancia de tres meses para complementar los estudios de este trabajo.

A la Dra. Denise Re, por su confianza, guía, apoyo constante y su entusiasmo en la realización de este trabajo y en mi crecimiento profesional.

Al Dr. Alexei Licea, por todo el apoyo durante los dos años de maestría, su asesoría y empuje a mi crecimiento.

Al Dr. Miguel Avalos y al Dr. Pedro Negrete por su confianza y apoyo en la mejora constante de este trabajo y por hacer el proceso más ameno.

Al Dr. Félix Figueroa, por su entusiasmo, confianza y apoyo en la realización de este proyecto. A su familia por abrirme las puertas de su casa.

Al Dr. Roberto Abdala, por su asesoría constante y su empuje para la realización de este proyecto.

Al M.C. Pavel Lugo, por proporcionar la cepa de *E. coli* productora de rESAT-6 requerida para la realización de este trabajo.

Al M. C. Pilar Bonilla, por compartirme su experiencia.

A los integrantes del departamento de Ecología y de Cultivo Celular de la UMA por su asesoría y apoyo personal y académico.

A los investigadores y estudiantes del Servicio Central de Apoyo a la Investigación SCAI por permitirme trabajar en sus instalaciones y por sus asesorías.

A mis compañeros de maestría por su apoyo durante los dos años, tanto a nivel personal como académico.

A mis amistades de Málaga, por no permitir que me sintiera sola durante los 3 meses de estancia y por haber dejado una huella grata en mi vida.

A mi amiga María del Pilar, por haberse convertido en una hermana para mí.

A mi madre y a mis hermanas Laura y Claudia, por su apoyo incondicional y su ejemplo, las amo.

A mi gran esposo, por sacrificar nuestro tiempo juntos para la realización de este trabajo, por su comprensión, su paciencia y empuje para mi crecimiento constante.

Contenido

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
II.1. Experimentos realizados en esta tesis.....	10
II.2. Descripción breve de las técnicas de análisis y herramientas utilizadas.....	12
III. Justificación.....	19
IV. Hipótesis.....	20
V. Objetivo General.....	20
VI. Objetivos específicos.....	20
VII. Materiales y métodos.....	21
VII.1. Extractos de <i>M. pyrifera</i>	21
VII.2. Análisis de Infrarrojo de las fracciones de <i>M. pyrifera</i>	24
VII.3. Determinación de la actividad inmunoestimulante de las fracciones de <i>Macrocystis pyrifera</i> en ratones Balb/c.....	25

VII.4. Cultivo celular de RAW 264.7 y exposición a las fracciones de <i>M. pyrifera</i>	37
VIII. Resultados.....	43
VIII.1. Obtención de polisacáridos ácidos a partir de <i>M. pyrifera</i>	43
VIII.2. Análisis de Infrarrojo de las fracciones de <i>M. pyrifera</i>	43
VIII.3. Obtención de rESAT-6	47
VIII.4. Estandarización del método de disección y del establecimiento de cultivo celular primario a partir de nódulos linfáticos de ratón.....	51
VIII.5. Estandarización de Concanavalin A.....	53
VIII.6. Determinación por ensayos de proliferación celular de la actividad inmunoestimulante de las fracciones de <i>Macrocystis pyrifera</i> en ratones Balb/c.....	57
VIII.7. Cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 y exposición a las fracciones de <i>M. pyrifera</i>	64
VIII.8 Análisis estadístico	82
IX. Discusión	84
IX.1. Polisacáridos extraídos de <i>M. pyrifera</i>	84
IX.2. Determinación por ensayos de proliferación celular de la actividad inmunoestimulante de los extractos de <i>Macrocystis pyrifera</i> en ratones Balb/c.....	86
IX.3. Cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 y exposición a los extractos de <i>M. pyrifera</i>	92
X. Conclusiones.....	96
XI. Recomendaciones.....	97

XII. Referencias	98
Apéndice I: Glosario.....	107
Apéndice II: Espectros para identificación contra bibliotecas espectrales	116
Apéndice III: Preparación de soluciones.....	128

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Diagrama general de la metodología	11
Figura 2. a) ELISA directo; b) ELISA sándwich directo (DAS: Sandwich de doble anticuerpo) (Crowther, 1995).....	15
Figura 3. ELISA sándwich directo para cuantificar la IL-6 contenida en el medio de cultivo de los macrófagos expuestos a las fracciones de <i>M. pyrifera</i> . Imagen adaptada de R&D Systems Inc (2010).	16
Figura 4. Procedimiento seguido por Bonilla (2010) para la obtención de polisacáridos solubles a partir de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Rioux et al. 2007).	21
Figura 5. Procedimiento para la obtención de polisacáridos ácidos a partir de <i>M. pyrifera</i>	22
Figura 6. 1er. (izquierda) y 2do. (derecha) lavado de la harina seca de <i>M. pyrifera</i> con etanol para eliminar los pigmentos.	23
Figura 7. Polisacáridos ácidos de la harina de <i>M. pyrifera</i> precipitados al agregar cetavión 2%	23
Figura 8. (a y b) se coloca con cuidado la pastilla de la fracción. (c) Se coloca la base dentro de la plataforma por donde pasa el rayo de infrarrojo en el espectrómetro FT-IR. (d) Se corre la lectura del blanco y se lee la pastilla.....	25

Lista de Figuras (continuación)

	Página
Figura 9. Diseño de placa para detectar rESAT-6 por medio de un ELISA.....	26
Figura 10. Ubicación de los nódulos linfáticos poplíteos (Van den Broeck, 2006).	30
Figura 11. Diseño de la placa de 96 pocillos para determinar la concentración de Concanavalin A más adecuada.....	32
Figura 12. Jaulas de acrílico con los ratones de la cepa Balb/c.....	34
Figura 13. Inmunización subcutánea en el cojinete plantar de la extremidad inferior de un ratón de la cepa Balb/c.....	36
Figura 14. Diseño de placa para determinar la respuesta inmunológica <i>in vitro</i> con rESAT-6.	36
Figura 15. Diseño de las placas de cultivo de 24 pocillos para cultivo de RAW 264.7 con los 3 extractos de <i>M. pyrifera</i>	38
Figura 16. Diseño de la placa de 96 pocillos para la determinación de la cantidad de IL-6 y TNF- α	39
Figura 17. Diseño de la placa de 96 pocillos para el ensayo de óxido nítrico.	41
Figura 18. Diseño de placa utilizado para determinar la citotoxicidad de las fracciones MpA, MpB y MpAC.....	42

Lista de Figuras (continuación)

	Página
Figura 19. Polisacáridos ácidos liofilizados a partir de harina de <i>M. pyrifera</i>	43
Figura 20. Espectro de infrarrojo de la fracción MpA	44
Figura 21. Espectro de infrarrojo de la fracción MpB	44
Figura 22. Espectro de infrarrojo de la fracción MpAC.....	45
Figura 23. Estructura química de los compuestos semejantes al extracto MpA de acuerdo con el análisis de infrarrojo y el porcentaje de similitud.	46
Figura 24. Estructura química de los compuestos semejantes al extracto MpB de acuerdo con el análisis de infrarrojo y el porcentaje de similitud.	46
Figura 25. Estructura química de los compuestos semejantes al extracto MpAC de acuerdo con el análisis de infrarrojo y el porcentaje de similitud.	47
Figura 26. ELISA de inducción. En el eje x se observan los valores de absorbancia leídos a una longitud de onda de 405nm. Las barras presentan el promedio de la absorbancia obtenida para el control negativo (azul), el control positivo (rojo) y la muestra (verde).	48
Figura 27. ELISA para detectar rESAT-6 en los volúmenes obtenidos durante su purificación con la columna Histrap™.....	49

Lista de Figuras (continuación)

	Página
Figura 28. Curva estándar del ensayo Micro BCA para determinar la concentración total de proteínas. Determinación de la concentración de rESAT-6.....	50
Figura 29. Caja de cultivo obtenido por digestión enzimática. Se observa la turbidez del medio por la contaminación bacteriana.	51
Figura 30. Caja de cultivo obtenido por maceración mecánica. Las figuras circulares con núcleo iluminado se identifican como células vivas.....	52
Figura 31. Técnica de maceración mecánica de los nódulos de ratón utilizada en los ensayos enviar a resultados	52
Figura 32. Ensayo colorimétrico MTS para determinar si una densidad celular de 2.5×10^5 células por pocillo es apropiada para el ensayo donde se probarán las fracciones de <i>M. pyrifera</i> como inmunoestimulantes inmunológicos.....	54
Figura 33. Ensayo de viabilidad celular Celltiter 96® One Solution. Comparación entre la lectura de diferentes densidades celulares, para determinar la más adecuada respecto al control negativo.	55
Figura 34. Curva estándar del ensayo Micro BCA para determinar la concentración total de proteínas. Determinación de la concentración de ConA.	56
Figura 35. Ensayo colorimétrico Celltiter 96 ® One Solution para determinar la concentración y tiempo de exposición apropiados para utilizar ConA como control positivo de la proliferación de linfocitos T.....	57

Lista de Figuras (continuación)

	Página
Figura 36. Ensayo de proliferación celular para determinar el mejor tiempo de exposición a rESAT-6 utilizando las células provenientes de los ganglios de ratón inmunizados con rESAT-6 y PBS1X (Grupo 0) y con rESAT-6 y adyuvante completo de Freund (ACF) (Grupo 1).....	58
Figura 37. Ensayo de proliferación celular para determinar el efecto inmunoestimulante de diferentes concentraciones de las fracciones MpA y MpB. A: MpA; B: MpB; 100: 100 µg; 0.5: 0.5 µg; c: desafiados con rESAT-6 <i>in vitro</i> ; la ausencia de "c" indica que no fueron desafiad.....	60
Figura 38. Ensayo de proliferación celular para determinar el efecto inmunoestimulante de las fracciones combinados en diferentes proporciones: A70B30: 70% de A + 30%B; A30B70:30% de A + 70%B; A50B50:50% de A + 50%B.....	62
Figura 39. Gráficas de la producción de TNF-α al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpA (a) y el extracto MpB (b).....	66
Figura 40. Gráfica de la producción de TNF-α al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpAC.....	67
Figura 41. Gráfica de la producción de TNF-α al exponer macrófagos RAW 264.7 al LPS como control de la capacidad de las células para producir ésta citocina.	69
Figura 42. Gráficas de la producción de IL-6 al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpA (a) y el extracto MpB (b)	72
Figura 43. Gráfica de la producción de IL-6 al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpAC.....	74

Lista de Figuras (continuación)

	Página
Figura 44. Gráfica de la producción de IL-6 al exponer macrófagos RAW 264.7 al LPS como control de la capacidad de las células para producir ésta citocina.	75
Figura 45. Concentración de ON producido por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a diferentes concentraciones de MpA expuestos durante 24 h y 48 h.....	76
Figura 46. Concentración de ON producido por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a diferentes concentraciones de MpB expuestos durante 24 h y 48 h.....	77
Figura 47. Concentración de ON producido por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a diferentes concentraciones de MpAC expuestos durante 24 h y 48 h.....	77
Figura 48. celular (%) al exponer los macrófagos (20,000 células ml ⁻¹) a las fracciones de <i>M. pyrifera</i> con diferentes concentraciones durante 24 h.	78
Figura 49. Viabilidad celular y producción de IL-6 y TNF- α al exponer los macrófagos RAW 264.7 al extracto MpA.....	80
Figura 50. Viabilidad celular y producción de IL-6 y TNF- α al exponer los macrófagos RAW 264.7 al extracto MpB.....	80
Figura 51. Viabilidad celular y producción de IL-6 y TNF- α al exponer los macrófagos RAW 264.7 al extracto MpAC.....	81

Lista de tablas

	Página
Tabla I. Diseño experimental (<i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>) para determinar el efecto de las fracciones de <i>M. pyrifera</i> en ratones Balb/c.	35
Tabla II. Viabilidad celular (%) al exponer los macrófagos (RAW 264.7) a diferentes concentraciones de LPS.	81
Tabla III. Resumen de resultados. Cantidad de TNF- α , IL-6, ON y proliferación celular al exponer la línea celular RAW 264.7 a las fracciones de <i>M. pyrifera</i> (MpA, MpB y MpAC) durante 24 h y 48 h.	82
Tabla IV. Comparación de las concentraciones de TNF- α e IL-6 en (pg ml ⁻¹) encontrada en este estudio en los estudios <i>in vitro</i> con estudios <i>in vivo</i> en ratón (Abram et al. 2000) y en humanos (Sabry et al 2006).	94

I. Introducción

Una de las alternativas más recientes y prometedoras, dirigidas a la aplicación clásica de antibióticos como tratamiento contra enfermedades, es el uso de inmunomoduladores para aumentar las respuestas de defensa del organismo hospedero (Tzianabos, 2000).

En la búsqueda de nuevos métodos de prevención de enfermedades se han realizado estudios sobre sustancias inmunoestimulantes que pueden reforzar el sistema inmune, permitiendo disminuir las concentraciones de antibióticos y antiparasitarios utilizadas.

La aplicación de antibióticos a un individuo es exclusivo para el tratamiento de infecciones y no para su prevención, mientras que las sustancias inmunoestimulantes son utilizadas previa a que la enfermedad aparezca. Las desventajas de los tratamientos con antibióticos pueden ser: alergias, disbacteriosis (eliminación de bacterias buenas presentes en el hospedador), desequilibrio de las poblaciones microbianas en el individuo, resistencia de la bacteria a los antibióticos, toxicidad (daños a tejidos como hígado y riñón) y finalmente el costo del tratamiento. Todos estos efectos negativos pueden evitarse con el uso de métodos que prevengan la infección por la presencia de patógenos.

Los inmunomoduladores actúan en diferentes niveles del sistema inmune, por esto la necesidad de desarrollar agentes que puedan inhibir o intensificar selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células para la respuesta inmunológica, tales como: linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células asesinas NK y citotóxicas (CTL), o producir mediadores solubles como las citocinas (Morris et al. 1999; Stites et al. 1985).

Los vertebrados tienen un sistema inmunológico complejo que es capaz de reconocer antígenos específicos y así responder de manera eficiente a un evento

infeccioso. El sistema inmunológico del ratón es semejante al del ser humano, tiene una respuesta inmune humoral (anticuerpos producidos por linfocitos B) y otra mediada por células (linfocitos T citotóxicos, macrófagos, linfocitos T asesinos naturales y liberación de citocinas como TNF- α , IFN- γ , etc.).

Esta tesis pretende determinar si las fracciones de *M. pyrifera* inducen en una línea celular (RAW 264.7) la producción de algunos factores inmunológicos (citocinas, proliferación celular, etc.) y si tienen funciones de inmunoestimulante inmunológico al inyectarlos con un inmunógeno en ratones Balb/c como modelo de estudio.

II. Antecedentes

El mecanismo de acción de los inmunomoduladores puede ser de acción específica o inespecífica. Los inmunomoduladores que actúan inespecíficamente son agentes que logran estimular o suprimir la respuesta inmune, sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado (Martínez, 2005). Los inmunomoduladores de acción específica ejercen su acción sobre células del sistema inmune, atribuible a la presencia de un antígeno o inmunógeno dado, por lo que hay especificidad selectiva en la acción de estas células para producir una respuesta inmune. La inmunomodulación es selectiva cuando hay estimulación y su resultado significa una inmunorreacción hacia un antígeno o varios, como es el caso de los inmunoestimulantes inmunológicos o las vacunas terapéuticas (Gupta et al. 1996, Stites et al. 1985 y TaKx, 1992).

Se ha demostrado que una variedad de polisacáridos extraídos de diferentes fuentes tienen la habilidad de estimular el sistema inmune, comportándose como inmunomoduladores (Soltanian et al.; 2009). Los compuestos clasificados como inmunomoduladores son aquellos capaces de interaccionar con el sistema inmune para regular positiva o negativamente aspectos específicos de la respuesta del hospedero (Tzianabos, 2000). Farmacológicamente, estos compuestos se clasifican como modificadores de la respuesta biológica (MRB) (Soltanian et al. 2009). El hecho de que un compuesto aumente o reprima las respuestas del sistema inmunológico depende de varios factores como son: dosis, ruta de administración y tiempo de administración del compuesto (Tzianabos, 2000).

Los polisacáridos aislados de fuentes botánicas (hongos, algas, líquenes y plantas superiores) han atraído gran atención en el campo biomédico debido a su amplio espectro de propiedades terapéuticas y por su toxicidad relativamente baja. (Paulsen, 2001; Schepetkin y Quinn, 2006; Tzianabos, 2000; Wasser, 2002).

Castro et al. (2004) sugieren que la capacidad estimuladora de las fracciones hidrosolubles de las algas marinas está asociada a los polisacáridos; se ha demostrado que estas sustancias pueden modificar la actividad de algunos componentes del sistema inmune en mamíferos y en peces, e incrementar la protección frente a ciertas enfermedades.

Los polisacáridos obtenidos de algas marinas utilizados como inmunoestimulantes son: el carragenano, alginato de sodio, ergosa, laminarían β -Glucano) y fucoidán (Castro et al. 2004 y Ponce et al. 2003). Con excepción del primero, en todos los demás abundan en las algas pardas y el contenido de polisacáridos hidrosolubles varía entre el 40% y 80% de su biomasa seca (Zvyagintseva et al. 1999). Generalmente las algas pardas contienen, laminarinal, manitol, celulosa, alginatos y fucoidán, Se tienen reportes de las funciones inmunomoduladoras del polisacárido fucan sulfatado o fucoidán extraído de algas pardas. Siendo el Fucoidán uno de los mayores constituyentes de la pared celular de estas algas (Leung, et al. 2006).

El Fucoidán es un polímero de L-fucosas unidas de manera general por enlaces α -1,2 y la sulfatación ocurre principalmente en la posición O-4. (Aspinall y Monteiro, 1996). Éste polímero puede contener también xilosa, galactosa, manosa, glucosa, ramnosa, y ácido glucurónico. (Nishino et al. 1994; Ponce et al. 2003).

Algunos polisacáridos procedentes de algas marinas, como la *Periandra mediterránea* (Pereira et al. 2000), *Endarachne binghamiae* (Huang y Lee 2005), *Hisikia fuziformis*, *Derbesia marina* (Seo et al. 2006) y *Hydropuntia cornea* (Diaz-Rosales et al. 2007) entre otros, han mostrado tener algún tipo de actividad inmunoestimulante, ya sea por aumento en la proliferación de células inmunológicas o por el aumento de la producción de citocinas.

Macrocystis pyrifera, pertenece al orden de las laminarias; también conocida vernáculamente como sargazo gigante, huiro, sargazo, cachiyuyo o chascón, *Macrocystis pyrifera* es un alga parda gigante que puede formar bosques submarinos. El hábitat de esta especie está en la parte somera de la zona de

mareas, y las mayores profundidades a las que se les ha encontrado corresponden a los 40.3 m., en áreas de fondo rocoso, formando mantos densos de grandes extensiones (Guzmán del Proo et al. 1986). Esta alga se encuentra en la costa oeste de Norteamérica, desde la península de Monterrey en California Central, hasta la mitad de la Baja California en la costa oeste. Se distribuye en las costas de Tasmania, Australia, Perú, Chile, y Argentina. (Cruz-Suarez et al. 2000).

M. pyrifera tiene una gran variedad de usos industriales, desde 1998 *M. pyrifera* ha sido siendo utilizada en algunos alimentos comerciales para engorda de camarón como “agente aglutinante” y como “aditivo inmunoestimulante” (Tordoya-Romero, 2008). En California, USA se utiliza en la Industria del alginato (Kelco), en forma de harina o alga deshidratada para consumo animal o humano y para uso farmacéutico (Productos del Pacífico, México) (Cruz-Suarez et al. 2000).

Estudios realizados por Cruz-Suarez et al. (2000) manifiestan que esta alga mejora las condiciones fisiológicas del camarón gracias a sus compuestos como alginato de sodio (18 - 26%) y fucoidán, polisacárido sulfatado, (0.5 – 2%). Estos dos compuestos poseen diversas actividades biológicas, como la de incrementar la actividad fagocítica, la actividad anticoagulante y antitrombótica, así como producir un efecto antiinflamatorio, antitumoral y antiviral (Castro et al. 2004, Ponce et al., 2003 y Zvyagintseva et al. 2003).

Se piensa que los mecanismos involucrados en las propiedades terapéuticas de los polisacáridos botánicos se deben a la modulación de la respuesta inmunológica innata, más específicamente el aumento y/o activación de las respuestas inmunológicas de los macrófagos; esto conduce a la inmunomodulación, a la actividad antitumoral y a otros efectos terapéuticos (Schepetkin y Quinn, 2006).

La defensa inmunológica en humanos es compleja y de multinivel, involucrando muchos tipos de células con distintas funciones (Janeway y Medzhitov, 2002).

Entre los tipos de células involucradas en la respuesta temprana a una invasión por organismos patógenos, están los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos) que son los participantes clave en la respuesta innata inmune (Janeway y Medzhitov, 2002 y Uthaisangsook, 2002).

La respuesta Inmunológica celular es la respuesta inmune mediada por células que no involucra anticuerpos (producidos por linfocitos B) o el sistema del complemento (proteínas fundamentales en la respuesta inmunitaria), pero si involucra la activación de macrófagos, asesinos naturales (NK por sus siglas en ingles), linfocitos T citotóxicos (LTC) y la liberación de varias citocinas en respuesta a la presentación de un antígeno. La inmunidad celular es dirigida principalmente a los microbios que sobreviven la fagocitosis y los que infectan células no fagocíticas. Además participa en la defensa contra hongos, protozoarios, cáncer y bacterias intracelulares (Abbas, et al. 2007).

Los macrófagos, junto con los neutrófilos constituyen el principal mecanismo de defensa del organismo frente agentes extraños como los microorganismos (Abbas et al. 2007). A diferencia de otras células del sistema inmunológico, tales como los linfocitos B y T, los cuales en condiciones basales se encuentran en reposo y cuya activación siempre conlleva un proceso de expansión clonal caracterizado por una elevada tasa proliferativa, los macrófagos, o bien se encuentran proliferando, o bien se activan, dejan de proliferar y pasan a ejercer sus funciones específicas (Comalada, 1998). Los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunológica. Estas células actúan como mediadoras de innumerables mecanismos diferentes dentro de la respuesta inmunológica, no sólo participan en la inmunidad natural, sino que además, están adaptados para desempeñar funciones esenciales en la inmunidad específica adquirida, tanto humoral como mediada por células (Comalada, 1998). De forma basal, los macrófagos se encuentran en disposición de realizar una serie de funciones sin necesidad de ningún tipo de estímulo, aunque muchas de éstas pueden realizarse con mayor eficiencia tras la activación de la célula (Comalada, 1998).

La activación de los macrófagos es un proceso complejo y estrictamente controlado que consiste en una serie de modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales que culminan en el aumento del potencial de la célula para ejercer funciones complejas, tales como la presentación de antígenos, la lisis de células tumorales y la actividad bactericida. Los agentes más potentes en la activación de los macrófagos son la citocina IFN- γ y el lipopolisacárido (LPS), aunque también otros agentes como el GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-2, IL-4 y TNF- α pueden inducir algunos aspectos de la activación (Celada, 1994; Celada y Nathan, 1994 y Hamilton y Adams, 1987).

Durante la respuesta inmunológica adquirida mediada por células, los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno (APC, antigen presenting cell), es decir, procesan antígenos extraños y los presentan en su superficie para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T. Además, producen una serie de proteínas que, una vez secretadas o expresadas en la membrana celular, promueven la activación de los linfocitos T.

Algunos polisacáridos derivados de 35 especies de plantas han mostrado aumentar la función de los macrófagos, particularmente en la actividad citotóxica contra células tumorales y microorganismos, así como la actividad fagocítica, la producción de óxido nítrico, en la secreción de citocinas y quimiocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, interferón (IFN)- γ e INF- β 2 (Schepetkin y Quinn, 2006 y 2005). La actividad inmunomoduladora de polisacáridos derivados de plantas no involucra solamente los efectos en la activación de los macrófagos, sino también la proliferación y diferenciación celular (Schepetkin y Quinn, 2006).

Las citocinas son mensajeros utilizados por varios tipos celulares en su comunicación. Como señales moleculares que regulan en las células funciones de proliferación, diferenciación, movimiento, supervivencia y muerte celular. A nivel fisiológico tienen a su vez un papel regulador en procesos como: la respuesta

inmune, la hematopoyesis y la inflamación (Arai et al. 1990), etc. Algunos ejemplos de citocinas son IL-2, IL-6, TNF- α , IL-10, INF- γ , etc.

Las citocinas presentan características en común (Balkwill y Burke 1989):

- Son proteínas glucosiladas de bajo peso molecular (generalmente menores de 80kD).
- Extremadamente potentes: actúan en concentraciones picomolares.
- En general se producen de forma transitoria y local, transmitiendo la información entre células de un tejido o entre varios tejidos con mecanismos preferentemente de tipo paracrino y autócrino.
- Interaccionan con receptores de superficie específicos para cada citocina o grupo de citocinas, siendo escaso el número necesario de ellos para producir el efecto biológico.
- La unión de una citocina a su receptor conduce a una señal de transducción que modula la expresión génica alterando en definitiva el comportamiento de la célula.
- Son reguladas por muchos factores como son, su concentración local en el medio, el tipo de célula productora, la unión simultánea de otras citocinas a la célula y otras señales de transducción paralelas.
- Las citocinas interaccionan en una red compleja: una citocina induce a otras, modula la expresión de receptores de citocinas (el propio o el correspondiente a otra) y pueden interactuar de forma sinérgica o antagónica sobre la misma célula.
- Implicadas en los procesos de inmunidad e inflamación regulan el comienzo, la amplitud y la duración de la respuesta.

Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina que participa en la inmunidad innata y adaptativa. Se sintetiza por macrófagos, Linfocitos T, células endoteliales y linfoblastos en respuesta a microorganismos y a otras citocinas como IL-1 y TNF. En la

inmunidad adaptativa la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos. IL-6 también actúa como factor de crecimiento autócrino. Favorece las relaciones inmunitarias celulares estimulando la síntesis de algunas citocinas proinflamatorias e inhibiendo la generación y las acciones de los linfocitos T reguladores que actúan suprimiendo la activación del sistema inmune manteniendo la homeostasis (Abbas *et al.*, 2007).

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos infecciosos. Su principal origen celular son los macrófagos, linfocitos T estimulados y las NK. El estímulo más potente para activar la síntesis de TNF- α por macrófagos es la presencia de lipopolisacáridos. La principal función del TNF- α es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos a los focos de infección y activar a estas células para que erradiquen a los microorganismos (Abbas *et al.*, 2007).

Óxido nítrico (ON)

El ON es un miembro importante de la familia de los mediadores biológicos de señales, es producido por una familia de enzimas conocidas como sintetasa del óxido nítrico (NOS's), estas convierten a L-arginina a ON y L-citrulina utilizando oxígeno y NADPH como cofactores (Weissman y Gross. 2001).

Los macrófagos liberan ON, el cual es conocido también, por estar involucrado en la defensa antitumoral y es un mediador de la inflamación (Cui et al. 1994 y Dileepan et al. 1995). Evidencias recientes indican que ON podría interactuar con aniones superóxido derivados de células transformadas y de este modo generar el inductor apoptótico peroxinitrito. (Heigold et al. 2002 y Herdener et al. 2000). La

producción del anión extracelular representa un sello del estado de transformación. La generación de peroxinitrito basada en la interacción de ON con aniones de superóxido derivados de células diana puede ser la clave para la acción antitumoral selectiva de los macrófagos basada en el óxido nítrico (Heigold y Bauer, 2002).

El ON se puede cuantificar de forma directa e indirecta. Los métodos directos no son precisos ya que el ON es un gas inestable que además deriva otros productos (nitritos, nitratos, etc.), por lo tanto, en esta tesis se utilizó un método indirecto que mide productos estables de la oxidación del ON, llamado el método de Griess, éste permite determinar la concentración de nitritos presentes en la muestra por colorimetría (Weissman y Gross. 2001).

II.1. Experimentos realizados en esta tesis

Los polisacáridos de *M. pyrifera* obtenidos por el método de Rioux (2007) fueron empleados en ratones como inmunoestimulantes inmunológicos frente a la proteína recombinante ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*. Se analizó la proliferación celular de los linfocitos y macrófagos extraídos de los nódulos linfáticos peritoneales de los ratones inmunizados para determinar el efecto de las fracciones (Figura 1).

Utilizando precipitación selectiva se extrajeron polisacáridos ácidos de *M. pyrifera* haciendo un total de 3 polisacáridos para los experimentos posteriores. Este último extracto, así como los obtenidos por el método de Rioux, se utilizaron para determinar algunas respuestas inmunológicas, como son la proliferación celular, la producción de citocinas y la citotoxicidad. Para estos ensayos, las fracciones se agregaron a un cultivo de macrófagos RAW 264 de ratones Balb/c para determinar la producción de IL-6, TNF- α y óxido nítrico por ELISA y su proliferación celular y citotoxicidad por el ensayo colorimétrico de viabilidad celular MTT. En esta tesis se

espera determinar el efecto inmunológico que estos extractos tienen en las pruebas antes mencionadas. Todas las fracciones fueron analizadas por espectrofotometría de infrarrojo para determinar el tipo de polisacáridos contenidos en estos.

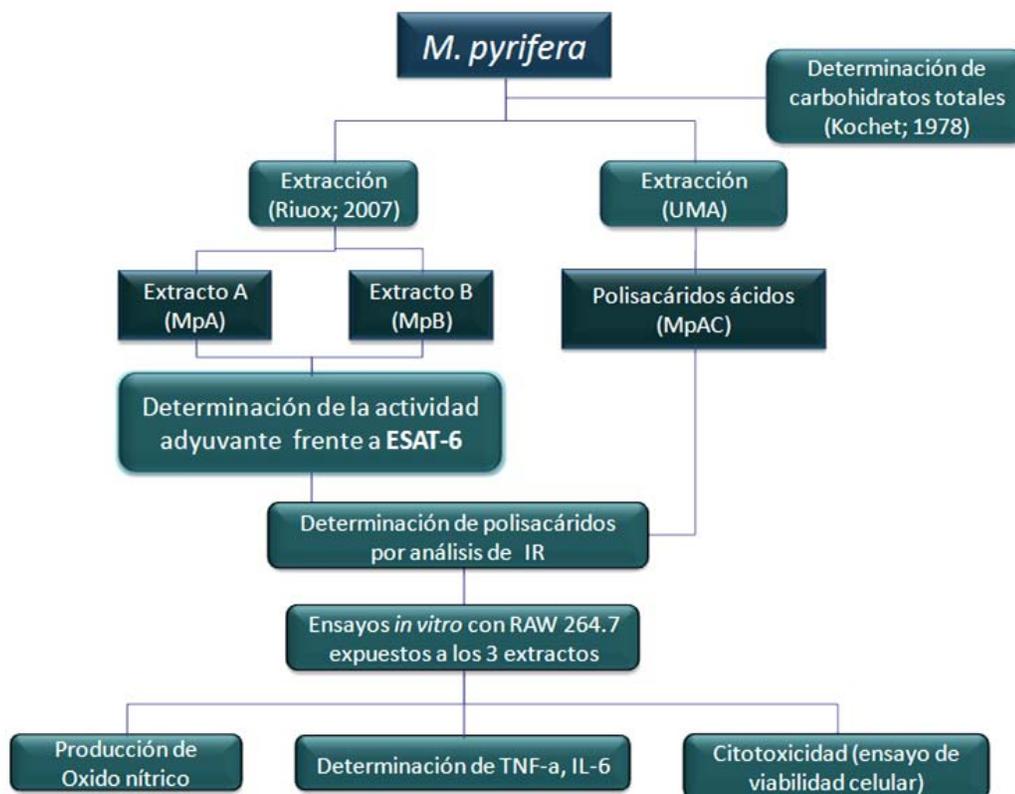


Figura 1. Diagrama general de la metodología

Las principales técnicas de análisis y ensayos utilizados para llevar a cabo los experimentos de esta tesis son:

- Espectrofotometría de luz ultravioleta (UV)
- Espectrofotómetro de transformada de Fourier (FT-IR)
- Ensayo de viabilidad y citotoxicidad celular por colorimetría (MTT y MTS)
- ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Algunas herramientas utilizadas en los ensayos fueron:

- La proteína rESAT-6
- El lipopolisacárido (LPS)

II.2. Descripción breve de las técnicas de análisis y herramientas utilizadas

II.2.1. Espectrofotometría de luz ultravioleta visible (UV)

Un espectrofotómetro permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia utilizando la colorimetría como base. La importancia de las soluciones coloreadas descansa en el hecho de que la radiación absorbida es característica del material que efectúa la absorción. Cualquier material soluble coloreado puede determinarse cuantitativamente. Si toda la luz pasa a través de una solución sin absorción, entonces la absorbancia es cero, y el por ciento de transmitancia es 100%. Muchas moléculas absorben radiación a longitudes de onda diferentes (la longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm), la absorción de radiación UV por una molécula, causa la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. Un espectro de absorción mostrará un número de bandas de absorción correspondientes a grupos estructurales que están dentro de la molécula. Por ejemplo, la absorción que se observa en la región UV para el grupo carbonilo en la acetona es de la misma longitud de onda que la absorción del grupo carbonilo en la dietilcetona (Amézquita, 2008).

II.2.2. Espectrofotómetro de transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo es un método que permite identificar la naturaleza de la muestra por comparación de espectros de muestras conocidas. Consiste en irradiar con luz infrarroja a una muestra para obtener un espectro que representa

la absorción y transmisión molecular de energía que es única y característica de la muestra, creando así una huella digital de esta.

La espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) fue desarrollada para vencer las limitaciones encontradas con instrumentos dispersivos. La principal dificultad era el lento proceso de escaneo. Es por esto la necesidad de encontrar un método para medir todas las frecuencias de infrarrojo simultáneamente. La solución fue el uso del interferómetro. Este dispositivo produce una señal única que tiene todas las frecuencias de infrarrojo “codificadas” en él. La señal es medida rápidamente, de esta forma el tiempo utilizado por muestra es reducido a segundos. Debido a que el analista requiere de un espectro de frecuencias (una gráfica de intensidad en cada frecuencia por individual) para poder hacer la identificación, la señal del interferograma medido no puede ser interpretada directamente. Se requiere una “decodificación” de las frecuencias individuales. Esto puede lograrse con la técnica matemática de transformada de Fourier. La transformación es llevada a cabo por la computadora que presenta el espectro requerido para el análisis (Thermo Nicolet Corporation, 2001).

II.2.3. Ensayo de viabilidad y citotoxicidad celular por colorimetría (MTT y MTS)

Los ensayos de proliferación son ampliamente utilizados en biología celular para estudiar factores de crecimiento, citocinas, nutrientes y agentes citotóxicos. Hay múltiples maneras de determinar el número de células en un ensayo de proliferación, entre ellas están el conteo directo de las células utilizando el microscopio ó un contador electrónico de partículas, ó un método indirecto donde por incorporación de precursores radioactivos ó por la medición de la actividad metabólica de enzimas celulares (Promega, 2009a). Éste último método fue utilizado para los ensayos que determinaron el efecto de los polisacáridos en los macrófagos respecto a la proliferación y citotoxicidad.

Los ensayos de proliferación celular CellTiter 96® Non-Radioactive y el CellTiter 96® AQueous One Solution, están basados en la conversión celular de la sal

tetrazolium en un formazán, el cual es un producto de fácil detección utilizando un lector de placas de 96 pocillos (Promega, 2009a).

El Ensayo de Proliferación Celular CellTiter 96® Non-radioactive, conocido comúnmente como ensayo colorimétrico MTT por utilizar compuestos de tetrazolium, es una colección de reactivos calificados que proveen de un método rápido y conveniente para determinar en ensayos el número de células viables en la proliferación, citotoxicidad, adherencia celular, quimiotaxis y apoptosis. El ensayo se lleva a cabo añadiendo al cultivo con la fracción a probar una premezcla de "Solución para teñir"; se deja incubando 4 horas para permitir la formación de las sales de formazán. El formazán es un precipitado cristalino producto de la reducción del MTT, que requiere de la disolución de dichos cristales antes de realizar la lectura de la absorbancia. Se agrega entonces la solución que solubilizará el formazán formado, para esto se puede utilizar SDS 20%, DMSO, entre otros solventes. Una vez disuelto se obtiene una coloración en el medio que se puede leer a una absorbancia óptima de 570nm, siendo la lectura directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. (Promega, 2009).

CellTiter 96® AQueous One Solution, permite medir (a una longitud de onda de 490nm) la cantidad de formazán producido como indicador del número de células viables en cultivo. Debido a que el producto de formazán MTS es soluble en cultivo celular, este ensayo requiere de menos pasos que el MTT que usa compuestos de tetrazolium.

La utilización de uno u otro método en los ensayos de este trabajo, dependió de la disponibilidad de los reactivos.

II.2.4. ELISA

ELISA es el acrónimo de Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, es un ensayo que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida

mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido con un espectrofotómetro.

Hay diferentes tipos de ELISA, en este trabajo se utilizaron el ELISA directo y el ELISA tipo sándwich directo.

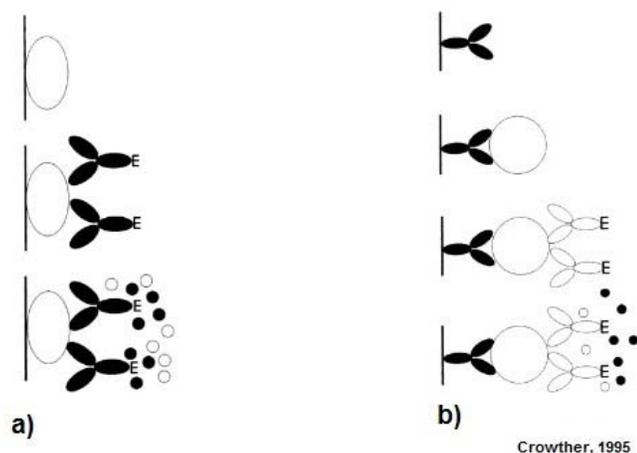


Figura 2. a) ELISA directo; b) ELISA sándwich directo (DAS: Sandwich de doble anticuerpo) (Crowther, 1995).

Para la detección de rESAT-6 se realizó un ELISA directo (Figura 2a), el cual consiste en agregar la proteína purificada a una placa e incubarla permitiendo que esta se adhiera. Después se incuba la placa con el anticuerpo anti hemaglutinina (anti HA) capaz de reconocer específicamente a la proteína recombinante ESAT-6, debido a que esta contiene una secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina que sirve como etiqueta de reconocimiento para el anticuerpo. El anticuerpo anti HA está unido a la enzima peroxidasa, la cual permitirá que en presencia de peróxido de hidrógeno se genere un radical metaestable del ABTS, el cual tendrá una coloración verde que permitirá detectar la presencia o ausencia de la proteína rESAT-6.

Para cuantificar IL-6 y TNF- α se utilizó un Elisa sándwich directo (Figura 2b). Éste consiste en fijar primero el anticuerpo de reconocimiento (anti IL-6 o TNF- α de acuerdo con sea el caso) para después agregar el medio de cultivo de las células expuestas a las fracciones de *M. pyrifera* y permitir que los anticuerpos fijados detecten a la citocina en cuestión. Después se agrega el anticuerpo biotinilado, el cual es capaz de reconocer también la citocina (IL-6 o TNF- α) y además tiene biotina en el otro extremo, la cual es afín a la enzima Avidin peroxidasa, lo cual permite que a todos los anticuerpos unidos a la citocina se peguen la peroxidasa; al agregar peróxido de hidrógeno y ABTS, la peroxidasa unida al anticuerpo biotinilado produce un radical metaestable (ABTS⁺) que genera un color verde con un espectro de absorción característico, así, la lectura de la absorbancia será proporcional a la concentración de la citocina detectada por el anticuerpo.

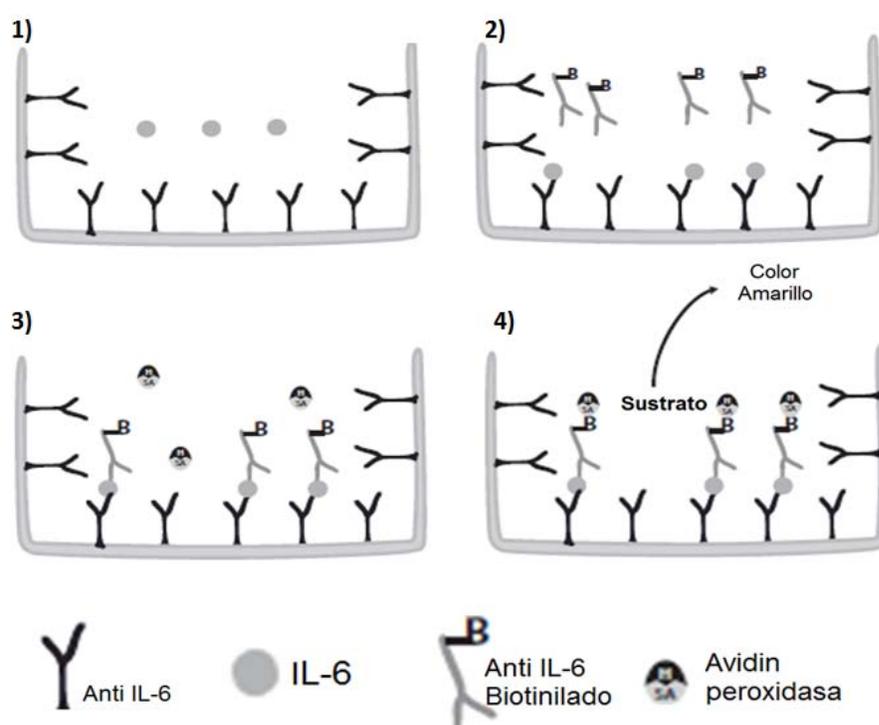


Figura 3. ELISA sándwich directo para cuantificar la IL-6 contenida en el medio de cultivo de los macrófagos expuestos a las fracciones de *M. pyrifera*. Imagen adaptada de R&D Systems Inc (2010).

II.2.5. ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target, 6KDa)

La proteína ESAT-6, junto con la CFP-10, forma parte de un complejo proteico de secreción que se relaciona con la patogenicidad de *M. tuberculosis*. ESAT-6 es una proteína que se utiliza como modelo para estudios donde se desea simular la presencia de una bacteria patógena, como *M. tuberculosis* sin utilizar el bacilo directamente, evitando los riesgos de exposición durante su manejo. Sin embargo no podemos tomar los efectos de rESAT-6 (ESAT-6 recombinante) como los esperados con *M. tuberculosis*, ya que esta proteína es solo una de varias proteínas que proporcionan la patogenicidad al bacilo. rESAT-6 se obtiene de la transformación de una bacteria con el plásmido pComb 3x que contiene el inserto del gen que codifica para rESAT-6 (Lugo-Fabres, 2009).

II.2.6. Lipopolisacáridos (LPS) como control positivo en los ensayos *in vitro* con RAW 264.7

El LPS es uno de los componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas.

En los macrófagos, el LPS induce la síntesis de citocinas, tales como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α/β , TGF- β , metabolitos del ácido araquidónico y otros lípidos bioactivos, péptidos quimiotácticos y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. La mayor parte de estos productos inducidos por el LPS actúan de forma autocrina sobre los propios macrófagos y algunos de ellos, como por ejemplo, los metabolitos del ácido araquidónico o el IFN- α/β , controlan la expresión de genes tardíos en el contexto de la respuesta al LPS. Sin embargo, no todos estos productos ejercen un efecto positivo sobre la respuesta de los macrófagos. Por ejemplo, la IL-10 forma parte de un mecanismo autoinhibidor que controla la producción de otras citocinas como el TNF- α (Sweet y Hume, 1996).

Debido a lo anterior, el LPS se utiliza como control positivo de la producción de citocinas y especies reactivas del oxígeno en los ensayos realizados en este trabajo.

III. Justificación

Las sustancias moduladoras de la inmunidad innata tienen un impacto significativo en la habilidad del hospedero para responder rápida y fuertemente a diversos tipos de patógenos.

Algunas sustancias como los Polisacáridos extraídos de fuentes de origen botánicas, como las algas marinas, tienen propiedades terapéuticas que ofrecen una alternativa menos agresiva que los antibióticos en la obtención de mejores respuestas inmunológicas, ante la invasión de un organismo patógeno.

Macrocystis pyrifera es una alga marina que es una alternativa disponible para su estudio y explotación, lo cual la distingue como una buena opción de investigación y un buen recurso, si se obtienen resultados significativos que le den un mayor interés comercial.

IV. Hipótesis

Las fracciones de *Macrocystis pyrifera* actúan como inmunomoduladores de la respuesta inmune celular en ratones Balb/c.

V. Objetivo General

Estudiar el efecto de las fracciones del alga *Macrocystis pyrifera* como inmunomodulador de la respuesta inmunológica celular de ratones Balb/c.

VI. Objetivos específicos

- Determinar la actividad inmunoestimulante de las fracciones MpA y MpB de *M. pyrifera* ante un desafío con rESAT-6 en células de nódulos infartados de ratones Balb/c.
- Obtener de un tercer extracto de polisacáridos ácidos a partir de la harina de *M. pyrifera*.
- Determinar la viabilidad celular y la producción de TNF- α , IL-6 y ON por macrófagos expuestos a las fracciones algales de *M. pyrifera*.
- Identificar por espectrofotometría de infrarrojo los polisacáridos extraídos de *M. pyrifera*.

VII. Materiales y métodos

VII.1. Extractos de *M. pyrifera*

VII.1.1. Extractos MpA y MpB

Las fracciones MpA y MpB de *M. pyrifera* utilizados en este estudio se fueron obtenidos por Bonilla (2010) de acuerdo a la metodología de Rioux *et al.* (2007); en la metodología antes mencionada, se indica que MpA (fracción A) debe contener laminarián (ó laminaran) y fucoidán, mientras que la MpB (fracción B) se espera contenga fucoidán principalmente (Fig. 4).

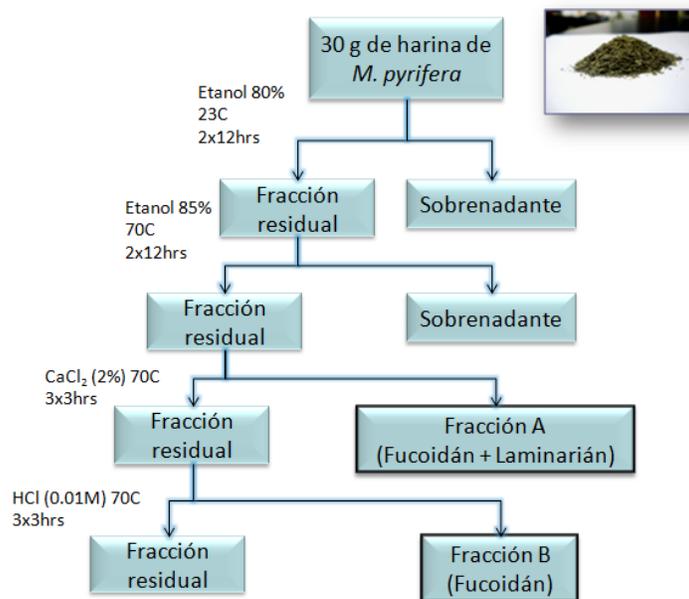


Figura 4. Procedimiento seguido por Bonilla (2010) para la obtención de polisacáridos solubles a partir de *Macrocystis pyrifera* (Rioux et al. 2007).

VII.1.2. Extracto MpAC

De acuerdo con algunos autores, como Morris–Quevedo *et al.* (2000), los polisacáridos ácidos de algunas algas han presentado propiedades inmunomoduladoras. Con estos antecedentes, se decidió extraer los polisacáridos ácidos de *M. pyrifera* (Fig 5).

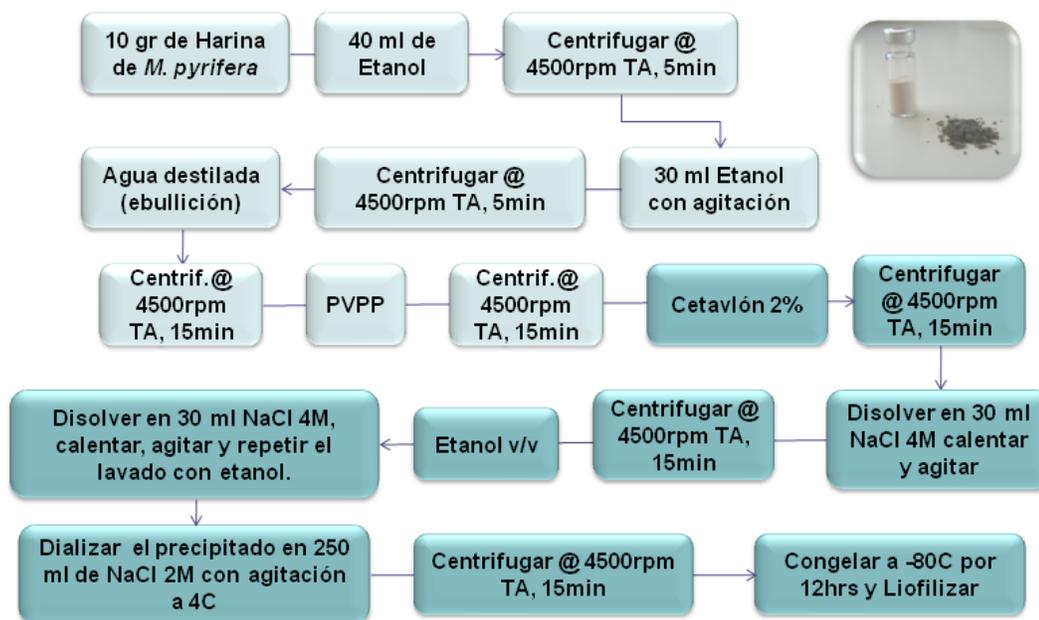


Figura 5. Procedimiento para la obtención de polisacáridos ácidos a partir de *M. pyrifera*

El procedimiento consistió en poner en 40 ml de Etanol puro 10g de la harina del alga y dejarlo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó la suspensión a 4500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 30 ml de Etanol puro, se dejó en agitación a temperatura ambiente por un par de horas o hasta observar que el alcohol se tiñó indicando la despigmentación del alga (Fig. 6).



Figura 6. 1er. (izquierda) y 2do. (derecha) lavado de la harina seca de *M. pyrifera* con etanol para eliminar los pigmentos.

Se centrifugó la suspensión y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 40 ml de agua a la harina y se calentó hasta llegar a ebullición. Se dejó enfriar la suspensión y se centrifugó. Se colectó el sobrenadante y se desechó la harina, ya que en la fase líquida tenemos los carbohidratos solubles que nos interesan. Para mejorar la calidad de la fracción se agregó PVPP (Polivinilpolipirrolidona) ya que permite eliminar los fenoles contenidos en la solución que evitan obtener un extracto despigmentado. Se centrifugó la suspensión y se colectó el sobrenadante, al cual se le agregó cetavión 2% v/v (Morris–Quevedo *et al.*; 2000) para precipitar selectivamente los polisacáridos ácidos contenidos en la solución (Fig. 7).



Figura 7. Polisacáridos ácidos de la harina de *M. pyrifera* precipitados al agregar cetavión 2%

Se centrifugó la suspensión para separar los polisacáridos ácidos contenidos en el precipitado. Se puso el precipitado en 30 ml de NaCl 4M con agitación y temperatura hasta que se disolvió, se centrifugó y se tomó el sobrenadante. Se agregó etanol puro v/v y se volvió a centrifugar. Se disolvió nuevamente en NaCl 4M y se lavó de nuevo con etanol. El precipitado se colocó en una membrana de diálisis de celulosa y se sumergió en NaCl 2M a 4°C con agitación durante toda la noche. La solución resultante se congeló a -80°C por 12 horas para ser liofilizada posteriormente. Se pesó la fracción y se determinó el rendimiento obtenido.

VII.2. Análisis de Infrarrojo de las fracciones de *M. pyrifera*

Los análisis de espectrometría de infrarrojo se realizaron con el objetivo de tener una referencia aproximada de la naturaleza de las fracciones MpA, MpB y MpAC obtenidos de *Macrocystis pyrifera*. Los espectros obtenidos, ayudarían también a establecer que hay claras diferencias entre los polisacáridos MpA y MpB, obtenidos en la metodología de Rioux (2007) y de la fracción de MpAC.

Los espectros se obtuvieron utilizando un FT-IR (Espectrofotómetro de transformada de Fourier). Cada una de las fracciones del alga se mezcló con bromuro de potasio en una proporción de 1:4. Se prensó la mezcla utilizando un molde de 16 mm de diámetro y aplicando una presión hidrostática de 15.0 tons cm^{-2} por 2 minutos logrando así una pastilla homogénea. Los espectros fueron colectados en el espectrofotómetro Thermo Nicolet Avatar 360 IR (Thermo Electron Inc., San Jose, CA) con una resolución de 4 cm^{-1} con un detector DTGS, utilizando el programa OMNIC 7.2 (ancho de banda 50 cm^{-1} , factor de aumento 2.6). Los espectros fueron obtenidos en la región de 1745-763.39 cm^{-1} . El ajuste de blanco de lectura se llevó a cabo utilizando el programa Thermo Nicolet OMNIC para llevar a la lectura base en cada toma de espectro (Fig. 8). La correlación

logarítmica del OMNIC fue utilizada para comparar los espectros de las muestras con la librería de Thermo Fischer Scientific, del Laboratorio de Aplicaciones en Madrid, España.

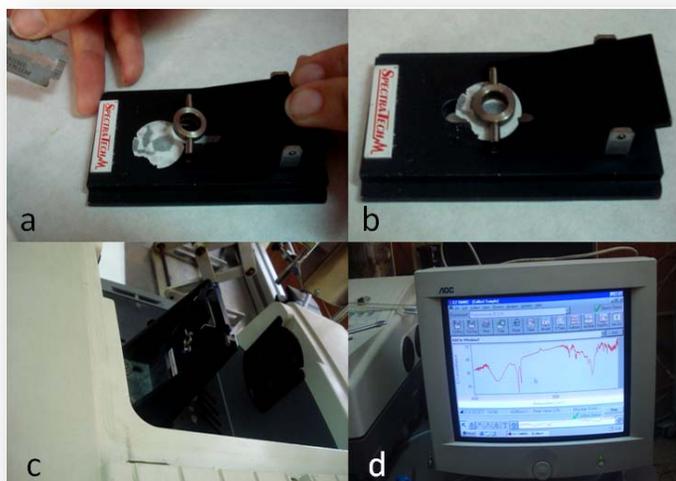


Figura 8. (a y b) se coloca con cuidado la pastilla de la fracción. (c) Se coloca la base dentro de la plataforma por donde pasa el rayo de infrarrojo en el espectrómetro FT-IR. (d) Se corre la lectura del blanco y se lee la pastilla.

VII.3. Determinación de la actividad inmunoestimulante de las fracciones de *Macrocystis pyrifera* en ratones Balb/c

VII.3.1. Obtención rESAT-6

Esta proteína se obtuvo de una cepa de *Escherichia coli* donada por el Departamento de Biotecnología Marina de CICESE que contiene el plásmido pComb 3x el cual tiene el gen Rv3875 que codifica para ESAT-6.

La cepa se tuvo en glicerol a -40°C , por lo que se requirió reactivar sembrándola en 30 ml de medio SB líquido con carbencilina (0.1 mg ml^{-1}) y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm por 12 horas.

Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml del cultivo con la cepa reactivada y se agregaron a 8 matraces Erlenmeyer preparados con 100 ml de medio SB líquido y carbencilina (0.1mg ml^{-1}); se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de ≤ 0.700 con una $\lambda 600$ (aproximadamente 3 h). Una vez obtenida la densidad requerida se agregó MgCl_2 (0.02mM) e IPTG (0.6mM) a cada frasco y se incubó por 5 horas a 30°C y 300 rpm.

A continuación se llevó a cabo la extracción periplásmica. El objetivo de este paso es obtener la proteína del interior de la bacteria. Para esto se colectaron los 800 ml y se centrifugaron a 4500rpm por 20 min a 4°C . Después de esto se desechó el sobrenadante y se agregaron 2.5 ml de buffer de lisis PPB por cada 100 ml de medio SB. Se resuspendió la pastilla y se puso en hielo por 20 minutos. Se colectó el volumen y se centrifugó a 9000 rpm por 20 min a 4°C . Se colectó el sobrenadante y se separó en un tubo de 50 ml. Se agregaron 2.5 ml de MgSO_4 5mM por cada 100 ml de SB líquido utilizado. Se resuspendió la pastilla y se puso 20 minutos en hielo. Se centrifugó a 9000 rpm durante 20 min a 4°C . Se colectó el sobrenadante y se juntó con el primer volumen reservado. El volumen total obtenido fue de aproximadamente 40 ml.

La detección de rESAT-6 se realizó por medio de un ensayo de ELISA. En una placa de 96 pocillos se agregó el control negativo (BSA3%), positivo (rESAT-6) y la muestra como lo indica la Figura 9:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA 3%											
B	ESAT-6											
C	Muestra											
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 9. Diseño de placa para detectar rESAT-6 por medio de un ELISA.

Se incubó el plato por una hora a 37°C. Se descartó el sobrenadante, se bloqueó con 150 µL de BSA 3% en cada pocillo y se incubó por una hora a 37°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó suavemente tres veces con la solución de lavado. Se agregaron 50µL de anti-HA anti ratón (1:1000 disuelto en BSA 1%) y se incubó por 1 hora a 37°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó 3 veces suavemente con la solución de lavado; se agregó ~~50~~ 50 µL de solución reveladora y se incubó por 20 minutos a 37°C. La lectura se realizó a 492nm.

Una vez que se comprobó la obtención de rESAT-6, se realizó la primera diálisis. Para eliminar proteínas con peso menor a 2000 Da y equilibrar las sales contenidas en la muestra, se utilizó una membrana de diálisis 6Spectra. Se colocó la muestra dentro de la membrana y se sumergió en 4L de PBS 1X a 4°C por una hora con agitador magnético. Cumplido este tiempo, se hizo un lavado desechando el PBS y se agregaron nuevamente 4L de PBS 1X incubando por 1 hora a 4°C con agitación magnética. Se realizaron 3 lavados y al colocar el cuarto volumen de PBS 1X se dejó por 12 horas a 4°C con agitación.

Para aislar la proteína rESAT-6 del resto de sustancias contenidas en la muestra se utilizó una columna de cromatografía por afinidad a metal HisTrap™, la cual permite que la proteína recombinante marcada con 6 histidinas sea inmovilizada en la columna por su afinidad con el níquel contenido en la HisTrap™.

La columna fue recargada con sulfato de níquel de acuerdo con el protocolo de GE Healthcare (Instructions 71-5027-68 AH HisTrap affinity columns; HisTrap HP, 1 ml and 5 ml) para mejorar el rendimiento de la purificación.

La columna se guarda a 4°C con etanol al 20%, por lo que se requiere lavar con 5 volúmenes de agua destilada (cada volumen equivale a 5 ml), haciéndola pasar a un flujo de 5 ml min⁻¹ (para la columna de 5 ml de capacidad). Una vez terminado el lavado se equilibró la columna con 10 volúmenes de la solución reguladora de unión (Binding buffer) que por su bajo contenido de Imidazol aumenta la unión

entre níquel y las histidinas de la proteína. Antes de cargar la muestra en la columna, se requirió agregar Imidazol a una concentración de 20-40mM. Se pasó la muestra por la columna y se colectó el volumen cargado. Después se equilibró la columna con 10 volúmenes de solución reguladora de unión, y se colectó el volumen equilibrado. Posteriormente se cargaron 5 volúmenes de la solución reguladora de elusión (Elution buffer), el cual por su alto contenido de Imidazol permitió separar la proteína del níquel de la columna y colectarla en el volumen saliente. Para guardar la columna a 4°C fue necesario lavarla nuevamente con 10 volúmenes de agua destilada y después con 3 volúmenes de etanol al 20% (GE Healthcare. Instrucciones HisTrap affinity columns).

Para eliminar el contenido de Imidazol y equilibrar las sales de la muestra se realizó una segunda diálisis, siguiendo el mismo procedimiento de la primera, pero utilizando PBS 0.2X para que el contenido de sales no interviniera con la liofilización de la proteína.

Para liofilizar la proteína se hicieron alícuotas de 5 ml en 5 tubos de 15 ml. Se congelaron a -70°C por aproximadamente 2 horas. Después se cubrió la boca del tubo con parafilm y se hicieron orificios con una aguja para permitir que la liofilizadora hiciera vacío. Se colocaron las muestras en los frascos de congelado rápido y se conectaron a la cámara de secado de la liofilizadora Free Zone de LABCONCO y se abrió la válvula de vacío. La presión debe ser igual o menor a 0.700bar y la temperatura debe estar a -50°C. Se dejaron las muestras a estas condiciones durante 24 horas. Una vez terminado el proceso las muestras se guardaron a 4°C.

La determinación de la concentración de proteína se hizo utilizando el kit Micro BCA™. Micro BCA™ es un ensayo colorimétrico que permite detectar y cuantificar proteínas totales en una muestra. Se utilizaron estándares de albúmina diluida como control positivo para determinar la concentración de la muestra. La curva de albúmina se construye a partir de una solución de 2mg ml⁻¹, diluyéndola a 200µg

ml^{-1} y continuando con diluciones de 1:1, obteniendo así concentraciones de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, $25 \mu\text{g ml}^{-1}$, $14.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $7.25 \mu\text{g ml}^{-1}$, $3.12 \mu\text{g ml}^{-1}$, $1.55 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $0 \mu\text{g ml}^{-1}$ conforman la curva estándar. Para detectar la proteína se requirió preparar la solución WR (por su nombre en inglés Working Reagent) a partir de las soluciones MA, MB y MC que vienen en el ensayo de Micro BCA™ en una proporción de 25:24:1 respectivamente.

En una placa de 96 pocillos se agregaron $150 \mu\text{l}$ de cada solución estándar y de la muestra. Se añadieron $150 \mu\text{l}$ de la solución WR a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C durante dos horas. Se dejó enfriar el plato a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 565nm . Se determinó la ecuación de la curva y se calculó la concentración de la proteína contenida en la muestra. (Instrucciones del ensayo de proteína Micro BCA™)

Se hicieron alícuotas de 1 ml y se congelaron a -70°C por aproximadamente 2 horas hasta que estuvieron totalmente congeladas. Se colocaron las muestras en los frascos de congelado rápido y se conectaron a la cámara de secado de la liofilizadora Free Zone de LABCONCO. Las muestras se dejaron a una presión menor de 0.700bar y a una temperatura de -50°C durante 8 horas. Una vez terminado el proceso las muestras se guardaron a 4°C hasta su uso.

VII.3.2. Estandarización del método de disección y del establecimiento del cultivo celular primario a partir de nódulos linfáticos de ratón

Para determinar el mejor método de extracción de las células de nódulos linfáticos, se probaron dos métodos, digestión enzimática y maceración. Se utilizaron 2 ratones Balb/c hembra no inmunizados para cada método de extracción. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y en condiciones asépticas se extrajeron los nódulos linfáticos axilares propios y los poplíteos, marcados con el número 5 y 9 respectivamente en la Figura 10.

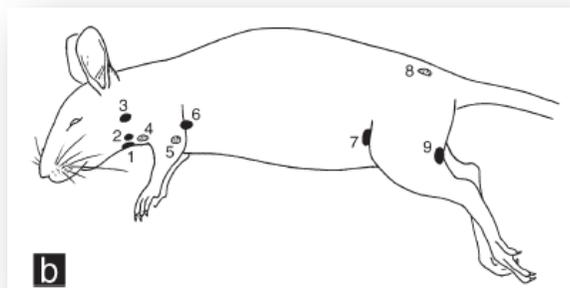


Figura 10. Ubicación de los nódulos linfáticos poplíteos (Van den Broeck, 2006).

Para el método enzimático se utilizó la enzima colagenasa, en una concentración de $0.27 \text{ unidades ml}^{-1}$ de HBSS mezcla completa. Después de la disección de los nódulos se sumergieron en $500 \mu\text{L}$ de la solución de colagenasa. Con una jeringa de insulina sin aguja se tomó el nódulo y se resuspendió la solución para promover la disgregación celular. Posteriormente se incubó la solución a 37°C por 15 min. Al término de la incubación se retiraron los tejidos suspendidos dejando las células en el fondo del tubo. Se realizaron 3 lavados con HBSS mezcla completa retirando cada vez los tejidos suspendidos y conservando las células precipitadas. Al término de los tres lavados se centrifugó la solución a 1000 rpm por 5 min. Se resuspendieron las células en 30 ml de medio *RPMI-1640* suplementado (SFB al 10%, antimicótico 100 U ml^{-1} y $2\text{-}\beta\text{-mercaptoetanol}$ al 0.05mM) y se colocaron en un plato de cultivo a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$. A las 24 horas se observaron en el microscopio invertido.

Para el método de maceración se colocaron los nódulos en un vial estéril con $500 \mu\text{L}$ de medio *RPMI* con FBS al 10%. Con una jeringa de insulina sin aguja se tomó el nódulo y se hizo la disgregación celular poco a poco subiendo y bajando el émbolo hasta que quedó solamente el tejido que conformó al nódulo. Esta suspensión se hizo pasar por una gasa estéril para retener el tejido sobrante. Se centrifugó la suspensión celular obtenida a 1000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio *RPMI-1640* suplementado y se pusieron

en un plato de cultivo con 30 ml a 37°C a 5% CO₂ (Matheu et al. 2007). Se observaron en el microscopio invertido para determinar su viabilidad y si presentaban alguna contaminación.

VII.3.3. Estandarización de Concanavalin A

La concanavalin A (ConA) es una proteína globular de origen vegetal que se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*. Debido a sus propiedades bioquímicas, la ConA fue clasificada por Sumner y Howell (1936) como una lectina. Los estudios realizados por Ruscetti y Chervenick (1975) y Novogrodsky y Katchalski (1971) demuestran que la ConA es un excelente inductor de mitosis en los linfocitos. El objetivo de este experimento es estandarizar la concentración de Concanavalin A y el tiempo de exposición de las células a esta sustancia como control positivo de la proliferación celular.

Para este experimento se inmunizó un ratón el día uno en el cojinete plantar de ambas patas traseras con la proteína rESAT-6 a una concentración de 2.5µg en 15 µl por pata conteniendo adyuvante completo de Freund en relación 1:1 (15 µl de adyuvante completo) dando un total de 30 µl de suspensión a inyectar en cada cojinete. El día ocho se inyectó nuevamente rESAT-6 a una concentración de 2.5 µg 15 µl¹ conteniendo ahora Adyuvante incompleto de Freund en relación 1:1 (15 µl de Adyuvante incompleto) dando un total de 30 µl de suspensión a inyectar. El día nueve se sacrificó al animal y se realizó la disección de los nódulos linfáticos poplíteos. Se pusieron las células en cultivo con medio RPMI-1640 suplementado con β-mercaptoetanol 0.05 mM, antimicótico 100 U ml⁻¹ y SFB al 10%.

En el día 10 se contaron las células y se tomó una alícuota para obtener 200,000 células 90 µl¹ por pocillo y se sembró en 4 placas de 96 pocillos con el diseño siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medio											
B	Sin Con A											
C	Con A $1\mu\text{g ml}^{-1}$											
D	Con A $2.5\mu\text{g ml}^{-1}$											
E	Con A $5\mu\text{g ml}^{-1}$											
F												
G												
H												

Figura 11. Diseño de la placa de 96 pocillos para determinar la concentración de Concanavalin A más adecuada.

Se prepararon las soluciones 10X de ConA a las concentraciones de $5\mu\text{g ml}^{-1}$, $2.5\mu\text{g ml}^{-1}$ y $1\mu\text{g ml}^{-1}$. Se agregaron $10\mu\text{L}$ de Concanavalin A a cada pocillo y se incubó por 12, 24, 48 y 72 horas. Cumplido el tiempo se agregaron $15\mu\text{l}$ de MST y se incubaron a 37C por 4 horas. Se realizó la lectura a 565 nm . Se graficaron e interpretaron los datos para determinar la mejor concentración de ConA y el mejor tiempo de incubación con ésta.

Los resultados de este ensayo mostraron que no había proliferación celular al exponer las células extraídas de los nódulos poplíteos a diferentes concentraciones del mitógeno Concanavalin A. Estos resultados se cree se debieron a tres posibles causas:

1. La densidad celular utilizada no fue apropiada para poder apreciar la diferencia entre el control negativo y los pocillos con la ConA.
2. La preparación de ConA no fue apropiada, por lo que las concentraciones que se utilizaron no fueron las calculadas, y
3. La ConA perdió las propiedades mitogénicas debido a que se encontraba en mal estado.

Para probar las primeras dos opciones se realizaron dos pruebas; la primera fue cambiar la densidad celular utilizada, así, se probaron diferentes densidades, desde 250, 000 células por pocillo a 700,000 células por pocillo.

La segunda prueba, fue confirmar la concentración de la proteína ConA utilizando el ensayo de Micro BCA™.

A continuación se describen dichos ensayos.

1. Estandarización de la densidad celular para MTS

El ensayo de viabilidad (CellTiter 96® One Solution) es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en experimentos de proliferación o citotoxicidad.

Se realizó un ensayo de proliferación celular utilizando el Celltiter 96® One Solution para establecer si 250,000 células por pocillo son suficientes para obtener una lectura que permita diferenciar el control negativo (medio solo) del positivo (medio con células). Para este ensayo se utilizaron células del bazo de un ratón sin inmunizar, debido al gran número de linfocitos que se pueden obtener de éste órgano sin necesidad de un pretratamiento.

Debido a que las lecturas mostraron que esta densidad no era suficiente se realizó otro ensayo para determinar la cantidad de células más apropiada para este análisis, utilizando diferentes densidades celulares: 0, 2×10^5 , 4×10^5 , 6×10^5 y 7×10^5 células por pocillo.

2. Una vez establecida la mejor densidad celular a utilizar y re-ajustada la concentración de ConA, se repitió el experimento con el mismo diseño experimental, midiendo la proliferación a diferentes tiempos 12, 24, 48 y 72 h.

VII.3.4. Determinación de la actividad inmunoestimulante de las fracciones de *Macrocystis pyrifera* en ratones Balb/c por ensayos de proliferación celular

Para determinar el efecto adyuvante de las fracciones de *M. pyrifera* frente a rESAT-6 se emplearon 30 ratones de la cepa Balb/c comprados de HarlanTM de género femenino, de 4-5 semanas de edad y un peso de 17-18.5 gramos. Los individuos fueron colocados en jaulas con una base de papel periódico en tiras y arena para gato para mantener la higiene de la jaula. Los ratones se dejaron aclimatar durante una semana y se alimentaron con comprimidos para roedores y agua *ad libitum*. Antes de comenzar el experimento se verificó que estuvieran sanos observando algunos aspectos como el brillo del pelaje, la humedad de la nariz, motricidad y peso; todos los individuos se encontraron en condiciones saludables (Fig. 12).



Figura 12. Jaulas de acrílico con los ratones de la cepa Balb/c

Se inmunizaron los 27 ratones de acuerdo con el siguiente diseño experimental:

- A. Para los grupos que sirvieron como control (grupo 0 y 1) se inmunizaron ratones con rESAT-6 + PBS y con rESAT-6 + Adyuvante completo de Freund.

Para los grupos de prueba:

- B. se inyectó rESAT-6 con diferentes concentraciones de las fracciones de alga que se obtuvieron (grupo 2, 3, 4 y 5).
- C. se inyectó rESAT-6 con MpA y MpB combinados y en diferentes proporciones: 30%-70% y 50%- 50% (grupo 6, 7 y 8).

Las condiciones utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla I. Diseño experimental (*in vivo* e *in vitro*) para determinar el efecto de las fracciones de *M. pyrifer*a en ratones Balb/c.

Gpo.	Día 1				Día 8		Día 10	# Ratones
	1er. Inmunización				2da. Inmunización		<i>In vitro</i>	
	[ESAT-6]	ACF	[MpA]	[MpB]	[ESAT-6]	AIF	[ESAT-6]	
0	5µg por ratón	PBS1X			5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
1	5µg por ratón	Si			5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
2	5µg por ratón	No	100µg por ratón		5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
3	5µg por ratón	No	0.5µg por ratón		5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
4	5µg por ratón	No		100µg por ratón	5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
5	5µg por ratón	No		0.5µg por ratón	5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
6	5µg por ratón	No	70µg por ratón	30µg por ratón	5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
7	5µg por ratón	No	30µg por ratón	70µg por ratón	5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3
8	5µg por ratón	No	50µg por ratón	50µg por ratón	5µg por ratón	Si	3µg ml ⁻¹	3

El procedimiento que se siguió para los grupos control fue el que se describe a continuación. Se determinó la proliferación celular *in vitro* con las células de nódulos linfáticos de los ratones Balb/c inmunizados previamente con 5 µg por individuo de rESAT-6 y adyuvante completo de Freund en el día uno, e incompleto en el día ocho. Las inmunizaciones se realizaron en el cojinete plantar de las extremidades inferiores (Fig. 13).



Figura 13. Inmunización subcutánea en el cojinete plantar de la extremidad inferior de un ratón de la cepa Balb/c

El día nueve se sacrificó el animal y se realizaron las disecciones de los nódulos, se maceraron y se pusieron las células en una placa de 96 pocillos de acuerdo con el diseño experimental, a una densidad celular de 700,000 células/pocillo durante 24 h. Cumplido el tiempo se agregaron $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ de rESAT-6 a cada pocillo. A las 24, 48 y 72 horas de exposición a la proteína se añadieron $15 \mu\text{L}$ de MTS y se leyó a 565 nm (Fig. 14).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sin ESAT-6											
B	ESAT-6											
C	Medio											
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 14. Diseño de placa para determinar la respuesta inmunológica *in vitro* con rESAT-6.

El análisis del efecto inmunoestimulante de las fracciones de *M. pyrifera*, se realizó por medio de un ensayo de proliferación celular *in vitro*, utilizando células extraídas de nódulos linfáticos de ratones, inmunizados el día uno con 5 µg por ratón de rESAT-6 y se utilizaron los 3 extractos algales como inmunoestimulante: MpA, MpB y MpA combinado MpB. El día ocho se realizó una segunda inmunización con rESAT-6 y adyuvante incompleto de Freund. El día nueve se sacrificaron los 3 animales de cada grupo y las células extraídas de los ganglios se pusieron a incubar por 24 horas. Cumplido este tiempo se sembraron las células en placa y se agregaron 3µg ml⁻¹ de rESAT-6 a cada pocillo. Como control de la proliferación se pusieron pocillos con células sin rESAT-6. El tiempo de incubación con la proteína rESAT-6 fue de 48 h.

Los resultados de estos últimos experimentos (A, B y C) se compararon para determinar la efectividad de las fracciones algales como sustancia inmunomoduladora de la respuesta inmunológica celular frente a rESAT-6.

VII.4. Cultivo celular de RAW 264.7 y exposición a las fracciones de *M. pyrifera*

Se mantuvieron cultivos de RAW 264.7 en medio DMEM con L-glutamina, suplementado con 10% de suero fetal bovino y antimicótico 100 U ml⁻¹. La condiciones de incubación fueron de 5% CO₂ a 37°C. Cada tercer día se les cambió el medio hasta alcanzar una confluencia del 80%; en este punto las células se cosechan y se ponen en una placa de 24 pocillos a una densidad de 75,000 células ml⁻¹ con el siguiente diseño (Fig. 15):

	A	B	C	D		A	B	C	D		A	B	C	D
	24 h	48 h	24 h	48 h		24 h	48 h	24 h	48 h		24 h	48 h	24 h	48 h
1	MpA 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$	MpB 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$			1	MpAC 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$	LPS 0.75 $\mu\text{g ml}^{-1}$			1	DMSO 0.1%			
2	MpA 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$	MpB 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$			2	MpAC 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$	LPS 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$			2	MEDIO SOLAMENTE			
3	MpA 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	MpB 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$			3	MpAC 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	LPS 0.075 $\mu\text{g ml}^{-1}$			3				
4	MpA 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$	MpB 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$			4	MpAC 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$	LPS 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$			4				
5	MpA 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$	MpB 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$			5	MpAC 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$	LPS 0.025 $\mu\text{g ml}^{-1}$			5				
6	MpA 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	MpB 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$			6	MpAC 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	LPS 0.012 $\mu\text{g ml}^{-1}$			6				

Figura 15. Diseño de las placas de cultivo de 24 pocillos para cultivo de RAW 264.7 con los 3 extractos de *M. pyrifera*.

Las células se incubaron por 24 horas, se retiró el medio y se agregaron 900 μl de medio nuevo. Se prepararon las diferentes concentraciones de los polisacáridos por diluciones seriadas (500, 250, 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Se pesaron 0.01 g de cada extracto. Para esterilizar los polisacáridos se disolvieron inicialmente en 100 μL de DMSO, y en condiciones estériles se les agregó 900 μL de medio DMEM suplementado para llevarlo a una concentración 10X. Debido a que las fracciones no se disuelven fácilmente en el medio, se pusieron 10 minutos a baño maría a 37°C. Una vez disueltos se tomaron 500 μL de esta solución y se diluyeron en 500 μL de DMEM para obtener la primer concentración de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 10X. A partir de esta solución se prepararon las restantes haciendo diluciones 1:1 en medio DMEM. Se añadieron 100 μl de cada concentración de polisacárido a la placa de acuerdo con el diseño y se incubó por 24 y 48 h. Concluido el tiempo de incubación, se retiró el medio sobrenadante y se realizó el ensayo de ELISA para detectar el TNF- α y la IL-6 producidos, así como la detección de óxido nítrico utilizando el reactivo de Griess.

VII.4.1. Determinación de IL-6 y TNF- α producido por RAW 264.7 posterior a la exposición con las fracciones de *M. pyrifera*

Se preparó el diseño de la placa para saber cuántos pocillos serían necesarios preparar (Fig.16).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MpA 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$				Estándar 10 ng ml^{-1}		
B	MpA 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$				Estándar 5 ng ml^{-1}		
C	MpA 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$				Estándar 2.5 ng ml^{-1}		
D	MpA 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$				Estándar 1.25 ng ml^{-1}		
E	MpA 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$				Estándar 0.6 ng ml^{-1}		
F	MpA 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$				Estándar 0.3 ng ml^{-1}		
G	LPS 0.75 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.075 $\mu\text{g ml}^{-1}$			LPS 0.025 $\mu\text{g ml}^{-1}$				LPS 0.006 $\mu\text{g ml}^{-1}$		
H	LPS 0.50 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$			LPS 0.0125 $\mu\text{g ml}^{-1}$				Control (-)		

Figura 16. Diseño de la placa de 96 pocillos para la determinación de la cantidad de IL-6 y TNF- α

Este diseño se utilizó para determinar la concentración de IL-6 y TNF- α a las 24 y 48 h de exposición a diferentes concentraciones de los polisacáridos, utilizando en total 4 placas.

En una placa de 96 pocillos agregaron 50 μl de la solución de anticuerpo de captura, se cubrió la placa con aluminio para prevenir la evaporación. Se incubó durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Terminado el tiempo de incubación, se descartó el contenido de los pocillos y se lavó la placa dos veces con 150 μl de solución de lavado. Se agregaron 200 μL de solución de bloqueo a cada pocillo y se dejó incubando por 2 horas y media a temperatura ambiente. Se descartó el contenido de los pocillos y se lavó 4 veces

con 120 μL de solución de lavado. Se agregaron 100 μL de los estándares, del control positivo (LPS) y del medio de cultivo sobrenadante una vez concluidas las 24 y 48 horas de incubación de las células RAW 264.7 con las fracciones MpA, MpB y MpAc. Se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se descartó el contenido de los pocillos y se lavó 4 veces con 150 μL de la solución de lavado. Se agregaron 100 μL a cada pocillo de la solución de anticuerpo biotinilado preparado anteriormente y se incubó 1 hora y media a temperatura ambiente. Se descartó el contenido y se lavó 6 veces con solución de lavado. Se añadieron 100 μL de la solución de Avidin peroxidasa y se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el contenido de la placa y se lavó 8 veces. Se limpió la base de la placa cuidando que no estuviese mojada ni tuviese ninguna suciedad. Se añadieron 100 μL de ABTS preparado con peróxido de hidrógeno, se cubrió la placa con aluminio para que no le diera la luz y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. La placa se midió en un espectrofotómetro de luz ultravioleta a una longitud de onda de 405 nm.

De la curva estándar se obtuvo una ecuación que se utilizó para calcular la concentración de IL-6 y TNF- α presentes en el medio de cultivo sobrenadante. Los resultados se graficaron concentración de proteína versus concentración de polisacárido.

VII.4.2. Determinación del óxido nítrico producido por RAW 264.7 posterior a la exposición con las fracciones de *M. pyrifera*

La acumulación de nitritos se utilizó como un indicador de la presencia de óxido nítrico en el medio, 90 μl del medio de cultivo libre de células se incubaron con el mismo volumen del reactivo de Griess 0.1% (w/v) naphthylenediamine dihydrochloride, 0.5% (v/v) H_3PO_4) a temperatura ambiente por 5 minutos. Cumplido el tiempo se midió la absorbancia a 550nm utilizando un lector de placas (Whittaker Bioproducts, USA). La concentración de NO_2 se determinó utilizando

una regresión lineal de una curva estándar creada con NaNO_2 . El diseño utilizado para este ensayo fue el siguiente (Fig. 17).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MpA 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpB 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$			NaNO ₂ 14 μM		
B	MpA 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpB 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$			NaNO ₂ 10 μM		
C	MpA 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpB 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$			NaNO ₂ 7 μM		
D	MpA 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpB 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$			NaNO ₂ 3 μM		
E	MpA 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpB 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$			NaNO ₂ 0 μM		
F	MpA 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpB 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$			MpAC 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$					
G	LPS 0.75 $\mu\text{g ml}^{-1}$			LPS 0.075 $\mu\text{g ml}^{-1}$			LPS 0.025 $\mu\text{g ml}^{-1}$			LPS 0.006 $\mu\text{g ml}^{-1}$		
H	LPS 0.50 $\mu\text{g ml}^{-1}$			LPS 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$			LPS 0.0125 $\mu\text{g ml}^{-1}$			Control (-)		

Figura 17. Diseño de la placa de 96 pocillos para el ensayo de óxido nítrico.

VII.4.3. Determinación de la citotoxicidad de los polisacáridos por el ensayo de viabilidad celular (MTT)

El ensayo CellTiter 96® Non-radioactive es un método conveniente para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación, citotoxicidad, entre otros. Este ensayo está basado en la conversión celular de la sal tetrazaolium en un formazan, el cual es un producto de fácil detección utilizando un lector de placas de 96 pocillos (Promega, 2009).

La citotoxicidad de las fracciones de *M. pyrifera* se determinó exponiendo a los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 a un gradiente de concentración (500, 250, 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) de los 3 extractos. Se cosecharon las células cuando éstas se encontraban en una confluencia del 80%, se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 20,000 células por pocillo en un volumen de 90 μl por pocillo. A las 24 horas se agregaron 10 μl de los polisacáridos 10X y se incubó por 24 y 48 horas. Cumplido el tiempo de incubación se agregaron 15 μl de MTT preparado. Se incubó de nuevo por 4 horas y se agregaron 12 μl de SDS 20% para disolver las sales. Se dejó incubando por 16 horas y se leyó la

absorbancia a 550nm en el lector de placas (Whittaker Bioproducts, USA). El diseño de placa utilizado se muestra en la figura 18.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MpA 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpAC 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.75 $\mu\text{g ml}^{-1}$					
B	MpA 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpAC 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.50 $\mu\text{g ml}^{-1}$					
C	MpA 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpAC 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.075 $\mu\text{g ml}^{-1}$					
D	MpA 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpAC 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$					
E	MpA 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpAC 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.025 $\mu\text{g ml}^{-1}$					
F	MpA 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpB 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$		MpAC 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$		LPS 0.0125 $\mu\text{g ml}^{-1}$					
G							Medio solo			LPS 0.006 $\mu\text{g ml}^{-1}$		
H							Medio solo			Control (-)		

Figura 18. Diseño de placa utilizado para determinar la citotoxicidad de las fracciones MpA, MpB y MpAC.

Los resultados de los ELISA's, proliferación celular y óxido nítrico fueron analizados aplicando una ANOVA de una vía y se graficaron los resultados.

VIII. Resultados

VIII.1. Obtención de polisacáridos ácidos a partir de *M. pyrifera*

El proceso de obtención de polisacáridos ácidos fue exitoso. Se obtuvieron 1.1361g de un extracto fino, hidrosoluble y de color blanquecino (figura 19). Considerando que la cantidad de harina de *M. pyrifera* utilizada para la extracción fue de 10g, la proporción de la fracción obtenida fue de 11.361%.



Figura 19. Polisacáridos ácidos liofilizados a partir de harina de *M. pyrifera*.

VIII.2. Análisis de Infrarrojo de las fracciones de *M. pyrifera*

Los espectros de infrarrojo obtenidos para las fracciones de *M. pyrifera* son los siguientes:

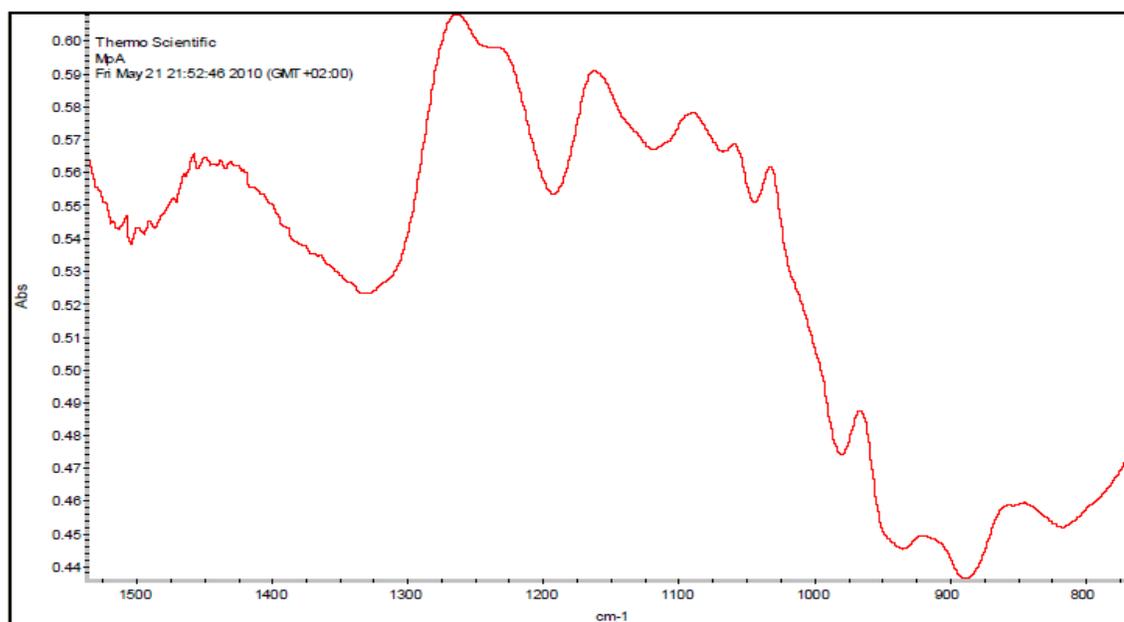


Figura 20. Espectro de infrarrojo de la fracción MpA

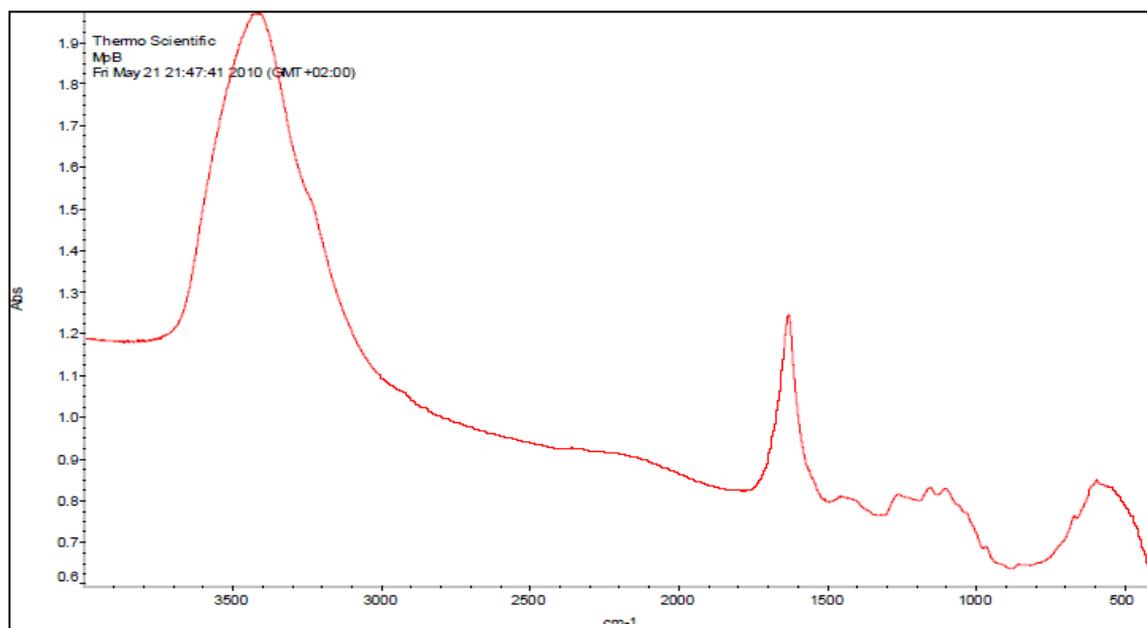


Figura 21. Espectro de infrarrojo de la fracción MpB

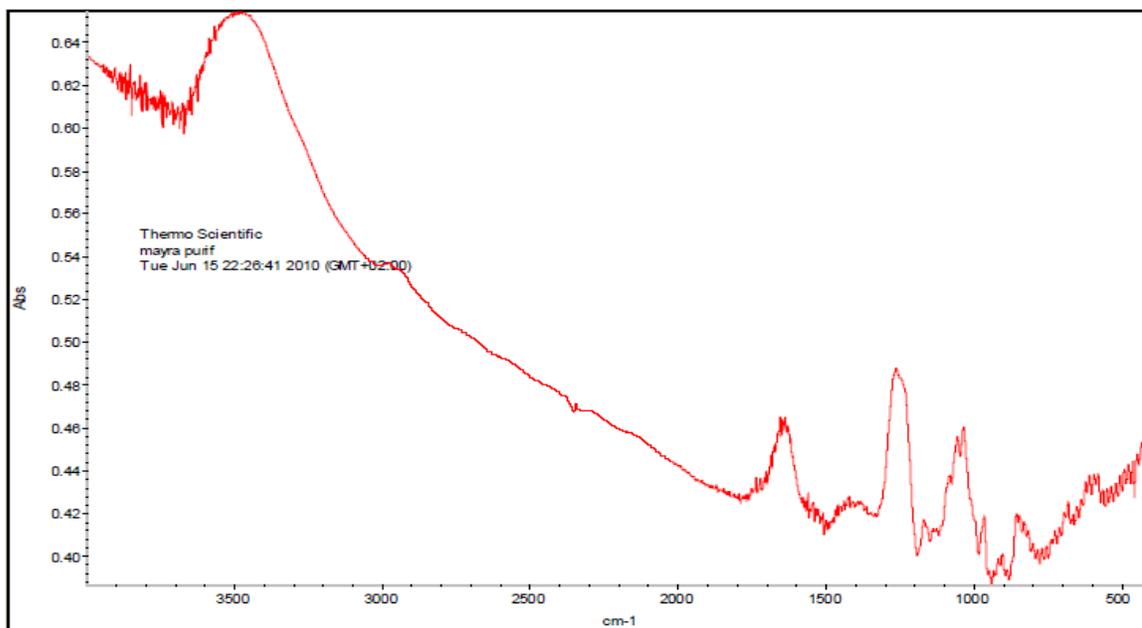


Figura 22. Espectro de infrarrojo de la fracción MpAC.

Como se mencionó en la metodología, la correlación logarítmica del OMNIC fue utilizada para comparar los espectros de las muestras con la librería de Thermo Fischer Scientific, del Laboratorio de Aplicaciones en Madrid, España. Los resultados de esta comparación se muestran en las figuras 23, 24 y 25.

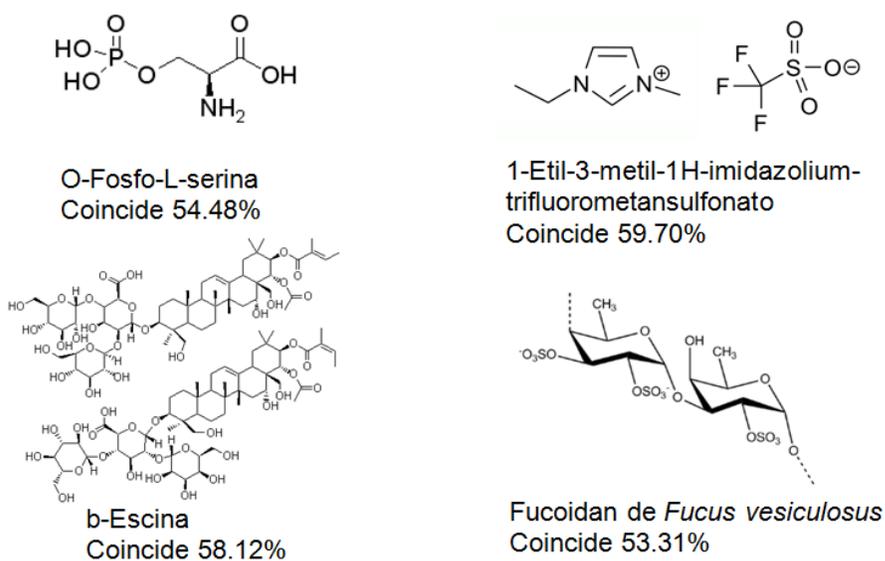


Figura 23. Estructura química de los compuestos semejantes al extracto MpA de acuerdo con el análisis de infrarrojo y el porcentaje de similitud.

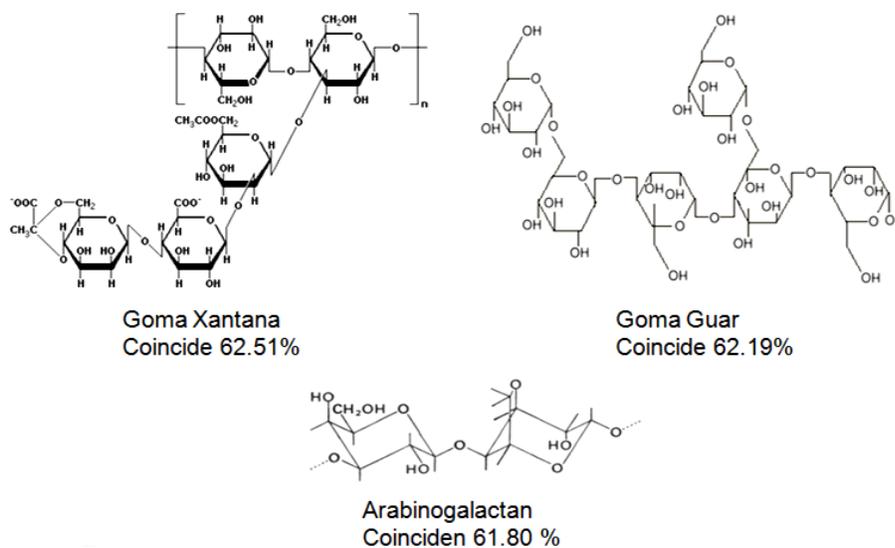


Figura 24. Estructura química de los compuestos semejantes al extracto MpB de acuerdo con el análisis de infrarrojo y el porcentaje de similitud.

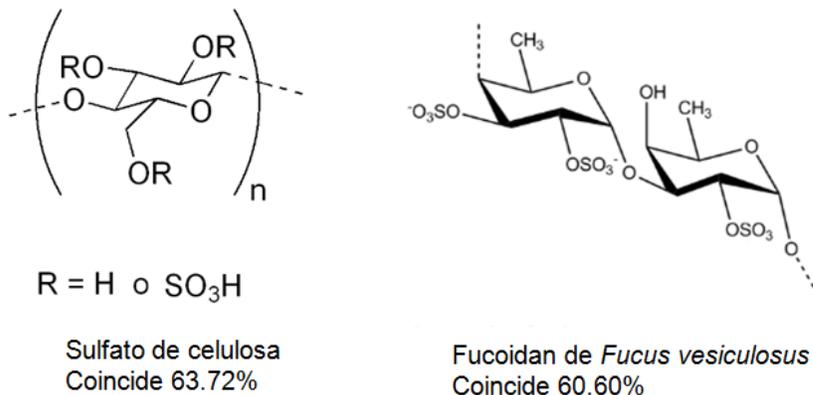


Figura 25. Estructura química de los compuestos semejantes al extracto MpAC de acuerdo con el análisis de infrarrojo y el porcentaje de similitud.

El reporte del análisis de infrarrojo de la muestras emitido por Thermo Fischer Scientific, del Laboratorio de Aplicaciones en Madrid se puede consultar en el Anexo II.

VIII.3. Obtención de rESAT-6

Después de realizar la inducción y la extracción periplásmica para obtener rESAT-6, se realizó un ensayo de ELISA para determinar si en los 40 ml totales obtenidos se contenía exitosamente la proteína recombinante en cuestión.

Como se menciona en la metodología, en una placa de 96 pocillos se agregó el control negativo (BSA3%), positivo (ESAT-6) por triplicado y se identificó la presencia de rESAT-6 utilizando el anticuerpo Anti HA. Las lecturas de absorbancia (405nm) obtenidas se graficaron y se muestran a continuación.

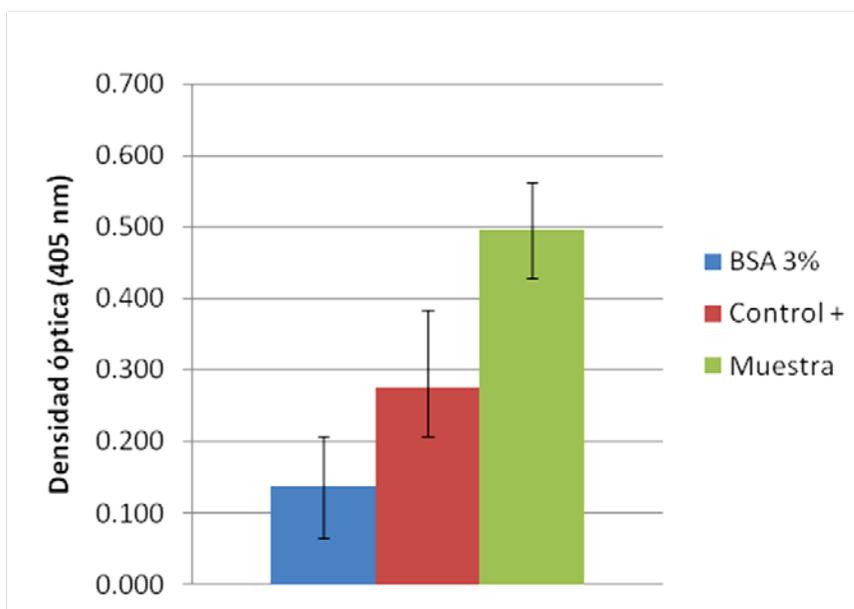


Figura 26. ELISA de inducción. En el eje x se observan los valores de absorbancia leídos a una longitud de onda de 405nm. Las barras presentan el promedio de la absorbancia obtenida para el control negativo (azul), el control positivo (rojo) y la muestra (verde).

Los resultados del ELISA mostrados en la gráfica anterior, indican que la obtención de rESAT-6 fue exitosa, por lo cual se prosiguió con la purificación de la proteína.

VIII.3.1. ELISA de reconocimiento en los volúmenes obtenidos durante la purificación de rESAT-6

El protocolo de la columna de cromatografía Histrap™ utilizada para la purificación de la proteína, indica la realización de lavados de la columna con diferentes soluciones para la recuperación de la proteína y el buen mantenimiento de la columna. Se realizó un ELISA para detectar la presencia de rESAT-6 en los lavados. Durante la purificación se obtienen 4 volúmenes diferentes: el volumen cargado, el equilibrado, el de elusión (donde se obtiene la proteína purificada) y el

de lavado. El volumen cargado es la solución (40 ml) que contenía la proteína de interés, pero al pasar por la columna de purificación, se espera que la proteína sea retenida por el níquel contenido a la columna debido a la afinidad que tienen los 6 residuos de histidina unidos a rESAT-6. Para verificar que la proteína recombinante fue removida de la solución se realiza un ELISA, el cual permitirá determinar si hay aun rESAT-6. El volumen equilibrado, son los 50 ml obtenidos al pasar la solución de unión a través de la columna de purificación que pretenden mejorar el proceso debido a su bajo contenido de imidazol. El volumen de elusión contiene la proteína purificada. De este se obtienen 25 ml. Después se realiza un lavado con agua (50 ml) para limpiar la columna. De cada uno de estos volúmenes se realizó un ELISA para detectar rESAT-6. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica.

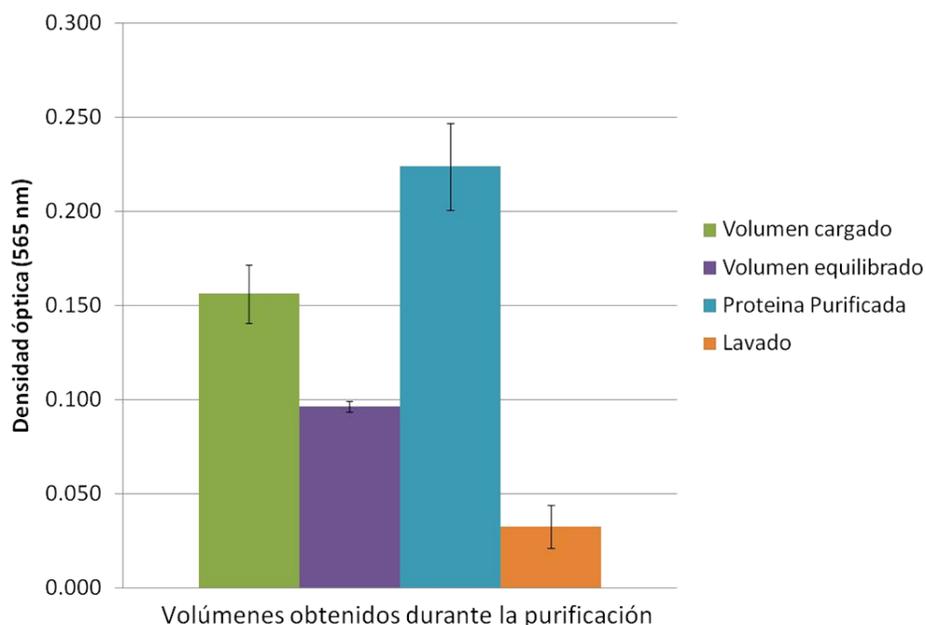


Figura 27. ELISA para detectar rESAT-6 en los volúmenes obtenidos durante su purificación con la columna Histrap™.

VIII.3.2. Determinación de la concentración de rESAT-6 con el ensayo MicroBCA

Después de dializar la proteína purificada en PBS 0.2X y liofilizarla, se determinó la concentración de rESAT-6 utilizando el ensayo colorimétrico Micro BCA™. Siguiendo el protocolo del proveedor (Micro BCA™ Protein Assay Kit Number 23235 Thermo Scientific) se determinó la concentración de la proteína recombinante utilizando una curva de BSA a concentraciones conocidas, se obtuvo una ecuación. La concentración de rESAT-6 fue de $31.1 \mu\text{g ml}^{-1}$. La curva estándar construida se muestra en la figura 28.

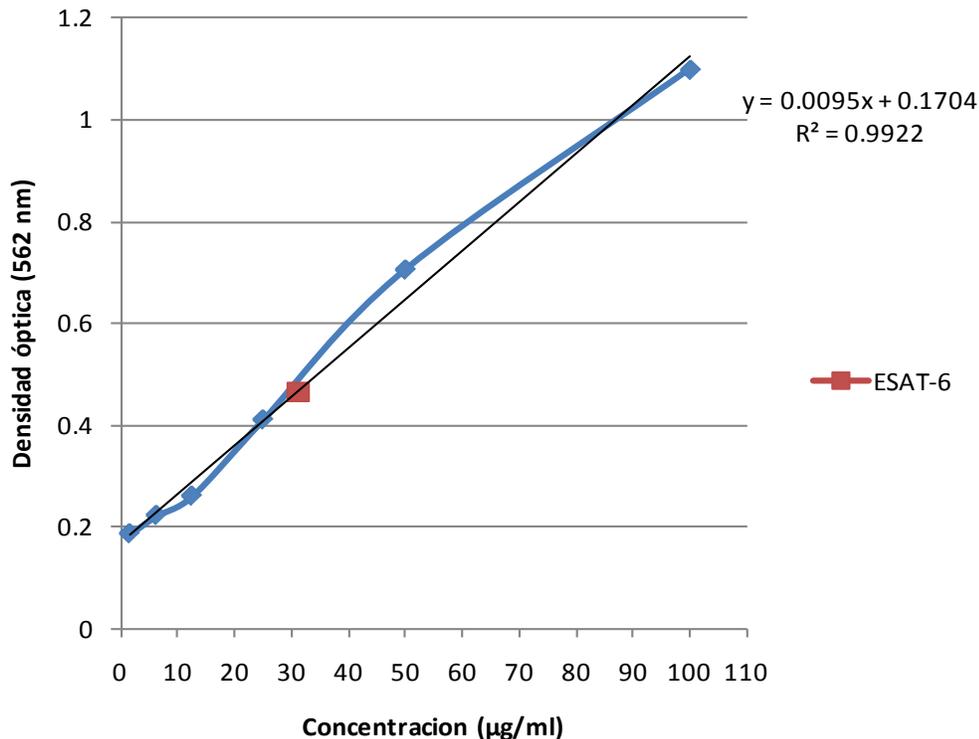


Figura 28. Curva estándar del ensayo Micro BCA para determinar la concentración total de proteínas. Determinación de la concentración de rESAT-6.

VIII.4. Estandarización del método de disección y del establecimiento de cultivo celular primario a partir de nódulos linfáticos de ratón

VIII.4.1. Células extraídas por digestión enzimática.

A las 24 horas de que las células se pusieron en cultivo, las cajas fueron observadas en el microscopio invertido ZEISS para determinar el estado de éstas. La cantidad de células observadas (Figura 29) fue casi nula y el medio de cultivo se observó turbio.

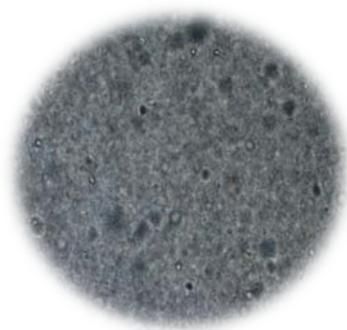


Figura 29. Caja de cultivo obtenido por digestión enzimática. Se observa la turbidez del medio por la contaminación bacteriana.

Se observaron las células en la cámara de Neubauer y se detectó contaminación bacteriana en el cultivo en mayor concentración que en la maceración mecánica. No fue posible realizar un estimado de la densidad celular presente ya que la cantidad de células fue muy pequeña.

VIII.4.2. Células extraídas por maceración de nódulos linfáticos de ratones no inmunizados.

Después de 24 horas, se observó la caja de cultivo en el microscopio invertido ZEISS. Se observaron algunas células y el medio se observó turbio (Figura 30).

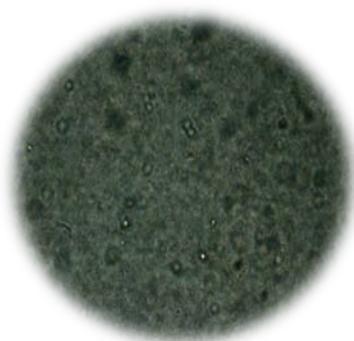


Figura 30. Caja de cultivo obtenido por maceración mecánica. Las figuras circulares con núcleo iluminado se identifican como células vivas.

Se observaron las células en la cámara de Neubauer y se detectó contaminación bacteriana en el cultivo. A pesar de que la cantidad de células fue mayor que el obtenido por digestión enzimática, no fue posible realizar un estimado de la densidad celular presente.



Figura 31. Técnica de maceración mecánica de los nódulos de ratón utilizada en los ensayos enviar a resultados

VIII.5. Estandarización de Concanavalin A

El objetivo de estandarizar la concentración de Concanavalin A y determinar el mejor tiempo de exposición de las células a esta sustancia es para utilizarla como control positivo de la proliferación celular en las pruebas donde se estudiará el efecto inmunoestimulante de las fracciones de *M. pyrifera*.

Los resultados de las absorbancias obtenidas del ensayo de viabilidad celular, cuyo diseño experimental se muestra en la figura 11 (placa de ConA), fueron lecturas iguales en los pocillos con células y los controles negativos, es decir, que los resultados no fueron de utilidad y se requirió realizar más pruebas para determinar el porqué de éstos. Las pruebas realizadas, como se menciona en la metodología, fueron las siguientes:

1. Cambiar la densidad celular utilizada. Para esto se requirió la estandarización de la densidad celular para el ensayo colorimétrico de viabilidad celular (MTS)

Se realizó un ensayo de viabilidad celular para establecer si 250,000 células por pocillo eran suficientes para obtener una lectura apropiada para este tipo de ensayo. Las absorbancias obtenidas fueron graficadas y se muestran en la siguiente figura.

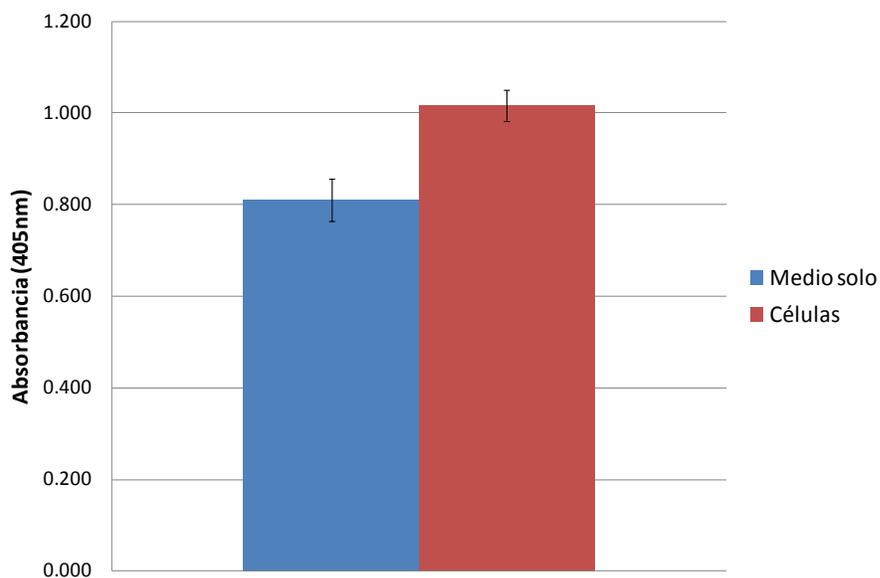


Figura 32. Ensayo colorimétrico MTS para determinar si una densidad celular de 2.5×10^5 células por pocillo es apropiada para el ensayo donde se probarán las fracciones de *M. pyrifera* como inmunoestimulantes inmunológicos.

Debido a que el ensayo de viabilidad celular (figura 31) mostró que la absorbancia del control negativo es muy semejante al positivo, por lo que se consideró que la densidad celular de 250,000 células por pocillo no es apropiada para este ensayo.

Se hizo otra prueba para determinar una mejor densidad celular para el ensayo de viabilidad utilizando diferentes densidades celulares. De la disección del bazo de ratón sin inmunizar se obtuvieron un total de 6.24×10^7 células, lo cual fue suficiente para sembrar las diferentes densidades celulares en la placa.

Los resultados del ensayo fueron los siguientes:

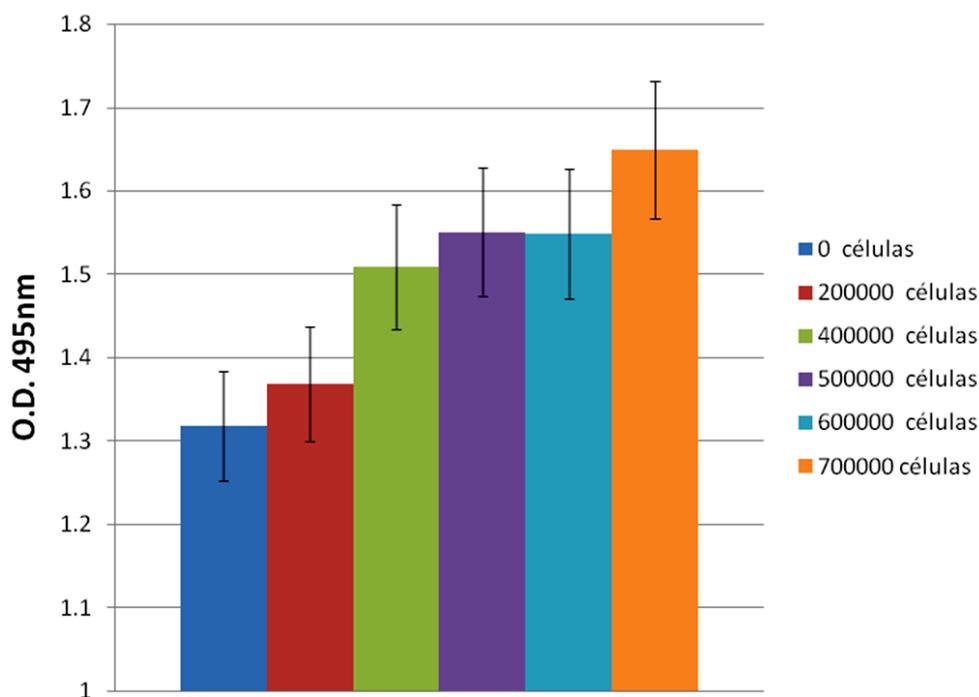


Figura 33. Ensayo de viabilidad celular Celltiter 96® One Solution. Comparación entre la lectura de diferentes densidades celulares, para determinar la más adecuada respecto al control negativo.

La densidad celular más apropiada se puede escoger con base en la lectura de absorbancia obtenida, ya que esta no debe ser muy baja (~ 0.200) ni muy alta (~ 1.000) para que se puedan identificar diferencias entre las condiciones experimentales y el control.

De acuerdo con los resultados de la gráfica anterior, la densidad más apropiada, es de 700, 000 células por pocillo para el ensayo de Celltiter 96® One Solution. Esta decisión, se ve apoyada con otros estudios donde se han utilizado densidades celulares de entre 500, 000 y 1'000,000 células por pocillo (Bautista, et al; 2000).

El ensayo de MicroBCA™ mostró que la concentración de la ConA está a solo el 40% de la concentración calculada, ya que una muestra de $50\mu\text{g ml}^{-1}$ mostró

contener solamente $21.64 \mu\text{g ml}^{-1}$, por lo que la concentración de ConA anteriormente utilizada fue menor que la que se estableció en el diseño experimental.

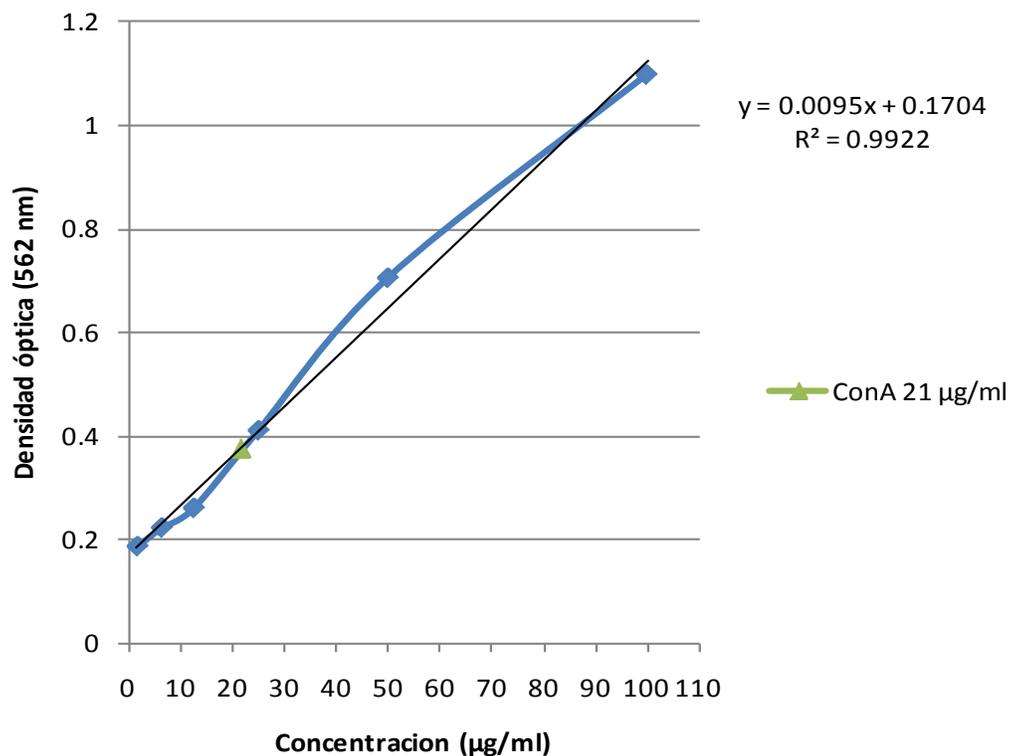


Figura 34. Curva estándar del ensayo Micro BCA para determinar la concentración total de proteínas. Determinación de la concentración de ConA.

Una vez establecida la mejor densidad celular a utilizar y re-ajustada la concentración de ConA, se repitió el experimento con el mismo diseño experimental, midiendo la proliferación a diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la figura 34.

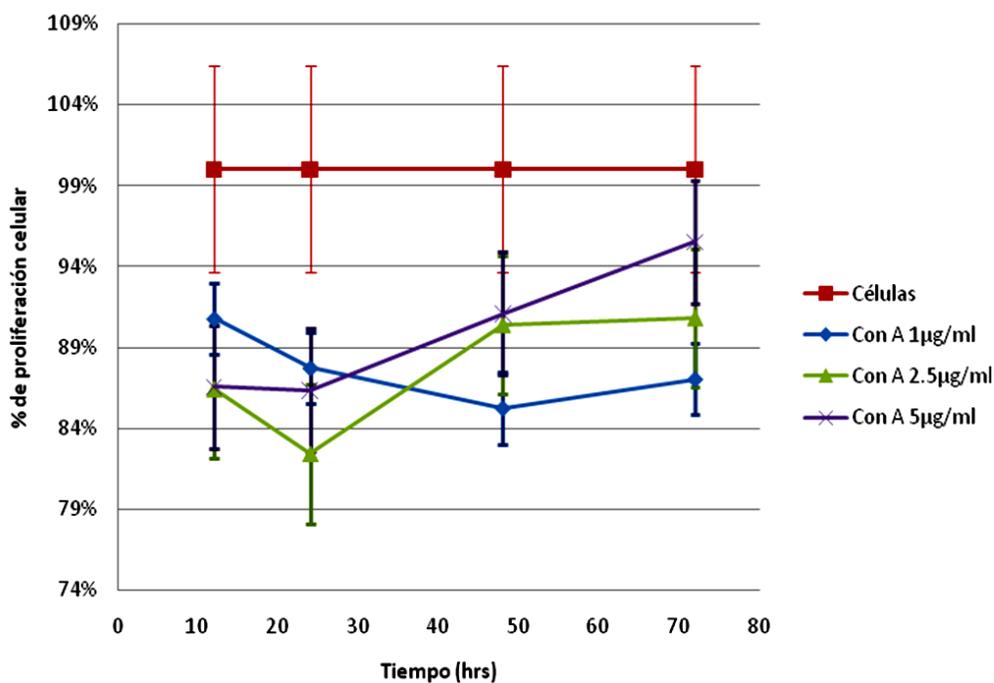


Figura 35. Ensayo colorimétrico Celltiter 96 ® One Solution para determinar la concentración y tiempo de exposición apropiados para utilizar ConA como control positivo de la proliferación de linfocitos T.

Esta gráfica muestra que las diferentes concentraciones de ConA, no inducen proliferación celular respecto al control negativo (células solas), lo que indica que es probable que la Concanavalin A sea tóxica para las células. Por esto se descartó el uso de ConA como control positivo de la proliferación.

VIII.6. Determinación por ensayos de proliferación celular de la actividad inmunoestimulante de las fracciones de *Macrocystis pyrifera* en ratones Balb/c

Para determinar el efecto de las fracciones de *M. pyrifera* como inmunoestimulante frente a rESAT-6 se inmunizaron 27 ratones de acuerdo con el siguiente diseño experimental:

- A. Determinar el tiempo de exposición a la proteína recombinante, se inmunizaron ratones con rESAT-6 en PBS y con rESAT-6 más Adyuvante completo de Freund. (Figura 35)
- B. Grupos de prueba inyectados con rESAT-6 y con diferentes concentraciones de MpA y MpB (Figura 36).
- C. Grupos de prueba inyectados con rESAT-6 y con diferentes combinaciones de MpA y MpB (Figura 37).

Se debe recordar que el tratamiento descrito en los puntos anteriores fue *in vivo*, previo al cultivo de las células extraídas de los ganglios poplíteos. Los resultados descritos en esta sección son los obtenidos en el ensayo *in vitro* al exponer todos los grupos a rESAT-6, contando con un control de células de la misma procedencia pero sin exponer a rESAT-6.

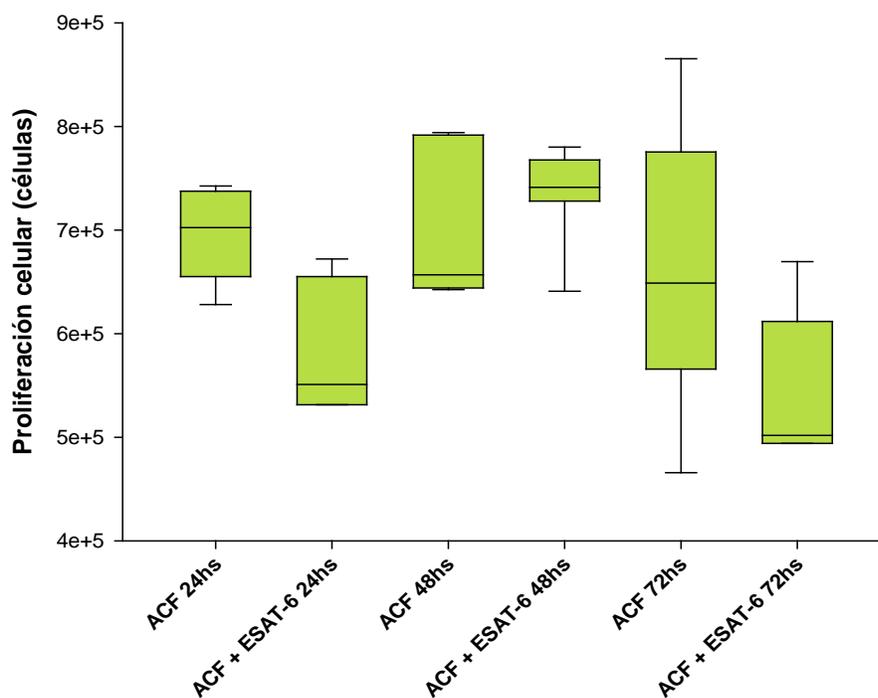


Figura 36. Ensayo de proliferación celular para determinar el mejor tiempo de exposición a rESAT-6 utilizando las células provenientes de los ganglios de ratón inmunizados con rESAT-6 y PBS1X (Grupo 0) y con rESAT-6 y adyuvante completo de Freund (ACF) (Grupo 1).

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada grupo y para cada tiempo.

Grupo 0: Ratones inmunizados con rESAT-6 en PBS2X

Al agregar rESAT-6, se observó que a las 24 h había un ligero aumento en la cantidad de células, respecto al control negativo (sin rESAT-6). La diferencia entre estos no fue lo suficientemente grande para indicarla como estadísticamente significativa.

A las 48 h disminuyó la cantidad de células en el pocillo expuesto a rESAT-6, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa.

A las 72 h aumentaron las células expuestas a rESAT-6, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Grupo 1: Ratones inmunizados con rESAT-6 más Adyuvante Completo de Freund.

A las 24 h, las células expuestas a rESAT-6 disminuyeron en cantidad respecto a las células control. La diferencia entre estos no fue lo suficientemente grande para indicarla como significativa.

A las 48 h la cantidad de células en el pocillo expuesto a rESAT-6 no presentó diferencia respecto al control no expuesto a la proteína recombinante.

A las 72 h el promedio disminuyó pero los valores se mantuvieron en el rango de los valores control.

Para determinar el tiempo de exposición a la proteína recombinante ESAT-6, en los ensayos *in vitro* con las células de los ganglios de ratón, se utilizó el grupo 1,

que fue inmunizado previamente el día uno con rESAT-6 y Adyuvante completo de Freund, esto con la visión de que la mejor respuesta se obtendría de este grupo. Como se muestra en la figura 35, no hay diferencia significativa entre los grupos desafiados con rESAT-6 y los que no, sin embargo, a las 48 h se obtuvieron mayor cantidad de células viables, por lo que se optó por este tiempo de exposición para los grupos del 2 al 8.

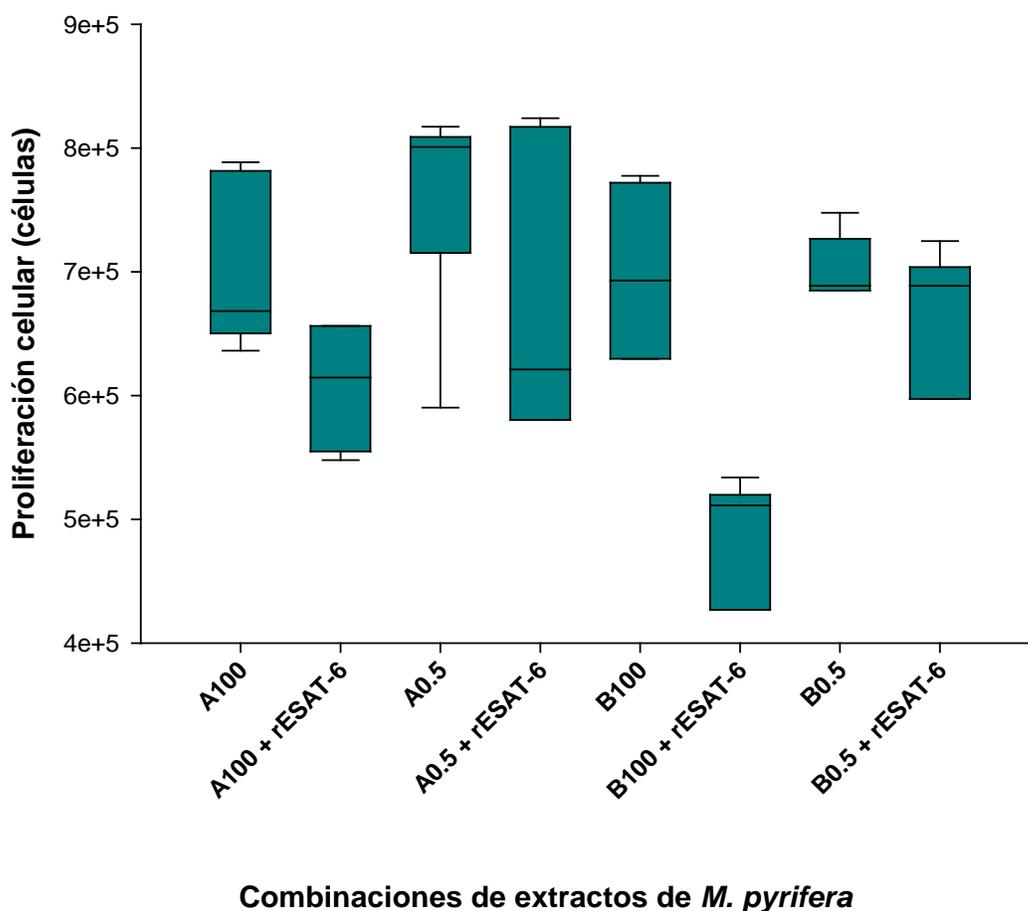


Figura 37. Ensayo de proliferación celular para determinar el efecto inmunoestimulante de diferentes concentraciones de las fracciones MpA y MpB. A: MpA; B: MpB; 100: 100 μ g; 0.5: 0.5 μ g; c: desafiados con rESAT-6 *in vitro*; la ausencia de "c" indica que no fueron desafiados

Grupos de prueba inyectados con rESAT-6 y con diferentes concentraciones de MpA y MpB:

En la figura 36 se comparan las lecturas de viabilidad celular para determinar si hubo proliferación de las células extraídas de los nódulos poplíteos infartados (grupos 2 al 5), las cuales fueron cultivadas en placa y desafiadas con rESAT-6 para determinar si las fracciones MpA y MpB tienen efecto inmunoestimulante. El análisis estadístico indicó que la diferencia entre la media de los grupos es altamente significativa ($P < 0.001$), por lo que no se considera que estas diferencias sean por muestreo al azar. La gráfica muestra, que al comparar los controles (A100, A0.5, B100 y B0.5) con los pocillos de prueba desafiados con rESAT-6 (A100c, A0.5c, B100c y B0.5c), se tiene una media menor en estos últimos, es decir que hay una disminución de la viabilidad celular, sin embargo, no hay diferencia significativa excepto en el grupo B100c respecto a sus control ($P < 0.05$).

A continuación se detallan los resultados para cada grupo en particular.

Grupo 2: Ratones inmunizados con rESAT-6 más 100 μg por ratón de MpA

A las 48 h, con la concentración más alta de MpA, se observa que la media y la distribución de los valores de viabilidad celular en los pocillos expuestos a la proteína recombinante bajan respecto al control, pero la diferencia no es suficientemente grande para considerarse significativa.

Grupo 3: Ratones inmunizados con rESAT-6 más 0.5 μg por ratón de MpA

Las células expuestas *in vivo* con la menor concentración de MpA, mantienen una densidad celular muy similar a las células de los pocillos de control.

Grupo 4: Ratones inmunizados con rESAT-6 más 100 μg por ratón de MpB

A las 48 h, con la concentración más alta de MpB, se observa que la media y la distribución de los valores de viabilidad celular en los pocillos expuestos a la proteína recombinante bajan significativamente respecto al control.

Grupo 5: Ratones inmunizados con rESAT-6 más 0.5 µg por ratón de MpB

Las células expuestas *in vivo* a la menor concentración de MpB, mostraron que a las 48 h la media y la distribución de los valores de viabilidad celular en los pocillos expuestos a la proteína recombinante se mantienen iguales respecto al control.

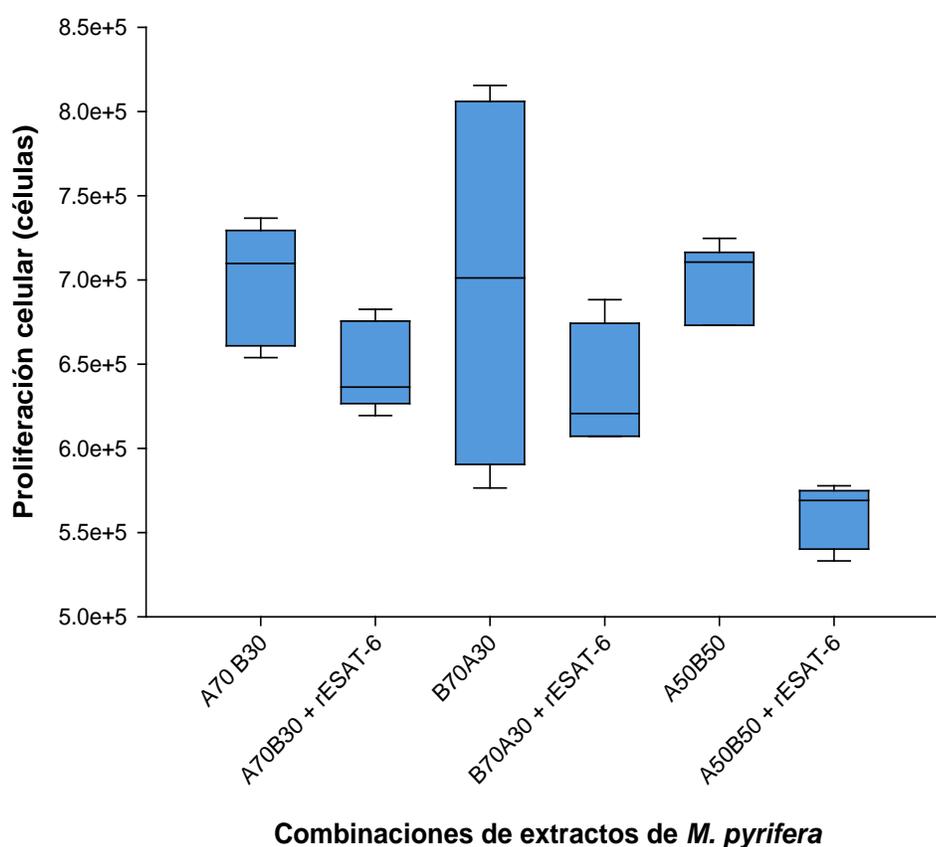


Figura 38. Ensayo de proliferación celular, para determinar el efecto inmunoestimulante de las fracciones combinados en diferentes proporciones: A70B30: 70% de A + 30%B; A30B70:30% de A + 70%B; A50B50:50% de A + 50%B.

En la figura 38, se comparan las lecturas de viabilidad celular para determinar si hubo proliferación de las células extraídas de los nódulos poplíteos infartados, las cuales fueron cultivadas en placa y desafiadas con rESAT-6 para determinar si las fracciones MpA y MpB tienen efecto inmunoestimulante. La gráfica muestra, que al comparar los controles (A70B30, A30B70 y A50B50) con los pocillos de prueba desafiados con rESAT-6 (A70B30c, A30B70c y A50B50c), se tiene una media menor en estos últimos, es decir que hay una disminución de la viabilidad celular, sin embargo, no hay diferencia significativa excepto en el grupo A50B50c respecto a sus controles.

A continuación se detallan los resultados para cada grupo en particular.

Grupo 6: Ratones inmunizados con rESAT-6 más 70 μ g por ratón de MpA combinado con 30 μ g por ratón de MpB.

Las células expuestas a la proteína recombinante disminuyeron ligeramente su cantidad respecto al control, sin embargo la diferencia no es significativa.

Grupo 7: Ratones inmunizados con rESAT-6 más 70 μ g por ratón de MpB combinado con 30 μ g por ratón de MpA.

El valor de la media de la viabilidad en el pocillo de prueba disminuyó respecto al control, pero no hay diferencia significativa entre estos debido a su dispersión.

Grupo 8: Ratones inmunizados con rESAT-6 más 50 μ g por ratón de MpA combinado con 50 μ g por ratón de MpB.

Las células expuestas a rESAT-6 disminuyeron significativamente su viabilidad respecto al pocillo control, el cual presentó alrededor de 700 mil células viables, mientras que el pocillo de prueba se encontró por debajo de las 600 mil células viables.

Al comparar los datos de todas las condiciones en las células desafiadas, se encuentra que la fracción que disminuyó la cantidad de células viables fue MpB a

una concentración de 100µg y la que presentó una mayor cantidad de células fue la combinación de la fracción MpA con el MpB a una concentración de 50µg cada uno, aunque esta no presentó diferencia significativa respecto a su control.

VIII.7. Cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 y exposición a las fracciones de *M. pyrifera*

VIII.7.1. Determinación de TNF-α producido por RAW 264.7 posterior a la exposición de la fracción de *M. pyrifera* MpA.

En la figura 39 a) muestra la cantidad de TNF-α (ng por cada 1000 células) producido (eje y) por los macrófagos RAW 264.7 al exponerlos a 6 concentraciones diferentes de la fracción MpA (eje x) a las 24 h y 48 h.

La menor concentración de extracto utilizado produjo en promedio 0.262 ng por cada 1000 células a las 24 h y 0.719 ng por cada 1000 células a las 48 h; la concentración que más produjo TNF-α fue la de 250 µg ml⁻¹ en ambos tiempos de incubación: 0.874 ng por cada 1000 células y 1.034 ng por cada 1000 células para 24 h y 48 h respectivamente.

A pesar de que las concentraciones de 12.5, 25 y 50 µg ml⁻¹ tienen valores de TNF-α mayores a las 24 h que a las 48 h, al realizar una prueba de t, los promedios comparados como grupo indican que la diferencia no es lo suficientemente grande para rechazar la posibilidad de que las diferencias son debido a la variabilidad del muestreo. Estadísticamente no hay diferencia significativa entre los grupos de 24 y 48 h (P=0.076).

La cantidad de TNF-α producida por el extracto MpA no tiene una gran diferencia al variar las dosis de la fracción de 12.5 a 250 µg ml⁻¹, ni entre 25 y 50 µg ml⁻¹, ni entre 50 y 500 µg ml⁻¹ por lo que en estos rangos no hay grandes diferencias, esto se aplica tanto a las 24 h como a las 48 h. Sin embargo, el análisis estadístico

indica que la variación en la concentración de la fracción MpA si tiene efecto en la producción de TNF- α ($P = 0.002$ para 24 h y $P = 0.023$ para 48 h).

VIII.7.2. Determinación de TNF- α producido por RAW 264.7 posterior a la exposición de la fracción MpB de *M. pyrifera*.

En la figura 39 b) muestra la cantidad de TNF- α (ng por cada 1000 células) producido (eje y) por los macrófagos RAW 264.7 al exponerlos a 6 concentraciones diferentes de la fracción MpB (eje x), a las 24 y 48 horas.

La menor concentración de extracto utilizado produjo en promedio 0.376 ng por cada 1000 células a las 24h y 1.306 ng por cada 1000 células a las 48 h; la concentración que produjo una alta cantidad de TNF- α fue la de 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en ambos tiempos de incubación: 1.189 ng por cada 1000 células y 2.181 ng por cada 1000 células para 24 h y 48 h respectivamente.

Se realizó una prueba de t y se determinó que hay diferencia muy altamente significativa ($P < 0.001$) entre los valores promedio de TNF- α obtenidos a las 24 h y a las 48 h, lo que indica que para el extracto MpB la cantidad de citocina producida se ve influida por el tiempo de exposición a este.

La cantidad de TNF- α no presenta diferencia significativa al exponer las células al rango de concentración de 25 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, lo mismo sucede en el rango de 250 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, indicando que las concentraciones entre ellos producen la misma cantidad de TNF- α para 24 h y para 48 h. El análisis estadístico muestra que la producción de la citocina se ve afectada por la cantidad de extracto MpB utilizado ($P = < 0.001$).

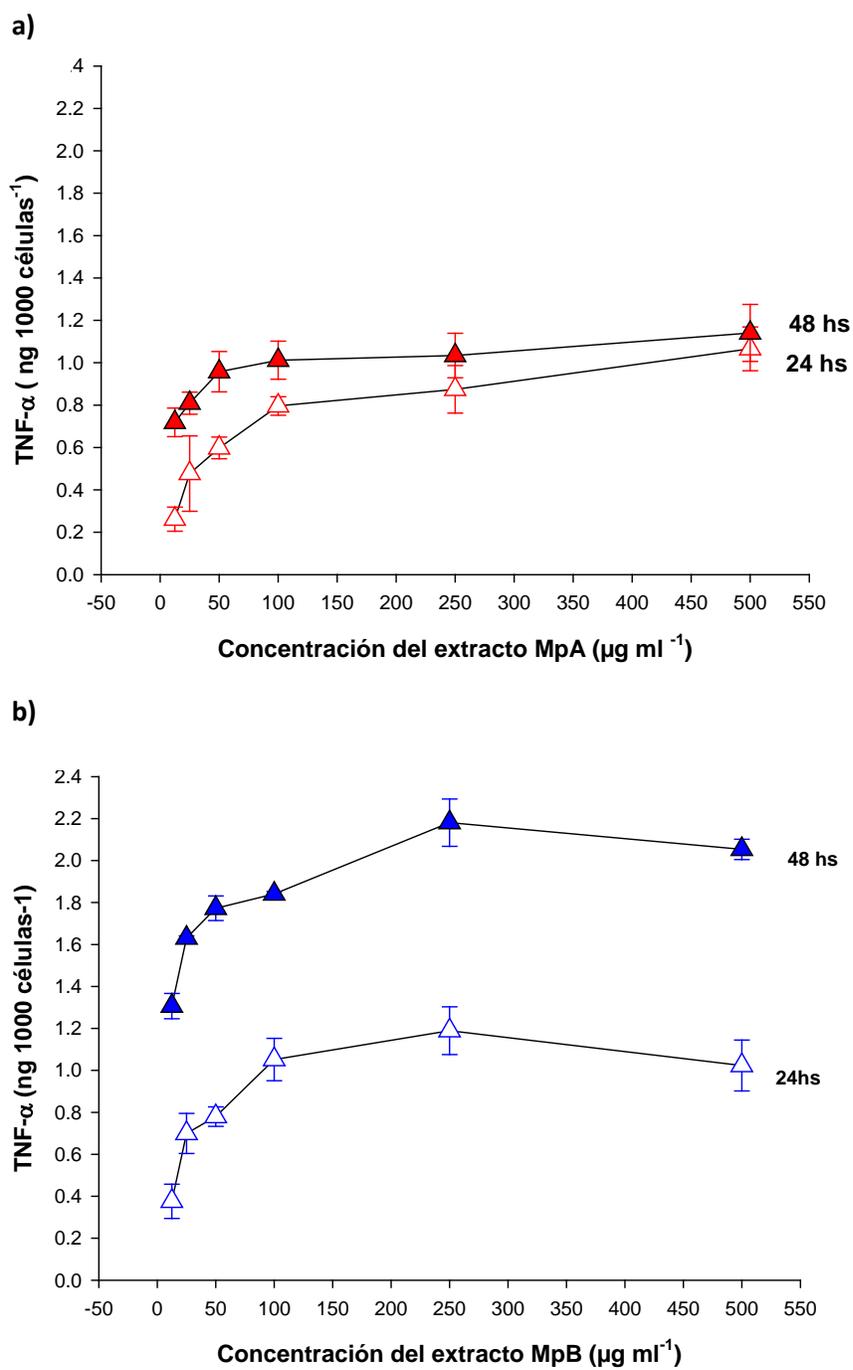


Figura 39. Gráficas de la producción de TNF- α al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpA (a) y el extracto MpB (b).

VIII.7.3. Determinación de TNF- α producido por RAW 264.7 posterior a la exposición de la fracción de *M. pyrifera* MpAC.

En la figura 40 muestra la cantidad de TNF- α (ng por cada 1000 células) producido (eje y) por los macrófagos RAW 264.7 al exponerlos a 6 concentraciones ($\mu\text{g ml}^{-1}$) diferentes de la fracción MpAC (eje x) a las 24 y 48 horas.

La menor concentración de extracto utilizado produjo en promedio 0.144 ng por cada 1000 células a las 24 h y 0.483 ng por cada 1000 células a las 48 h; las concentraciones que produjeron una alta cantidad de TNF- α fueron las de 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, que presentaron valores similares entre ellos en ambos tiempos de incubación, llegando hasta 0.951 ng por cada 1000 células y 1.637 ng por cada 1000 células para 24 h y 48 h respectivamente.

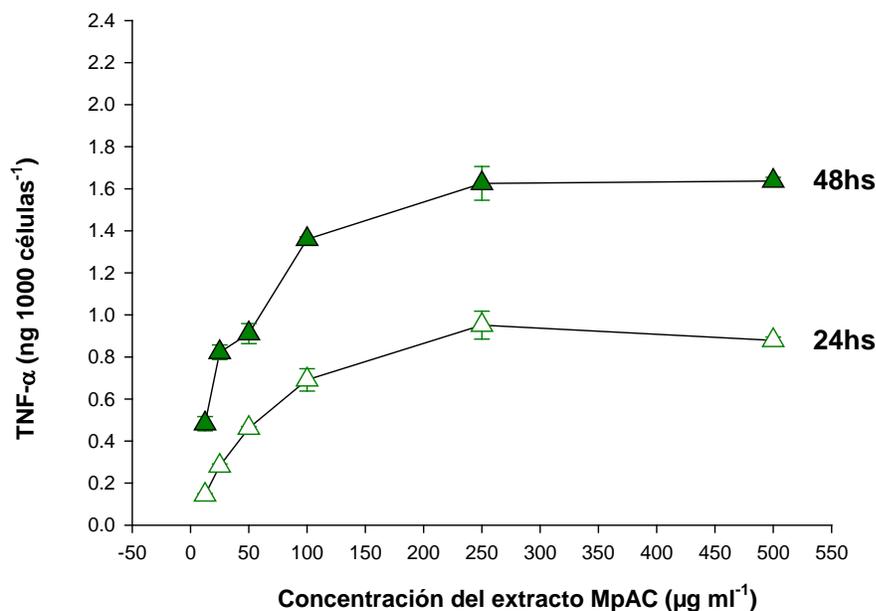


Figura 40. Gráfica de la producción de TNF- α al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpAC.

Se realizó una prueba de t y se determinó que hay diferencia significativa ($P = 0.035$) entre los valores promedio de TNF- α obtenidos a las 24 h y a las 48 h, lo que indica que para el extracto MpAC la cantidad de citocina producida se ve influida por el tiempo de exposición a este.

La cantidad de TNF- α no presenta diferencia significativa cuando se exponen las células al rango de concentración de 12.5 a 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$, lo mismo sucede en el rango de 250 a 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, indicando que las concentraciones entre ellos producirán la misma cantidad de TNF- α a las 24 h, mientras que a las 48 h, el rango de 25 a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ no presenta diferencia en la producción de citocina; el análisis estadístico muestra que la producción de la citocina se ve afectada por la cantidad de extracto MpAC utilizado ($P = <0.001$).

Se realizó un análisis de varianza de dos vías para determinar el efecto que tiene el dejar los macrófagos 24 h o 48 h expuestos a cada extracto y para determinar si el efecto de cada extracto es significativamente diferente entre ellos. Los resultados de las diferencias entre los tiempos se describieron en los apartados anteriores (VIII.7.1 al 3); los resultados de las pruebas entre el efecto que tiene un extracto con otro en los dos tiempos de incubación, mostraron que a las 24 h no hay diferencia significativa entre MpA y MpB ($P=0.356$), entre MpAC y MpB ($P=0.136$), ni entre MpA y MpAC ($P= 0.556$); sin embargo a las 48 h hay diferencia muy altamente significativa entre MpA y MpB ($P<0.001$) y altamente significativa entre MpAC y MpB ($P=0.001$) pero no entre MpA y MpAC ($P=0.304$), lo cual indica que a las 48 h el efecto que tiene MpB sobre los macrófagos, respecto a la producción de TNF- α , es diferente comparado a los efectos de las fracciones MpA y MpAC, siendo MpB el extracto que produjo mayor cantidad de TNF- α .

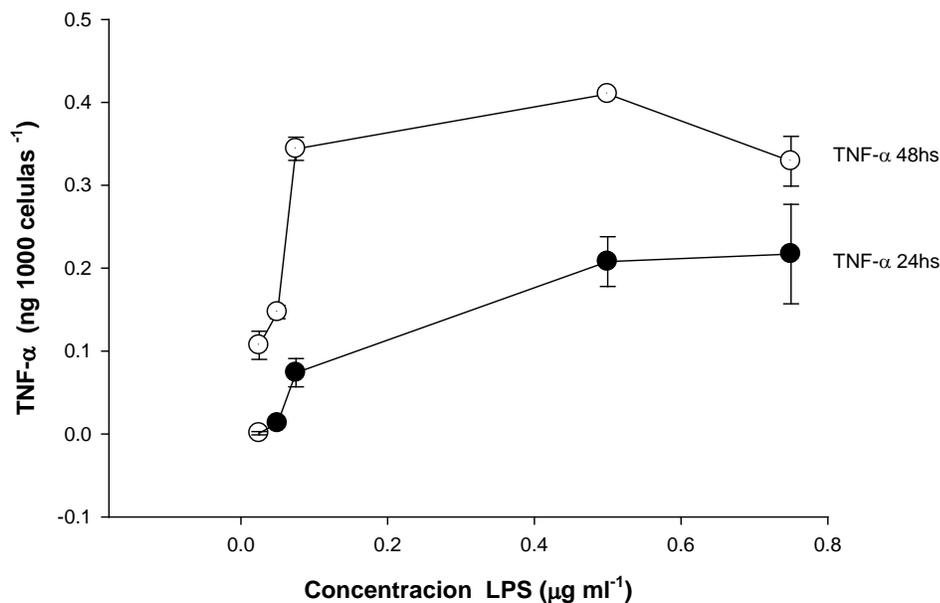


Figura 41. Gráfica de la producción de TNF- α al exponer macrófagos RAW 264.7 al LPS como control de la capacidad de las células para producir ésta citocina.

En la figura 41 se muestra la producción de TNF- α inducida al exponer las células al LPS en distintas concentraciones durante 24 h y 48 h. La gráfica demuestra que las células responden adecuadamente al LPS y que estaba en las condiciones adecuadas para utilizarlas en el experimento.

VIII.7.4. Determinación de IL-6 producida por RAW 264.7 posterior a la exposición de la fracción de *M. pyrifera* MpA.

En la figura 42 a) muestra la cantidad de IL-6 (ng por cada 1000 células) producido (eje y) por los macrófagos RAW 264.7 al exponerlos a 6 concentraciones ($\mu\text{g ml}^{-1}$) diferentes de la fracción MpA (eje x) a las 24 y 48 horas.

La menor concentración de extracto utilizado produjo en promedio 0.073 ng por cada 1000 células a las 24h y 0 ng por cada 1000 células a las 48 h; la concentración que más produjo IL-6 fue la de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en ambos tiempos de incubación: 0.210 ng por cada 1000 células y 0.352 ng por cada 1000 células para 24 h y 48 h respectivamente.

Al realizar una prueba de t, los promedios comparados como grupo indican que la diferencia no es lo suficientemente grande para rechazar la posibilidad de que las diferencias sean debido a la variabilidad del muestreo. Estadísticamente no hay diferencia significativa entre los grupos de 24 y 48 h ($P=0.818$). esto indicó que la producción de IL-6 no se vio afectada por el tiempo de exposición al extracto MpA.

La cantidad de IL-6 no presentó diferencia significativa cuando se exponen las células al rango de concentración de 12.5 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, indicando que en este rango se produjo la misma cantidad de IL-6 a las 24 h, mientras que a las 48 h, el rango de 12.5 a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ no presentó diferencia en la producción de citocina, sucediendo lo mismo de 25 a 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$; el análisis estadístico muestra que la producción de la citocina se vio afectada por la cantidad de extracto MpA utilizado ($P = <0.001$).

VIII.7.5. Determinación de IL-6 producida por RAW 264.7 posterior a la exposición de la fracción de *M. pyrifera* MpB.

En la figura 42 b) se muestra la cantidad de IL-6 (ng por cada 1000 células) producido (eje y) por los macrófagos RAW 264.7 al exponerlos a 6 concentraciones ($\mu\text{g ml}^{-1}$) diferentes de la fracción MpB (eje x) a las 24 y 48 horas.

La menor concentración de extracto utilizado produjo en promedio 0.075 ng por cada 1000 células a las 24 h y 0.069 ng por cada 1000 células a las 48 h; la concentración que más produjo IL-6 fue la de 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en ambos tiempos de

incubación: 0.260 ng por cada 1000 células y 0.572 ng por cada 1000 células para 24 h y 48 h respectivamente.

Al realizar una prueba de t, los promedios comparados como grupo indicaron que la diferencia es lo suficientemente grande. Estadísticamente hay diferencia significativa entre los grupos de 24 y 48 h ($P=0.002$), esto indica que la producción de IL-6 se vio afectada por el tiempo de exposición al extracto MpB.

La cantidad de IL-6 no presenta diferencia cuando se exponen las células al rango de concentración de 12.5 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, así como al rango de entre 250 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ indicando que la producción de IL-6 en dichos rangos a las 24 h fue la misma, mientras que a las 48 h, el rango de entre 25 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ no presentó diferencia en la producción de citocina, sucediendo lo mismo de 100 a 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$; el análisis estadístico muestra que la producción de la citocina se vio afectada por la cantidad de extracto MpB utilizado ($P = <0.001$).

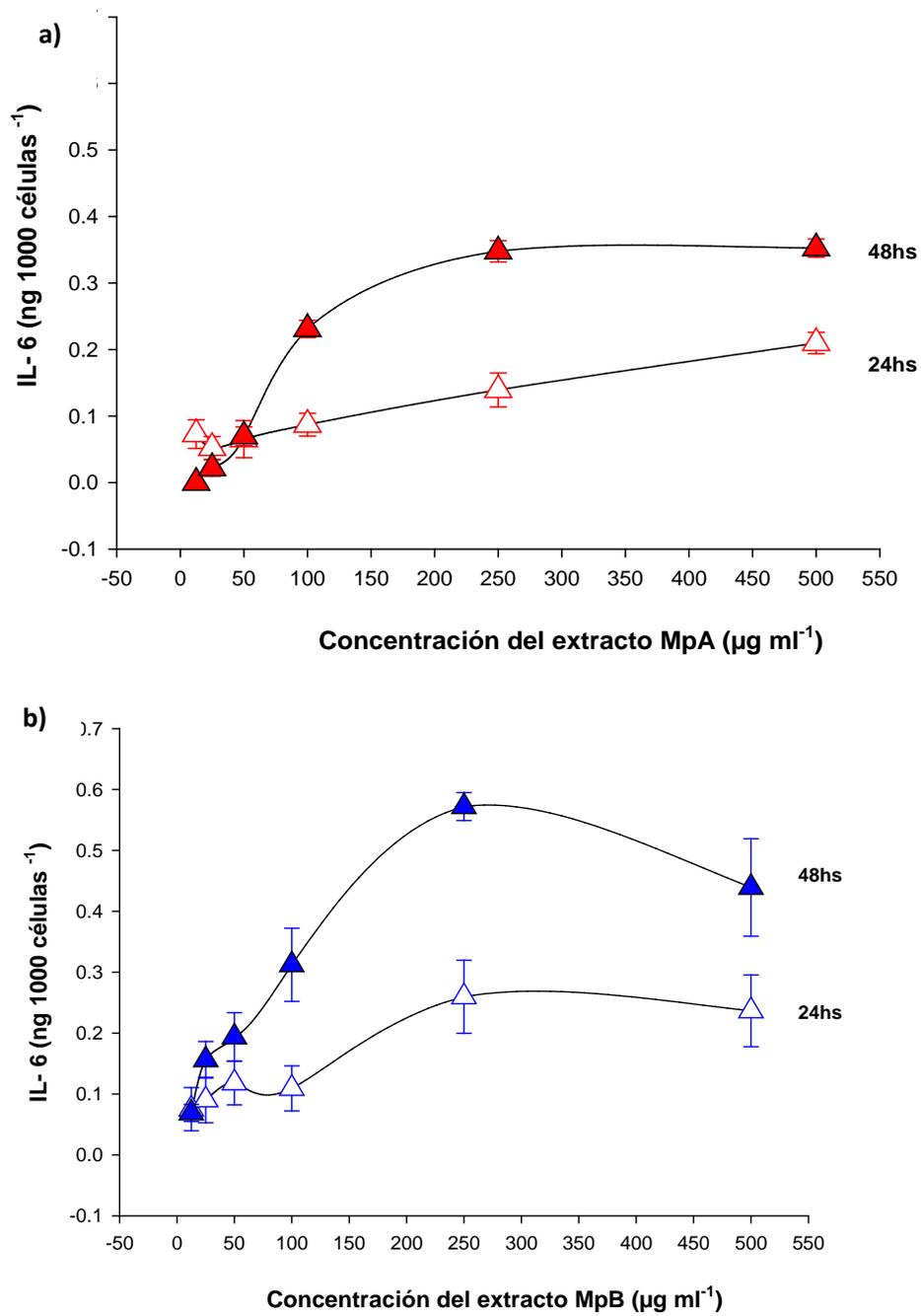


Figura 42. Gráficas de la producción de IL-6 al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpA (a) y el extracto MpB (b)

VIII.7.6. Determinación de IL-6 producida por RAW 264.7 posterior a la exposición de la fracción de *M. pyrifera* MpAC.

En la figura 43 muestra la cantidad de IL-6 (ng por cada 1000 células) producido (eje y) por los macrófagos RAW 264.7 al exponerlos a 6 concentraciones ($\mu\text{g ml}^{-1}$) diferentes de la fracción MpAC (eje x) a las 24 y 48 horas.

La menor concentración de extracto utilizado produjo en promedio 0.024 ng por cada 1000 células a las 24 h y 0.002 ng por cada 1000 células a las 48 h; la concentración que más produjo IL-6 fue la de $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ en ambos tiempos de incubación: 0.026 ng por cada 1000 células y 0.497 ng por cada 1000 células para 24 h y 48 h respectivamente.

Al realizar una prueba de t-student, los promedios comparados como grupo indican que la diferencia no es lo suficientemente grande para rechazar la posibilidad de que estas diferencias son debido a la variabilidad del muestreo. Estadísticamente no hay diferencia significativa entre los grupos de 24 y 48 h ($P=0.394$), esto indica que la producción de IL-6 no se vio afectada por el tiempo de exposición al extracto MpAC.

La cantidad de IL-6 no presenta diferencia significativa cuando se exponen las células al rango de concentración de 12.5 a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$, indicando que las concentraciones incluidas en este rango producen la misma cantidad de IL-6 a las 24 h, mientras que a las 48 h, el rango de 12.5 a $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ no presenta diferencia en la producción de citocina. En el rango de 250 a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ tampoco tiene diferencia significativa en la producción de la citocina. El análisis estadístico muestra que la producción de la citocina se ve afectada por la cantidad de extracto MpAC utilizado ($P<0.001$).

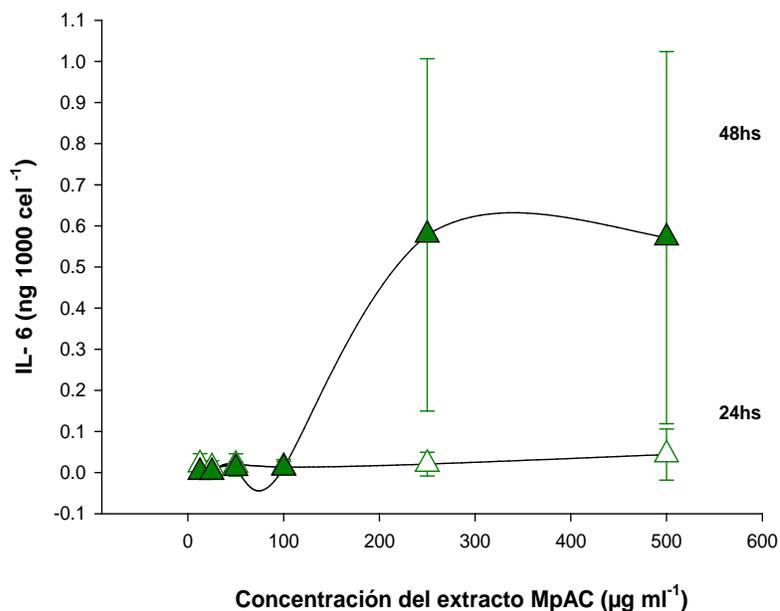


Figura 43. Gráfica de la producción de IL-6 al exponer macrófagos RAW 264.7 al extracto MpAC.

Se realizó un análisis de varianza de dos vías para determinar el efecto que tiene el dejar los macrófagos a 24 h y 48 h expuestos a cada extracto y para determinar si el efecto de cada extracto es significativamente diferente entre ellos. Los resultados de las diferencias entre los tiempos se describieron en los apartados anteriores (VIII.7.4 al 6); los resultados de las pruebas entre el efecto que tiene un extracto con otro en los dos tiempos de incubación, mostraron que hay diferencia significativa entre MpA y MpB ($P=0.021$) y entre MpAC y MpB ($P=0.002$), pero entre MpA y MpAC no la hay ($P= 0.199$).

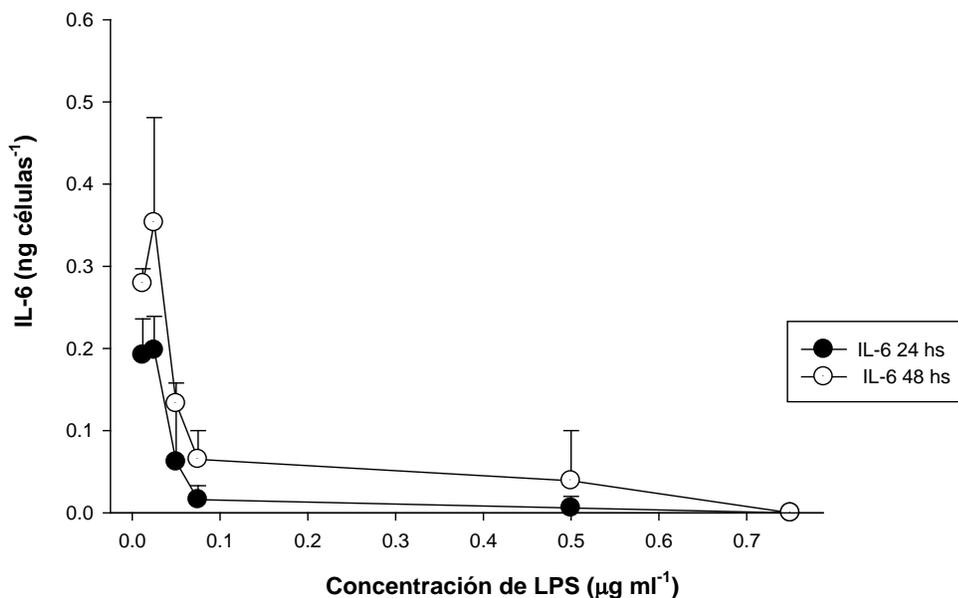


Figura 44. Gráfica de la producción de IL-6 al exponer macrófagos RAW 264.7 al LPS como control de la capacidad de las células para producir ésta citocina.

La figura 44 muestra la producción de IL-6 inducida al exponer las células al LPS en distintas concentraciones durante 24 h y 48 h. La gráfica demuestra que las células responden adecuadamente al LPS y que estaba en las condiciones adecuadas para utilizarlas en el experimento.

VIII.7.7. Determinación de la producción de óxido nítrico (ON) por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a las fracciones de *M. pyrifera*.

Para este ensayo, se realizaron 4 réplicas del experimento para cada extracto, sin embargo solo una fue exitosa y son los promedios de ésta, los que se grafican e interpretan a continuación. Debido a esto, estos resultados se utilizaron únicamente para estimar la tendencia de la producción del óxido nítrico a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Para el extracto MpA, se obtuvieron concentraciones de ON más altas a las 24 h de exposición, mientras que a las 48 h disminuyó o fue nula completamente su detección (Figura 44). El extracto MpB tiene valores mayores a las 48 h que a las 24 h en la mayoría de las concentraciones utilizadas. La excepción es, marcadamente, la producción de ON al exponer las células a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 45). Al exponer los macrófagos a MpAC, la presencia de ON fue muy baja, teniendo lecturas diferentes de cero sólo a las 24 h, mientras que a las 48 h no fue detectado (Figura 46).

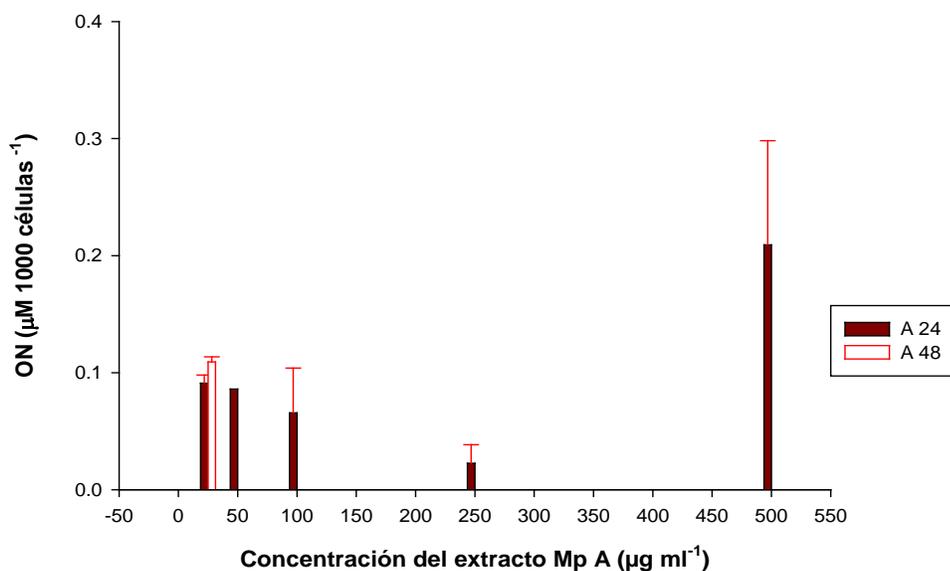


Figura 45. Concentración de ON producido por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a diferentes concentraciones de MpA expuestos durante 24 h y 48 h.

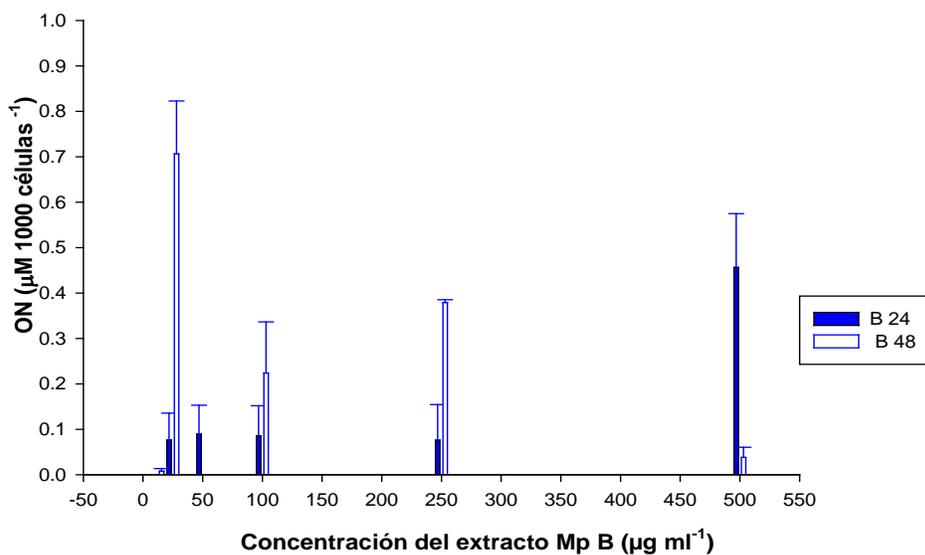


Figura 46. Concentración de ON producido por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a diferentes concentraciones de MpB expuestos durante 24 h y 48 h.

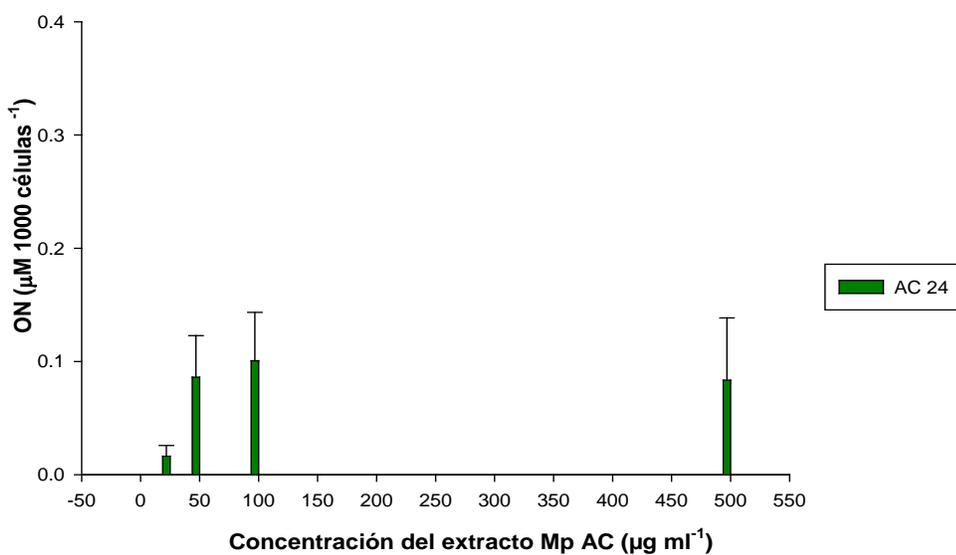


Figura 47. Concentración de ON producido por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a diferentes concentraciones de MpAC expuestos durante 24 h y 48 h.

La exposición a los polisacáridos de *M. pyrifera* disminuyeron la cantidad de células vivas sembradas en la placa de 96 pocillos al aumentar la concentración de las fracciones. Las fracciones A y B presentaron los mismos porcentajes de células viables, así como la misma tendencia a disminuir al aumentar la cantidad de extracto utilizado. Por otro lado, el extracto MpAC, fue el que tuvo mayor porcentaje de células viables a bajas concentraciones. Las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ presentaron una viabilidad celular del 102%, 79%, 70% y 60% respectivamente, mientras que las de 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ bajó hasta 47% y la de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 42%; estos valores son importantes, ya que los otros extractos tuvieron una viabilidad máxima de 55% (MpA) y 51% (MpB) y mínima de 29% y 34% respectivamente.

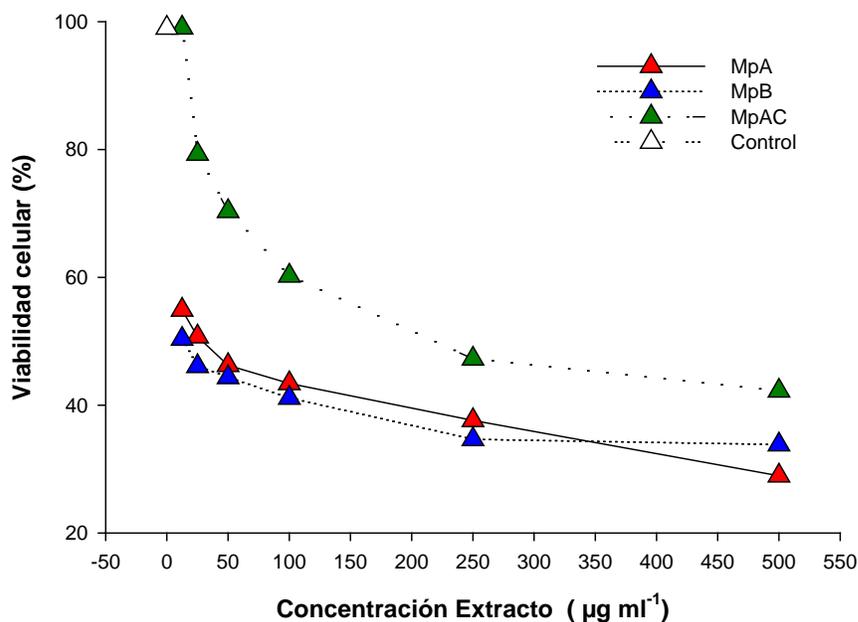


Figura 48. Viabilidad celular (%) al exponer los macrófagos ($20,000 \text{ células ml}^{-1}$) a las fracciones de *M. pyrifera* con diferentes concentraciones durante 24 h.

Las figuras 49, 50 y 51 muestran en conjunto, la inducción de la producción de TNF- α e IL-6, y la viabilidad celular al exponer las células a MpA, MpB y MpAC respectivamente.

Conforme se aumenta la concentración de la fracción, aumenta la producción de citocinas, pero disminuye la cantidad de células metabólicamente activas.

La cantidad de TNF- α producida es mayor a la de IL-6 y ambas aumentan con el gradiente de concentración de la fracción hasta llegar a un plato. El plato parece ser alcanzado a partir de las dos concentraciones más altas de la fracción utilizada, lo que indica que en este punto, la concentración de MpA, MpB y MpAC llega a un máximo de producción de TNF- α e IL-6. Para confirmar lo anterior, se requeriría hacer un ensayo donde se incluyan por lo menos dos concentraciones mayores a 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

La viabilidad celular disminuyó rápidamente conforme aumentó la concentración del extracto.

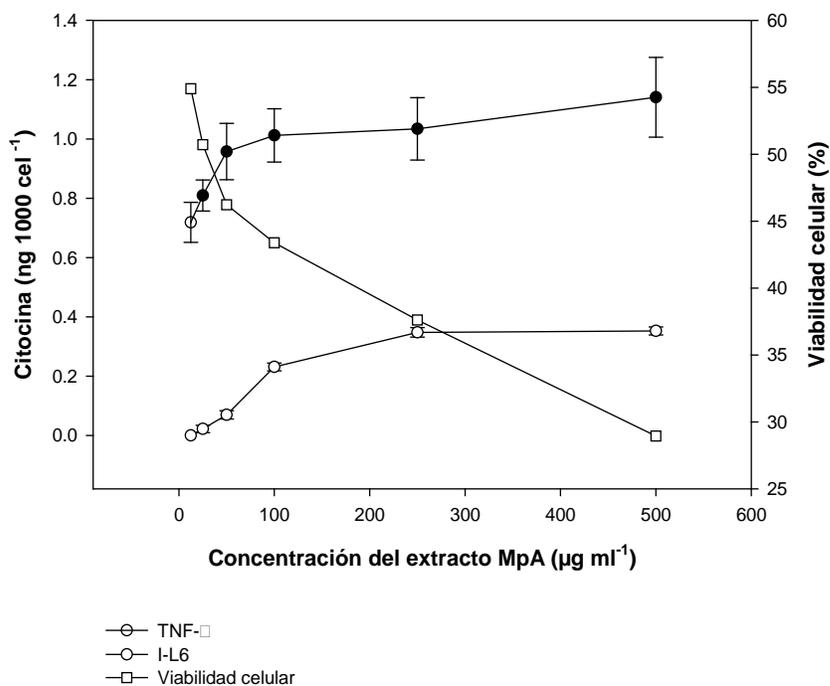


Figura 49. Viabilidad celular y producción de IL-6 y TNF- α al exponer los macrófagos RAW 264.7 al extracto MpA

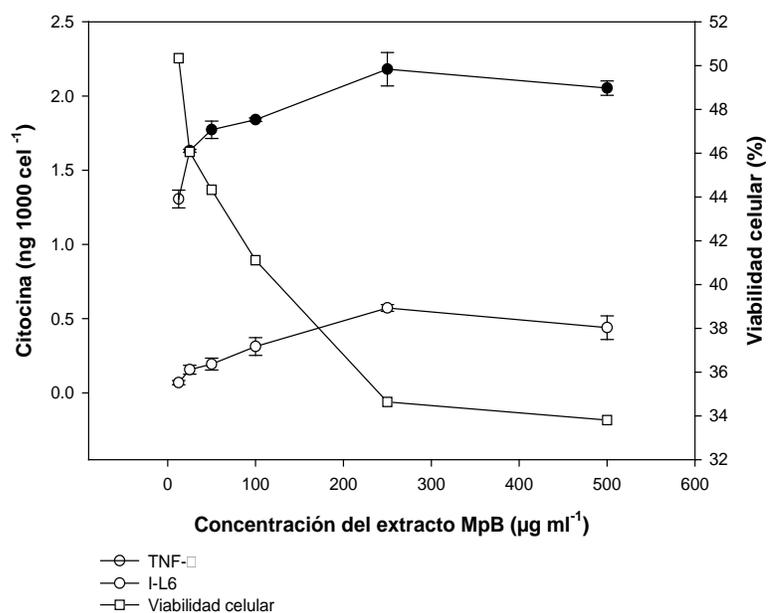


Figura 50. Viabilidad celular y producción de IL-6 y TNF- α al exponer los macrófagos RAW 264.7 al extracto MpB.

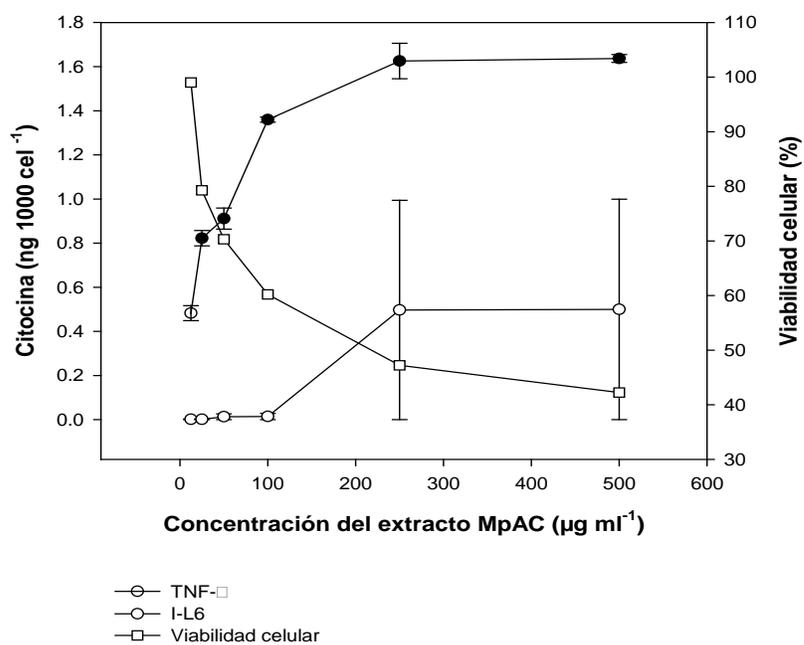


Figura 51. Viabilidad celular y producción de IL-6 y TNF- α al exponer los macrófagos RAW 264.7 al extracto MpAC.

Para corroborar el estado saludable de los macrófagos y su capacidad de responder ante modificadores de la respuesta biológica, se expusieron a diferentes concentraciones de LPS y los resultados de la viabilidad se muestran en la tabla II:

Tabla II. Viabilidad celular (%) al exponer los macrófagos (RAW 264.7) a diferentes concentraciones de LPS.

Concentración de LPS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Viabilidad celular	Desviación estándar
0.012	120%	26%
0.025	112%	14%
0.05	120%	5%
0.075	105%	11%
0.5	99%	12%
0.75	103%	15%

Estos resultados demuestran que los macrófagos se encontraban capaces de proliferar y responder al LPS.

Al comparar la producción más alta de IL-6, TNF- α y ON, inducida a las 48 h por el extracto MpB a $250 \mu\text{g ml}^{-1}$,

La tabla III, contiene el resumen de los resultados promedio de TNF- α , IL-6, ON y viabilidad celular obtenidos al exponer las células a los diferentes fracciones de *M. pyrifera*.

Tabla III. Resumen de resultados. Cantidad de TNF- α , IL-6, ON y proliferación celular al exponer la línea celular RAW 264.7 a las fracciones de *M. pyrifera* (MpA, MpB y MpAC) durante 24 h y 48 h.

Determinación de:	Extracto	Tiempo de exposición (h)	Concentración del extracto ($\mu\text{g ml}^{-1}$)					
			12.5	25	50	100	250	500
TNF- α (ng 1000 células $^{-1}$)	MpA	24	0.262	0.477	0.598	0.796	0.874	1.066
		48	0.719	0.809	0.958	1.012	1.034	1.141
	MpB	24	0.376	0.7	0.78	1.052	1.189	1.023
		48	1.306	1.631	1.773	1.841	2.181	2.053
	MpAC	24	0.144	0.282	0.462	0.691	0.951	0.879
		48	0.483	0.822	0.911	1.36	1.626	1.637
IL-6 (ng 1000 células $^{-1}$)	MpA	24	0.073	0.052	0.065	0.087	0.139	0.21
		48	0	0.022	0.07	0.231	0.348	0.352
	MpB	24	0.075	0.09	0.118	0.109	0.26	0.237
		48	0.069	0.156	0.194	0.312	0.572	0.439
	MpAC	24	0.024	0.015	0.024	0.017	0.026	0.024
		48	0.002	0.001	0.013	0.014	0.497	0.5
ON (μM 1000 células $^{-1}$)	MpA	24	0	0.091	0.086	0.066	0.023	0.209
		48	0	0.109	0	0	0	0
	MpB	24	0	0.077	0.09	0.086	0.076	0.456
		48	0.008	0.707	0	0.224	0.379	0.038
	MpAC	24	0	0.016	0.086	0.101	0	0.084
		48	0	0	0	0	0	0
Proliferación Viabilidad celular (%)	MpA	24	55%	51%	46%	43%	38%	29%
	MpB	24	50%	46%	44%	41%	35%	34%
	MpAC	24	102%	79%	70%	60%	47%	42%

VIII.8 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos de los experimentos en vivo de los ratones Balb/c y de los experimentos realizados en las células de macrófagos *in vitro*, se realizaron análisis de correlación simple, prueba t-student, así como ANOVA de una vía para determinar dependencia lineal con la concentración de las dos fracciones obtenidas de *M. pyrifera*. Los datos de proliferación celular de los ganglios, al igual que los datos óxido nítrico, Interleucina-6, TNF- α y viabilidad celular se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza; cuando estos supuestos no se cumplieron se utilizó estadística no paramétrica.

Se aplicó el análisis de varianza de una vía y de dos vías así como la prueba a posteriori de Tukey; la de Kruskal- Wallis y de comparación múltiple para determinar la diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre las concentraciones de las combinaciones experimentales de cada extracto (A, B y AC) y el tiempo (24 h y 48 h) (Dietrich y Kearns, 1989; Zar, 1996).

Los datos fueron procesados con los programas Excel 2007, Statistica 6, SigmaStat 3.1 y graficados en cajas de paralelo mediante el programa Sigmaplot 11.0.

IX. Discusión

IX.1. Polisacáridos extraídos de *M. pyrifera*

IX.1.1. MpA

El análisis de infrarrojo indicó que la fracción MpA tiene similitud con la O-Fosfo-L-serina (55%), la β -Escina (58%), el fucoídán de *Fucus vesiculosus* (53%) y con el 1-Etil—3-metil-1Himidazolium-trifluorometansulfonato (60%). De acuerdo con el método de extracción de Rioux (2007) la fracción MpA está constituida principalmente por fucoídán y laminarián, los cuales están formados por polímeros de L-fucosa sulfatados y por (1→3),(1→6)- β -D-glucanos respectivamente. A pesar de que el análisis de infrarrojo no determina con certeza los componentes del extracto, sino que solamente nos arroja un porcentaje de similitud entre las sustancias contenidas en la biblioteca de Thermo Fischer Scientific y la muestra, podemos señalar que fucoídán está presente en MpA, ya que de acuerdo al análisis, tiene un 53% de similitud con Fucoídán de *Fucus vesiculosus*; este resultado coincide con lo reportado por Rioux (2007). Se ha reportado que el fucoídán (de *Fucus vesiculosus*) tiene actividad antitrombótica más fuerte que la heparina, y en células vasculares tratadas con este polisacárido, tuvieron un decremento en la producción de quimiocinas y de citocinas proinflamatorias, así como la inhibición de la proliferación (Kyu-Won, 2009).

Respecto al contenido de laminarián esperado, de acuerdo con el análisis de infrarrojo, no se tiene un porcentaje de similitud entre laminarián y alguna sustancia de referencia, sin embargo esto no significa dicho compuesto esté ausente en MpA, ya que se requeriría de análisis más profundos para determinar su presencia o ausencia, así como para determinar la naturaleza de las otras sustancias que puedan estar contenidos en la fracción, puesto que MpA, al igual que las otras fracciones, no está purificada, y puede contener diferentes polisacáridos, sales, etc.

IX.1.2. MpB

El análisis de infrarrojo indicó que la fracción MpA tiene similitud con la Goma Xantana (63%), la Goma Guar (62%) y el Arabinogalactano (62%). A pesar de que el análisis de infrarrojo no evidencia la presencia de sulfatos, si muestra un alto contenido de polisacáridos, ya que la goma xantana es un polisacárido con un esqueleto de β -D-glucosa como la celulosa, pero cada segunda unidad de glucosa está conectada a un trisacárido de manosa, ácido glucurónico, y manosa. La goma guar, está formada por una cadena de manosa con grupos laterales de galactosa en una proporción aproximada de 2:1 respectivamente. El arabinogalactano es un proteoglucano (una combinación de unidades de azúcar y de proteína). De los tres tipos de polisacáridos, se ha reportado que en estudios *in vitro*, los arabinogalactanos aumentan la función de algunas células del sistema inmunológico, y tienen propiedades antiinflamatorias (Kim et al. 2002).

De acuerdo con el método de extracción de Rioux (2007) la fracción MpB está constituida principalmente de fucoidán, sin embargo, el análisis de infrarrojo no arrojó ningún porcentaje de similitud con este. Al igual que en el caso de MpA, esto no significa dicho compuesto esté ausente, ya que se requeriría de análisis más profundos para determinar su presencia o ausencia, así como para determinar la naturaleza de las otras sustancias que puedan estar contenidos en la fracción.

IX.1.3. MpAC

La extracción de los polisacáridos ácidos se realizó una única ocasión, por lo que no se tienen réplicas para aplicar un análisis estadística al rendimiento obtenido (11.36%). El análisis de infrarrojo de este extracto indica que se obtuvieron exitosamente polisacáridos ácidos, ya que el porcentaje de similitud entre MpAC y

fucoidán y sulfato de celulosa es de 64% y 61% respectivamente; estos polisacáridos, por el contenido de sulfato, se consideran polisacáridos ácidos.

Con los resultados anteriormente descritos, se puede afirmar que la obtención de polisacáridos en las fracciones MpA y MpB por Bonilla 2010 y en la fracción MpAC en este trabajo fueron exitosas, pero para determinar con exactitud el contenido de éstas, se requiere de análisis más profundos como lo son la resonancia magnética nuclear, HPLC, espectrometría de masas, etc.

IX.2. Determinación por ensayos de proliferación celular de la actividad inmunoestimulante de los extractos de *Macrocystis pyrifera* en ratones Balb/c

Para determinar si las fracciones de *M. pyrifera*, MpA y MpB, tenían actividad inmunoestimulantes inmunológicos, se realizaron las inmunizaciones antes descritas (VII.3.4.), la elección de los días de inmunización con respecto a los resultados obtenidos fue exitosa, este diseño se apoya en el utilizado en Licea (1994), sin embargo en ese estudio se utilizó un tiempo de incubación con el antígeno de 72 h.

IX.2.1. Obtención de rESAT-6

Los resultados del ELISA de reconocimiento mostraron que la obtención de la proteína recombinante fue exitosa al pues la absorbancia fue mayor a la del control negativo, e incluso a la del positivo. Pudiendo así continuar con el siguiente paso, que fue la diálisis en PBS1X y su purificación por columna de Histrap. Para poder determinar si la proteína fue purificada con éxito o no, se realizó otro ensayo de ELISA, que mostró la presencia de rESAT-6 en los volúmenes de cargado, equilibrado y de elusión (proteína purificada); considerando el volumen de cada uno (40 ml, 50 ml y 25 ml respectivamente) el que pareciera tener mayor cantidad de proteína es el de volumen cargado, esto no se pudo asegurar ya que no se

contó con una curva estándar para determinar la concentración en este ensayo. A pesar de lo anterior, el contenido de rESAT-6 en el volumen de elusión, de acuerdo con el análisis de MicroBCA realizado posteriormente, fue suficiente para no requerir de otra inducción. Una vez purificada la proteína se dializó en PBS0.2X para no alterar la estabilidad de ésta y para mejorar la calidad del liofilizado.

Una vez liofilizada la muestra, se resuspendió en 1 ml de agua destilada (ya que la muestra contenía sales del PBS) y se determinó que su concentración era de 31 $\mu\text{g ml}^{-1}$; calculando la cantidad de rESAT-6 requerida para los ensayos *in vivo* e *in vitro*, se determinó que era suficiente para cubrir lo que el diseño experimental demandaba.

IX.2.2. Estandarización del método de disección y del establecimiento de cultivo celular primario a partir de nódulos linfáticos de ratón

Los nódulos linfáticos poplíteos no inmunizados se disectaron y se procesaron por dos métodos para establecer el cultivo celular primario de los linfocitos T, B y células presentadoras contenidas en éstos. La primer técnica fue la de digestión enzimática, pero su efecto fue muy fuerte y las células viables fueron pocas y la contaminación fue alta (no se realizó ningún conteo). La segunda técnica fue la de maceración mecánica utilizando una jeringa de 1 ml para la disgregación celular, y éste método demostró que era mejor para obtener un mayor número de células viables, aunque también presentó contaminación (no se realizó ningún conteo). Debido a lo anterior, se optó por la técnica de maceración y se hicieron algunas mejoras, entre ellas están la sustitución del uso de jeringas de 1 ml, por una malla de nylon (con un poro de 75 μm) previamente esterilizada utilizando el pistón de una jeringa para macerar los tejidos, esto aumentó la viabilidad de las células y proporcionó un cultivo sin contaminación aparente. También se estableció la necesidad de utilizar ratones inmunizados para la obtención de un cultivo celular

con densidad apropiada, ya que los nódulos no inmunizados fueron demasiado pequeños para su disección.

IX.2.3. Estandarización de Concanavalin A

Para estandarizar la densidad celular en el ensayo colorimétrico CellTiter® One Solution, se realizó una prueba para establecer si 2.5×10^5 células por pocillo (figura 33) eran apropiadas. Sin embargo la diferencia entre el control negativo (medio sin células) y el positivo (medio con células), no tuvo una diferencia lo suficientemente grande para utilizar esta densidad celular en los ensayos. Por lo anterior, se hizo otra prueba con diferentes densidades celulares (figura 34). La densidad celular más apropiada se puede escoger con base en la lectura de absorbancia obtenida, ya que esta no debe ser muy baja (~ 0.200) ni muy alta (~ 1.000) para que se puedan identificar diferencias entre las condiciones experimentales y el control. La densidad con mayor diferencia respecto al control negativo, fue la de 700, 000 células por pocillo, por lo cual esta condición fue utilizada en los ensayos de proliferación celular. Esta decisión, se ve apoyada con otros estudios donde se han utilizado densidades celulares de entre 500, 000 y 1'000,000 células por pozo (Bautista, C., et al; 2000).

Para asegurarnos que la concentración de Con A utilizada en las soluciones madre era la calculada, se realizó un ensayo de MicroBCA (figura 35). El ensayo de mostró que la concentración de la Con A estaba un 40% más baja de la concentración estimada, ya que una muestra de 50 μ g/ml contenía solamente 21.64 μ g/ml, por lo que la concentración de Con A anteriormente utilizada fue menor que la que se estableció en el diseño experimental.

Una vez establecida la densidad óptica apropiada para el ensayo de viabilidad y la concentración real de Con A, se llevó a cabo la determinación de la concentración y tiempo de exposición apropiados para utilizar Con A como control positivo de la proliferación de linfocitos T (Figura 36). Los valores de la densidad óptica del ensayo de proliferación celular mostraron que se tenían menos células viables en

los pozos expuestos a la Con A que en el control negativo (células solas), lo que indicó que es probable que la Concanavalin A no se encontraba en buenas condiciones. Por esto se descartó el uso de Con A como control positivo de la proliferación.

X.2.4. Determinación por ensayos de proliferación celular, la actividad inmunoestimulante de las fracciones de *Macrocystis pyrifer* en ratones Balb/c

Algunas de las características que interesan de un inmunoestimulante son:

- Su capacidad de potenciar la inmunogenicidad de antígenos con un grado de pureza elevado o recombinantes (McElrath, 1995).
- La reducción de la cantidad de antígeno y del número de reinmunizaciones requeridas para proveer una inmunidad protectora.
- El aumento de la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos y las personas inmunocomprometidas (Marx, 1993)

Este trabajo se enfoca en el primer punto, y las pruebas que se discuten a continuación tuvieron como objetivo, determinar si las fracciones de *M. pyrifer* tienen la capacidad de potenciar la reacción inmunológica ante un antígeno específico. La proteína rESAT-6 se utilizó como antígeno considerando antecedentes que indican que ésta promueve la respuesta inmunológica celular (Calderón et al 2006, Ravn et al 1999, Sreekumar et al 2002); sin embargo los resultados obtenidos en el experimento con las células de los nódulos linfáticos poplíteos de los ratones, indicaron que hay una disminución en la cantidad de células viables cuando se agrega rESAT-6 a las células.

Los primeros dos grupos se utilizaron para determinar el tiempo de exposición a la proteína recombinante. En los resultados de los ensayos *in vivo-in vitro*, se observó lo siguiente respecto a la proliferación.

Las células del grupo 0 son aquellas que estuvieron menos estimuladas en la etapa de la inmunización, ya que solamente fueron expuestas a rESAT-6. Esto parece influir en la respuesta observada al exponerlas nuevamente a la proteína recombinante en los ensayos *in vitro*, ya que las células que fueron estimuladas con rESAT-6 y ACF (Grupo 1), presentaron una disminución en la cantidad de células a las 24 h y 72 h, mientras que las del grupo 1 se mantuvieron sin diferencia estadística en los tres tiempos de incubación.

Los grupos de prueba inyectados con rESAT-6 y con diferentes concentraciones de MpA y MpB se utilizaron para determinar el efecto de estas fracciones por separado a una concentración baja y a una alta.

Las células estimuladas con la mayor concentración de MpA (grupo 2) presentaron una disminución en su densidad, respecto al control (sin llegar a tener una diferencia significativa). La disminución en la densidad celular fue significativa en las células estimuladas por la fracción MpB (grupo 4). Las células estimuladas con la menor concentración de MpA (grupo 3) presentaron la misma cantidad de células viables que el control; lo mismo sucedió con las células expuestas a la menor concentración de MpB (grupo 5). Los grupos de prueba inyectados con rESAT-6 y con diferentes combinaciones de MpA y MpB se utilizaron para determinar el efecto inmunoestimulante de las fracciones en conjunto, en 3 diferentes concentraciones, manejando siempre un máximo de 100 µg por ratón.

Los grupos 6 y 7 presentaron la misma cantidad de células viables respecto a sus controles, mientras que el grupo 8 que contenía 50% de cada una de las fracciones, disminuyó significativamente la cantidad de células viables. Esto indica que no hubo diferencia entre combinar las fracciones en una proporción de 70%-30% pero sí al utilizar la misma cantidad de cada fracción. Al parecer la combinación de ambas fracciones a una concentración de 50 µg cada una, promueve la disminución de la viabilidad celular en presencia de rESAT-6.

Se logró observar una diferencia en cuanto a la concentración más alta de MpB pero no de MpA, ni en las combinaciones MpA-MpB en presencia de rESAT-6.

En el ensayo *in vitro*, se observó que las fracciones eran citotóxicas, mientras que en el ensayo *in vivo-in vitro*, no se evidenció dicha citotoxicidad; esto podría deberse que al inmunizar los ratones con la proteína recombinante sola o con ACF o con las fracciones de *M. pyrifera*, el sistema inmune en conjunto, fue capaz de reaccionar y mantener la salud del individuo. Por otra parte, en el ensayo *in vitro* se restó la interacción de las células contenidas en los nódulos linfáticos, con otras células y con sus productos mediadores de la inmunidad. La disminución de células metabólicamente viables, puede deberse a que rESAT-6 no estuvo funcionando como inmunógeno propiamente; la publicación de Derrick y Morris (2007) y López (2003) demuestran que rESAT-6 promueve la apoptosis de macrófagos por activación de las caspasas; este efecto es dependiente de la dosis, así, $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de rESAT-6 promueve la apoptosis del 66% de las células cultivadas. Además de la inducción de apoptosis, Wang y colaboradores (2009) reportaron que linfocitos T de humanos expuestos a rESAT-6 en ensayos *in vitro*, presentan inhibición de la producción de IL-12, la cual a su vez induce la producción de INF- γ por linfocitos T y natural killer (NK); INF- γ promueve la diferenciación de linfocitos T, B y de macrófagos, por lo tanto al estar ausente o en cantidades muy pequeñas no hay proliferación, y la densidad celular se ve afectada respecto a las células que no están expuestas a rESAT-6.

Por otro lado, Soltys y Quinn (1998) publicaron que al cultivar células de ratón previamente inmunizados con β -glucanos solubles, y exponerlas a LPS y a la enterotoxina B (SEB) se reprime la producción de citocinas proinflamatorias, sugiriendo que el tratamiento con β -glucanos solubles pueden modular la inducción de citocinas durante la sepsis, resultando en un decremento general en la mortalidad del hospedero. Considerando lo anterior, la disminución de la densidad celular, cuando se ha inmunizado con $100 \mu\text{g}$ de MpB, pudiera deberse a que ésta fracción está modulando la producción de citocinas proinflamatorias.

IX.3. Cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 y exposición a los extractos de *M. pyrifera*

Para determinar, de acuerdo con las pruebas *in vitro*, qué extracto es el más apropiado para inducir inmunomodulación, se deben considerar algunos factores, como la citotoxicidad y la potencia del extracto, es decir, su capacidad de inducir la producción de mensajeros de importancia inmunológica, como son las citocinas: TNF- α y la IL-6, así como también el ON.

Las siguientes figuras muestran la citotoxicidad y la producción de TNF- α e IL-6 debido al gradiente de las fracciones de *M. pyrifera* utilizadas en este estudio. Los resultados obtenidos son a las 48 h, debido a que este fue el tiempo que presentó una producción de ambas citocinas en los rangos de concentración utilizados para cada fracción.

X.3.1. Determinación de la citotoxicidad y de la producción de TNF- α e IL-6 por RAW 264.7 posterior a la exposición de la fracciones de *M. pyrifera*.

La mejor concentración de MpA para provocar una alta producción de citocinas fue de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, ya que la cantidad de TNF- α no tuvo diferencia significativa con 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$; lo mismo sucede con las cantidades de IL-6 producidas; sin embargo la viabilidad celular fue mayor al utilizar 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de la fracción, lo cual indicó que se pueden obtener los mismos resultados con una menor citotoxicidad. Una baja toxicidad es deseable, ya que entre menos efectos secundarios produzca una sustancia, el rango de aplicación para aprovechar sus propiedades en un individuo será más amplio.

La aplicación de estas fracciones en el campo de la medicina preventiva requiere estudios más profundos, ya que los resultados de los experimentos *in vitro* pueden ser diferentes a los que se puedan obtener *in vivo*. Sin embargo los resultados obtenidos con RAW 264.7, dejan claro que las fracciones de *M. pyrifera*

promueven la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, y partiendo de aquí se puede direccionar el rumbo de las investigaciones en su uso adecuado como tratamiento profiláctico o como tratamiento de una enfermedad.

En el año 2000, Abram y colaboradores reportaron en su investigación que la concentración de TNF- α encontrada en suero de ratones C57BL/6 sanos, era de 55 ± 20.02 pg ml⁻¹, y que al infectarlos con una bacteria (*Listeria monocytogenes*), el nivel de TNF- α en el plasma sanguíneo aumenta hasta 170 pg ml⁻¹ el segundo día; sin embargo, en ratones infectados con *Campylobacter jejuni* el nivel más alto de TNF- α se encontró en el día cuatro (aproximadamente de 150 pg ml⁻¹). En este mismo estudio se determinó también la producción de IL-6 para individuos sanos e infectados con las bacterias antes mencionadas. El nivel de IL-6 para los ratones sanos fue de 110.6 ± 18.52 pg ml⁻¹, igual que los niveles de los individuos infectados por *L. monocytogenes* al día dos, mientras que en el día dos, en los ratones infectados por *C. jejuni* la concentración de IL-6 fue de cerca de 1200 pg ml⁻¹.

Lo anterior indica que existe una relación directa entre el tipo de organismo patógeno y la cantidad de citocinas producidas. Tomando esto como referencia, se puede decir que es debe tenerse cuidado con las sustancias que se utilizan para promover la síntesis de citocinas, ya que no en todos los individuos ni en todos los casos se podrá utilizar la misma dosis, ya que un exceso de TNF- α produce fiebre, daño hepático, daños en los vasos sanguíneos, trombosis y en algunos casos la muerte. Por esto, se recomienda realizar estudios dirigidos a enfermedades donde la presencia de TNF- α e IL-6 sean requeridos y mediar la dosificación de las fracciones de *M. pyriferá*.

La siguiente tabla muestra la cantidad de TNF- α e IL-6 en pg ml⁻¹, en estas unidades podemos hacer una comparación superficial con los resultados de M. Abram y colaboradores (2000), ya que los resultados *in vitro* no son necesariamente los que se deben esperar *in vivo*, pero esta información nos

puede dar una mejor idea de la concentración y la fracción más adecuada de acuerdo con si se desea inducir poca o mucha producción de citocina. Así, la fracción de MpAC es la que induce una cantidad de IL-6 semejante a las esperadas en individuos infectados por la bacteria *L. monocytogenes*. Sin embargo, los niveles de TNF están por encima de los obtenidos en ratones infectados con *L. monocytogenes* ó con *C. jejuni*.

Tabla IV. Comparación de las concentraciones de TNF- α e IL-6 en (pg ml⁻¹) encontrada en este estudio en los estudios *in vitro* con estudios *in vivo* en ratón (Abram et al. 2000) y en humanos (Sabry et al 2006).

Determinación de:	Extracto	Tiempo de exposición (h)	Concentración del extracto ($\mu\text{g ml}^{-1}$)						
			12.5	25	50	100	250	500	
TNF- α (pg ml ⁻¹ 1000 células ⁻¹)	MpA	24	5240	9540	11960	15920	17480	21320	
		48	14380	16180	19160	20240	20680	22820	
	MpB	24	7520	14000	15600	21040	23780	20460	
		48	26120	32620	35460	36820	43620	41060	
	MpAC	24	2880	5640	9240	13820	19020	17580	
		48	9660	16440	18220	27200	32520	32740	
	Individuo	Días de exposición	Inmunizado		Bacteria		Producción		
	Ratón C57BL6	0	No		-		55 \pm 20.02 pg ml ⁻¹		
		4	Si		<i>Campylobacter jejuni</i>		150 pg ml ⁻¹		
		2	Si		<i>Listeria monocytogenes</i>		170 pg ml ⁻¹		
	Humano	0	No		-		172.7 \pm 39.19 pg ml ⁻¹		
	IL-6 (pg 1000 células ⁻¹)	MpA	24	1460	1040	1300	1740	2780	4200
			48	0	440	1400	4620	6960	7040
MpB		24	1500	1800	2360	2180	5200	4740	
		48	1380	3120	3880	6240	11440	8780	
MpAC		24	480	300	480	340	520	480	
		48	40	20	260	280	9940	10000	
Individuo		Días de exposición	Inmunizado		Bacteria		Producción		
Ratón C57BL6		0	No		-		110.6 \pm 18.52 pg ml ⁻¹		
		2	Si		<i>Campylobacter jejuni</i>		1200 pg ml ⁻¹		
		2	Si		<i>Listeria monocytogenes</i>		110.6 \pm 18.52 pg ml ⁻¹		
Humano		0	No		-		21.15 \pm 10.99 pg ml ⁻¹		

Respecto a la concentración deseada de citocinas pro-inflamatorias a inducir con estas fracciones, dependerá del objetivo que se persiga. Si se busca un efecto

profiláctico, probablemente lo más adecuado sea aumentar ligeramente la concentración de la citocina respecto a una condición basal. Las concentraciones de TNF- α y de IL-6 en suero de humanos sanos, de acuerdo con un estudio realizado por Sabry y colaboradores (2006), es de 172.7 ± 39.19 pg ml⁻¹ y de 21.15 ± 10.99 pg ml⁻¹ respectivamente. Considerando el uso de MpA, MpB y MpAC en humanos, sería recomendable realizar estudios *in vitro* con células mononucleadas de sangre periférica (o PBMC por sus siglas en inglés) de humanos sanos, establecer el efecto de las fracciones y su citotoxicidad.

IX.3.2. Determinación de la producción de óxido nítrico (ON) por macrófagos (RAW 264.7) expuestos a los extractos de *M. pyrifera*

A pesar de que sólo una réplica de cuatro arrojó datos sobre la producción de ON debido a complicaciones técnicas, estos resultados pueden ser utilizados para evidenciar la producción de ON inducida por la presencia de las fracciones de *M. pyrifera* en el medio de cultivo de los macrófagos.

X. Conclusiones

Se obtuvo una tercera fracción de *M. pyrifera* que contiene polisacáridos ácidos.

El análisis de infrarrojo indicó que la fracción MpAC es diferente de MpA y de MpB. Mientras que MpA y MpB tienen en común la presencia de fucoidán.

Las tres fracciones de *M. pyrifera* indujeron la producción de IL-6, TNF- α y ON. La fracción que produjo más TNF- α y más IL-6 fue MpB a las 48 h. La fracción que tuvo menor citotoxicidad fue MpAC, siendo el mayor porcentaje de viabilidad del 98% a una concentración de 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y la menor admisible de 60% a una concentración de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La fracción que presentó mejores resultados respecto a la citotoxicidad y una mayor producción de citocinas, fue MpAC a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a las 48 h.

Por lo tanto, la Hipótesis es aceptada para las tres fracciones de *Macrocystis pyrifera*.

XI. Recomendaciones

Para profundizar y reforzar los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda lo siguiente:

- Realizar un estudio *in vivo-in vitro* donde se monitoree la temperatura corporal, pérdida de peso o de habilidad motriz, así como determinar la concentración de TNF- α , IL-6 e INF- γ en el experimento *in vitro*;
- Se recomienda tener precaución al utilizar la proteína rESAT-6 como inmunógeno, debido a las inhibiciones en linfocitos T y la inducción de apoptosis en macrófagos.
- Probar las 3 fracciones en un cultivo *in vitro* de células mononucleadas de sangre periférica de humano para determinar el efecto que tienen en este tipo de células (producción de citocinas y citotoxicidad).
- Obtener más información sobre la producción de ON al exponer RAW 264.7 para realizar análisis estadísticos e interpretaciones de los resultados, ya sea perfeccionando el ensayo del reactivo de Griess o utilizando otras técnicas.

XII. Referencias

Abram, M., D. Vučković, B. Wraber and D. Miljenko. 2000. Plasma cytokine response in mice with bacterial infection. *Mediators of Inflammation*; 9: 229-234 p.

Amézquita, L. y D. Mendoza. 2008. Curso Básico de Espectroscopía Ultravioleta - visible. Facultad de Química. Universidad de Guanajuato.

Arai, K.I., Lee, L., Miyama, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. 1990. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory conditions. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 783-811 p.

Aspinall, G. and M. Monteiro. 1996. Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. *Biochemistry*. 35:2498-2504 p.

Balkwill, F. and F. Burke. 1989. The cytokine network. *Immunology Today*. 10: 299-304 p.

Calderon, M., C. Parra-Lopez, R. Alfonso, P. Barato, D. Giraldo, M. Pinto and M. Patarroyo. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen immunogenicity in Owl Monkeys. Nova- Publicación científica. 14-16 p.

Castro, R., I. Zarra and J. Lamas. 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*; 229: 67-78 p.

Celada, A. and Nathan, C.F. 1994. Macrophage activation revisited. *Immunology Today*. 15: 100-102 p.

- Celada, A. and Nathan, C.F. 1994. Macrophage activation revisited. *Immunology Today*.15:100-102 p.
- Comalada, V. 1998. Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir. Universidad de Barcelona. España. 376 p.
- Crowther J. 1995. Métodos en biología molecular. ELISA teoría y práctica. Humana Press. Totowa, New Jersey. 256 p.
- Cruz-Suarez, E.; D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, C. Guajardo-Barbosa. 2000. Uso de harina de kepl (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. *Avances en Nutricion Acuicola*. V: 227-267 p.
- Cui, S., J. Reichner, R. Matero, J. Albina. 1994. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxidedependent or - independent mechanisms. *Cancer Res*. 54: 2462–2467 p.
- Cui, S., J. Reichner, R. Matero, J. Albina. 1994. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxidedependent or - independent mechanisms. *Cancer Res*. 54: 2462–2467 p.
- Curso Básico de Espectroscopía Ultravioleta -visible. 2008. Amézquita L. Fernando, Mendoza O. Diana. Universidad de Guanajuato. Facultad de Química
- Diaz-Rosales, P., C. Felices, R. Abdala, F. L Figueroa, J. Gomez, M. A Mourino, M. Balebona. 2007. *In vitro* effect of the red alga *Hydropuntia cornea*. *Aquaculture Research* (38): p.1411-1418 p.

- Derrick, S. and S. Morris. 2007. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*. 9(6): 1547–1555p.
- Dietrich, F. H. and T. J. Kearns. 1989. *Basic Statistics an Infeerencial Approach*. Dellen Publishing Company. Tercera edición. San Francisco. 745pp.
- Dileepan, K., J. Page, Y. Li, and D. Stechschulte. 1995. Direct activation of murine peritoneal macrophages for nitric oxide production and tumor cell killing by interferon gamma. *J. Interferon Cytokine Res.* 15: 387–394 p.
- Dileepan, K., J. Page, Y. Li, and D. Stechschulte. 1995. Direct activation of murine peritoneal macrophages for nitric oxide production and tumor cell killing by interferon gamma. *J. Interferon Cytokine Res.* 15: 387–394 p.
- Douce, G., C. Turcotte and colaboradores. 1995. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP ribosyl-transferase activity act as non-toxic mucosal adjuvants. *Proceedings of the National Academic Science of the United States*; 92:1644–1648 p.
- Gupta, R., P. Griffin, J. Echenchang, R. Rivera, R. Anderson, B. Rots. 1996. The role of adjuvant and delivery. Novel strategies in design and production of vaccines. New York: Plenum Press 105-113 p.
- Guzmán del Proo, S., M. Casas-Valdez, A. Díaz-Carrillo, Ma. Díaz-lópez, J. Pineda-Barrera, Ma. Sánchez-Rodriguez. 1986. Diagnóstico sobre las investigaciones y explotación de las algas marinas en México. *Investigación Marina CICIMAR*, (3) 2: 1-63 p.

- Hamilton, T. and D. Adams. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunology Today*. 8: 151-158 p.
- Heigold, S., C. Sers, W. Bechtel, B. Ivanovas, R. Schäfer, and G. Bauer. 2002. Nitric oxide mediates apoptosis induction selectively in transformed fibroblasts compared to nontransformed fibroblasts. *Carcinogenesis*. 23: 929–941 p.
- Heigold, S., C. Sers, W. Bechtel, B. Ivanovas, R. Schäfer, and G. Bauer. 2002. Nitric oxide mediates apoptosis induction selectively in transformed fibroblasts compared to nontransformed fibroblasts. *Carcinogenesis*. 23: 929–941 p.
- Herdener, M., S. Heigold, M. Saran, G. Bauer. 2000. Target cell-derived superoxide anions cause efficiency and selectivity of intercellular induction of apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 29; 1260–1271 p.
- Huang, R and H. Lee. 2005. Immunological properties of the marine brown alga *Endarachne binghamiae* (Phaeophyceae). *International journal of applied science and engineering* (3): p.167-173 p.
- Janeway C. and R. Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Revision of immunology*; 20:197–216 p.
- Kim, L., R. Waters, P. Burkholder. 2002. Immunological activity of larch arabinogalactan and Echinacea: a preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alternative medicine*. 7: 138-149 p.

- Kyu-Won K; C. Kil-Sang; H. Ok-Jin; L. Kwang-Hyung, L. Boo-Yong; K. Jung-Jae; C. Kwang-Hoe. 2009. Biological effects of fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus* on thrombosis and vascular cells. *The Korean journal of hematology*: 45 (1): 51-57 p.
- Licea, A. 1994. Incremento de la respuesta inmunológica de Linfocitos T dirigida contra *Mycobacterium leprae*, utilizando polímeros de péptidos sintéticos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Leung M., C. Liub, M. Koon, K. Funga. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*; 105: 101-114 p.
- Lopez, M., L. Sly, Y. Luu, Y., D. Young, D., H. Cooper, H. y N. Reiner. 2003. The 19-kDa *Mycobacterium* tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through tolllike receptor-2. *Journal of Immunology*. 170: 2409–2416 p.
- Lugo-Fabres, P. 2009. Desarrollo de una prueba de detección de *Mycobacterium tuberculosis* por medio de hemaglutinación. Tesis de Licenciatura. Universidad Xochicalco. 54 p.
- Martínez Manrique C. 2005. Modulación de la respuesta inmune. Tendencias vigentes (artículo en línea). *MEDISAN* 2005;9 (3). <http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol9_3_05/san06305.htm> [12 de Septiembre 2010).
- Marx, P., R. Compans and A. Gettie. 1993. Protection against vaginal SIV transmittion with microencapsulated vaccine. *Science*; 28:1323–1327 p.

- McElrath, M. 1995. Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Seminars in Cancer Biology*; 6:375–385 p.
- Morris, H., C. Martínez, R. Abdala, D. Campos. 1999. Adyuvantes inmunológicos. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*; 18 (2): 130-137 p.
- Morris-Quevedo, H., C. Martínez, R. Abdala, y G. Cobas Pupo. 2000. Evidencias preliminares de la actividad inmunomoduladora de la fracción polisacárida de origen marino PC-1. *Revista Cubana de Oncología*. 16(3): 171-176 p.
- Nishino T, C. Nishioka, H. Ura, T. Nagumo. 1994. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydrate Research*; 255: 213–224 p.
- Novogrodsky, A. and Katchalski, E. 1971. Lymphocyte transformation induced by Concanavalin A and its reversion by methyl- α -D mannopyranoside. *Biochimica et Biophysica Acta*; 228:579-583 p.
- Paulsen, BS. 2001. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Current Organic Chemistry*; 5:939–50 p.
- Pereira BM, B. da Silva, N. Pereira and J. Parente. 2000. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*. *Phytochemistry*; 54(4): 409-413 p.
- Ponce, N., C. Pujol, E. Damonte, M. Flores and C. Stortz. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction method, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research*; 338:153-165 p.

- Promega. 2009. CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay: Instructions for use of products G4000 and G4100. En línea: <http://www.promega.com/tbs/tb112/tb112.pdf>
- Promega. 2009a. CellTiter 96® One Solution Cell Proliferation Assay. Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582. En línea: <http://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf>
- R&D Systems Inc. 2010. Elisa Development guide. En línea: http://www.rndsystems.com/DAM_public/5670.pdf
- Ravn, P., A. Demissie, T. Eguale, H. Wondwosson, D. Lein, H. Amoudy, A. Mustafa, A. Jensen, A. Holm, I. Rosenkrands, F. Oftung, J. Olobo, F. Reyn and P. Andersen. 1999. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 179:637-645 p.
- Reyes, R. G. Hernandez, F. Lopez, E. Vernon, P. Castro. 2004. Sodium and potassium alginates extracted from *Macrocystis pyrifera* algae for use in dental impression materials. *Ciencias marinas* (30): 189-199 p.
- Ruscetti, F. and P. Chervenick. 1975. Release of Colony-Stimulating Activity from Thymus-Derived Lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation*; 55: 520-527 p.
- Sabry, A., R. Elbasyouni, A. Sheashaa, K. Mahmoud, S. George, E. Kaleek, H. abo-Zena, A. Kalil, T. Mohsen, M. Rahim, A. El-samanody. 2006. Correlation between levels of TNF- α and IL-6 and hematological

involvement in SLE Egyptian Patients with *lupus nephritis*. International Urology and Nephrology. 38:731–737 p.

Schepetkin, I. and Quinn, M. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. International immunopharmacology. 6:317-333 p.

Seo, Y., S. Kang, H. Lee, and H. Youn, B. Lee, H. Chung and Y. KIM. 2006. *In vitro* Screening of seaweed extract on the proliferation of mouse spleen and thymus cell. Biotechnology and Bioprocess Engineering; 11: 160-163 p.

Soltanian, S., E. Struyven, E. Cox, P. Sorgeloos, P. Bossier. 2009. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. Critical Reviews in Microbiology , 35 (2): 109-138 p.

Soltys, J. and M. Quinn. 1998. Modulation of Endotoxin- and Enterotoxin-Induced Cytokine Release by *In vivo* Treatment with b-(1,6)-Branched b-(1,3)-Glucan. Infection and immunity. 67:244-252 p.

Sreekumar, M., M. Wannemuehler, G. Mahairas, F. Minion. 2002. Mycobacterial ESAT-6 Protein Enhances Mouse IFN- γ Responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* P71 Protein. Journal of Interferon & Cytokine Research. 22(7): 807-813 p.

Stites, D., J. Stogo, U. Fuderberg, and V. Wule. 1985. Inmunología básica y clínica. Editorial Científico Técnica. 200-250 p.

Sweet, M. and D. Hume. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. Journal of Leukocyte Biology. 60: 8-26 p.

- Takx, C. 1992. Immunomodulators. *Pharmacology Weebi Sci*; 14: 24-52 p.
- Tordoya, C. 2008. Estudio para evaluar el efecto inmunomodulador de los polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera* en la dieta del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. CICESE.
- Tzianabos, A. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clinical Microbiology*; 13: 523-533 p.
- Uthaisangsook S., N. Day, S. Bahna, R. Good, S. Haraguchi. 2002. Innate immunity and its role against infections. *Annual Allergy Asthma Immunology*; 88:253–64 p.
- Weissman, B. and Gross, S. 2001. Measurement of NO and NO Synthase. *Current Protocols in Neuroscience*. UNIT 7.13. En línea: <http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0713>.
- Zar, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*. New jersey, United States of America: Prentice-Hall, Inc. Tercera edición. N.J. Thermo Nicolet Corporation. 2001. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. En línea: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>.
- Zvyagintseva, T., N. Shevchenko, I. Popivnich, V. Isakov, A. Scobun, E. Sundukova, et al. 1999. A new procedure for separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydrate Research*; 322: 32–39 p.

Apéndice I: Glosario

Absorbancia (Abs): La absorbancia, A , es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra. Está definida como:

$$A = -\log \frac{I}{I_0}$$

donde I es la intensidad después de haber medido la absorción e I_0 la intensidad de la luz que se hace incidir en la muestra.

ABTS: su nombre químico es 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid). Este compuesto en presencia de H_2O_2 y enzimas peroxidasas deriva a un radical metaestable ($ABTS^+$) que genera una coloración verde con un espectro de absorción característico y diferente al ABTS, presentando máximos de absorción en la región espectral del UV y visible a 413, 645, 727 y 811 nm. La aplicación del ABTS en ELISA es que permite obtener una lectura de absorbancia proporcional a la cantidad de peroxidasa presente en la muestra, la cual a su vez es proporcional a la cantidad de la proteína de interés. Haciendo uso de una curva estándar el ABTS permite cuantificar la proteína.

Adyuvante de Freund. Es una solución que contiene una emulsión de un antígeno en aceite mineral y se utilice como inmunopotenciador (booster). El adyuvante completo de Freund (CFA o FCA por sus siglas en inglés) está compuesto de mycobacteria (usualmente *M. tuberculosis*) inactivada o seca. El adyuvante incompleto de Freund (IFA o FIA por sus siglas en inglés) carece de los componentes de la mycobacteria, por lo tanto es una emulsión de agua con aceite.

Anti HA: anticuerpo que reconocen la proteína hemaglutinina (HA) y se unen a ella.

Anticuerpo: tipo de molécula glucoproteica producida por linfocitos B y que se une al antígeno, a menudo con un alto grado de especificidad y afinidad. Los

anticuerpos pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos. Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy semejante, una pequeña región del ápice de la proteína es extremadamente variable, lo cual permite la existencia de millones de anticuerpos, cada uno con un extremo ligeramente distinto. Esta enorme diversidad de anticuerpos permite al sistema inmune reconocer una diversidad igualmente elevada de antígenos. Los anticuerpos se utilizan como herramienta de identificación de proteínas en el ensayo de ELISA, debido a su alta especificidad, hace que dicho ensayo sea versátil, robusto y sencillo de realizar.

Beta mercaptoetanol: es un compuesto químico utilizado en cultivo celular como agente reductor, para romper muchos de los metabolitos tóxicos producidos por las células en cultivo, mejorando así el ambiente del medio. En los cultivos de células T se utiliza para mejorar el aprovechamiento de cistina de estas células, ya que los Linfocitos T no son capaces de transportar la cistina al citosol, donde debe ser convertida en cisteína. El Beta mercaptoetanol reduce la cistina para que ésta sea transportada por las células y entonces convertida en la cisteína necesaria para el crecimiento celular.

BSA o albúmina de suero bovino: es un suero de albúmina proteico que tiene numerosas aplicaciones bioquímicas incluyendo ensayos de ELISA, inmunoblots e inmunohistoquímica. También es utilizado como nutriente en cultivo celular y microbiano. Es comúnmente utilizado para determinar la cantidad de otras proteínas, por comparación de una concentración desconocida de una proteína de interés con una cantidad conocida de BSA.

Cepa: conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Cetavión: compuesto químico utilizado para precipitar selectivamente los polisacáridos ácidos contenidos en una muestra.

Citocinas: proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas.

Colagenasa: son enzimas que rompen el enlace peptídico del colágeno, el cual es el componente más abundante en el tejido conectivo.

Concanavalin A (Con A): es una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*. 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.

Confluencia: es el estado que se alcanza por un grupo de células que están en crecimiento en una superficie sólida, que al multiplicarse cubren el área de ésta superficie completamente sin encimarse unas sobre otras.

Cultivo celular: conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas

Densidad óptica (OD): La densidad óptica es la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada. Cuando se hace referencia a densidad óptica sin referencia a una longitud de onda específica, debe considerarse sinónimo de absorbancia.

Diálisis: proceso de separar las moléculas en una solución por la diferencia en sus índices de difusión a través de una membrana semipermeable. Uno de sus usos es la disminución de la concentración de sales en las muestras.

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

ESAT-6: es una proteína de 6kDa secretada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Es un antígeno potente que estimula a los linfocitos T. ESAT-6 es el acrónimo por su nombre en inglés “early secretory antigenic target 6kDa”.

Espectrofotetría: Se denomina espectrofotetría a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda.

Espectrofotómetro: instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

FTIR (Espectrofotómetro de transformada de Fourier): es un método de espectroscopia de infrarrojo que consiste en irradiar con luz infrarroja una muestra y se obtiene un espectro que representa la absorción y transmisión molecular, creando así una huella digital de la muestra. Este método permite identificar la naturaleza de la muestra por comparación de espectros de muestras conocidas.

Griess, Reactivo de.: es un reactivo que se utiliza para realizar una prueba química que detecta la presencia de nitritos orgánicos.

Hemaglutinina (HA): glucoproteína antigénica que se encuentra en la superficie del virus de la gripe y es la responsable de la unión del virus a la célula infectada. Esta proteína se utiliza para marcar proteínas como ESAT-6 para facilitar su reconocimiento.

His trap: columna empacada con sefarosa con níquel y es utilizada para purificar proteínas recombinantes marcadas con histidina.

IL-6 (Interleucina 6): es una citocina que participa en la inmunidad innata y adaptativa. Se sintetiza por macrófagos, Linfocitos T, células endoteliales y linfoblastos en respuesta a microorganismos y otras citocinas como IL-1 y TNF.

Imidazol: su fórmula es $C_3H_4N_2$ y pertenece a una familia de compuestos químicos aromáticos, caracterizada por disponer de un anillo pentagonal nitrogenado. Entre sus usos, esta su función como eluyente (en altas concentraciones) al utilizar una columna his trap para la purificación de proteínas recombinantes marcadas con histidinas.

Inducción: desencadenamiento o activación de genes que sólo son transcritos cuando el inductor está presente, como por ejemplo IPTG.

Inmunoestimulantes: Sustancia que aumenta la capacidad del sistema inmunitario de combatir antígenos.

Inmunomoduladores: sustancias que actúan sobre el sistema inmune, para modular su actividad.

IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido): es un reactivo usado como análogo no hidrolizable de la alolactosa. Permite la producción de proteínas recombinantes cuya transcripción es inhibida por genes reguladores. El IPTG se utiliza como inductor artificial del operón lac, ya que es capaz de unirse al represor LacI, pero no es un sustrato para la β -galactosidasa y no puede ser metabolizado por la bacteria.

Linfocito B: son leucocitos de los cuales depende la inmunidad humoral, es decir la que esta mediada por anticuerpos con actividad específica de fijación de antígenos.

Linfocito T: son los leucocitos responsables de coordinar la respuesta inmune celular, constituyendo el 70% del total de los linfocitos que segregan proteínas o citocinas. Se incluyen las células T cooperadoras y las citotóxicas.

Liofilización: es el proceso en el que se congela una muestra y se introduce en una cámara de vacío para separar el agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido.

Macrófago: células sanguíneas de la serie blanca, especializada en la captación de material particulado mediante fagocitosis.

Medio SB: medio de cultivo utilizado para el crecimiento de bacterias, contiene triptona, extracto de levadura, NaCl y NaOH.

Micro BCA: es una formulación que permite, por colorimetría, la detección y cuantificación total de proteína contenida en una muestra, utilizando concentraciones conocidas de BSA para construir una curva estándar.

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]: es la sal contenida en el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous One Solution. El compuesto MTS tetrazolium es bioreducido por las células a un producto llamado formazan que es soluble en el medio de cultivo celular y tiene una coloración que puede medirse por espectrofotometría UV a 490nm. La cantidad de células metabólicamente viables será proporcional a la coloración que presente el medio de cultivo, haciendo posible que este ensayo se utilice para la determinación de viabilidad, citotoxicidad o proliferación celular.

MTT: es una sal de tetrazolium que se utiliza en el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Non-Radioactive para determinar viabilidad, citotoxicidad y proliferación celular. A diferencia del ensayo que utiliza MTS, MTT no es soluble en el medio de cultivo, por lo que se requiere un solvente después del tiempo de incubación, el cual puede ser SDS al 20%, DMSO, o la solución que recomiende el proveedor.

Nódulo linfático: o ganglios linfáticos agrupaciones celulares con forma de frijol que se conectan mediante vasos linfáticos. Se encuentran en racimos cerca de las venas en puntos estratégicos a lo largo de los vasos linfáticos medianos de la rodilla,

codo, axila, ingle, cuello, abdomen y pecho. La sangre se limpia y filtra en estos nódulos y los glóbulos blancos se acumulan allí cuando hay una enfermedad. Este proceso de filtrado previene la introducción de bacterias, células cancerosas u otros agentes infecciosos en el sistema circulatorio sanguíneo. Los nódulos linfáticos son los centros de producción y almacenamiento de algunos glóbulos blancos, llamados linfocitos monocitos, estos son importantes en el mecanismo inmunológico del organismo. Durante cualquier tipo de infección, los nódulos se dilatan en el área de drenaje debido a la multiplicación de linfocitos.

Nódulos poplíteos: son aquellos nódulos ubicados en la parte posterior de la rodilla.

Óxido nítrico (ON): importante molécula señalizadora involucrada en procesos fisiológicos tales como la comunicación neuronal o la regulación del tono vascular. Los macrófagos cuando están inmunoestimulados, producen altas cantidades de nitritos y nitratos. El óxido nítrico producido por los macrófagos actúa como un citotóxico para ciertos microorganismos. En algunas situaciones, la óxido nítrico sintetasa inductible (NOSi) de los macrófagos, produce grandes cantidades de óxido nítrico, que inhibe la producción de adenosin trifosfato (ATP) y de ADN, por consiguiente impide la proliferación patógena de bacterias, hongos y parásitos.

PBS (buffer de fosfato salino): solución reguladora utilizada en investigaciones biológicas. Contiene cloruro de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Ayuda a mantener un pH estable y la osmolaridad y las concentraciones iónicas coinciden normalmente con las del cuerpo humano.

Peroxidasa (EC 1.11.1.7) es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Plásmido: moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Sirven como una importante herramienta en laboratorios de genética e ingeniería bioquímica, donde son comúnmente usados para multiplicar (hacer muchas copias de) o como genes particulares expresos. Un uso importante de los plásmidos es fabricar grandes cantidades de proteínas. En este se deja crecer la bacteria que contiene el plásmido que encierra al gen de interés. Solo como la bacteria produce la proteína que le confiere si resistencia a los antibióticos, este también puede ser usado para producir proteínas en grandes cantidades desde el gen insertado. Esta es una forma barata y fácil de producir genes o proteínas que este codifica de forma masiva, como por ejemplo insulina, o inclusive antibióticos.

Polisacáridos ácidos: son los polisacáridos que contienen grupos carboxyl, grupos del fosfato y/o sulfúrico éster grupos.

PVPP (polivinilpirrolidona): es un polímero soluble en agua fabricado a partir de N-vinilpirrolidona. Este compuesto se utiliza para precipitar el fenol contenido en una muestra líquida, permitiendo su eliminación por centrifugación.

RAW 264.7: línea celular de macrófagos monocitos leucémicos de ratón. Esta línea celular es utilizada como modelo experimental para establecer la respuesta (producción de de citocinas, citotoxicidad y proliferación) de macrófagos ante un agente de estudio.

RPMI 1640: medio de cultivo celular formulado para células en suspensión (principalmente linfoblastos). RPMI-1640 fue desarrollado por Moore y colaboradores en el Roswell Park Memorial Institute (1966), de ahí el acrónimo de RPMI. Utiliza el sistema regulador de pH de bicarbonatos y contiene aminoácidos y vitaminas. Ha demostrado ser un medio con amplias aplicaciones para el crecimiento de muchos tipos de líneas celulares, incluyendo linfocitos humanos recién extraídos.

SDS (Dodecilsulfato sódico): es un compuesto tensoactivo iónico, empleado.

Solución reguladora: tampón, *buffer* o amortiguadora es la mezcla de un ácido débil y su base conjugada. Su función es la de mantener estable el pH de una disolución.

TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa): es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos infecciosos. Su principal origen celular son los macrófagos, linfocitos T estimulados y las NK. El estímulo más potente para activar la síntesis de TNF- α por macrófagos es la presencia de lipopolisacáridos. La principal función del TNF- α es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos a los focos de infección y activar a estas células para que erradiquen a los microorganismos.

Apéndice II: Espectros para identificación contra bibliotecas espectrales

Laboratorio de Aplicaciones

Espectroscopía Molecular

Espectrometría FTIR

Para



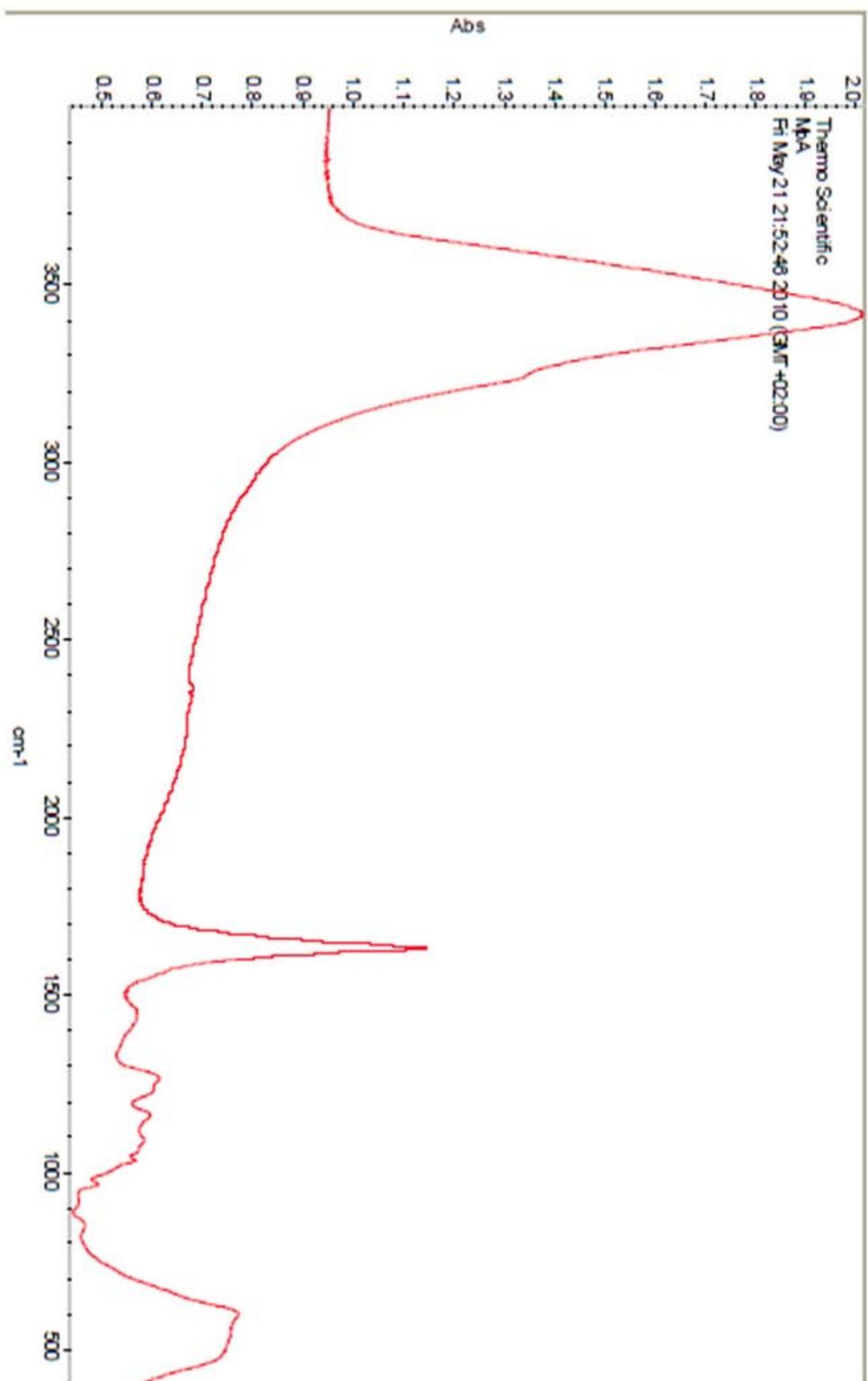
Realizada Por Rafael Sánchez Hernández

Madrid, 12 de Julio de 2010

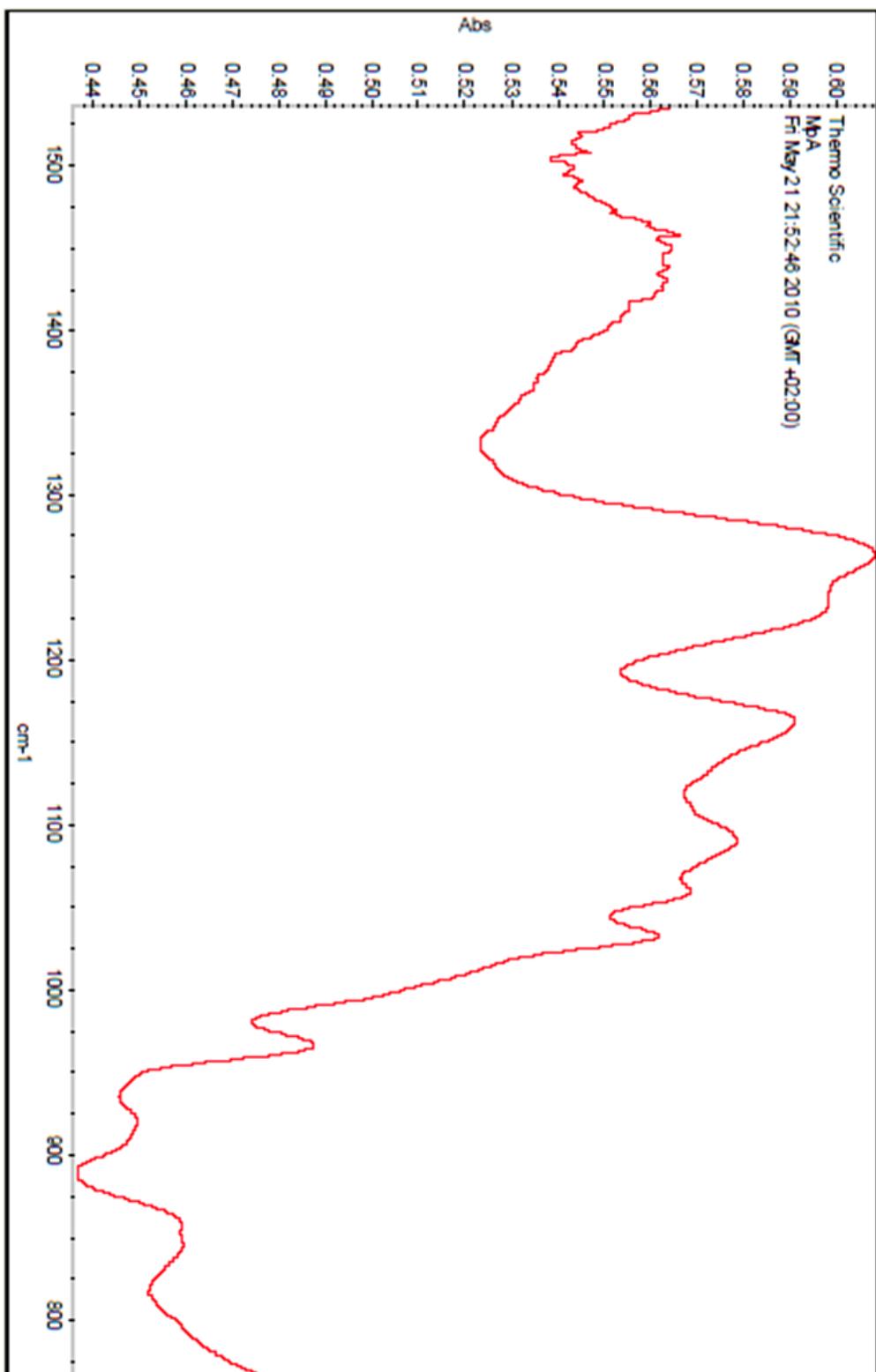
La información contenida en el presente documento tiene carácter confidencial y su uso se debe limitar al proceso de selección de equipamiento y accesorios para Universidad de Málaga y, exclusivamente, a personal de dicha organización o de cualquier otra que la represente.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

The world leader in serving science



La búsqueda en todo el rango proporciona valores no significativos (Cloruro cálcico, Agua en KBr, celulosa, etc.) se amplía la región.



Sun Jul 11 22:01:09 2010 (GMT+02:00)

SEARCH:

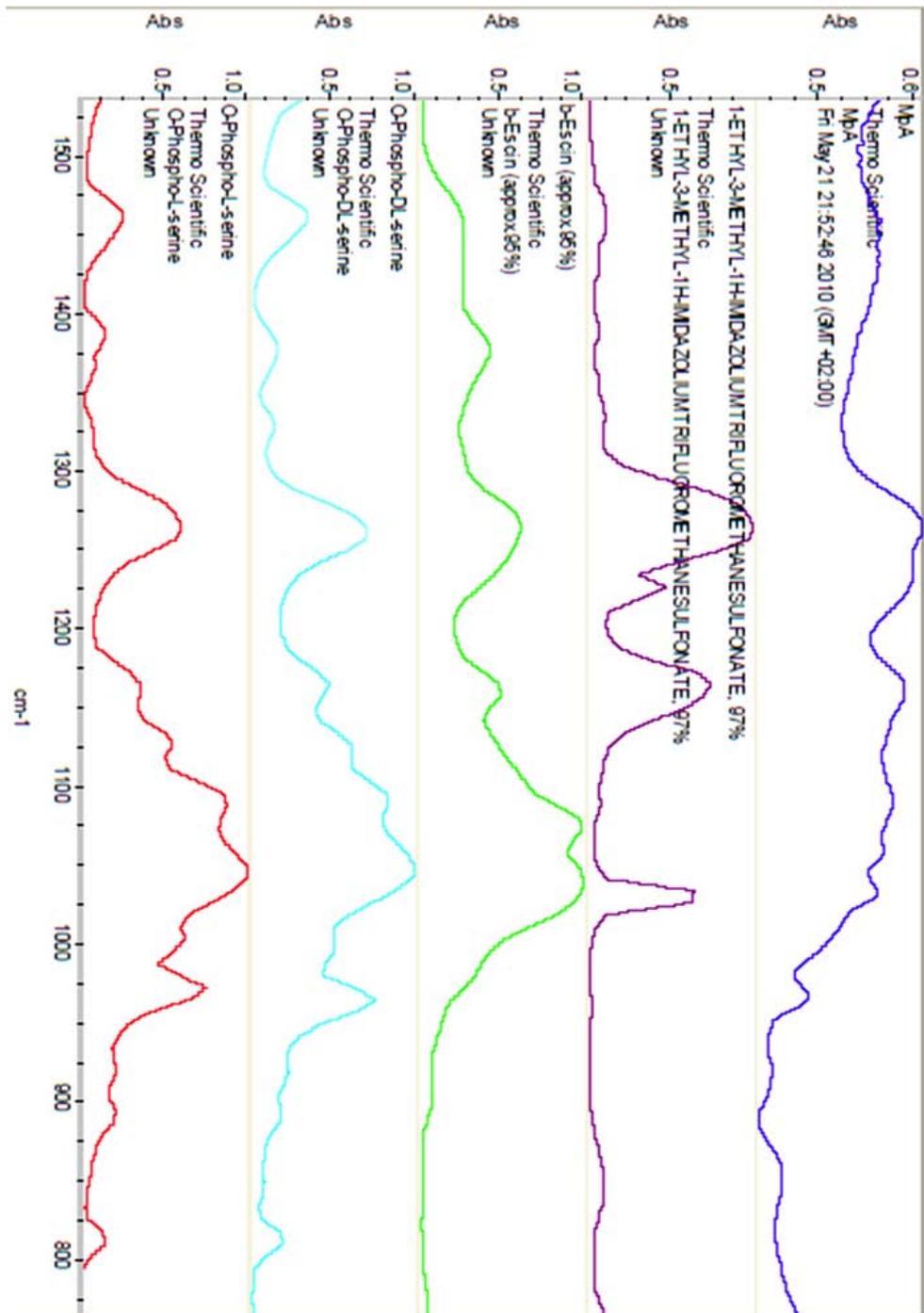
Spectrum: MpA

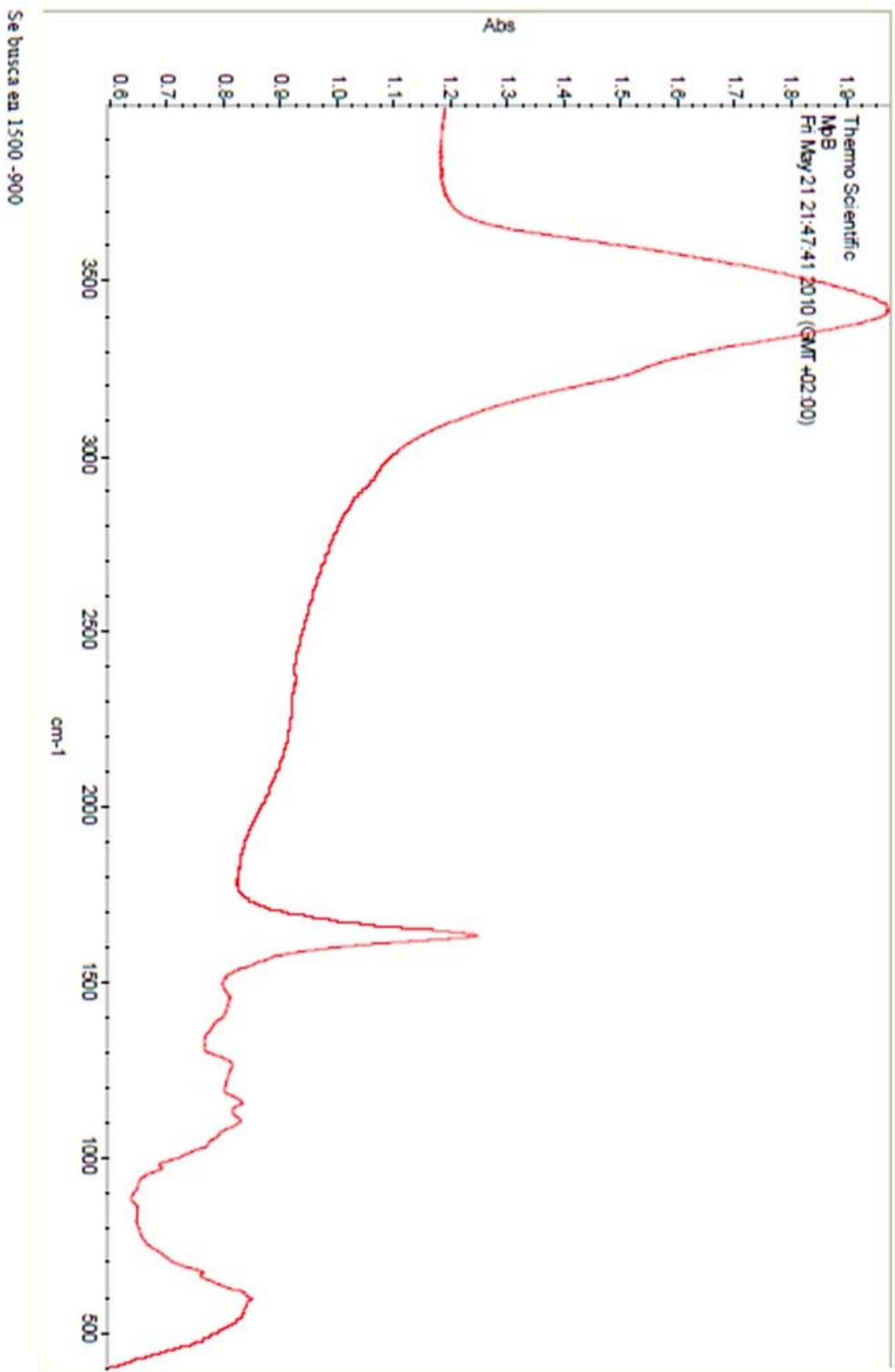
Region: 1536.09-763.39

Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
13449	59.70	1-ETHYL-3-METHYL-1H-IMIDAZOLIUM TRIFLUOROMETHANESULFONATE, 97%	Library Aldrich FT-IR Collection Edition II I
2993	58.12	b-Escin (approx. 95%)	Sigma Steroids
999	54.48	O-Phospho-DL-serine	Sigma Biochemical Condensed Phase
1000	54.06	O-Phospho-L-serine	Sigma Biochemical Condensed Phase
294	53.86	N(a)-t-BOC-w-nitro-L-arginine	Sigma Biochemical Condensed Phase
292	53.79	Peat	Paper Materials Library
3009	53.31	5-Amino-2'-deoxyuridine	Sigma Biochemical Condensed Phase
548	53.31	Fucoidan from fucus vesiculosus	Sigma Sugars and Carbohydrates
2922	53.31	Fucoidan from fucus vesiculosus	Sigma Biochemical Condensed Phase
197	53.31	Brown leather walter	Common Materials





Sun Jul 11 22:24:41 2010 (GMT+02:00)

SEARCH:

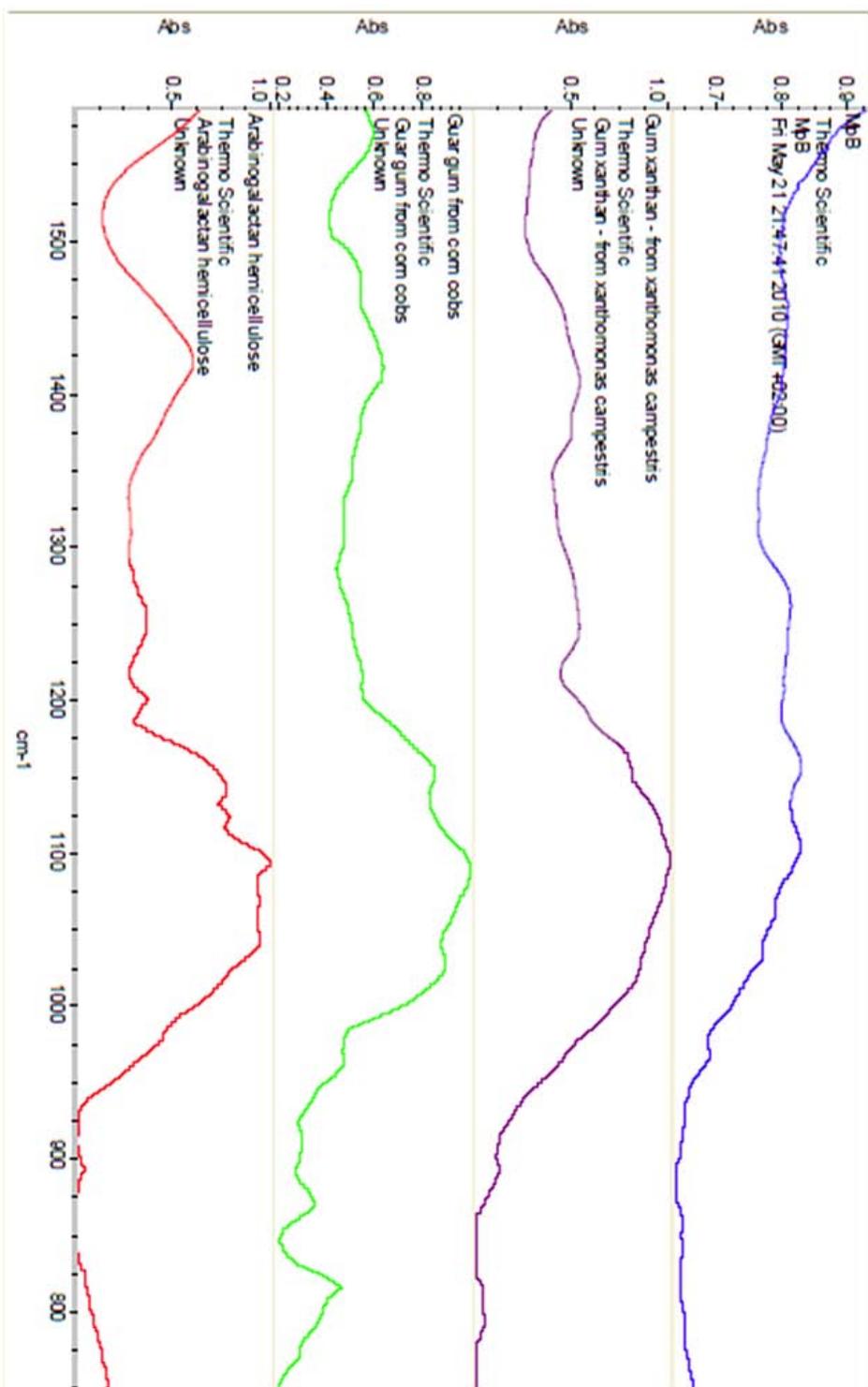
Spectrum: MpB

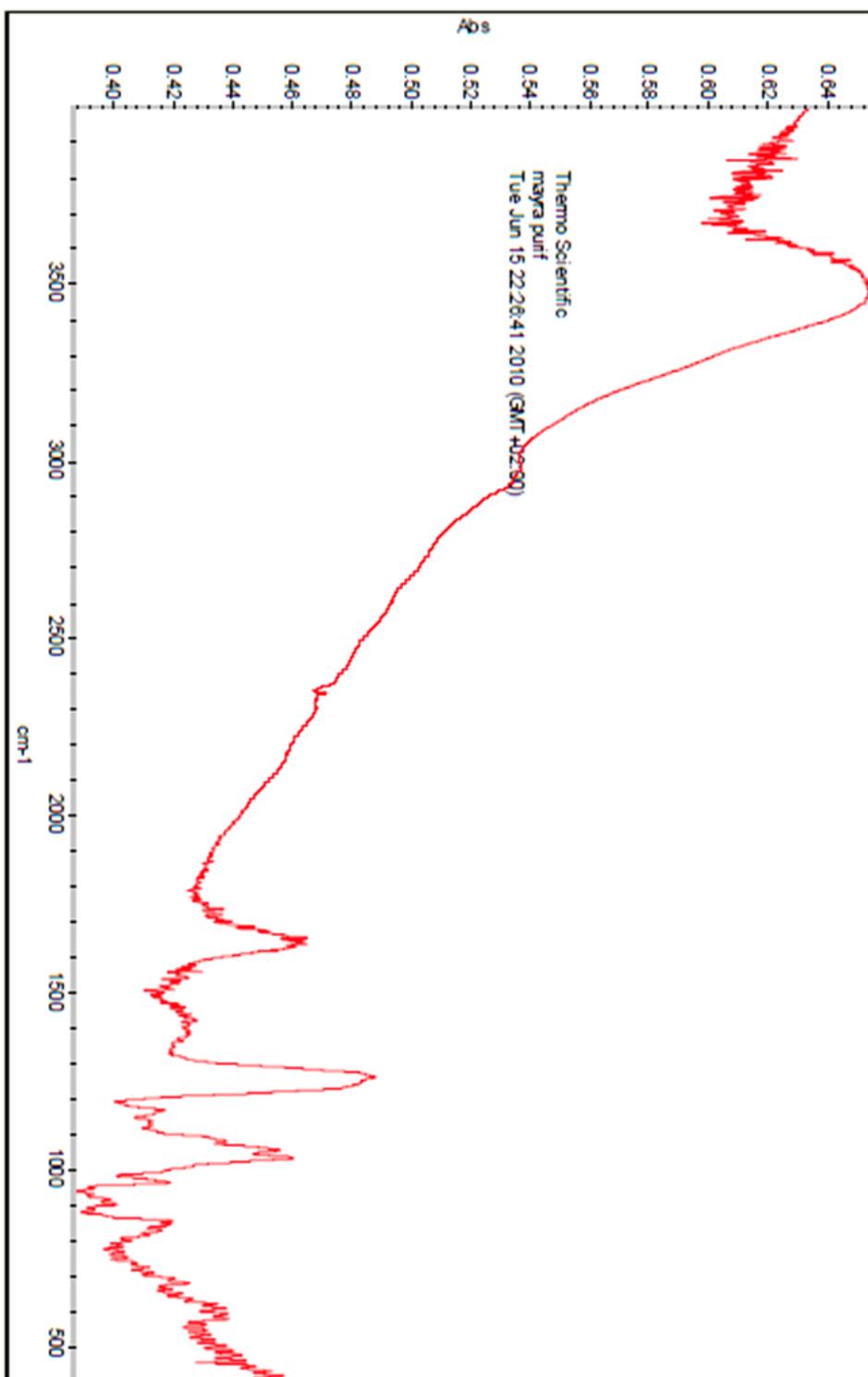
Region: 1522.12-894.97

Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
138	62.51	Gum xanthan - from <i>Xanthomonas campestris</i>	Paper Materials Library
37	62.19	Guar gum from corn cobs	Paper Materials Library
126	61.80	Arabinogalactan hemicellulose	Paper Materials Library
165	61.14	CAB-O-SIL MS	Industrial Coatings
1555	60.51	GFS GUM	Industrial Coatings
4446	59.89	Silicon(TV) oxide	Aldrich Condensed Phase Supplement
197	59.77	Brown leather waller	Common Materials
3333	59.51	Perchloric acid, 70%	Toronto Forensic
206	59.13	Psyllium Seed	Paper Materials Library
439	59.10	PYROCHLORE, Licenced to L'oreal France	HR Inorganics I - Minerals





Sun Jul 11 22:45:15 2010 (GMT+02:00)

SEARCH:

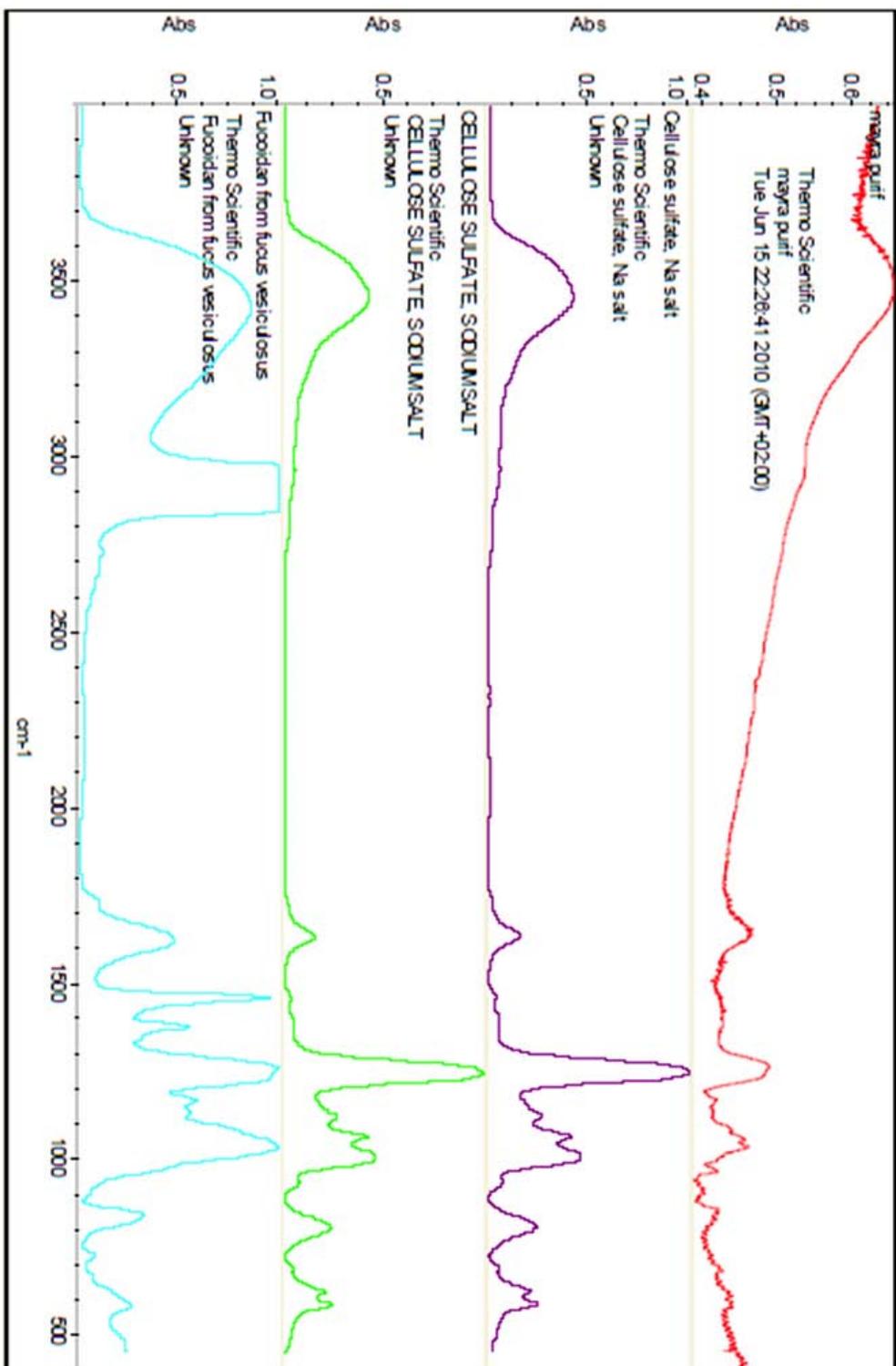
Spectrum: mayra purif

Region: 1745.59-789.43

Search type: Correlation

Hit List:

Index	Match	Compound name	Library
1134	63.72	Cellulose sulfate, Na salt	Library Aldrich Condensed Phase Supplement
17713	61.57	CELLULOSE SULFATE, SODIUM SALT	Aldrich FT-IR Collection Edition II
548	60.60	Fucoidan from fucus vesiculosus	Sigma Sugars and Carbohydrates
2922	60.60	Fucoidan from fucus vesiculosus	Sigma Biochemical Condensed Phase
1829	58.83	11b,17a,21-Trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione 21-sulfate, sodium salt; Cortisol 21-sulfate, potassium salt	Sigma Steroids
1794	58.72	11b,21-Dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione 21-sulfate, potassium salt; Corticosterone 21-sulfate	Sigma Steroids
7	57.79	Cellulose sulfate, sodium salt	Sprouse Scientific Systems Polymers by Transmission Library
7	57.79	Cellulose sulfate, sodium salt	Sprouse Polymers by Transmission
1593	57.54	Resin Catalyst FC-520	Coatings Technology
50	56.93	Estriol 3-sulfate, sodium salt + 33% methylglucamine	Sigma Steroids



En Madrid a 12 de julio de 2010

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping, vertical and horizontal strokes, appearing to read 'Rafael Sánchez Hernández'.

Fdo. Rafael Sánchez Hernández.
Molecular Spectroscopy Line Mgr.
Thermo Fisher Scientific S.L.U.

Apéndice III: Preparación de soluciones

Soluciones requeridas para la detección de TNF- α e IL-6

1. Coating buffer (Current Protocols in Immunology A2A.7 supplement 34)

Solución A: NaH₂PO₄ H₂O 0.2M (27.6 g/L en agua MQ)

Solución B: Na₂HPO₄ 7H₂O 0.2M (53.65g/L en agua MQ)

Estas soluciones deben mezclarse en función de la citocina que se desea detectar, cuidando el pH:

Citocina	pH requerido	Solución A	Solución B	Agua MQ	Volumen final
TNF- α , mL-10, mMCP-1, rGM-CSF	6	87.7 ml	12.3 ml	100 ml	200 ml
IL-2, IL-6, IFN- γ	9	0	100 ml	100 ml	200 ml

La concentración final debe ser de 0.1M de las sales (sumatoria de ambas sales).

2. PBS 10X

- 80g de NaCl
- 11.6g de Na₂HPO₄
- 2g de KH₂PO₄
- 2g de KCl aforar a 1 Litro

3. Solución de bloqueo

PBS 1X con 10% de SFB

Preparar 500 ml

4. Solución de lavado

PBS 1X con 0.05% de Tween 20

Preparar 500 ml

5. Preparación de anticuerpos y otras soluciones:

Anticuerpo de captura (Anti: TNF- α , mL-10, mMCP-1, rGM-CSF, IL-2, IL-6, IFN- γ):

Diluir el anticuerpo de captura anti citocina en la solución de unión correspondiente preparada en el punto No. 1 en una proporción 1:250. Se recomienda preparar estas soluciones justo antes de utilizarlas.

Para una placa de 96 pozos se requieren 24uL de anticuerpo + 5976uL de solución de unión.

Citocinas recombinantes para curva estándar (recombinante purificado de Anticuerpo de captura (AntiTNF- α , mL-10, mMCP-1, rGM-CSF, IL-2, IL-6, IFN- γ):

Usar una alícuota de 5uL del stock que esta a 2ng/uL, se añade a 995 uL de la solución de bloqueo, esta es la mayor concentración que se utiliza en la curva. Realizar diluciones a partir de esta 1:1 obteniendo la siguiente curva: 10, 5, 2.5, 1.23, 0.625, 0.31 y 0 ng/ml.

Anticuerpo Biotinilado (Biotinilado AntiTNF- α , mL-10, mMCP-1, rGM-CSF, IL-2, IL-6, IFN- γ):

Preparar en solución de bloqueo a una dilución 1:250. Para una placa de 96 se requieren 44uL de anticuerpo biotinilado + 10956uL de solución de bloqueo.

Avidin peroxidasa

Esta solución se debe preparar justo antes de ser utilizada. Preparar 11ml de Avidin peroxidasa en una proporción 1:2000 en solución de bloqueo. Se requieren 5~~uL~~ de Avidin - Horseradish Peroxidase, Sigma A3151, solución stock 1mg/ml en 10.994 ml de solución de bloqueo.

6. Solución reveladora (ABTS)

Esta solución se debe preparar justo antes de ser utilizada. Se requiere preparar alícuotas de ABTS y mantener a -20C cubiertos de la luz, ya que esta solución es fotosensible. Para cada placa se requieren 11ml. El ABTS se disuelve en una solución de ácido cítrico anhidro 0.1M en agua destilada con un pH 4.35 (ajustar con NaOH). Pesar 150mg de ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzoathiazoline-6-sulfonic acid)) y disolverlo en 500 ml de la solución de ácido cítrico previamente preparada. Preparar las alícuotas en tubos de 15ml y cubrirlos de la luz con aluminio; mantenerlos a -20C hasta su utilización; al descongelar mantener protegido de la luz.

Una vez descongelada la solución de ABTS agregar peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en una proporción 1:1000, es decir 11 μ L para 11ml de solución.