



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE Dr. RAFAEL BURGOS A.
INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE Dr. JUAN HANCKE O.
INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOSUPRESOR DE ANGROGRAFOLIDO EN LA
PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS DE LAS CÉLULAS T DE RATÓN”**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al título de Químico Farmacéutico**

MIRNA ELENA PÉREZ AGUILERA

VALDIVIA – CHILE

2005

A Dios, Padres, Hermana y Esposo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar mis más afectuosos agradecimientos en primer lugar a Dios por estar conmigo en cada momentos, a mis padres por haberse esforzado para permitirme estudiar, a mi hermana quien me ayudó en las materias comunes a su carrera, a mi esposo por su paciencia y a veces postergación en pro de este logro.

También quisiera agradecer a los profesores que guiaron este trabajo de tesis, por su apoyo y dedicación en todo el proceso, al personal del Instituto de Inmunología, en especial a Marcela Ortega y Priscilla Muñoz quienes colaboraron con muy buena voluntad durante el tiempo de estadía en ese instituto. Así mismo al personal del Instituto de Farmacología, quienes del mismo modo colaboraron en el aprendizaje de los métodos aplicados.

No quisiera dejar pasar la ocasión de agradecer a cada profesor que participó en mi proceso formativo durante los años de estadía en esta Universidad cuyo propósito fue siempre la formación de profesionales orgullosos y capaces de atender sabiamente la necesidad de quienes nos requieran.

INDICE

	Página
Capitulo I Introducción.....	1
1.1 Antecedentes Teóricos.....	2
1.1.1 Aspectos Básicos de la Respuesta Inmune.....	2
1.1.1.1 Tejido Linfoide y Ganglios linfáticos.....	3
1.1.1.2 Linfocitos T y el reconocimiento de los antígenos.....	4
1.1.1.3 Células T Helper.....	5
1.1.1.4 Citoquinas.....	6
1.1.1.5 Estimulación linfocitaria <i>in vitro</i>	6
1.1.2 Vías de Transducción de Señales.....	7
1.1.3 <i>Andrographis paniculata</i>	8
1.2 Presentación del problema.....	9
1.3 Hipótesis.....	10
1.4 Objetivos.....	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	11
Capitulo II Materiales y Métodos.....	12
2.1 Materiales.....	13
2.1.1 Animales.....	13
2.1.2 Principio Activo.....	13
2.1.3 Kits de Citoquinas.....	13
2.1.4 Mitógeno.....	14

	Página
2.1.5 Medio de Cultivo.....	14
2.2 Métodos.....	15
2.2.1 Preparación de soluciones de Andrografolido.....	15
2.2.2 Obtención de células linfáticas a partir de ganglios linfáticos.....	15
2.2.3 Estimulación de Linfocitos <i>in vitro</i>	16
2.2.4 Cultivo para estudio de la presencia de citoquinas.....	16
2.2.5 Cultivo y obtención de proteínas para estudio de actividad de p-ERK1/2.....	17
2.2.6 Determinación de citoquinas secretadas <i>in vitro</i> mediante ELISA sándwich.....	17
2.2.7 Determinación de la expresión de proteínas p-ERK 1/2 por Western Blot.....	18
2.2.8 Determinación de Citotoxicidad.....	20
2.3 Expresión de Resultados.....	21
2.3.1 Medición de concentración de citoquinas estudiadas.....	21
2.3.2 Expresión de enzimas p-ERK1/2.....	21
2.3.3 Determinación de citotoxicidad.....	22
2.4 Análisis estadístico.....	23
Capítulo III Resultados.....	24
3.1 Efecto de Andrografolido sobre la Producción <i>in vitro</i> de citoquinas en células de ganglios linfáticos.....	25

	Página
3.2 Efecto de Andrografolido sobre la producción <i>in vitro</i> de citoquinas en células de ganglios linfáticos estimuladas con Con-A.....	27
3.3 Efecto de Andrografolido sobre la actividad de la enzima p-ERK 1/2.....	28
3.4 Efecto de Andrografolido sobre la citotoxicidad de los linfocitos en presencia de Con-A.....	30
Capítulo IV Discusión.....	31
4.1 Discusión.....	32
4.2 Conclusión.....	36
4.3 Proyección del trabajo.....	37
Capítulo V Bibliografía.....	38
Capítulo VI Anexos.....	42

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto del andrografolido, un componente de *Andrographis paniculata*, en la producción de citoquinas y sobre la actividad de las enzimas p-ERK1/2. Para este propósito se utilizaron ratones de la cepa *Rockefeller*, los que fueron sacrificados cuyos ganglios linfáticos se extrajeron para el cultivo de sus células con andrografolido o el solvente por 24 horas. Se determinó la producción de citoquinas T_H1 y T_H2 por ELISA “sándwich” en el sobrenadante de las células linfoides cultivadas.

La actividad de las enzimas p-ERK1/2 fue determinada a través de Western Blotting de las proteínas extraídas de las células linfoides preincubadas con andrografolido y estimuladas con Concanavalina-A.

Los resultados obtenidos indicaron que andrografolido *in vitro* disminuye la producción de IFN- γ e IL-2. La producción de IL-4, una importante citoquina T_H2 no se vio afectada por el andrografolido en los distintos experimentos. El mecanismo por el cual se desarrolla esta disminución en la respuesta inmune se basa en la capacidad del andrografolido de impedir la fosforilación de las enzimas ERK1/2, disminuyendo de ese modo la producción de las citoquinas.

De estos resultados podemos concluir que andrografolido disminuye la respuesta proliferativa de las células T_H1, reduciendo la fosforilación de las enzimas kinasas ERK 1/2, por lo que disminuye la respuesta inmune mediada por células. Por otro lado, andrografolido no afecta las citoquinas del tipo T_H2 encargadas de co-activar las células B, que ayudan a la generación de la respuesta inmune humoral dada por la secreción de inmunoglobulinas.

SUMMARY

In this work the effect of Andrographolide (a component of *Andrographis paniculata*) on the cytokine production and on the activity of the enzymes p-ERK1/2 was studied. For this purpose, mice *Rockefeller* were used sacrificed and their lymphatic ganglion extracted for cell culture with andrographolide or solvent for 24 hours. Using ELISA “sandwich” The T_H1 and T_H2 cytokines production was determined in the supernatant of the lymphoid cells cultivated.

The activity of the p-ERK1/2 enzymes was determined by Western Blotting of the extracted proteins of the linfoides cells preincubated with andrographolide and stimulated with Concanavaline-A.

The results indicate that andrographolide *in vitro* diminishes the production of IFN- γ and IL-2. In our experiments the production of IL-4, an important T_H2 cytokine, was not affected by andrographolide in the different experiments. The mechanism by which this decrease is developed is based on the capacity of andrographolide to block ERK1/2 enzymes.

Based on these results, we can conclude that andrographolide diminishes the proliferative response of T_H1 cells, reducing the phosphorylation of the ERK 1/2 enzymes kinases. On the other hand, andrographolide did not affect the T_H2 cytokines responsible of co-activation of B cells, which help to generate the humoral response mediated by the immunoglobulin secretion.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES TEÓRICOS

1.1.1 ASPECTOS BÁSICOS DE LA RESPUESTA INMUNE

El sistema inmunitario es una red de componentes celulares y solubles que interaccionan entre sí. El funcionamiento normal del sistema inmunológico constituye una efectiva defensa contra partículas extrañas, tales como agentes microbianos patógenos y contra células que han sido sometidas a transformación neoplásica. Una función defectuosa de este sistema puede resultar en enfermedad (Peakman y Vergani, 1997). La capacidad de distinguir entre un constituyente normal del cuerpo y uno foráneo es esencial para que el organismo se mantenga por sí mismo libre de invasión ya sea por microorganismos o parásitos (Tizard, 1982).

Algunos mecanismos de protección incluyen la inmunidad innata y la inmunidad adquirida o específica. Entre los componentes de esta última se cuentan los linfocitos y sus productos entre ellos los anticuerpos (Ac), existiendo interacciones entre ambos mecanismos en forma bidireccional (Abbas *et al*, 1998). Según el componente del sistema inmunitario que participa en la respuesta, esta se clasifica en 2 tipos: inmunidad mediada por células o inmunidad celular e inmunidad mediada por anticuerpos o inmunidad humoral (Diasio y LoBuglio, 1996).

1.1.1.1 Tejido Linfoide y Ganglios linfáticos

Para generar una respuesta por parte del sistema inmunológico existen células capaces de reconocer un antígeno y luego responder a los determinantes antigénicos específicos. Estas células son los linfocitos: los linfocitos B o células B (derivadas de la médula ósea) que conducen a la producción de anticuerpos, y las células T o linfocitos T (derivadas del timo) que conducen a una respuesta mediada por células (Tizard, 1982). Los linfocitos son las células responsables del reconocimiento específico de los agentes patógenos, e inician las respuestas inmunitarias adaptativas (Roitt *et al*, 1997). Dichas células se encuentran ubicadas en los tejidos linfoides, los que según la base de sus roles en la generación de linfocitos y en la provisión de un medio ambiente adecuado para la interacción entre el antígeno procesado y la célula sensibilizada por el antígeno pueden clasificarse en: tejido linfoide primario u órganos generadores y tejido linfoide secundario u órganos periféricos (Tizard, 1982 y Abbas *et al*, 1998); Entre los primeros encontramos el timo y la bolsa de Fabricio en aves y entre los segundos tenemos el bazo, ganglios linfáticos (Tizard, 1982), el tejido linfático asociado a mucosas y el sistema inmunitario de la piel (Abbas *et al*, 1998).

Los ganglios linfáticos son pequeños agregados nodulares de tejido linfoide (Abbas *et al*, 1998). Forman parte de la red que filtra los antígenos (Ag) contenidos en el líquido intersticial de los tejidos y en la linfa, durante el transporte de estos líquidos desde la periferia hasta el conducto torácico. Los ganglios linfáticos se encuentran situados en los puntos de ramificación de los vasos linfáticos. Un ganglio linfático contiene una región de células B (cortex), una región de células T (paracortex) y una

medula central, en la que aparecen cordones celulares que contienen células T, células B, células plasmáticas y abundantes macrófagos (Roitt *et al*, 1997).

1.1.1.2 Linfocitos T y el reconocimiento de los antígenos

Los linfocitos T son muy heterogéneos, entre ellos se reconocen 2 tipos de células efectoras capaces de elaborar citoquinas o de destruir células extrañas, células T colaboradoras o helper (T_H) que asisten a los linfocitos B u otros linfocitos T, linfocitos T supresores que inhiben otros linfocitos T o B. Otros linfocitos que también juegan un rol en la respuesta inmune celular son las células asesinas naturales (NK) (Coles, 1986) y las células T citolíticas o citotóxicas (CTL) (Abbas *et al*, 1998).

Las células T reconocen el Ag mediante el receptor de la célula T (TCR), y otras moléculas de adhesión accesorias. Los genes que codifican el TCR se recombinan dando lugar así a un gran número de clones de células T, cada uno con una respuesta a Ag específica (Coles, 1986).

Las células T necesitan “ver” al antígeno asociado a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígeno (Roitt *et al*, 1997). El MHC es una región genética muy grande que codifica las moléculas de clase I y II, las que se unen a Ag peptídicos extraños y forman complejos que son reconocidos por los linfocitos T específicos de Ag (Abbas *et al*, 1998). Los Ag MHC de clase I y II actúan como sistemas de guía para las células T (Roitt *et al*, 1997). Los CTL $CD8^+$ reconocen antígenos peptídicos extraños cuando se unen a moléculas de clase I del MHC y los linfocitos $T_H CD4^+$ reconocen antígenos unidos a las moléculas de clase II del MHC (Abbas *et al*, 1998).

El mecanismo por el cual se procesa el Ag y se asocia con el MHC antes de presentarse a las células T tiene lugar en las células presentadoras de antígeno (APC), como: las células de Langerhans, los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas foliculares y las células B (Roitt *et al*, 1997). Es importante saber si el Ag se asocia al MHC de clase I o II, porque las moléculas CD4 y CD8 actúan como moléculas de adhesión accesorias al unirse a las clases II o I, respectivamente (Tizard, 1982).

1.1.1.3 Células T Helper

Los linfocitos expresan un gran número de diferentes moléculas marcadoras sobre su superficie, que pueden emplearse para distinguir diversas poblaciones celulares (Roitt *et al*, 1997). La mayoría de las células T_H expresan una proteína de superficie llamada CD4 y la mayoría de las CTL expresan un marcador diferente llamado CD8 (Abbas *et al*, 1998).

Pueden distinguirse 2 poblaciones de células T $CD4^+$ según las citoquinas que secretan denominadas T_H1 y T_H2 , desarrolladas a partir de un linfocito T $CD4^+$ virgen. Una vez que se desarrolla una subpoblación, ésta produce citoquinas que inhiben la diferenciación hacia la otra subpoblación aumentando así la polarización de la respuesta inmune (Abbas *et al*, 1998). Ante una estimulación inicial, estas células evolucionan a células T_H0 , que pueden secretar varias citoquinas, como IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 y IL-10; dependiendo de la citoquina disponible, las células T_H0 pueden evolucionar a células T_H1 o T_H2 (Roitt *et al*, 1997). La citoquina efectora más importante de las producidas por las células T_H1 es IFN- γ , aunque también secretan IL-2; y las citoquinas producidas por las células T_H2 son: IL-4 e IL-5, entre otras (Abbas *et al*,

1998). En general, las T_H1 favorecen la inmunidad celular, mientras que las T_H2 favorecen la inmunidad humoral (Roitt *et al*, 1997). La diferenciación de las células T $CD4^+$ vírgenes en células T_H1 o T_H2 está influenciada por las citoquinas producidas inicialmente en la respuesta frente al microorganismo que desencadena la reacción inmunitaria (Abbas *et al*, 1998).

1.1.1.4 Citoquinas

Las citoquinas son un grupo diverso de proteínas producidas durante la fase de activación y efectora de la inmunidad innata y específica (Abbas *et al*, 1998). Estas pueden dividirse en varios grupos, entre los que se encuentran los interferones (INF), que limitan la diseminación de ciertas infecciones víricas; las interleuquinas (IL-1 – IL-17); los factores estimuladores de colonias (CSF); los factores de necrosis tumoral (TNF) y el factor β de transformación del crecimiento (TGF) (Roitt *et al*, 1997).

1.1.1.5 Estimulación linfocitaria *in vitro*

La activación y la proliferación inducidas por el antígeno se pueden producir en los tejidos linfoides, y pueden ser observadas *in vitro* cultivando linfocitos en presencia de un agente activador. Entre estos agentes se encuentran:

- Antígenos que reconocen los receptores superficiales.
- Anticuerpos monoclonales frente a CD3-TCR o frente a algún epítipo de CD2.
- Lectinas.

Las lectinas son proteínas de origen vegetal y bacteriano, capaces de unirse a los hidratos de carbono. Algunas de ellas activan a los linfocitos mediante el

entrecruzamiento de los receptores de células B o los receptores de células T, y se denominan mitógenos (inductores de la proliferación). Las células T y B son activadas por mitógenos diferentes. La fitohemaglutinina (PHA) y la Concanavalina A (Con-A) estimulan las células T humanas y murinas. El Lipopolisacárido (LPS) estimula las células B murinas, mientras que el mitógeno de hierba carmín (PWM) estimula las células humanas T y B (Roitt *et al*, 1997).

La utilización de estos agentes *in vitro* ha servido para demostrar que la activación de las células T y B conduce a la formación de citoquinas y de receptores de las mismas, siendo ésta la señal de partida para que se inicie el ciclo de vida de los clones seleccionados (proliferación), que conduce finalmente a la maduración y a la producción de células efectoras y de memoria (Roitt *et al*, 1997).

1.1.2 VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La presencia de la vía de transducción de señales MAP quinasa consistente de Raf-1, MEK1 y ERK1/2 en las células se encuentra bien establecido (Whitehurst y Geppert, 1996)

Existen múltiples vías mediadas por segundos mensajeros que son activadas después de la estimulación del TCR, donde se incluyen aquellas que son gatilladas por el flujo de calcio al interior de la célula, la activación de la Proteína quinasa C (PKC) y la inducción de varias tirosinas quinasas (Franklin *et al*, 1994), siendo la clave entre estos efectores las enzimas Fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (Shan *et al*, 2001). Una de las moléculas de estas vías de señales que es estimulada por las tirosinas quinasas (PTK) es la PLC- γ 1, la cual

produce la liberación de segundos mensajeros que estimulan un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y la activación de PKC que conduce una vía de transducción de señal hacia el núcleo (Franklin *et al*, 1994).

La GTPasa, p21^{ras} (RAS), representa otra importante molécula dentro de las vías de señales acoplada a la activación de PTK que opera río arriba de varias vías efectoras, incluyendo la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP) y la cascada de quinasas Nterminal c-Jun (JNK). Estas vías de señales controlan la expresión de diversos genes, que codifican proteínas intracelulares y de superficie y una serie de citoquinas, entre ellas, IL-2, IFN- γ e IL-4 (Dumont *et al*, 1998).

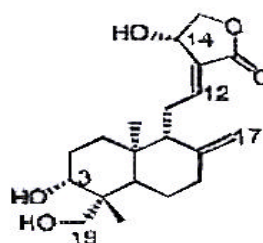
1.1.3 **ANDROGRAPHIS PANICULATA**

Andrographis paniculata, es una planta de la familia Acanthaceae, usada en Asia y China para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como infecciones virales y artritis reumatoidea (Wang *et al*, 2003). Además, se le ha atribuido actividad antialérgica, inmunoestimulante, antitrombótica, hipoglicémica, hipotensiva (Rajagopal, 2003) y anticancerígena (Ajaya *et al*, 2004). *Andrographis paniculata* es una planta anual, con ramas erectas de medio a un metro de altura, que crece abundantemente al sureste de Asia: India, Pakistán e Indonesia, pero es cultivada extensivamente en China y Tailandia (Ajaya *et al*, 2004). Las partes aéreas de la planta (hojas y tallos) son usadas para la extracción de los principios activos, entre los que se encuentran: diterpenoides, flavonoides y esteroides; sin embargo, sus principales componentes son las lactonas diterpénicas, de los cuales el andrografolido es el principal (Rajagopal *et al*, 2003).

Andrografolido, es una lactona α , β insaturada, cuyo peso molecular es de 350,46 g/mol y su extracción se hace habitualmente con etanol o solventes orgánicos (Zheng, 1982).



Andrographis paniculata



Andrografolido

1.2 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

El fracaso en el control de las respuestas inmunitarias fisiológicas contra antígenos extraños o el mantenimiento de la autotolerancia (ausencia de una respuesta inmunológica dirigida contra los antígenos tisulares nativos de la propia persona) produce enfermedades en las que el mecanismo patogénico primario es inmunológico (Roitt *et al*, 1997), lo que da lugar a inmunodeficiencia, hipersensibilidad o enfermedades autoinmunitarias (Diasio y LoBuglio, 1996). Las 2 primeras se deben a una respuesta inapropiadamente pequeña o grande, respectivamente, el tercero es un fallo en la discriminación entre lo propio y lo no propio (Roitt *et al*, 1997). Las enfermedades autoinmunitarias surgen cuando el sistema inmunitario es sensibilizado por proteínas endógenas que son reconocidas como antígenos “heterólogos”; con ello se forman anticuerpos o células T inmunitarias que reaccionan con dichos antígenos,

presentes en el tejido, para ocasionar cambios destructivos. Se ha demostrado que la terapia inmunosupresora resulta eficaz para suprimir este tipo de reacciones (Diasio y LoBuglio, 1996). La eficacia de la terapia inmunosupresora en enfermedades autoinmunitarias ha sido variable, y en términos generales no ha sido tan fructífera como en el caso del trasplante de órganos o en el tratamiento de cuadros inmunitarios específicos (como en la prevención de enfermedad hemolítica por Rh en el neonato). Varios trastornos autoinmunitarios, como la púrpura trombocitopénica idiopática, la anemia hemolítica autoinmunitaria y la glomerulonefritis aguda, reaccionan razonablemente bien a los regímenes inmunosupresores, que incluyen en forma típica corticosteroides solos, o en casos más graves, en combinación con citotóxicos (Diasio y LoBuglio, 1996).

Los intentos de obtener una inmunosupresión selectiva comprenden el uso de antisueros frente a linfocitos humanos o células tímicas en un esfuerzo para suprimir la inmunidad celular dejando la respuesta inmunitaria humoral del receptor intacta. También se utilizan anticuerpos monoclonales y radiación. Los tratamientos inmunosupresores en desarrollo son, entre otros, agentes químicos de diferentes tipos y sustancias biológicas, como anticuerpos seleccionados por sus propiedades especiales. (Tizard, 1982).

1.3 HIPÓTESIS

Andrografolido (Ap), es capaz de producir disminución de la respuesta inmunológica en células T provenientes de ganglios linfáticos de ratón.

1.4 **OBJETIVOS**

Probar el efecto inmunosupresor del andrografolido en células de ratones de experimentación.

1.4.2 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos que se plantean son los siguientes:

1. Demostrar que el andrografolido disminuye la respuesta inmunológica.
2. Demostrar que la administración del andrografolido inhibe la producción de citoquinas del tipo T_H1 (IL-2 e IFN- γ), que regulan en forma positiva la respuesta inmune en ratones.
3. Demostrar que la administración del andrografolido disminuye la producción de citoquinas del tipo T_H2 (IL-4) en ratones.
4. Demostrar que el andrografolido inhibe las enzimas p-ERK1/2 en células de ganglio estimuladas con Con-A.

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa *Rockefeller* provenientes del vivero del Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile. Para cada experimento se usaron los ratones requeridos según cálculo por grupo. Los ratones se mantenían en cajas a temperatura de 20°C y fueron alimentados con concentrado especial para ratones y agua *ad libitum*.

2.1.2 Principio Activo

Se utilizó para todos los experimentos el compuesto Andrografolido en forma pura obtenido de *Andrographis paniculata*, producido por el laboratorio AMSAR PRIVATE LTD. (India). Andrografolido fue usado para los cultivos *in vitro* de las células linfáticas obtenidas de los ratones.

2.1.3 Kits de Citoquinas

IL-2 : (Mouse IL-2 set) N° 555148. Laboratorio Pharmingen

IL-4 : (Mouse IL-4 set) N° 555232. Laboratorio Pharmingen

INF- γ : (Mouse INF- γ set) N° 555138. Laboratorio Pharmingen

Cada uno de estos kits consta de un primer anticuerpo de captura anti-antígeno, un segundo anticuerpo conjugado a una enzima peroxidasa y una solución estándar de la citoquina para la elaboración de la curva de calibración.

2.1.4 Mitógeno

Se usó Concanavalina-A (Con-A) de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean).

Producto N° C7275 del Laboratorio SIGMA.

2.1.5 Medio de Cultivo

Se utilizó RPMI 1640 con L-Glutamina y sin Bicarbonato de sodio, como medio de cultivo incompleto.

Producto N° R6504. Laboratorio SIGMA.

Esta solución es utilizada como base para la preparación del medio completo RPMI 1640 (Anexo 5.1.1).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparación de las soluciones de Andrografolido

Andrografolido fue preparado a las siguientes concentraciones: 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 8, 6, y 4 μM disuelto en DMSO al 0,4%. Para ello se pesaron 0,0175 g. de andrografolido en polvo disolviéndolo en 1 ml de DMSO, obteniendo así la concentración de 50 mM en 100% de DMSO y luego se hicieron diluciones seriadas para obtener 20 mM en 40% DMSO y 200 μM en 0,4 % DMSO, siendo ésta última la concentración patrón a partir de la cual se prepararon las restantes concentraciones, todas en RPMI/DMSO 0,4%.

Es importante destacar que todas las concentraciones señaladas están al 4X, ya que el volumen agregado a cada pocillo permite que la concentración final sea la cuarta parte de lo preparado, quedando todos los pocillos a concentración de 0,1% DMSO, evitando así la muerte celular provocada por la alta concentración del solvente.

2.2.2 Obtención de Células Linfáticas a partir de Ganglios Linfáticos

Para la obtención de los ganglios linfáticos, los animales fueron sacrificados por inhalación excesiva de éter y posterior dislocación cervical. Se extrajeron los ganglios linfáticos, los que fueron depositados en una placa Petri con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 incompleto estéril y luego trasladados a 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 completo estéril contenido en otra placa Petri y disgregados en ella para la obtención de las células.

Para cuantificar el número de células obtenidas, se hizo una dilución 1:10 con 100 μ l de la solución de células y llevados 1 ml en con solución Hyam, para ser contadas en la cámara de Neubauer. Luego se ajustó el número de células a la concentración requerida para cada estudio.

2.2.3 Estimulación de Linfocitos *in vitro*

Se utilizó Con-A en una concentración de 3,3 μ g/ml, disuelto en medio de cultivo RPMI 1640 estéril, aplicándose en los pocillos correspondientes de la placa de cultivo.

2.2.4 Cultivo para estudio de la presencia de citoquinas

Una vez cuantificadas las células (4×10^6 células por ml) fueron cultivadas en presencia del mitógeno, existiendo 2 controles, usándose para ello placas de cultivo de poliestireno de 24 pocillos de 2 ml cada uno. Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37°C, en 1 atmósfera de humedad y con un 5% de CO₂. Una vez transcurrido este período se extrajo el contenido total de cada pocillo y se sometieron las muestras a centrifugación por 1 minuto a 3.200 r.p.m. siendo alicuotados los sobrenadantes y luego congelados para la posterior medición de las citoquinas liberadas mediante la técnica de ELISA.

2.2.5 Cultivo y obtención de Proteínas para estudio de Actividad de p-ERK1/2

La cantidad de células incubadas fue de 4×10^6 por pocillo. Las células fueron preincubadas con Andrografolido por media hora y luego fueron estimuladas con Con-A por otra media hora. Una vez transcurrido ese período se agregó el buffer de extracción de proteínas (Anexo 5.2.1) y luego, por medio de centrifugación ($22000 \times g$ durante 45 min. a 4°C) se obtuvieron las proteínas presentes en el sobrenadante.

La cuantificación de dichas proteínas se realizó mediante el método de Bradford, Se midió la absorbancia a 595 nm y se graficó absorbancia versus Concentración de proteínas, el valor de la concentración de las muestras se obtuvo por interpolación de sus absorbancias. Las muestras fueron congeladas para el posterior análisis.

2.2.6 Determinación de citoquinas secretadas *in vitro* mediante ELISA Sándwich

Para estudiar la producción de citoquinas liberadas se utilizó la técnica de ELISA “sándwich” o llamado también ELISA de captura.

En cada experimento se utilizaron placas para ELISA “high binding” (alta unión), de poliestireno de 96 pocillos, donde se sembró 100 μl del anticuerpo de captura o primer anticuerpo diluido en Buffer Carbonato pH 9,5 (Anexo 5.1.3), para facilitar la unión a la placa, dejándose incubar toda la noche a 4°C con el objeto de asegurarse que el anticuerpo se una a la fase sólida. A la mañana siguiente, se eliminó el contenido de la placa y se lavó con 600 μl por pocillo de solución de lavado (Anexo 5.1.5) por tres

o cinco veces según sea IL-2, IL-4 o IFN- γ , respectivamente. Luego se agregaron a la placa 200 μ l de solución de bloqueo (Anexo 5.1.4) en cada pocillo incubándose 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se eliminó el contenido y se lavó nuevamente la placa. Una vez hecho esto, se procedió a agregar en la placa 100 μ l por pocillo de la muestra por triplicado con el antígeno a analizar (que se tenía congelada), además, en este momento se agregaron 100 μ l de la curva de calibración específica para cada citoquina. Se dejó incubar la placa por dos horas a temperatura ambiente, para luego lavarla y agregarle 100 μ l por pocillo de la solución del segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa o “Working Detector” dejándose incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar la placa se agregaron 100 μ l por pocillo de la solución sustrato (o reveladora) (Anexo 5.1.6 y 5.1.7) y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para detener esta reacción se agregó 50 μ l por pocillo de solución de parada (H_2SO_4 2,5 M). El resultado de dicha reacción se evaluó midiendo la absorbancia en un lector de ELISA con filtro de 450 nm dentro de los siguientes 30 minutos (Elx800 Universal Microplate Reader, Biotek).

2.2.7 Determinación de la expresión de proteína p-ERK 1/2 por Western Blot

Se comenzó preparando el sistema de electroforesis y preparando el gel separador al 10% (Anexo 5.2.6). Luego, se preparó el gel espaciador (Anexo 5.2.7) agregándolo sobre el primero y colocando inmediatamente la peinetas que forma los pocillos. Se prepararon las muestras de proteínas, agregando el volumen de muestra necesario para 48 μ g de proteínas final mas el resto de los reactivos necesarios. Luego,

se instaló el gel en el sistema de electroforesis, llenando la cámara con Buffer de corrida 1X (Anexo 5.2.2). Se cargaron las muestras teniendo cuidado que no salgan del pocillo y se conectó la fuente de poder (Poseer PAC 300) a 90 V por el tiempo necesario. Una vez finalizada la corrida electroforética, se transfirió el gel a la membrana de nitrocelulosa, contenida dentro del sándwich de transferencia, este sándwich fue puesto en el sistema de transferencia, llenándose el recipiente con buffer de transferencia (Anexo 5.2.3) y conectándose a la fuente de poder (Power PAC 200) por 2 horas a 0,03 A. Se sacó la membrana y se secó entre toalla de papel. Luego fue colocada en un recipiente donde se bloqueó con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Luego la membrana se lavó con TBS-T (Anexo 5.2.4) por 10 minutos 3 veces con la cantidad suficiente para cubrirla. Una vez hecho esto, se incubó con 5 ml de solución de primer anticuerpo de p-ERK en buffer de bloqueo en dilución 1:2000 agitando a 4°C toda la noche. A la mañana siguiente, se lavó la membrana con TBS-T por 10 minutos 3 veces y se incubó en 10 ml de solución de segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa de p-ERK en buffer de bloqueo en dilución 1:2000, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación y se volvió a lavar con TBS-T para posteriormente revelar con ECL.

Para estandarizar los resultados que se obtuvieron de este procedimiento, se realizó un Stripping para ERK1/2 totales, el que consiste en colocar la membrana de nitrocelulosa utilizada anteriormente en solución stripping por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación. Luego, en la misma solución por 1 hora en una estufa a 50°C \pm 2° y de nuevo por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación. Se lavó la membrana con TBS-T cada 10 minutos por 3 horas hasta eliminar el olor a β -mercaptoetanol. Una

vez hecho esto, se prosiguió como en la determinación de fosfo-ERK (p-ERK), desde el bloqueo de la membrana. Tanto el primer anticuerpo de ERK total como el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa de ERK total se realizó en dilución de 1:2000 con solución de bloqueo.

2.2.8 Determinación de citotoxicidad

Se preparó el cultivo celular, agregando a la placa las concentraciones de Andrografolido, el Con-A y las células en suspensión y se obtuvieron alícuotas a tiempo 0 horas de incubación, es decir, sin incubar y a tiempo 24 horas de cultivo.

Para visualizar las células al microscopio, se hizo una mezcla tomando alícuotas de 5 μ l de cada una de las muestras contenidas en la placa de cultivo mas 5 μ l de Azul de Tripán y se introdujo en la cámara de Neubauer para contar tanto el número de células vivas como muertas presentes en la muestra a tiempo cero horas de cultivo. Una vez obtenidas todas las alícuotas, la placa se introdujo nuevamente en la estufa a las mismas condiciones señaladas en el punto 2.2.4. A las 24 horas de incubación, se realizó el mismo procedimiento anterior para contar el número de células vivas y muertas correspondiente al tiempo 24 horas. Luego se realizó el cálculo del porcentaje de células vivas y se hicieron los cálculos de corrección para estandarizar los datos.

2.3 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

2.3.1 Medición de concentración de las citoquinas estudiadas

En cada medición de concentración de citoquinas, se realizó una curva de calibración en la misma placa. Por otro lado, el lector de ELISA arrojó valores de Absorbancia, con los que haciendo una extrapolación de ellos en la ecuación de la recta, se obtuvieron los valores de las concentraciones correspondientes. Estos resultados fueron expresados en unidades de concentración del orden de pg/ml.

2.3.2 Expresión de enzima p-ERK 1/2

Para cada uno de estos ensayos se estandarizó con la enzima ERK total sacándose la razón de p-ERK₁/ERK₁ y p-ERK₂/ERK₂.

Ejemplo de Cálculo:

	p-ERK1	ERK1	pERK1/ERK1
Control	0	5261	0
Con-A 3,3 µg/ml	48744	38992	1,250
Con-A + AP 1 µM	2942	21616	0,136
Con-A + AP 5 µM	20270	29975	0,676
Con-A + AP 10 µM	6263	42804	0,146

2.3.3 Determinación de Citotoxicidad

En este tipo de ensayos, se determinó el porcentaje de células vivas presentes en cada muestra para cada concentración a los distintos tiempos. Estos resultados fueron expresados como porcentaje de viabilidad.

Ejemplo de Cálculo:

$$\begin{array}{l} 90 \text{ cél. Total} \longrightarrow 89 \text{ cél. Vivas} \\ 100 \text{ cél.} \longrightarrow X \end{array} \quad X = 98,07\% \text{ células vivas}$$

$$\frac{98,07}{100} \times 100 = 98,07\%$$

Conc. Ap (mM)	células vivas	células muertas	células total	% viabilidad	% viabilidad correg.
1,0	89	1	90	98,07	100
1,5	74	3	77	96,1	98,0

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los gráficos presentados se realizaron en el programa GRAPH PAD PRISM 3.0. Usándose gráficos de barra y de puntos, según visualizara de mejor forma los resultados obtenidos. Cada barra o punto corresponde a la media aritmética de los valores obtenidos \pm el error estándar.

Los datos del análisis de la actividad enzimática fueron obtenidos con el programa Scion Image, para determinar la cantidad de enzima presente en cada banda obtenida.

CAPITULO III
RESULTADOS

3.1 EFECTO DEL ANDROGRAFOLIDO SOBRE LA PRODUCCIÓN *in vitro* DE CITOQUINAS EN CÉLULAS DE GANGLIOS LINFÁTICOS

En la figura **1-A**, se observa que el andrografolido no produjo inhibición en la producción basal de IL-2, cuyos valores tienden a mantenerse alrededor de 1,0 pg/ml de manera independiente a la concentración del andrografolido.

La figura **1-B**, muestra que el andrografolido no inhibió la producción basal de INF- γ , manteniéndose valores de alrededor de los 80 pg/ml.

De la misma manera, en la figura **1-C**, se aprecia que el andrografolido tampoco produjo inhibición de la producción basal de IL-4, en forma independiente de la concentración.

Figura 1

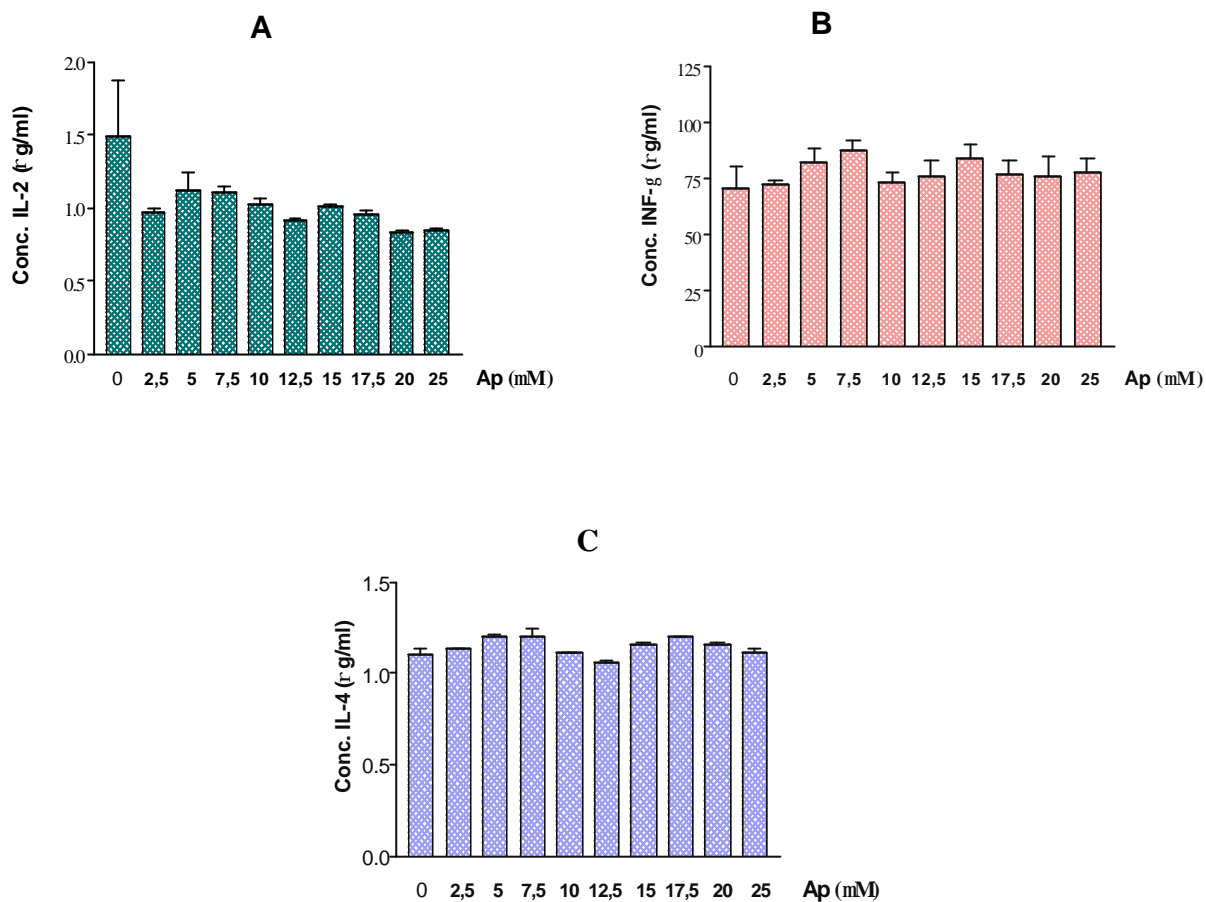


Figura 1: Efecto del andrografolido sobre la producción de citoquinas en células sin estímulo. Cada barra corresponde al promedio aritmético + el error estándar de tres experimentos independientes realizados en triplicado. El andrografolido no produjo inhibición de la producción de basal de ninguna de las citoquinas estudiadas. **A:** IL-2. **B:** INF- γ y **C:** IL-4.

3.2 EFECTO DEL ANDROGRAFOLIDO SOBRE LA PRODUCCIÓN *in vitro* DE CITOQUINAS EN CÉLULAS DE GANGLIOS LINFÁTICOS ESTIMULADAS CON CON-A

En las figuras **2-A** y **2-B**, se observa un notable aumento en la concentración de las citoquinas IL-2 e IFN- γ cuando las células fueron estimuladas con la Con-A. A diferencia de lo que se aprecia en la figura **2-C**, donde la Con-A no produjo estimulación de las células para la producción de IL-4.

Además, en la figura **2-A**, se observa que el andrografolido disminuyó la producción de IL-2 de forma dosis dependiente.

La figura **2-B**, muestra que el andrografolido inhibió la producción de INF- γ más drásticamente que en el caso de IL-2, observándose un brusco descenso a concentración 2,5 μ M del andrografolido para luego tender a estabilizarse desde concentración 12,5 μ M del andrografolido en adelante, con valores cercanos al control sin estímulo.

En la figura **2-C**, se aprecia que el andrografolido no produjo efecto en la producción de IL-4.

Figura 2

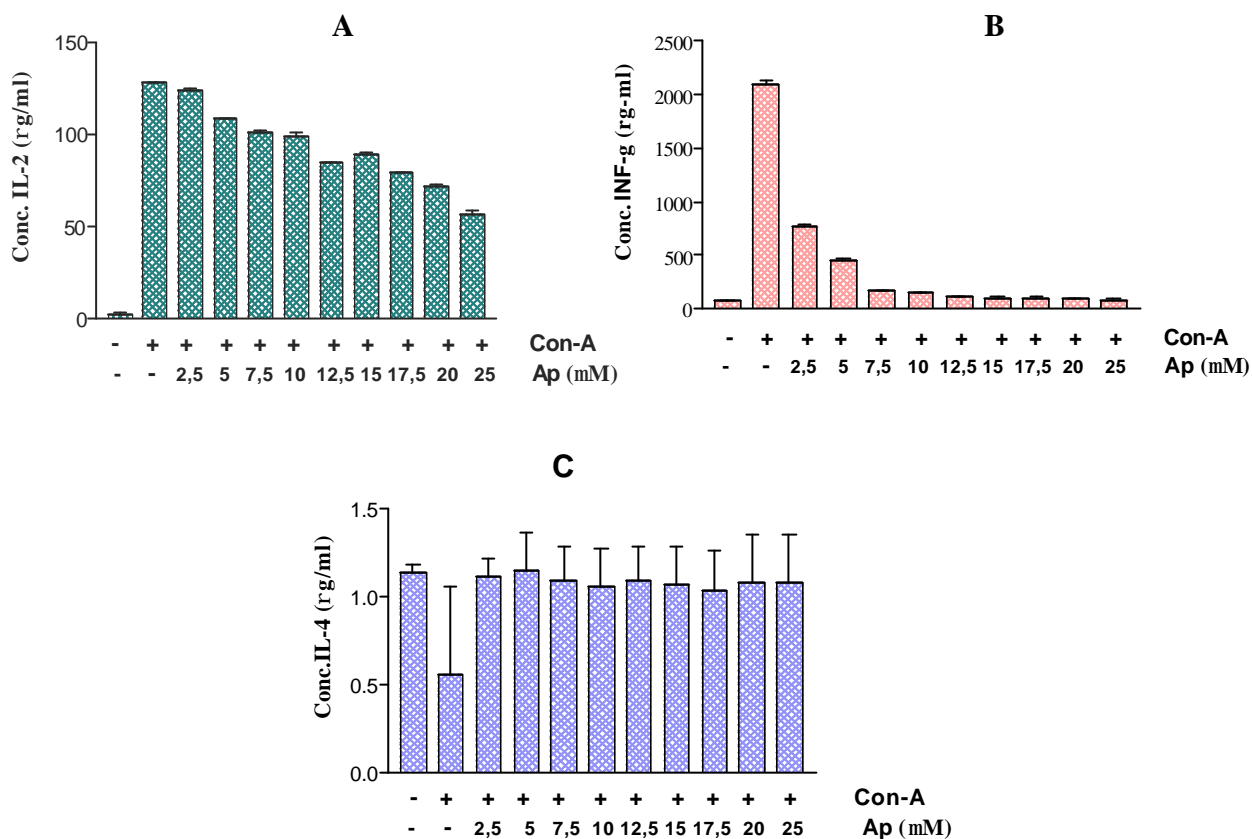


Figura 2: Efecto del andrografolido sobre la liberación de citoquinas en linfocitos T estimulados con Con-A. A: El andrografolido disminuyó la concentración de IL-2 de forma dosis-dependiente. **B,** se observa claramente una disminución producida por el andrografolido en la producción de INF- γ . **C,** tanto el andrografolido como la Con-A no cambian la concentración de IL-4.

3.3 EFECTO DEL ANDROGRAFOLIDO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA p-ERK 1/2

De la figuras **3-A** y **3-B**, se desglosa que Andrografolido produce un efecto de inhibición sobre la actividad de las enzimas ERK1/2.

Además, tanto en el caso de p-ERK1 y p-ERK2 se observa una mayor estimulación de enzima fosforilada cuando las células son estimuladas con

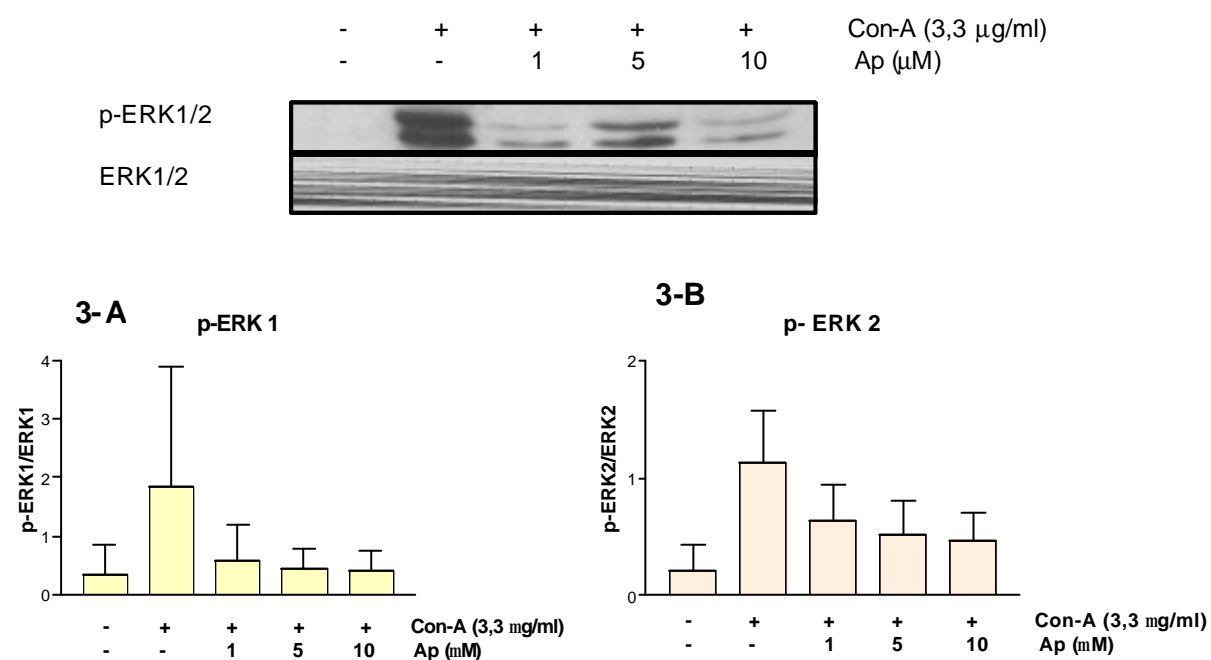


Figura 3: Efecto del andrografolido sobre la actividad de las enzimas p-ERK1/2.

Cada gráfico representa la proporción de enzima pERK1/2 estimulada v/s ERK 1/2 total, analizado según el programa Scion Image.

3.4 EFECTO DEL ANDROGRAFOLIDO SOBRE LA CITOTOXICIDAD DE LOS LINFOCITOS EN PRESENCIA DE CONCANAVALINA-A

En la figura 4, se muestra que el andrografolido disminuyó el porcentaje de células linfáticas vivas a las 24 horas de incubación, y que a partir de la concentración 12,5 μ M en adelante la diferencia de dichos porcentajes es significativa, llegando a reducirse prácticamente la mitad a la concentración mayor del andrografolido.

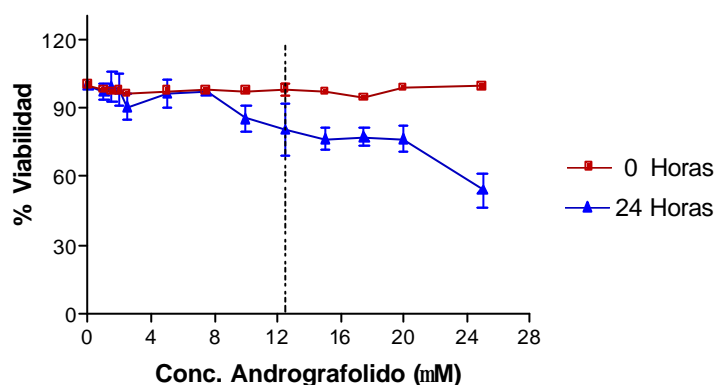


Figura 4: Efecto del andrografolido sobre la viabilidad de las células de ganglios linfáticos en presencia de Concanavalina-A. Se observa el porcentaje de células vivas a tiempo 0 y 24 horas de cultivo, disminuyendo estos porcentajes por efecto del andrografolido a tiempo 24 horas.

CAPITULO IV
DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN

El estudio realizado permitió demostrar que el principio activo andrografolido, no produjo inhibición de la producción basal de las citoquinas analizadas (figuras **1-A**, **1-B** y **1-C**), esto puede explicarse considerando que las células, al no ser estimuladas con un antígeno, no generan los mecanismos necesarios para iniciar una respuesta inmune, es decir, no hay producción de citoquinas y, por lo tanto, el andrografolido no produjo efecto a pesar de la concentración aplicada. Lo que es consistente con los estudios de Rajagopal, puesto que en sus resultados obtuvieron que el andrografolido, *per se*, no causa ningún cambio significativo en la inducción o proliferación sobre las células que estudiaron. Tal situación cambió radicalmente en las células que fueron incubadas con con-A (Figura **2-A**, **B** y **C**), donde el andrografolido presentó la capacidad de disminuir la concentración de las citoquinas producidas por las células T_H1 estudiadas (IL-2 e IFN- γ) en forma dependiente de la concentración; lo que no es observado en el caso de IL-4 producida por las células T_H2 , puesto que el andrografolido no provocó efecto sobre esta citoquina. Estos resultados se contraponen a lo señalado en otros reportes (Rajagopal *et al*, 2003), donde se señala que el andrografolido posee un efecto estimulante sobre el sistema inmunológico al aumentar la proliferación de los linfocitos y la producción de IL-2.

En las figuras **2-A** y **2-B**, se observa que los niveles de concentración de las citoquinas IL-2 e IFN- γ , respectivamente, aumentaron en forma considerable cuando las células fueron estimuladas con con-A. Esto puede explicarse, ya que al ser Con-A un mitógeno que *in vitro* estimula a los linfocitos en forma bastante fidedigna a la

producida por los antígenos específicos (Roitt *et al*, 1997), causa una serie de respuestas funcionales, las que conducen a la activación de factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que codifican citoquinas, receptores de citoquinas y otras proteínas necesarias para la función efectora de las células T (Abbas *et al*, 1998), promoviendo la proliferación de las células T al menos en parte hacia la producción de IFN y la expresión del receptor de IL-2 (Peakman y Vergani, 1997). Por otro lado, el hecho que IFN- γ haya aumentado mucho más el nivel de concentración que IL-2, puede explicarse porque IFN- γ modula la respuesta de la célula T ejerciendo un efecto directo sobre dicha célula, por ejemplo, células T periféricas humanas, incubadas *in vitro* con IFN- γ , expresan más receptores celulares para IL-2 (Peakman y Vergani, 1997), por lo que habría más IFN en forma libre para su detección.

En la figura **2-C**, se muestra que Con-A no causó efecto sobre las células y la producción de IL-4, cuyos niveles de concentración permanecieron alrededor del mismo valor, lo que podría ser explicado por el tipo de cepa de ratones utilizada.

Como es conocido, la señal de transducción del TCR es mediada por múltiples tirosinas kinasas (Shan *et al*, 2001). Entre las MAP kinasas ligadas a la expresión de genes de citoquinas se encuentra la kinasa ERK1/2 (Carter y Hunninghake, 2000).

Para clarificar el mecanismo de acción del efecto inmunosupresor del andrografolido, se consideraron los datos aportados sobre los mecanismos conocidos de modulación diferencial de la producción de citoquinas: afectar la vía de señales dependiente del aumento de la concentración de Ca^{2+} en la célula T (Liu *et al*, 1992), específicamente inhibir la Calcineurina y por otro lado interrumpir la cascada de señales de las MAP quinasas MEK/ERK, inhibiendo la fosforilación de las enzimas ERK1/2

(Dumont *et al*, 1998). Siguiendo el mismo razonamiento, en la figura **3-A** y **3-B**, se observa que el andrografolido redujo la fosforilación de las enzimas quinasas ERK1/2, inhibiendo la respuesta proliferativa de las células T, resultante, por ejemplo, de una inhibición de la producción de IL-2 más que de una menor respuesta de la célula T a IL-2 (Dumont *et al*, 1998). Este dato también concuerda con los resultados obtenidos por Tsai, quien demostró que el andrografolido bloquea específicamente las enzimas ERK1/2 estimulada por C5a (quien puede activar la cascada MAPK para mediar la migración celular) y río arriba la cascada MEK1/2, lo que sugiere que el andrografolido actúa bloqueando esta vía para suprimir el reclutamiento celular. Los resultados obtenidos también concuerdan con los trabajos de Whitehurst y Geppert, donde se concluye que la vía de transducción de señales MAP quinasa consistente de Raf-1, MEK1 y ERK1/2 actúan en la estimulación del gen de transcripción de IL-2 en el linfocito T activado.

En relación a la muerte celular, señalado en la figura **4**, el andrografolido no produjo mayor diferencia en el porcentaje de viabilidad de los linfocitos a tiempo 0 de cultivo, independiente de la concentración aplicada, a diferencia de lo que sucedió a tiempo 24 horas, donde el andrografolido llegó a reducir el número de células vivas prácticamente a la mitad de los valores obtenidos a tiempo 0. Esta disminución por parte del andrografolido en el porcentaje de células vivas se hace más evidente desde la concentración 12,5 μM en adelante. De hecho, se reporta que el andrografolido posee actividad citotóxica sobre diferentes tipos de células y que los diterpenoides aislados de *Andrographis paniculata* también tendrían esta propiedad y, por lo tanto, un probable uso terapéutico estaría dado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Singh *et*

et al, 1999), mediante la inhibición del crecimiento de las células por modulación directa o indirecta de las moléculas reguladoras del ciclo celular, perturbando las diferentes cascadas de señales celulares (Ragagopal *et al*, 2003).

A partir de este dato cabe mencionar que en las figuras **2-A y 2-B**, el efecto del andrografolido sobre la concentración de IL-2 desde la concentración 12,5 μ M fue dependiente del número de células vivas, pero su efecto sobre la concentración de IFN- γ fue de manera independiente de la viabilidad de las células.

La estructura del andrografolido corresponde a un labdano diterpeno bicíclico obtenido de *Andrographis paniculata* (Ajaya *et al*, 2004), grupo al cual pertenecen una serie de compuestos, de los cuales no existen reportes de producir una disminución de la respuesta inmune. Por otro lado, también existe una serie de compuestos sintetizados a partir del andrografolido por medio de degradación oxidativa de su cadena lateral, pero que han sido estudiados en otro ámbito (Nanduri *et al*, 2004). Por lo tanto, no existen evidencias concretas que indiquen un efecto similar al obtenido en este estudio, no obstante, moléculas estructuralmente similares (pertenecientes al mismo grupo químico) son potenciales inmunosupresores al tener similares acciones, o bien, puede sospecharse un efecto inmunosupresor por resultar clínicamente benéficos en el tratamiento de la diabetes, enfermedades autoinmunes o por disminuir la expresión de proteínas, al igual que el andrografolido.

Existen algunos compuestos que actúan de manera similar al andrografolido, es decir, inhibiendo proteínas quinasas, entre estos se encuentran un inhibidor del factor de crecimiento epidermal (EGF), receptor de tirosina quinasa. Estos inhibidores pueden

tener potencial efecto terapéutico como agentes anticancerígenos, antiinflamatorios o como inmunosupresores (Alessi *et al*, 1995).

4.2 CONCLUSIÓN

Según los objetivos planteados para este trabajo de tesis se concluye lo siguiente:

- El andrografolido es un compuesto que a concentraciones entre 1-10 μM es capaz de provocar una disminución de la respuesta inmunológica en ratones.
- El andrografolido a concentraciones entre 1–10 μM , produce una marcada disminución de la producción de las citoquinas producidas por las células del tipo T_H1 : IL-2 e IFN- γ , que actúan en la etapa efectora de la respuesta inmune celular.
- El andrografolido no disminuye la producción de la citoquina producida por las células T_H2 : IL-4, encargada de co-activar a las células B y de esa manera ayudar a la generación de la respuesta inmune humoral.
- El mecanismo por el cual el andrografolido estaría produciendo su efecto inmunosupresor, sería a través de la interrupción de la cascada de señales de las MAP quinasas, impidiendo la fosforilación de la enzima ERK-1 y ERK-2, produciendo de este modo una disminución en la cantidad de citoquina producida por la célula T estimulada.
- El andrografolido a concentraciones entre 12,5–25 μM presenta un efecto citotóxico sobre los linfocitos, lo que indica que a esas concentraciones no produce un efecto inmunosupresor propiamente tal.

4.3 PROYECCIÓN DEL TRABAJO

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el andrografolido, sería un compuesto útil en tratamientos de enfermedades autoinmunes, y para disminuir el rechazo a órganos transplantados, representando una alternativa de origen natural y a un bajo costo a los tratamientos existentes.

CAPITULO V
BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. (1998) *Immunología celular y molecular*. 3ª. Ed. M^o Graw Hill.
- Ajaya, R., Sridevi, K., Kumar, V., Nanduri, S. and Rajagopal, S. (2004) Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J. Ethnopharmacol.*, 92, 291-295.
- Alessi, D., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. and Saltiel, A. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 270, 27489-27494.
- Carter, A. and Hunninghake, W. (2000) A constitutive active MEK-ERK pathway negatively regulates NF- κ B-dependent gene expression by modulating TATA-binding protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 275, 27858-27864.
- Coles, E. H. (1986) *Veterinary clinical pathology*. 4ª. Ed. W. B. Saunders Company.
- Cunard, R., Eto, Y., Muljadi, J., Glass, C., Kelly, C. and Ricote, M. (2004) Represión of IFN- γ expresión by peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Immunol.*, 172, 7530-7536.
- Cunard, R., Ricote, M., DiCampli, D., Archer, D., Kahn, D., Glass, C. and Kelly, C. (2002) Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J. Immunol.*, 168, 2795-2802.
- Diasio, R. B., LoBuglio, A. F. (1996) *Inmunomoduladores: Farmacos inmunosupresores e inmunomoduladores. Las bases Farmacológicas de la terapeutica*. 9ª. Ed. M^o Graw Hill.

- Dumont, F., Starush, M., Fischer, P., DaSilva, C. and Camacho, R. (1998) Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP Kinase or Calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J. Immunol.*,160, 2579-2589.
- Franlin, R., Tordai, A., Patel, H., Gardner, A., johnson, G., and gelfand, E. (1994) Ligationof the T cell receptor complex results in activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 93, 2134-2140.
- Liu, J., Albers, M., Wandless, T., Luan, S., Alberg, D., belshaw, P., Cohen, P., MacKintosh, C., Klee, C., and Schreiber, S. (1992) Inhibition of Cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochem.*,31, 3896-3901.
- Nanduri, S., Nyavanandi, V., Thunuguntla, S., Velisoju, M., Kasu, S., Rajagopal, S., Kumar, R., Rajagopalan, R. and Iqbal, J. (2004) Novel routes for the generation of structurally diverse labdane diterpenes from Andrographolide. *Tetrahedron Lett.*, 45, 4883-4886.
- Peakman, M., and Vergani, D. (1997) Basic and Clinical immunology. 6^a. Ed. Lance.
- Rajagopal, S., Kumar, R. Deevi, S., Satyanarayana, C. and Rajagopalan, R. (2003) Andrographolide, a potential cancer therapeutic isolated from *Andrographis paniculata*. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 3, 147-158.
- Roitt, K., Brostoff, J., y Male, D. (1997) Immunología. 4^a. Ed. Harcourt Brace de España.

- Shan, X., Balakir, R., Criado, G., Wood, J., Seminario, M., Madrenas, J. And Wange, R. (2001) Zap-70-independent Ca^{2+} mobilization and ERK activation in jurkat T cells in response to T-cell antigen receptor ligation. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 7137-7149.
- Singh, M., Pal, M., and Sharma, R. (1999) Biological activity of labdane diterpenes. *Planta Med.*, 65, 2-8.
- Tizard, I. (1982) An introduction to veterinary immunology. 2^a. Ed. W. B. Saunders Company. 6.
- Tsai, H., Yang, L., Tsai, W., and Chiou, W. (2004) Andrographolide acts through inhibition of ERK1/2 and Akt phosphorylation to suppress chemotactic migration . *Eur. J. Pharmacol.*, 498, 45-52.
- Wang, T., Liu, B., Zhang, W. and Hong, J. (2003) Andrographolide reduces inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuronglia cultures by inhibing microglial activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,308, 975-983.
- Whitehurst, C., and Geppert, T. (1996) MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J. Immunol.*, 156, 1020-1029.

CAPITULO VI

ANEXOS

5.1 SOLUCIONES USADAS EN EL TEST DE ELISA

5.1.1 Medio Completo RPMI 1640

Para 1000 ml.:

- Piruvato de Sodio 100 X estéril..... 1 ml.
- Pen-Strep 100 X estéril..... 1 ml.
- Anfotericina B 100 X..... 1 ml.
- 2-mercaptoetanol 100 X..... 1 ml.
- Suero Bovino Fetal (SBF)..... 10 ml.
- RPMI 1640 incompleto estéril..... 86 ml.

Almacenar a 4°C hasta seis semanas después de su preparación.

5.1.2 Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,0

Para 1000 ml.:

- NaCl..... 80,0 g.
- Na₂HPO₄..... 11,6 g.
- KH₂PO₄..... 2,0 g.
- KCl..... 2,0 g.
- H₂O c.s.p..... 1000 ml.

Ajustar a pH 7,0 con NaOH 5 M o HCl 2 N. Guardar a 4°C.

Esta solución debe usarse dentro de tres días después de preparada.

5.1.2 Buffer Carbonato

5.1.3 Para 1000 ml.:

- NaHCO_3 8,40 g.
- Na_2CO_3 3,56 g.
- H_2O c.s.p..... 1000 ml.

5.1.4 Solución Bloqueo

Para 100 ml.:

- Leche Descremada 5%..... 5,0 g.
- PBS 10 X..... 10,0 ml.
- H_2O c.s.p..... 100 ml.

5.1.5 Solución Lavado

Para 1000 ml.:

- Tween 20 0,05%..... 0,5 ml.
- PBS 10 X..... 100,0 ml.
- H_2O c.s.p..... 1000 ml.

5.1.6 Solución Reveladora

5.1.7 Para 100 ml.:

- TMB 0,4 g/L..... 50 ml.
- H_2O_2 0,02%..... 50 ml.

Preparar en el momento de usar. El Kit de solución Reveladora es estable por in año a 4°C. Es altamente inestable a la luz.

5.1.8 Buffer Fosfato Citrato (BFC) pH 5,0

A.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 M)..... 3,56 g.
- H_2O c.s.p..... 100 ml.

B.

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (0,1 M)..... 2,1 g.
- H_2O c.s.p..... 100 ml.

Se toma 50 ml de cada solución, se mide el pH y se ajusta con la solución A. o B.

Según sea el caso.

Guardar a 4°C por separado.

5.1.9 Sustrato

- Ortofenildiamina (OPD)..... 2,0 mg.
- BFC..... 5,0 ml.
- H_2O_2 30 vol..... 6,0 μl
- (H_2O_2 10 vol..... 18,0 μl)

Se debe preparar al momento de ser usada.

5.2 SOLUCIONES USADAS EN WESTERN BLOT

5.2.1 Buffer de Extracción de Proteínas Totales (Buffer Lisis)

Para 5 ml.:

- Tris HCl 0,5 M; pH 7,4..... 500 μ l
- EDTA 0,5 M; 1 mM..... 10 μ l
- EGTA 0,5 M; 10 mM..... 100 μ l
- Inhibidor de Proteínas (10 mg/ml 10 μ g/ml)... 25 μ l
- NaF 0,5 M; 25 mM..... 250 μ l
- NaVO₄ 0,2 M; 2 mM..... 50 μ l
- PMSF 100 mM; 0,1 mM..... 5 μ l
- DTT 100 mM; 25 mM..... 1250 μ l
- Tritón X – 100 10%; 1,5%..... 750 μ l
- H₂O..... 2060 μ l

5.2.2 Buffer Corrida 5X

- Tris base..... 15,1 g.
- Glicina..... 94,0 g.
- SDS..... 5,0 g.
- H₂O c.s.p..... 1000 ml.

Diluir a 1X para trabajar

5.2.3 Buffer Transferencia pH 8,5

Para 1000 ml.:

- Tris base 25 mM..... 3,00 g.
- Glicina 0,2 M..... 15,14 g.
- Metanol 20%..... 200 µl
- H₂O c.s.p..... 1000 ml.

Ajustar a pH 8,5 con NaOH 5 M o HCl 2 N.

5.2.4 TBS – T 10X pH 7,6

Para 500 ml.:

- Tris base..... 24,2 g.
- NaCl..... 80,0 g.
- H₂O c.s.p..... 500 ml.

Diluir a 1X para trabajar

5.2.5 TBS 1X– Tween pH 7,4

Para 500 ml.:

- TBS 10X..... 50,0 ml.
- Tween 20 0,1%..... 0,5 ml.
- H₂O c.s.p..... 500 ml.

5.2.6 Gel Separador 10%

Para 18 ml

- Acril-Bis 30:0,8%..... 9,0 ml
- Tris HCl 1,5 – 0,4% SDS (pH 8,8)..... 4,5 ml
- Persulfato 1%..... 540 μ l
- TEMED..... 18,0 μ l
- H₂O..... 3,942 ml

El persulfato debe ser agregado en penúltimo lugar y el TEMED debe ser el último.

5.2.7 Gel Espaciador

Para 4 ml:

- Acril-Bis 30:0,8%..... 520 μ l
- Tris HCl 0,5 M – 0,4% SDS (pH 6,8)..... 1,0 ml
- Persulfato 1%..... 400 μ l
- TEMED..... 4,0 μ l
- H₂O..... 2,08 ml

El persulfato debe ser agregado en penúltimo lugar y el TEMED debe ser el último.