

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Efecto Inmunomodulador de Argemonina y Berberina en
Macrófagos Murinos

The seal of the University of Sonora is a circular emblem. It features a central shield with a lamp of knowledge on the left and an open book on the right. Above the shield are two owl heads. The shield is set against a background of a zigzag pattern. The entire seal is surrounded by a circular border containing the text 'UNIVERSIDAD DE SONORA' and the year '1942' at the bottom. A banner across the shield reads 'TODO LO ILLUMINAN'.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

1942

Daniela Soto Coronado

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Daniela Soto Coronado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Jael Teresa de Jesús Quintero Vargas

Presidente

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz

Secretario

Dra. Lilian Karem Flores Mendoza

Vocal

Dr. Joel Arias Martínez

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis Dra. Jael Quintero, por poner en este trabajo tanto tiempo y esfuerzo, por enseñarme que en la vida se debe tener paciencia y persistencia para poder ver los frutos del trabajo, por ayudarme a comprender que hay situaciones que no podemos controlar y que se presentan día con día; por darme lecciones no solo de laboratorio, sino de vida y mostrarme la importancia de la gratitud. Lo hicimos profe. Gracias por convertir este árbol en hojas, ojalá que algún día llegue a ser un buen libro.

A todos los doctores y profesores que me brindaron su tiempo, al doctor Juan Carlos Gálvez Ruíz por su apoyo durante la realización de este trabajo, al maestro Mario Leyva por brindarme los conocimientos básicos, que me ayudaron a crecer; al Dr. Roberto Rodríguez y al Dr. Luis Fernando Lares, recibirme dentro de sus laboratorios. A la Dra. Lilian Flores por ayudarme a culminar con mis experimentos.

A mi novio Juan Carlos, muchas gracias por soportar mis depresiones de los lunes, donde pensaba que ya no podía más por no ver un avance real; por tenerme más fé de la que yo me tuve en este proceso y por darme los ánimos que necesitaba para poder terminar todo.

A mis maestros de licenciatura, por darme los conocimientos básicos y enseñarme a amar mi carrera.

DEDICATORIAS

A mis padres, gracias a sus enseñanzas y a su guía soy lo que soy, todos mis triunfos son por y para ustedes, porque al final del día las personas son un reflejo de los valores inculcados en casa, yo no podría brillar jamás si ustedes no me hubieran brindado tanta luz. Los amo.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	12
General	12
Particulares	12
ANTECEDENTES	13
Alcaloides	13
Berberina y Argemonina	14
Actividades Biológicas Dirigidas por los Alcaloides	15
Generalidades del Sistema Inmunológico	17
Respuesta Inmune Innata y Respuesta Inmune Adaptativa	17
METODOLOGÍA	21
Cultivo celular	21
Bioensayos	21
Ensayo de Citotoxicidad	21
Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA)	22
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	22
Extracción de ARN Total	22
Formación de ADN Complementario	23
Reacción de PCR en Termociclador	23
Electroforesis en Gel de Agarosa	24
Citometría de Flujo	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Citotoxicidad Celular	26
Determinación de Citocinas Proinflamatorias	28
Producción de ARNm de Citocinas Proinflamatorias	30
Expresión del Complejo Principal de Histocompatibilidad II	33
CONCLUSIONES	36

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	40

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales citocinas proinflamatorias secretadas por el macrófago	20
2	Secuencia de cebadores de cadenas sentido y antisentido de citocinas proinflamatorias	24
3	Concentración de ARN a partir de células RAW 264.7 estimuladas con berberina y argemonina	31
4	Pesos correspondientes a citocinas proinflamatorias en pares de bases	33
5	Análisis de la expresión de las moléculas de CPH clase II en células RAW 264.7	34

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de un alcaloide (Nicotina)	13
2	Estructura química de berberina	14
3	Estructura química de argemonina	15
4	Espectro de actividades biológicas de los alcaloides en el organismo	16
5	Modelo de presentación de antígeno	18
6	Funciones del macrófago	19
7	Efecto citotóxico de argemonina y berberina en macrófagos RAW 264.7	27
8	Macrófagos RAW 264.7 expuestos a argemonina y berberina	28
9	Secreción de TNF- α en macrófagos RAW 264.7 por exposición a berberina y argemonina	29
10	Evaluación de la secreción de TNF- α en presencia de argemonina y berberina a 6.25 μ g/mL	30
11	Integridad de ARN por electroforesis de agarosa (0.8%)	31
12	Evaluación de ADN amplificado de citocinas proinflamatorias en macrófagos RAW 264.7	32

RESUMEN

Los alcaloides son metabolitos secundarios presentes en las plantas y son gran interés en el área de la salud debido al amplio espectro de actividades biológicas que los caracterizan. Dos alcaloides que presentan gran interés son argemonina y berberina, debido a las propiedades que poseen; berberina es un alcaloide distribuido en el reino vegetal, principalmente en especies de plantas correspondientes al género *Berberis*, al cual se le atribuyen efectos hipoglucemiantes, hipolipidémicos y antimicrobianos. En algunas plantas pertenecientes al género *Argemone* se puede encontrar el alcaloide argemonina, que ha demostrado presentar citotoxicidad hacia líneas cancerígenas. El sistema inmune, encargado de mantener la integridad del organismo frente a amenazas exteriores, está compuesto de una extensa variedad células y moléculas, cuyas funciones pueden ser modificadas por acción de los alcaloides. Con la finalidad de determinar el efecto inmunomodulador de berberina y argemonina, se expuso a macrófagos murinos pertenecientes a la línea celular RAW 264.7 a diferentes concentraciones de estos alcaloides, para evaluar la secreción de citocinas y la expresión del complejo principal de histocompatibilidad II (CPH II). Se encontró que concentraciones mayores a 12.5 µg/mL de ambos alcaloides afectan la viabilidad de las células RAW 264.7; en el intervalo de 3.125 a 6.25 µg/mL se detectó una elevación en la secreción de la citocina proinflamatoria TNF- α y un aumento en la expresión del CPH II, aunado a la expresión de ARNm correspondiente al panel de citocinas inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-12, INF- α , INF- γ y TNF- α , resultados que indican un efecto proinflamatorio para argemonina y berberina. Serán necesarios otros estudios para dilucidar los mecanismos que intervienen en la regulación de las células del sistema inmunológico por parte de estos dos alcaloides.

INTRODUCCIÓN

Los alcaloides son metabolitos secundarios producidos principalmente por las plantas; su estructura química es muy variada, pero comparten características en común, como su procedencia de aminoácidos, carácter básico, un nitrógeno intracíclico y que son generalmente incoloros y poco solubles en agua. (Geoffrey, 2009).

Se ha reportado que los alcaloides poseen un amplio espectro de actividades biológicas como: estimulantes o relajantes del sistema nervioso, reguladores de la presión sanguínea o como psicotrópicos; y actúan de manera dependiente a la dosis, y de su estructura química (Xu y col., 2010; Hesse, 2002). Algunos alcaloides ejercen un efecto inmunomodulador; pueden inducir una estimulación (inmunoestimulantes) o represión de (inmunosupresores) del sistema inmunológico (Jantan y col., 2015).

La respuesta inmune es orquestada por una gran variedad de células y moléculas, que al actuar de manera conjunta logran proteger al organismo. De acuerdo a los mecanismos activados, la respuesta inmunológica puede clasificarse como innata y adaptativa (Delves y col., 2000), en ambas participan una gran cantidad de estirpes celulares, siendo de gran interés los macrófagos, células fagocíticas que intervienen en ambos tipos de respuesta inmune. Los macrófagos son células pertenecientes a la progenie leucocitaria y efectúan diversas funciones indispensables para el efectivo desarrollo de los mecanismos protectores del organismo (Lavin y col., 2015). Entre ellas se encuentra la fagocitosis de microorganismos, su degradación por medio de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y enzimas proteolíticas, la presentación de los péptidos resultantes a los linfocitos y la secreción de citocinas que se encargan de dirigir los pasos posteriores para la eliminación de la amenaza (Roit y col., 2006). Estas funciones pueden ser modificadas debido a la exposición a algunos compuestos naturales, con la finalidad de reforzarlas y hacerlas más eficaces.

Se han descrito una gran cantidad de productos de origen natural con diversas actividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Schmidt y col., 2008). Las plantas presentan una vasta variedad de compuestos químicos con una amplia función biológica, importante para el funcionamiento adecuado del metabolismo o desarrollo de la misma (Huang y col., 2008).

Argemone gracilenta es una planta endémica del estado de Sonora, y crece con facilidad en las regiones semidesérticas con clima seco, dentro de los principales metabolitos secundarios que genera encontramos a argemonina y berberina, que en conjunto representan más del 90% de los alcaloides producidos por esta planta (Leyva y col., 2015). Berberina es un alcaloide presente en un gran número de especies de plantas. Se ha reportado su consumo

humano para disminuir altos niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, entre otras propiedades (Guaman y col. 2012). La distribución de argemonina, se encuentra restringida en un menor número de especies; sus propiedades conocidas se limitan a la acción antiproliferativa sobre líneas de células cancerígenas, haciendo falta un estudio de más amplio para este alcaloide (Leyva y col., 2015).

Por lo anterior, resulta de especial importancia realizar la caracterización inmunológica de argemonina y berberina, la cual proporcionaría una perspectiva sobre los efectos que conlleva su consumo en cuanto a la función del sistema inmune.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto inmunomodulador de argemonina y berberina en macrófagos murinos RAW 264.7.

Particulares

- Evaluar la inducción de secreción de TNF- α en macrófagos murinos RAW 264.7 por acción de argemonina y berberina.
- Evaluar la expresión de ARN mensajero de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, INF- α , INF- γ y TNF- α en macrófagos murinos RAW 264.7 en presencia de argemonina y berberina
- Analizar el cambio de expresión de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase II (CPH II) en macrófagos murinos RAW 264.7 por efecto de la exposición a argemonina y berberina.

ANTECEDENTES

Alcaloides

El término alcaloide hace referencia a un grupo de compuestos que poseen propiedades alcalinas. Su diversidad estructural y el gran espectro de actividad biológica los convierten, junto con los antibióticos, en los dos grupos más importantes de interés terapéutico en cuanto a sustancias naturales (Saxena, 2007).

Los alcaloides son compuestos orgánicos que poseen en su estructura un nitrógeno intracíclico y carácter básico (Figura 1). Éstos provienen del metabolismo de los aminoácidos, principalmente por parte de las plantas y su uso en diferentes campos de la medicina ha sido de gran utilidad por la gran variedad de efectos que tienen sobre el organismo, como hipoglucémicos, hipotensivos, hipolipidémicos, antimicrobianos, entre otros (Aniszewski 2015; Geoffrey, 2009).

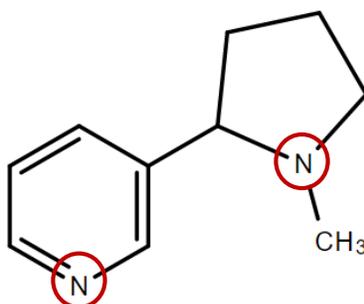


Figura 1. Estructura química de un alcaloide (Nicotina).

Su distribución en la naturaleza, más allá del reino vegetal, abarca en menor proporción a los insectos, vertebrados, animales marinos, microorganismos y hongos. Cumplen diversas funciones en los organismos productores, como regulación del crecimiento, almacenamiento y transporte de nitrógeno, y actúan como mecanismo de defensa por su carácter tóxico (Haroon y Pervaiz, 2016; Santana y col., 2016; Schmidt y col. 2008; Xu y col., 2010).

Berberina y Argemonina

Berberina es un alcaloide de color amarillo, sólido, inodoro y con un sabor amargo; está presente en el reino vegetal, principalmente en las especies del género *Berberis*. Se encuentra distribuido a lo largo de toda la planta, mostrando su mayor concentración en la raíz; su principal función es otorgarle cierto grado de toxicidad al organismo, ideal para la defensa contra insectos y herbívoros. El extracto acuoso de la raíz posee una amplia gama de actividades biológicas que desde la antigüedad han sido utilizadas contra diferentes patologías, como lo son artritis, fiebre, osteoporosis, enfermedades al hígado, infecciones respiratorias, entre otras (Guaman y col., 2012; Pang y col., 2015).

En la actualidad, se han realizado una gran cantidad de estudios sobre este alcaloide, dilucidando así, sus propiedades antibacterianas, antiparasitarias y antifúngicas. En organismos cuenta con la capacidad de bajar la presión arterial y los niveles de glucosa y de lípidos, tales como el colesterol y triglicéridos en sangre (Pang y col., 2015).

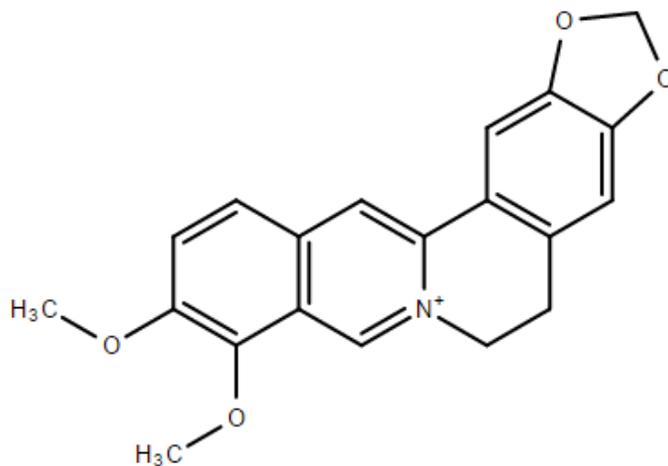


Figura 2. Estructura química de berberina.

Argemonina es un alcaloide de color amarillo, sólido e inodoro, contenido de manera general en las plantas del género *Argemone*. En la actualidad su uso radica como parte de insecticidas utilizados en los cultivos, a pesar de esto, la información que se tiene sobre las

actividades biológicas que presenta es escasa, como su capacidad antiproliferativa en distintas líneas celulares cancerígenas (Leyva y col., 2015).

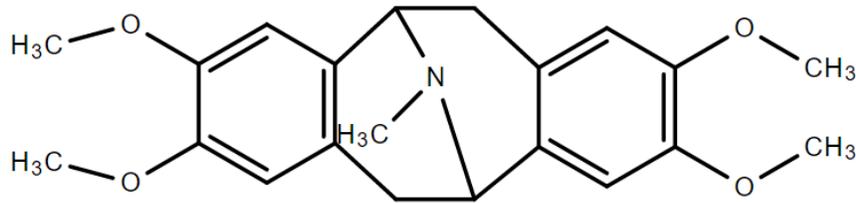


Figura 3. Estructura química de argemonina.

Actividades Biológicas Dirigidas por los Alcaloides

Existe una gran diversidad entre las estructuras moleculares de los alcaloides, misma que interviene de manera directa en el efecto que puedan tener sobre un organismo (Huang y col. 2008). Se ha descrito que estimulan la apertura o cierre de los canales iónicos presentes en las membranas celulares (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), inhiben o activan diferentes grupos de enzimas, interactúan con el ADN regulando la expresión de proteínas, estimulan receptores específicos en las membranas celulares o se unen a microtúbulos celulares; estas alteraciones desencadenan una modificación en el metabolismo y función de las células (Alves de Almeida y col., 2017; Guaman y col., 2012; Kingston, 2009; Sun y col., 2016; Yu y col., 2016).

La exposición a los alcaloides puede ocasionar cierto grado de toxicidad en los organismos, la dosis máxima que no conlleva a un efecto adverso depende de la estructura química, la pureza y la forma de ser metabolizados (Aniszewski, 2015; Nascimento y col., 2015). Los alcaloides tienen la capacidad de interactuar con diferentes órganos y sistemas en un organismo, alterando de esta forma su funcionalidad (Figura 4). Su acción puede ser generalizada, actuando en todo el organismo, o localizada, restringido a un sistema en particular.

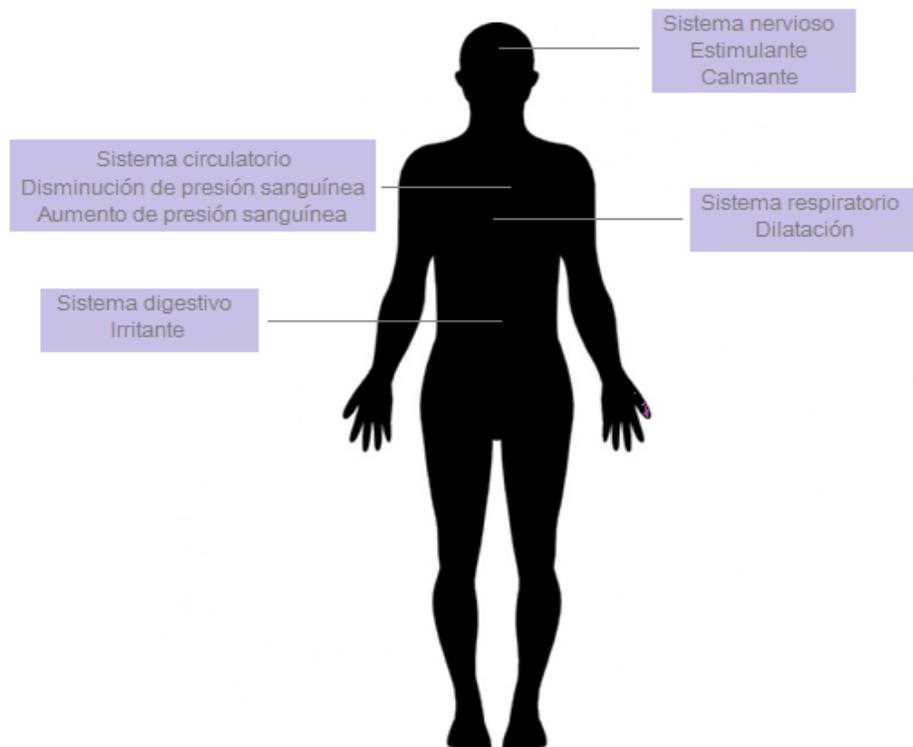


Figura 4. Espectro de actividades biológicas de los alcaloides en el organismo.

Modificado de: http://www.freepik.es/iconos-gratis/de-pie-silueta-del-cuerpo-humano_738395.htm

La mayoría de las actividades biológicas que presentan los alcaloides pueden ser empleadas en el campo de la medicina; por ejemplo, la leurocrestina es un agente antimitótico con potencial para ser empleado como tratamiento en neoplasias (Kingston, 2009). A su vez, berberina se utiliza para combatir infecciones intestinales, ya que evita la liberación de toxinas bacterianas y su adhesión al epitelio (Han y Huang, 2011).

Al igual que todos los sistemas del organismo, el sistema inmunológico no se encuentra exento de los efectos causados por los alcaloides, estos pueden aumentar la activación de las células (inmunoestimuladores) o deprimirla (inmunodepresores). Ambos efectos pueden ser empleados en el ámbito terapéutico en individuos que manifiestan alteraciones en las funciones de dicho sistema (Jantan y col., 2015).

Estudios realizados con anterioridad, han caracterizado la actividad de los alcaloides en el sistema inmune, observando que aquellos contenidos en las bebidas energizantes inducían un efecto inmunosupresor en atletas que los consumían con regularidad (Senchina y col, 2014). La evaluación del alcaloide tetradina como inmunomodulador en personas que padecían enfermedades autoinmunes lo caracterizó como una potencial alternativa terapéutica para este tipo de desórdenes inmunológicos (Jenn-Haung, 2002). Se han descrito algunos alcaloides,

curcumina, resvetrol y quercetina, con un efecto inhibitorio en moléculas de señalización (factor de transcripción NF- κ B) involucradas en la activación celular (linfocitos T) (Jantan y col., 2015). Los efectos inmunosupresores de los alcaloides ocasionan que el organismo se vuelva más propenso a la infección por agentes patógenos como bacterias, virus, hongos y parásitos, dada la función del sistema en el que están actuando. Sin embargo, pueden ser utilizados para disminuir los signos y síntomas de los individuos que padecen enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Jantan 2015 y col.; Jenn-Haung 2002).

Dentro del sistema inmunológico existen muchos elementos que pueden ser blancos potenciales de los efectos presentados por los alcaloides, ya que su conformación engloba una amplia variedad celular y molecular, que al interactuar entre sí, desempeñan la función de protección en el organismo.

Generalidades del Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico se constituye en una organización de moléculas y células que desempeñan funciones específicas e interactúan de manera conjunta con la función de proteger al organismo contra los agentes patógenos que se encuentran presentes en el medio ambiente, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, entre otros. Existen dos tipos de respuesta inmune frente a los microorganismos: la innata y la adaptativa, las cuales se diferencian entre sí por el tipo de células que participan, el tiempo de reacción, mecanismos efectores y especificidad frente a los agentes patógenos (Abbas y col., 2012; Delves y col., 2000; Harton y col., 2016; Kersh y col., 2016; Singh, 2008).

Respuesta Inmune Innata y Respuesta Inmune Adaptativa

La primera línea de defensa en el organismo es la respuesta inmune innata, que consta de barreras físicas (piel y mucosas) para evitar el ingreso de microorganismos; cuando la integridad de estas barreras se ve comprometida, los macrófagos, células dendríticas y polimorfonucleares intervienen, con la finalidad de fagocitar y destruir a los microorganismos; estos eventos y los posteriores son dirigidos por citocinas, moléculas de señalización secretadas por diferentes estirpes celulares. Los mecanismos efectores que desarrollan las células fagocíticas son inespecíficas y no le confieren memoria alguna al cuerpo para futuras infecciones, pero tiene la capacidad de activar a los linfocitos, células pertenecientes a la

inmunidad adaptativa (Liu y Cao., 2016; Roitt, 2006; Rugeles y col., 2009; Shoemaker y col., 2002; Voet y Voet., 2006;).

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por presentar gran especificidad durante el reconocimiento molecular, dado principalmente por el procesamiento y presentación de antígeno, un proceso en el que interactúan células presentadoras de antígeno profesionales (CPA), como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, mediante proteínas de superficie expresadas por ambas estirpes celulares. Posterior a la fagocitosis y digestión de los microorganismos, ocurre una selección de péptidos antigénicos, los cuales se presentan unidos al complejo principal de histocompatibilidad tipo II (CPH II) de las CPA, con la finalidad de activar a los linfocitos por medio del receptor de células T (TCR) (Figura 5). Cuando finalmente ocurre esto, se efectúa una expansión clonal y acciones específicas se llevan a cabo para la erradicación del microorganismo, incluidas la producción de anticuerpos, enzimas proteolíticas y citocinas. Al eliminar al agente infeccioso por completo, el sistema inmunológico entra en un estado de homeostasis, y se genera una memoria específica, que le atribuye mayor rapidez para neutralizar infecciones posteriores (Haung y Chen., 2016; Liu y Cao., 2016; MacLeod y Mansbridge., 2016; Rivera y col. 2016).

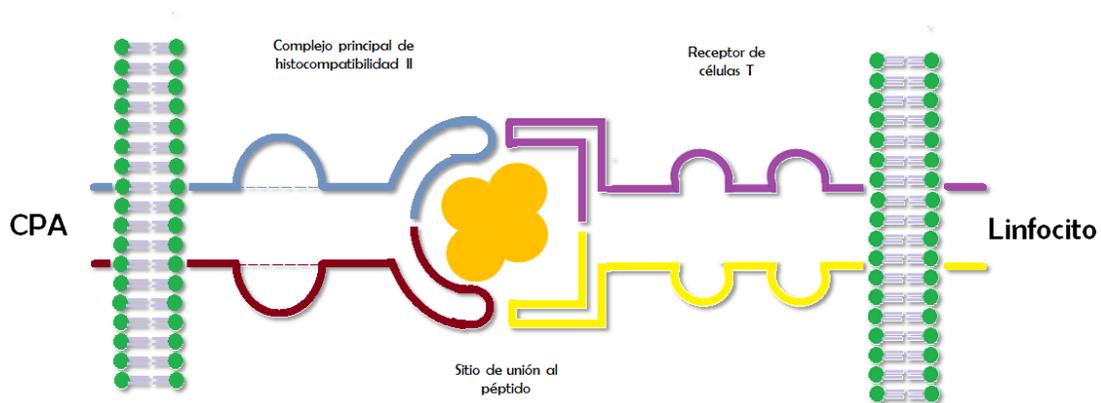


Figura 5. Modelo de presentación de antígeno

Los macrófagos son células mononucleares que provienen de un precursor en médula ósea que desarrolla a monocito. Su maduración está controlada por diferentes estímulos (IL-3, GM-CSF), después es liberado al torrente sanguíneo y circula por el organismo, hasta llegar a

los órganos periféricos, en donde culmina su diferenciación y desarrolla sus funciones como parte del sistema inmunológico (Lavin y col., 2015).

En los tejidos periféricos, se encarga de detectar cualquier sustancia extraña que ingrese al organismo (inhalación, ingestión o traumatismo), por medio de receptores proteicos presentes en la membrana citoplasmática, estos cuentan con una región citoplasmática asociada a proteínas transductoras que dirigen los cambios en la expresión genética y median la activación del macrófago una vez reconocido el agente patógeno (Kapellos e Iqbal., 2016; Ulbrincht, 2010).

Los acontecimientos posteriores a la activación del macrófago engloban cambios en el citoesqueleto, fagocitosis, formación del fagolisosoma, digestión del microorganismo por acción de enzimas lisosomales, EROs y óxido nítrico, presentación de antígeno por medio del CPH II y liberación de citocinas y factores de crecimiento para restaurar el tejido que resultó dañado de manera colateral (Figura 6) (Rivera y col. 2016; Roitt, 2006).

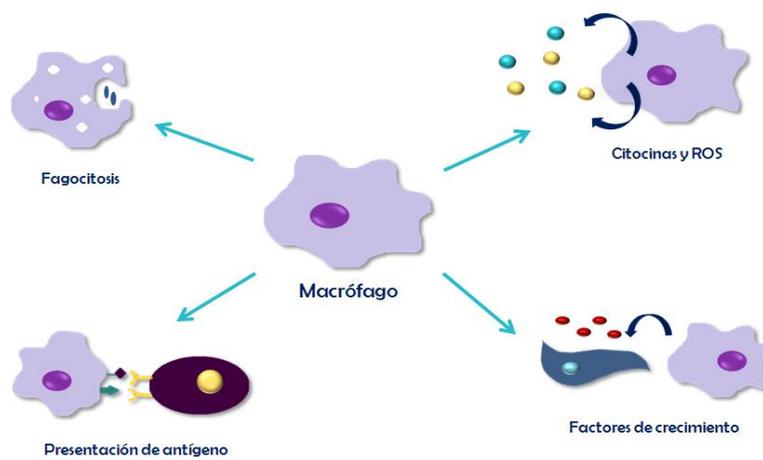


Figura 6. Funciones del macrófago

Las citocinas son moléculas de señalización que dirigen la actividad celular de forma autocrina o paracrina, su excreción cambia de acuerdo al entorno: al activarse los macrófagos se secretan citocinas proinflamatorias, y una vez que el microorganismo ha sido eliminado se secretan citocinas antiinflamatorias, regresar al estado basal del organismo (Goh y col., 2016). Dentro del primer grupo mencionado se encuentran la interleucina 12 (IL-12), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés) y el interferón γ (INF- γ), que presentan

diferentes funciones en el organismo (Tabla 1) (Abbas, 2012; Kapellos e Iqbal, 2016; Lavin y col., 2015; Roitt 2006):

Tabla 1. Principales citocinas proinflamatorias secretadas por el macrófago.

Citocina	Efecto
TNF- α	Aumento en expresión de CPH I Activación de linfocitos NK Estado antiviral
IL-12	Maduración de linfocitos CD4 ⁺ a Th1 Aumento en síntesis de INF γ
INF- γ	Maduración de linfocitos CD4 ⁺ a Th1 Secreción de IgG Aumento en expresión de CPH I y II

METODOLOGÍA

Cultivo Celular

Para el desarrollo de los bioensayos se utilizó la línea celular de macrófago murino RAW 264.7 (ATCC), la cual se cultivó en medio D-MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (D5F) en presencia penicilina 10,000 unidades/mL y estreptomina 10 mg/mL. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Bioensayos

Los bioensayos se desarrollaron en microplacas de 12 y 96 pozos, donde se adicionaron a las células diferentes concentraciones de argemonina (extracción de *A. gracilenta*) y berberina (SIGMA) (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 µg/mL), y se incubaron por diferentes periodos de tiempo a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células resultantes se utilizaron para ensayos de citotoxicidad, PCR (evaluación de ARNm) y citometría de flujo (expresión de CPH II); los sobrenadantes generados se almacenaron en congelación (-20 °C) para posteriores análisis (ELISA).

Ensayo de Citotoxicidad

Con la finalidad de encontrar un intervalo de concentraciones donde los alcaloides no resulten tóxicos para las células se desarrollaron bioensayos en microplacas de 96 pozos en medio D5F. Se utilizaron 100,000 células/mL y diversas concentraciones (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 µg/mL) de argemonina y berberina por triplicado. La placa se incubó por 48 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posterior a la incubación se agregaron 10 µL de la sal de tetrazolio (5 mg/mL, SIGMA) y se mantuvo en reposo, con las mismas condiciones durante 4 horas, pasado el tiempo se observó la formación de cristales púrpuras, los cuales se disolvieron con isopropanol ácido y se analizaron en un lector de microplacas (Labsystems, Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 570-655 nm. La detección de la proliferación células se basa en la formación de cristales de formazán, debido a la donación de protones provenientes de mitocondrias activas.

Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA)

Con el fin de determinar la modulación de la respuesta inmunológica por parte de los alcaloides (argemonina y berberina) se evaluaron los sobrenadantes generados en los bioensayos. Se utilizaron 100,000 células/mL en presencia de los alcaloides a diferentes tiempos de incubación (1, 2, 3, 6, 12 y 24 horas) y concentraciones (1.6, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 µg/mL), con un triplicado para cada condición, los sobrenadantes se recolectaron al término del tiempo de incubación, y se colocaron en un tubo cónico todos los provenientes de condiciones iguales, obteniendo así una mezcla de los mismos; se almacenaron a -80°C hasta utilización. Para su análisis, se adicionaron 100 µL del sobrenadante a una placa de ELISA (Mouse Tumor Necrosis Factor α ELISA kit RAB0477-1KT) de 96 pozos, los cuales previamente estaban recubiertos con el primer anticuerpo específico para TNF- α y se incubó por 2.5 horas; se realizó un lavado con una solución amortiguadora. Posterior a esto, se adicionó el anticuerpo biotinilado, y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente (25°C) y con agitación leve. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 100 µL de HRP-estreptavidina durante una incubación por 45 minutos. Para hacer evidente los anticuerpos unidos se adicionaron 100 µL de TMB colorimétrico, dejándolo reaccionar por 30 minutos y posteriormente 50 µL de solución de stop. La densidad óptica (D.O.) fue detectada con un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm, siendo directamente proporcional a la concentración de citocina presente en los sobrenadantes.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el propósito de evaluar la potencial activación de los macrófagos, se evaluó la producción de ARN mensajero (ARNm), se realizaron extracciones de ARN total de células RAW 264.7 expuestas a argemonina y berberina. Posterior a esto, se realizó la síntesis de ADNc y la amplificación por medio de la técnica de PCR de los fragmentos de citocinas, los cuales se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa.

Extracción de ARN Total

La extracción de ARN se realizó en células RAW 264.7 (Kit RNeasy Mini Kit, Qiagen), cultivadas en una microplaca de 12 pozos, a una concentración de 300,000 células/mL, e incubándolas

durante 24 horas con 3.125 µg/mL de argemonina y berberina. Las células se despegaron de manera mecánica por pipeteo y se colocaron en microtubos para su centrifugación a 1800 rpm por cinco minutos. Se realizaron tres lavados con PBS 1x, centrifugando a 1800 rpm por cinco minutos y retirando el sobrenadante en cada ocasión. Se adicionó al sedimento 350 µL del buffer RTL-β-mercaptoetanol 0.99 % y se homogeneizó durante 30 segundos. Trescientos cincuenta microlitros de etanol al 70% se incorporaron en el microtubo, y toda la mezcla se colocó en una columna de separación (RNeasy Mini Spin Column) y se centrifugó durante 15 segundos a 10,000 rpm; el líquido resultante se almacenó a -20°C (ADN). Se agregaron 700 µL del buffer RDW1 a la columna y se centrifugó durante 15 segundos a 10,000 rpm, descartando el líquido resultante y colocando dentro de la columna 500 µL (en dos ocasiones) de buffer RPE y centrifugando durante 15 segundos y dos minutos a 10,000 rpm para lavar la columna. Los restos de líquido se eliminaron centrifugando la columna sola durante un minuto a velocidad máxima. Para la obtención del ARN se agregaron 30 µL de agua libre de ARNasas y se centrifugó por un minuto a 10,000 rpm. Se evaluó su concentración por espectrofotometría (nanodrop 2000) e integridad por gel de agarosa.

Formación del ADN Complementario

Una vez extraído el ARN, su concentración fue obtenida por nanodrop (Nano2000); posteriormente para eliminar contaminaciones con ADN genómico se realizó un tratamiento con ADNasas, durante 30 minutos a 42°C. Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se colocaron en un microtubo 100 ng/mL de ARN tratado con ADNasas, 1 µL de oligos dT 50 µM y 1 µL de agua libre de ARNasas, los microtubos se colocaron en un termociclador con periodos de cinco minutos a 70°C y cinco minutos a 4°C. Posterior a eso, se adicionó 4 µL de buffer 5x, 3 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTPs y 1 µL de enzima retrotranscriptasa (RT). El protocolo de amplificación del ADNc fue 5 minutos a 25 °C, 1.5 horas a 42°C y 15 minutos a 70°C, utilizando el termociclador.

Reacción de PCR en Termociclador

Para la amplificación del fragmento codificante para cada una de las citocinas, producto de PCR, se utilizó el kit GoTaq G2 Colorless Master Mix (Progema, 9PIM783); se tomaron 1 µL de agua libre de ARNasas, 5 µL de master mix, 1 µL de cebador sentido (para la cadena 3´ a 5´) y 1 µL de cebador antisentido (para la cadena 5´ a 3´) para cada citocina (la secuencia sentido y

antisentido de cada cebador se específica en la Tabla 2), se adicionaron finalmente 2 μ L de ADNc proveniente de cada condición al tubo correspondiente (argemonina, berberina, control de células y LPS). Se amplificó el producto durante 38 ciclos con las siguientes condiciones de temperatura de 94 °C por 30 segundos, 50 °C durante 45 segundos y 72°C por 45 segundos, se dio un primer y único ciclo de 94°C por siete minutos y al final siete minutos a 72°C.

Tabla 2. Secuencia de cebadores de cadenas sentido y antisentido de citocinas proinflamatorias.

Citocina	Cebador de cadena 3' a 5'	Cebador de cadena 5' a 3'
IL-1	AGC CCA TCC ATC ACA GAT GA	GGT GAT GAC CTA GGC TTG ATG
IL-12	CCA TGC CCT CAC CAC TCC	TCA GAA GTG CAA GGG TAA AAT TC
INF α	ATG CTC CTG GCA CAA ATG A	CTC GGG AAA TCC AAA GT
INF γ	GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA G	TTT GGA TGC GGT CAT CTT
IL-6	GAT GAG TAC AAA AGT CCT GAT CCA	CTG CAG CCA CTG GGT CTG T
TNF α	GAC AAG CCT GTA GCC CAT GT	TCT CAG CTC CAC GCC ATT
IL-8	TGC GCC AAC ACA GAA ATT AT	TGC GCC AAC ACA GAA ATT AT

Electroforesis en Gel de Agarosa

Posterior a la amplificación, se realizó un análisis en gel de agarosa, para identificar la presencia o ausencia de los fragmentos de ADN amplificados. Los poros del gel de agarosa, junto con el ánodo y cátodo presentes en la cámara de electroforesis, permiten separar las moléculas de acuerdo a su tamaño y carga, contrastando los resultados con marcadores de pares de bases (1 Kb Plus) y controles positivos. Se realizó un gel de agarosa al 1.2 % con buffer TAE 1x, añadiendo calor para la disolución completa; se dejó enfriar durante cinco

minutos y se adicionó 1 μL de SYBR safe DNA Stain (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por cada 10 mL de solución de agarosa. La mezcla se dispuso en la cámara de electroforesis, colocando el peine para formar los pozos, y se reposó por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Se adicionó 1 μL del buffer de carga a las muestras a analizar, se retiró el peine y se cubrió con buffer TAE 1x completamente. Se dispusieron las muestras y el marcador de pares de bases en los pozos del gel y se dejó correr durante 35 minutos con 90v de intensidad. Los fragmentos de ADN se visualizaron con luz UV en un transiluminador.

Citometría de Flujo

Con el propósito de saber si los alcaloides impactaban en la expresión de las moléculas del CPH clase II en la superficie de los macrófagos (RAW 264.7) se procedió a realizar un análisis por citometría de flujo. Se utilizaron 150,000 células/mL en una placa de 12 pozos en fondo plano. Las células fueron cosechadas y lavadas con PBS frío 1x en dos ocasiones, después se incubaron con el anticuerpo monoclonal (AcMo) 40F (α -MHC-II I-A^k) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en D5F-0.05% NaN_3 durante una hora a 4°C. Posterior al tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS frío 1x y se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FIT-C) en una dilución 1:200 con D5F-0.05% NaN_3 por una hora a 4 °C en oscuridad. Después de la incubación, se realizaron dos lavados más con PBS frío 1x y las células se fijaron en paraformaldehído al 1% (PFA) en D5F-0.05% NaN_3 y se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su adquisición en el citómetro de flujo FACS Canto II (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó el efecto inmunomodulador de argemonina y berberina sobre macrófagos murinos (RAW 264.7) por medio de la determinación de citocinas secretadas, así como de la presencia de transcritos (ARNm) de diversas citocinas; y la expresión del complejo principal de histocompatibilidad II (CPH II) por medio de ensayos de MTT, ELISA, PCR y citometría de flujo.

Citotoxicidad Celular

Con la finalidad de poder establecer las condiciones adecuadas para el desarrollo de los ensayos de inmunomodulación, se establecieron concentraciones de alcaloides no citotóxicas en la línea celular RAW 264.7. Los resultados muestran que a concentraciones mayores de 12.5 µg/mL de argemonina (Figura 7A) la citotoxicidad fue evidente, debido a que claramente se disminuyó la viabilidad y proliferación celular. En menores concentraciones, de argemonina o berberina, no se observaron cambios morfológicos o daño celular, en comparación al grupo control en donde la línea celular RAW 264.7 mostró una morfología normal. A una concentración de 6.25 µg/mL de argemonina, las células no exhibieron un daño morfológico aparente, por lo cual para los ensayos de inmunomodulación, esta concentración fue la utilizada. Estas mismas características fueron encontradas en las células tratadas con berberina (Figura 7B), observándose una disminuida proliferación celular a concentraciones mayores de 12.5 µg/mL. Este descenso en la proliferación celular puede estar dirigida por algunos eventos celulares como apoptosis, necrosis o autofagia, caracterizados por estímulos extracelulares, la activación de moléculas de señalización, así como cambios morfológicos (Alberts y col., 2008). Previamente se ha estudiado la relación berberina y procesos apoptóticos en células provenientes de cáncer de mama, demostrando un aumento en moléculas proapoptóticas en etapas finales vía caspasas, como Bax y caspasa 3, en las líneas celulares MCF-7, (viabilidad celular <60%, berberina 50 µg/mL) y MDA-MB-231 (viabilidad celular <70%, berberina 100 µg/mL); a su vez, se ha evidenciado el sinergismo que puede tener berberina con otros alcaloides para potenciar su efecto, disminuyendo la viabilidad celular de MCF-7 y MDA-MB-231 a un 40 y 20 % respectivamente (Wang y col., 2016).

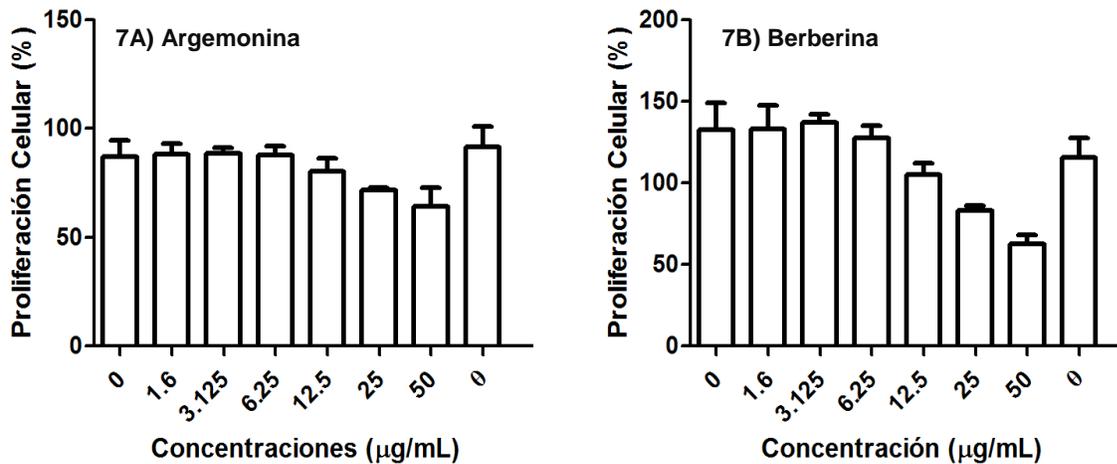


Figura 7. Efecto citotóxico de argemonina y berberina en macrófagos RAW 264.7. Las gráficas ilustran la proliferación celular de los macrófagos en presencia de diferentes concentraciones de argemonina (7A) y berberina (7B). La densidad óptica se obtuvo a las longitudes de onda 570 y 655 nm. El control celular PBS (1x) no mostró efecto tóxico en la morfología celular.

La muerte de una célula se acompaña de cambios morfológicos, los cuales han sido evaluados con anterioridad por nuestro grupo de investigación, donde se encontró que estas células en presencia de argemonina y berberina, en un período de 48 horas, presentaron características de muerte por apoptosis (cuerpos apoptóticos) y autofagia (vacuolas autofágicas) (Leyva y col., 2015). Claramente se observa un comportamiento dosis respuesta de los alcaloides, entre mayor concentración de los alcaloides mayor efecto citotóxico y muerte celular (Figura 8), y a menor concentración se disminuye dicho efecto, por estas observaciones se eligieron concentraciones menores a 6.25 µg/mL para la evaluación de la inmunomodulación de argemonina y berberina en los macrófagos RAW 264.7.

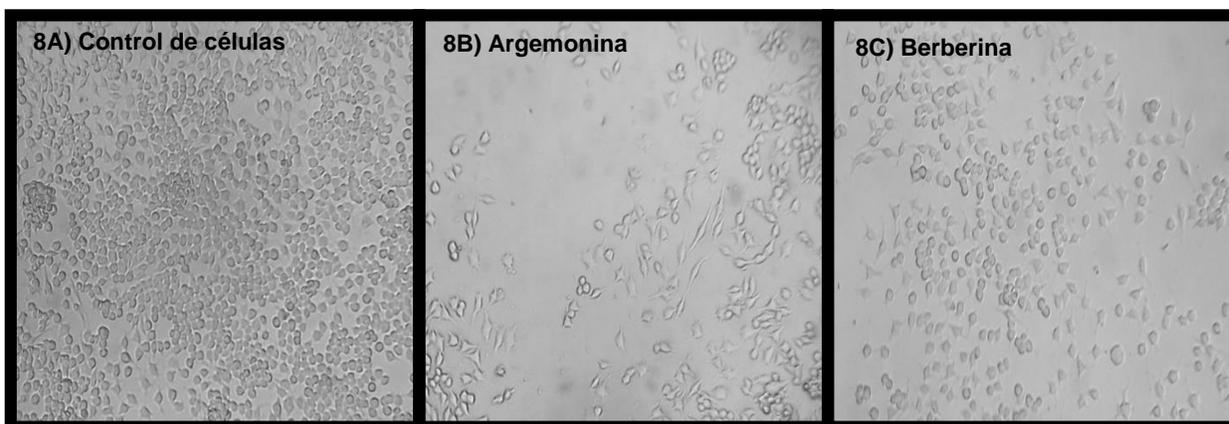


Figura 8. Efecto citotóxico de argemonina y berberina en Macrófagos RAW 264.7. Los macrófagos se incubaron por 48 h, posterior a este tiempo se observaron cambios en la morfología. Control de células (8A), argemonina (8B) y berberina (8C), a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Aumento de 100 x en microscopía óptica.

Determinación de Citocinas Proinflamatorias

Con el fin de evaluar el potencial papel inmunomodulador de los alcaloides en la línea celular RAW 264.7, se utilizaron concentraciones menores a 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de argemonina y berberina. El interés de evaluar el carácter modulador de la respuesta inmunológica de los alcaloides surge debido a que se ha observado a berberina como un alcaloide con características proinflamatorias, a concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, induciendo un aumento en la secreción de IL-12 en la línea celular RAW 264.7 (Tae y col., 2003). Es interesante observar que en la línea celular RAW 264.7 berberina a concentraciones no mayores a 40 μM presenta un carácter antiinflamatorio debido a que disminuye la expresión de factores de transcripción NF- κB y AP-1 (Huang y col., 2016). En este trabajo, los sobrenadantes obtenidos en los bioensayos donde se incubaron las células con argemonina y berberina durante 24 horas se evaluaron por ELISA con la finalidad de poder analizar la presencia de algunas citocinas proinflamatorias, como TNF- α . Los datos generados en este trabajo mostraron que entre las concentraciones de 3.125 y 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se presenta un incremento moderado en la secreción de TNF- α . Argemonina expresó una ligera elevación en la secreción de TNF- α a la concentración de 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 9A); en comparación con esto, berberina exhibió un leve aumento en la producción esta citocina proinflamatoria después de los 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con un comportamiento dosis-respuesta (Figura 9B). Las células control, tratadas con PBS no mostraron incremento en la producción de la

citocina. En el presente estudio se observó que los alcaloides (argemonina y berberina) a concentraciones de 3.125 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ inducen una moderada secreción de la citocina proinflamatoria $\text{TNF-}\alpha$.

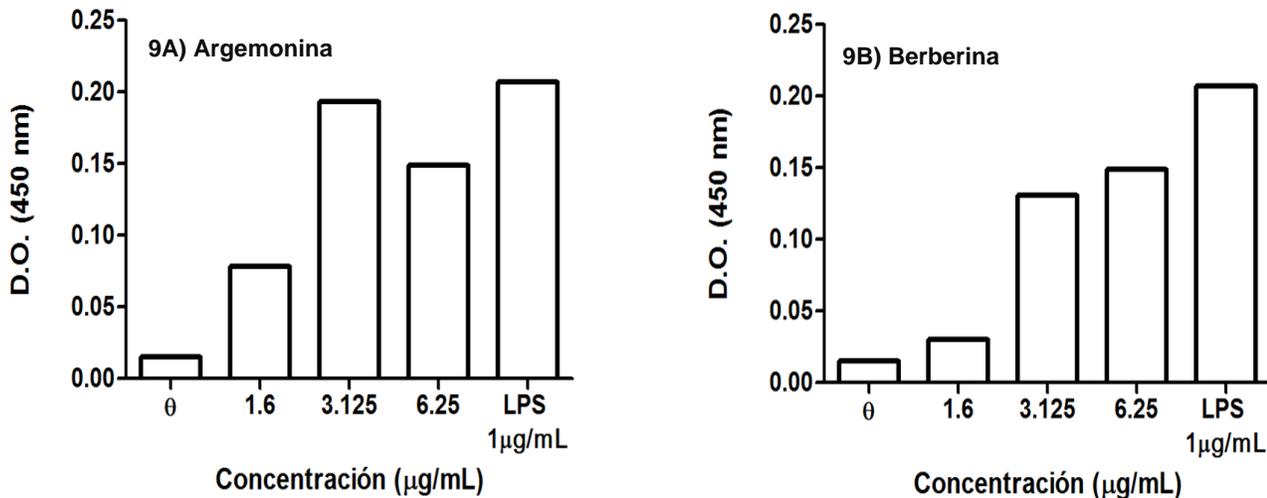


Figura 9. Secreción de $\text{TNF-}\alpha$ en macrófagos RAW 264.7 por exposición a berberina y argemonina. Se evaluó la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ en sobrenadante, en el intervalo de concentraciones no tóxicas para los macrófagos RAW 264.7, posterior a un tiempo de incubación de 24 horas con argemonina (9A) y berberina (9B). La densidad óptica se midió a una longitud de onda de 450 nm. El control de células no mostró un incremento de $\text{TNF-}\alpha$, al igual que las células tratadas con PBS.

Existen factores que influyen de manera considerable en la producción de $\text{TNF-}\alpha$, como la concentración de los alcaloides utilizada y/o el tiempo de exposición de los mismos en los cultivos celulares. Para determinar el tiempo adecuado que favorece la secreción de $\text{TNF-}\alpha$, se expusieron los macrófagos RAW 264.7 con ambos alcaloides en diferentes tiempos de incubación a una concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10). Los sobrenadantes evaluados mostraron una elevación de $\text{TNF-}\alpha$ en las primeras horas de incubación, con un aumento posterior a las tres horas presentado por argemonina (10A); En comparación, berberina exhibe un incremento en la secreción transcurridas dos horas de incubación (10B). Ambos alcaloides mantienen el aumento de la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ hasta el tiempo de 24 horas. La variación entre los efectos causados por berberina dependientes de la dosis y el tiempo, pueden ser consecuencia del amplio intervalo de blancos moleculares afectados por este alcaloide, que van desde sitios en el ADN (cajas TATA), hasta enzimas intracelulares (telomerasas,

ciclooxigenasas, entre otras) (Guaman y col., 2014). Nuestros datos sugieren que la secreción moderada de la citocina ocurre en un periodo prolongado de 24 horas. Futuros estudios son necesarios para poder determinar el carácter proinflamatorio de los alcaloides, por lo cual es necesario la determinación de un amplio perfil de citocinas relacionadas con la inflamación.

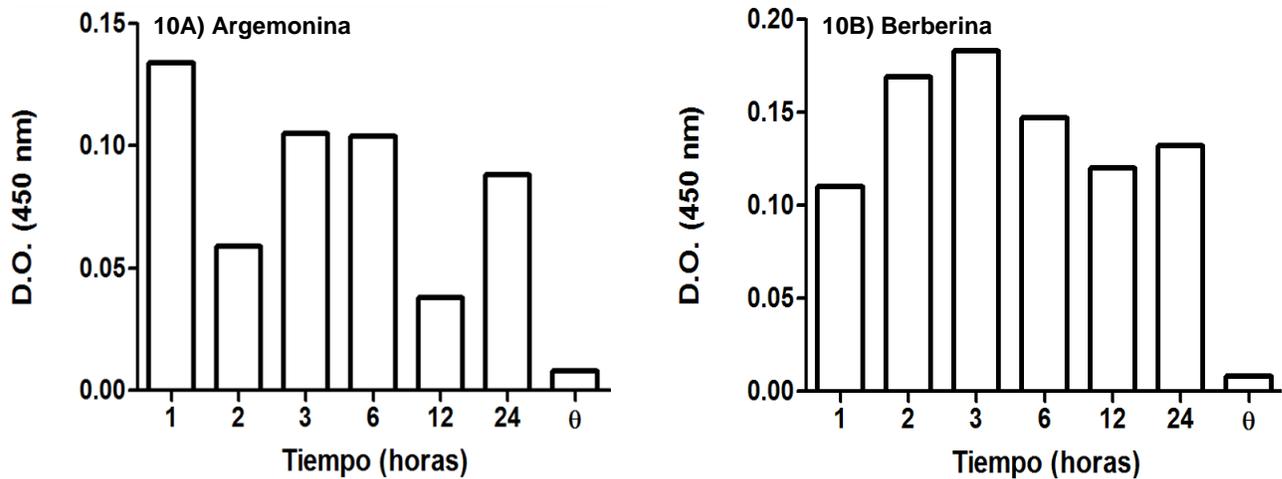


Figura 10. Evaluación de la secreción de TNF- α en presencia de argemonina y berberina a 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se determinó la presencia de la citocina por medio de ELISA, la densidad óptica se obtuvo a una longitud de onda de 450 nm, utilizando sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de exposición de la línea celular RAW 264.7 con argemonina (10A) y berberina (10B) a una concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Producción de ARNm de Citocinas Proinflamatorias

Debido a la baja producción generada de TNF- α en los bioensayos de inmunomodulación por ELISA, se decidió evaluar la generación de transcritos para un perfil de citocinas proinflamatorias, con el fin de determinar este carácter. Trecientas mil células/mL de RAW 264.7 se incubaron con 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ambos alcaloides por 24 horas. Posteriormente se extrajo el ARN total de las células y se determinó su concentración (Tabla 3) por medio de nanodrop (Nano2000). La mayor concentración se observó en las células tratadas con argemonina, mientras que la cantidad más baja la refirió el control positivo de LPS; estas variaciones son atribuibles al procesamiento de las muestras.

Tabla 3. Concentración de ARN a partir de células RAW 264.7 estimuladas con berberina y argemonina.

Condiciones ^a	Concentración (ng/ μ L)
Argemonina (3.125 μ g/mL)	256.6
Berberina (3.125 μ g/mL)	161.8
LPS (0.75 μ g/mL)	86.7
Control negativo ^b	187.9

^a Se utilizaron 300,000 células/mL, las células se incubaron 24 h y posteriormente se realizó el proceso de extracción de ARN Total. La concentración se evaluó por Nanodrop2000.

^b Control de células en presencia únicamente de D5F.

Una vez obtenido este ARNm, se prosiguió a la identificación de la expresión génica por medio de su conversión a ADN, para esto es necesario la integridad del ARN extraído, la cual puede comprobarse por medio de técnicas de biología molecular. La integridad del ARN se aprecia al realizar una electroforesis al 0.8% de agarosa, el cual exhibe dos bandas características, en 18S y 28S. Las bandas obtenidas por el procesamiento del ARN extraído de las muestras no presentan una gran intensidad, hecho que puede atribuirse a la baja concentración de ARN contenido en las muestras y a la degradación parcial del ARN, efecto de la manipulación de las muestras (Figura 11).

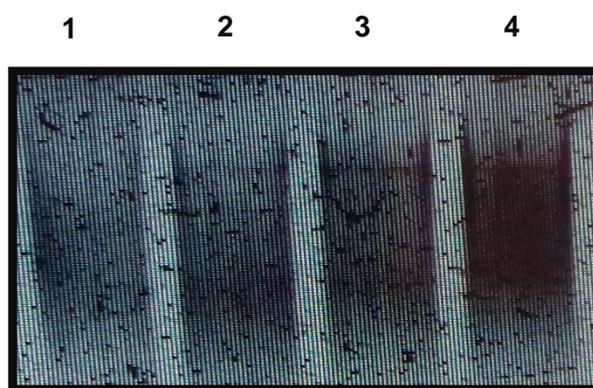


Figura 11. Integridad de ARN por electroforesis de agarosa (0.8 %). El ARN aislado se procesó por electroforesis de agarosa (0.8%, 80v, 40 minutos). ARN de (1) células tratadas con argemonina, (2) berberina, (3) control negativo y (4) LPS; las bandas se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

Para evaluar la producción de citocinas proinflamatorias se sintetizó ADNc para el ARN extraído; posteriormente se realizó un PCR para la amplificación de los genes correspondientes; de antemano se sabe que berberina tiene la capacidad de aumentar el ARNm en otro tipo de líneas celulares, como el miR-22-3p en células HepG2, esta cualidad le confiere propiedades anticancerígenas en tumores hepáticos y gástricos (Chen y col., 2016). En este trabajo se encontró la presencia de los ARNm para las citocinas IL-1 e IL-6 en las células tratadas con argemonina, y aquellas tratadas con berberina mostraron la fuerte presencia de ARNm para las citocinas IL-1 e IL-6, y con menor intensidad para las citocinas $INF\alpha$, $INF\gamma$, IL-12 y $TNF\alpha$ (Figura 12) bajo las condiciones evaluadas. Las bandas encontradas se contrastaron con un marcador de peso molecular, para determinar que estaba en el tamaño esperado, dando como resultado bandas entre los 70 y 130 pares de bases (Tabla 4). Para comprobar la correcta realización de la técnica de PCR se amplificó el gen RP, el cual se expresa de manera constitutiva en todas las células, su presencia indica una correcta metodología y procesamiento de las muestras. Los datos encontrados sugieren que los alcaloides argemonina y berberina inducen un incremento en el panel de citocinas proinflamatorias bajo las condiciones evaluadas.

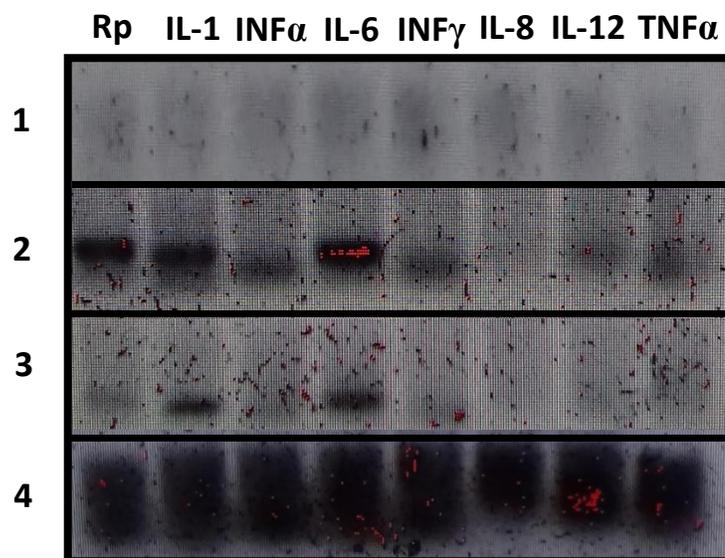


Figura 12. Evaluación de productos de PCR de citocinas proinflamatorias en macrófagos RAW 264.7. El control negativo de células no presenta bandas evidentes (1), para berberina (2) y argemonina (3) se exhiben bandas con pesos de pares de bases características de las citocinas evaluadas, en comparación con el control de LPS (4) expresa una saturación de estas moléculas, esto debido a que el LPS es una molécula altamente inmunogénica.

Tabla 4. Pesos correspondientes a citocinas proinflamatorias en pares de bases (pb).

Citocina	Peso (pb)
IL-1	80
IL-6	130
IL-12	95
INF α	70
INF γ	112
TNF α	105
IL-8	127

Expresión del Complejo Principal de Histocompatibilidad II

El CPH clase II es una proteína de membrana expuesta por las células del sistema inmunológico, por CPA principalmente, entre ellos macrófagos. La variación en la expresión de esta molécula es considerado un indicativo de la activación de las CPA. Se evaluó la inducción de CPH II en macrófagos RAW 264.7 por exposición a argemonina y berberina (3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas, utilizando anticuerpos monoclonales y evaluando las muestras por citometría de flujo. Esta técnica arroja una intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a las células viables, la cual es directamente proporcional a la expresión de las moléculas analizadas en la superficie de los macrófagos. Las células presentaron una IMF basal con una magnitud de 264. Mientras que las células tratadas con argemonina y berberina, mostraron un aumento en el IMF de 1725 y 2599 respectivamente (Tabla 5). Debido a las modificaciones en los IMF podemos sugerir que los alcaloides argemonina y berberina estimulan la expresión de las moléculas del CPH clase II en las condiciones evaluadas en estos experimentos, evento que conllevaría a una mayor estimulación de células pertenecientes a la inmunidad adaptativa por parte de los macrófagos.

Tabla 5. Análisis de la expresión de las moléculas del CPH clase II en células RAW 264.7

Cultivos^a	Expresión del CPH II^b (%)	Intensidad Media de Fluorescencia
Sin Teñir	1.7 ± 1.7	338
Control de Células	27.9 ± 5.94	264
Argemonina	31.3 ± 1.13	1725
Berberina	24.65 ± 1.2	2599
LPS	23.55 ± 1.18	3891

^a Posterior a 24 h de incubación de las células RAW 264.7 con 3.125 µg/mL de argemonina y berberina, se realizó la tinción superficial utilizando el AcMo 40 F(α-CPH II IA^k) y posteriormente un α-IgG (α-ratón).

^b Representación de tres experimentos independientes.

Los datos generados en el presente estudio muestran la estimulación de eventos proinflamatorios de macrófagos murinos por argemonina y berberina en las condiciones utilizadas, a nivel de citocinas y de la molécula de membrana CPH clase II. Existe una variación entre el nivel de activación para ambos alcaloides, mostrando un efecto más potente por parte de berberina con una expresión del CPH II superior a la provocada por argemonina, una secreción de TNF-α mayor y la estimulación de la síntesis de ARNm de INF-α, INF-γ, IL-12 y TNF-α, citocinas que no fueron impactadas por la exposición a argemonina; este hecho puede ser atribuido a la estructura molecular de ambos alcaloides y a la pureza de los mismos, puesto que berberina exhibe un grado de pureza de 97% (SIGMA), en comparación con argemonina, que proviene de extractos a base de solventes de la planta *A. gracilenta*. Esta diferencia en pureza puede impactar en modificaciones de los mecanismos de activación de los diversos factores de transcripción (STAT, T-bet) que controlan la activación de células de la inmunidad y a su vez favorecen la continua producción de mayor cantidad de citocinas. Los datos obtenidos sentarán las bases inmunológicas y moleculares de la relación entre la activación de células de la respuesta inmunológica y los alcaloides. Como perspectivas del presente trabajo será necesario cuantificar la producción de moléculas de ARNm del panel proinflamatorio de citocinas, conocer los mecanismos de acción utilizados para activar a los diversos factores de

transcripción relacionados con la producción de estas moléculas proinflamatorias. Otro aspecto importante será la valuación de la modificación de diferentes indicadores de activación (superficiales e intracelulares) de macrófagos y otras células de la inmunidad. Así como la determinación de la potenciación de mecanismos efectores, como la fagocitosis, de estos macrófagos por acción de argemonina y berberina.

CONCLUSIONES

Los alcaloides berberina y argemonina exhiben un efecto inmunomodulador en la línea celular RAW 264.7 a concentraciones menores de 6.25 µg/mL.

Existe una inducción en la producción de TNF-α en macrófagos murinos RAW 264.7 por efecto de argemonina y berberina, (3.125 - 6.25 µg/mL)

Se detectaron las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-12, TNF-α, IL-6 e INF-α en macrófagos murinos RAW 264.7 en presencia de berberina, para argemonina la elevación corresponde a IL-1 y IL-6.

Los alcaloides berberina y argemonina aumentaron la expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase II en la línea celular RAW 264.7 a concentraciones dentro del intervalo de 3.125 – 6.25 µg/mL.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas AK, Lichman AH, Pillal S, 2012. Cellular and molecular immunology. 7a edición. 1-12, 55-65.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter, 2008. Biología molecular de la célula. 5ta edición, 1115-1120, 1525-1537.
- Alves de Almeida, A. C., de-Faria, F. M., Dunder, R. J., Manzo, L. P. B., Souza-Brito, A. R. M., & Luiz-Ferreira, A. (2017). Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis: Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2017, 8528210.
- Aniszewski T, 2015. Alkaloids – secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. 2da ed. Amsterdam. 1-7, 204-206; 230.
- Chen J, Wu FX, Luo HL, Liu JJ, Luo T, Bai T, Fan XH, 2016. Berberine upregulates miR-22-3p to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Sp1. American Journal of Translational Research, 8 (11):4932–4941.
- Chu M, Ding R, Chu Z, Zhang M, Liu X, Xie S, Zhai Y, Wang Y, 2014. Role of berberine in antibacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor. Complementary and Alternative Medicine. 14:89 – 99.
- Cok A, Plaisier C, Salie M, Oram D, Chenge J, Louters L, 2011. Berberine acutely activates the glucose transport activity of GLUT1. Biochimie, 93(7):1187–1192.
- Delves P, Roitt I, 2000. The immune system. The new England journal of medicine.
- Geoffrey A. 2009. The Alkaloids: Chemistry and Biology. 1ra ed. San Diego (CA) Vol 1.1-10.
- Goh J, Goh K, Abbasi A, 2016. Exercise and Adipose Tissue Macrophages: New Frontiers in Obesity Research? Frontiers in Endocrinology, 7 (65).
- Guaman LM, Lombardi P, Tillhon M, Scovassi AI. 2012. Berberine, an epiphany against cancer. Molecules. 12350.
- Han, J., Lin, H., & Huang, W. (2011). Modulating gut microbiota as an anti-diabetic mechanism of berberine. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, RA164–RA167.
- Huang L, Pan X, Gong K, Shao G, 2016. Anti-inflammatory effects of three kinds of traditional Mongolian medicine monomer and its combination on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. European Review for medical and pharmacological sciences. 20: 950-958.

Perviz S, Khan H, Pervaiz A, 2016. Plant Alkaloids as an Emerging Therapeutic Alternative for the Treatment of Depression. *Frontiers in Pharmacology*, 7(28).

Harton J, Jin L, Hahn A, Drake J, 2016. Immunological Functions of the Membrane Proximal Region of MHC Class II Molecules. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev–368.

Huang C, Lin S, Liao, P, Young, S, Yang C, 2008. The Immunopharmaceutical Effects and Mechanisms of Herb Medicine. *Cellular and Molecular Immunology*, 5(1): 23–31.

Huang Y, Chen Z, 2016. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *American Journal of Translational Research*, 8(6):2490–2497.

Jantan I, Ahmad W, Bukhari, S, 2015. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in Plant Science*, 6:655.

Kapellos T, Iqbal A, 2016. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016, 6591703.

Kersh A, Sasaki M, Cooper L, Kissick H, Pollack, B, 2016. Understanding the Impact of ErbB Activating Events and Signal Transduction on Antigen Processing and Presentation: MHC Expression as a Model. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 327.

Kingston D, 2009. Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents. *Journal of Natural Products*, 72(3):507–515.

Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M, 2015. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews. Immunology*, 15(12): 731–744.

Leyva MA, Robles R, Garibay A, Ruiz E, Alvarez L, Gálvez JC, 2015. In vitro anti-proliferative activity of *Argemone gracilentia* and identification of some active components. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15 (13).

Liu J, Cao X, 2016. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(6):711–721.

MacLeod A, Mansbridge, J, 2016. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 5(2): 65–78.

Nascimento RF, Pradexedes IR, Oliveira R, Barbosa JM, Vieira M, Fachine J, Formiga F, Batista LM, 2015. Activity of alkaloids on eptic ulcer: What's new?. *Molecules*. 929-950.

Osborn A, Lanzotti V, 2009. Plant-derived Natural products: synthesis, function and application. 1ra ed. Nueva York. 3-5, 574-578.

Pang B, Zhao L, Zhou Q, Wang H, Gu C, Tong, XL, 2015. Application of Berberine on Treating Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 905749.

Rivera A., Siracusa MC, Yap GS, Gause WC, 2016. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nature Immunology*, 17(4): 356–363.

Rugeles MT, Patiño PJ, Montoya CJ, 2009. *Inmunología, una ciencia activa*. 2da ed. Colombia. 126-137.

Roitt, Delves, Martin, Burton. 2006. *Inmunología*. 11a ed. Buenos Aires. 1-34.

Santana PR, Pinheiro NM, Mernak MI, Righetti F, Martins MA, Lago JH, Prado CM, 2016. Evidences of Herbal Medicine-Derived Natural Products Effects in Inflammatory Lung Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2348968.

Remppis A, Bea F, Greten H, Buttler A, Wang H, Zhou Q, Preusch M, Enk R, Eehalt R, Katus H, Blessing E, 2010. Rhizoma coptidis inhibits LPS-induced MCP-1/CCL2 production in murine macrophages via an AP-1 and NF κ B-dependent pathway. *Mediators of inflammation*. 194896: 1-8.

Saxena PB, 2007. *Chemistry of alkaloids*. 1ra ed. New Delhi. 1-3.

Schmidt B, Ribnicky DM, Poulev A, Logendra S, Cefalu WT, Raskin I. 2008. A natural products biological activity NIH. Public Access. 1-5.

Shoemaker, Ayres, Grwnvik, Holbrook, 2002. *Tratado de medicina crítica y terapia intensiva*. 4ta ed. Madrid. 586-588.

Singh G, 2008. *How to boost your immune system?*. 1ra ed. Estados Unidos. (Singh, 2008).

Sun F, Xiong S, Zhu Z, 2016. Dietary Capsaicin Protects Cardiometabolic Organs from Dysfunction. *Nutrients*, 8(5).

Tae S, Kang B, Cho D, Kim S, 2003. Induction of interleukin-12 production in mouse macrophages by berberine, a benzodioxoloquinolizine alkaloid, deviates CD4⁺ T cells from Th2 to a Th1 response. *Inmunology*. 109: 407-414.

Ulbricht CE, 2010. *Natural standar, Herb and supplement guide*. 1ra ed. Massachusetts. 100-102.

Voet D, Voet JG, 2006. *Bioquímica*. 3ra ed. Buenos Aires. 1597-1599.

Wang K, Zhang C, Bao J, Jia X, Liang Y, Wang X, Chen M, Su H, Li, P, Wan J, He C, 2016. Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. *Scientific reports*. 6: 260664.

Yu M, Liu S, Sun P, Pan H, Tian C, Zhang L, 2016. Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(1): 56–66.

Xu R, Yu Y, Zhao W, 2010. *Introduction to natural products*. 1ra ed. Beijin. 55-58.

Zhang C, Li C, Chen S, Li Z, Jia X, Wang K, Bao J, Liang Y, Wang X, Chen M, Su H, Wan J, Lee S, Liu K, He C, 2017. Berberine protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells and zebrafish through hermetic mechanisms involving PI3K/AKT/Bcl-2 and Nrf2/HO-1 pathways. *Redox biology*. 11: 1-11.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación de Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (D-MEM)

La elección de un medio de cultivo adecuado es fundamental para el óptimo crecimiento celular, porque en ellos se encuentran todos los nutrientes requeridos por las células para su desarrollo. El medio de cultivo D-MEM es ampliamente utilizado, puesto que posee una alta concentración de aminoácidos y vitaminas y puede ser empleado para cualquier línea celular; para complementarlo se utiliza suero fetal bovino al 5% o 10%, el cual proporciona factores de crecimiento y requerimientos nutricionales esenciales para las células.

Reactivos

D-MEM (GIBCO CAS. 12100-061)

L-arginina (SIGMA.A-5131)

L-asparagina anhidro (SIGMA.a-4159)

NaHCO₃ (SIGMA.S-5761)

Piruvato de sodio (Biowhittaker Walkersville, CAS 13-115E)

L-glutamina (Biowhittaker Walkersville, CAS 17-605E)

Penicilina/estreptomicina

Equipo

Báscula digital

Sistema de filtración

Bomba de vacío

Pipetas serológicas

Probetas

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Placa de agitación con calentamiento e imán

Procedimiento

1.- Pesar los reactivos sólidos y colocarlos en un vaso de precipitado con agua destilada, colocar el vaso en una placa de calentamiento con calor intermedio y agitación durante 15 minutos, o hasta su total disolución.

Para preparar 1 litro de D-MEM

D-MEM 13.37 g

L-arginina 0.116 g

L-asparagina anhídrida 0.036 g

NaHCO₃ 3.71 g

Piruvato de sodio 10.0 mL

L-glutamina 7.5 mL

Penicilina/estreptomicina 10.0 mL

2.- Ajustar el pH entre 7.2-7.4 con HCl ó NaOH según se requiera.

3.- Adicionar los reactivos líquidos dentro de la campana de flujo laminar y esterilizar el medio por filtración con filtro Millipore 0.22 µm, un sistema de filtración y una bomba de vacío.

4.- Depositar el medio filtrado en un frasco estéril y etiquetarlo con fecha, pH y porcentaje de suero fetal bovino.

5.- Colocar dos pruebas de esterilidad en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ y revisarlas a las 24 y 48 horas.

6.- Guardar el medio de cultivo en refrigeración a 4°C.

NOTA: El medio D5F o D10F se prepara adicionando el medio D-MEM con suero fetal bovino al 5 o 10% respetivamente.

Anexo 2

Método Colorimétrico de la Sal de Tetrazolio (MTT)

Dentro de los organelos constituyentes de las células, se encuentran las mitocondrias, encargadas de la producción energética y del proceso de respiración oxidativa, el metabolismo realizado por ellas puede ser empleado para evaluar la viabilidad de los cultivos celulares. Las células metabólicamente activas, tienen la capacidad de reducir la sal de tetrazolium a cristales de formazán, por lo tanto, este método es utilizado para evaluar la proliferación y muerte celular cultivo celular. A mayor cantidad de células vivas, hay un aumento en la formación de cristales y la señal generada se eleva, la cual puede ser detectada empleando un lector de microplacas.

Reactivos

MTT (SIGMA: M2128)

PBS 1X estéril

Equipo

Campana de flujo laminar

Báscula digital

Espátula

Filtros de 0.22 μm (Millipore GSWP02500)

Vortex

Procedimiento

- 1.- Pesar una pequeña cantidad de MTT en un tubo cónico de 50 mL.
- 2.- Adicionar el volumen necesario de PBS1x para alcanzar la concentración final (5mg/mL).
- 3.- Agitar en vortex hasta completa disolución.
- 4,- Esterilizar la solución con un papel filtro Millipore 0.22 μm y un sistema de filtración.
- 5.- Guardar en un tubo cónico estéril y mantener protegida de la luz a -20°C hasta su uso.

Evaluación de la proliferación celular por el método de MTT.

- 1.- Adicionar 10 μL por cada 100 μL de medio a cada pozo de la placa donde se encuentran las células a evaluar e incubar durante 4 horas a 37°C.
- 2.- Añadir isopropanol ácido (100 μL 0.04M a cada pozo) y disolver los cristales color púrpura.
- 3.- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y leer la placa en un lector de microplacas a una longitud de onda de 570 nm y 655 nm.

Anexo 3

Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA)

La técnica de ELISA permite determinar la concentración de proteínas en una suspensión; debido al uso de anticuerpos, presenta una gran especificidad ante los metabolitos a estudiar y es ampliamente utilizada en el campo de la investigación. Los resultados se evalúan en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm, la absorbancia obtenida es directamente proporcional a la concentración de proteínas contenidas en el medio.

Reactivos

Kit de ELISA mouse tumor necrosis factor α ELISA Kit RAB0477-1KT

Buffer B 5x

HRP-estreptovidina 300x

Solución de lavado 20x

Anticuerpo biotinilado 80x

TMB colorimétrico 1x

Solución de stop 1x

Reactivo estándar

Equipo

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Tubos cónicos de 15 mL

Agitador

Procedimiento

- 1.- Realizar un conteo celular y ajustar la concentración a 10,000 células por pozo.
 - 2.- Disponer las células en una microplaca de 96 pozos y adicionar los estímulos; incubar a 37°C con 5% de CO₂.
 - 3.- Retirar el sobrenadante y conservar para analizar por ELISA.
- 1.- Diluir el Buffer B y la solución de lavado con agua destilada hasta obtener una concentración 1x.

- 2.- Diluir los demás reactivos con el buffer B, para obtener una concentración 1x.
- 3.- Adicionar 100 µL del sobrenadante en los pozos de la placa de ELISA, incubar durante dos horas y media en oscuridad a temperatura ambiente (25°C) y con agitación; o durante toda la noche a 4°C con agitación y oscuridad.
- 4.- Descartar la solución y lavar cuatro veces con 300 µL de la solución de lavado 1x, descartar entre cada paso, en el último lavado descartar por completo.
- 5.- Adicionar 100 µL de la solución de anticuerpo biotinilado 1x e incubar durante una hora.
- 6.- Descartar la solución y lavar como se indica en el paso 4.
- 5.- Adicionar 100 µL de la solución 1x de HRP estreptovidina e incubar 45 minutos.
- 6.- Descartar la solución y lavar como en el paso 4.
- 7.- Adicionar 100 µL de TMB colorimétrico, incubar durante 30 minutos.
- 8.- Finalizar agregando 50 µL de la solución de stop y leer de inmediato a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas.

NOTA: Los periodos de incubación se realizan a temperatura ambiente, con agitación constante y en ausencia de luz.

Preparación de la curva de calibración

- 1.- Adicionar al vial del reactivo estándar (vial C) 400 µL del buffer B 1x y disolver por agitación.
- 2.- Realizar diluciones seriadas como se muestra en el diagrama de abajo.

	A	B	C	D	E	F	G
Buffer B	880 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Tubo anterior	120 µL de vial C	300 µL					

- 3.- Procesar la curva de calibración como una muestra normal.

Anexo 4

Citometría de Flujo

La expresión de proteínas de membrana puede reflejar el estado de activación de las células que las presentan, esto es posible de cuantificar por medio de la técnica de citometría de flujo, que se basa en el uso de anticuerpos específicos. Los resultados son representados con histogramas, en donde se observa las características de la población, como el tamaño y la expresión de la proteína a evaluar.

Reactivos

PBS 1x

D5F con NaN_3 al 0.05%

Anticuerpo 40F α -MHC-II I-A^K cadena β

Anticuerpo α -IgG FITC

P-formaldehído al 2%

Equipo

Tubos FACS

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Tubos cónicos

Centrífuga

Preparación de reactivos

1.- Diluir los anticuerpos con D5F- NaN_3 al 0.05%, para el anticuerpo 40F α -MHC-II I-A^K cadena β hasta una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; el anticuerpo α -IgG FITC con un factor de dilución 1:200.

Procedimiento

1.- En una microplaca de 12 pozos colocar 300,000 células por pozo, adicionar los estímulos a evaluar e incubar a 37°C con 5% de CO_2 durante 24 horas (existe variación de tiempo según el protocolo de la investigación).

2.- Retirar el sobrenadante de la microplaca de cultivo, adicionar 200 μL de PBS 1x y despegar las células por pipeteo, evitando la formación de burbujas.

- 3.- Pasar las células a tubos FACS y centrifugar a 1800 rpm durante 7 minutos a 4°C.
- 4.- Adicionar 200 µL de PBS 1x y repetir las condiciones de centrifugación.
- 5.- Descartar el sobrenadante y adicionar 200 µL de la solución del anticuerpo 40F α-MHC-II I-A^K cadena β, incubar durante una hora a 4°C.
- 6.- Centrifugar con las condiciones del paso 3, retirar el sobrenadante y lavar con PBS (paso 4).
- 7.- Adicionar 200 µL del Anticuerpo α-IgG FITC e incubar durante una hora a 4 °C.
- 8.- Centrifugar (condiciones del paso 3), retirar el sobrenadante y lavar con PBS (paso 4).
- 9.- Adicionar partes iguales de p-formaldehído al 2% y de D5F-NaN₃ al 0.05% en un tubo cónico.
- 10.- Agregar 400 µL de la dilución de p-formaldehído a las células y guardar a 4°C en ausencia de luz hasta su análisis en el citómetro de flujo.

Anexo 5

Extracción de ARN Total

La información sobre la expresión de las proteínas está contenida en el ADN, en él se encuentran las secuencias de nucleótidos específicos para todas las proteínas necesarias del cuerpo humano. Para que las proteínas puedan ser sintetizadas, dicha información debe abandonar el núcleo celular, esto pasa por medio de un intermediario: El ARNm, mismo que copia la información y la lleva al citoplasma, donde por medio de los ribosomas se transcriben las proteínas, dirigidas por eventos de señalización. La extracción de ARN permite su evaluación por técnicas de biología molecular.

Reactivos

β -mercaptoetanol

Buffer de lisis RLT (RNeasy Mini Kit, QiaGen)

Buffer RW1

Buffer RPE

Agua libre de RNAsas

Etanol 96-100%

Etanol 70%

Equipo

Micropipeta 10-100 μ L

Micropipeta 100-1000 μ L

Microcentrifuga

Microtubo 2 mL

Microtubos 1.5 mL

Campana de bioseguridad nivel II

Columna (RNeasy Mini Column)

Preparación de reactivos

1.- Adicionar 10 μ L de β -mercaptoetanol por un mililitro de Buffer RLT. Almacenar a 15-25°C, hasta su uso.

2.- Diluir el Buffer RPE 1:5 con etanol al 96-100% antes de utilizarlo.

Procedimiento

- 1.- Realizar un conteo celular de la muestra a utilizar, el total de células a emplear debe estar dentro del intervalo de $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$.
- 2.- Centrifugar las células durante cinco minutos a 1800 rpm (300 g) y retirar el sobrenadante.
- 3.- Lavar el sedimento celular con PBS 1x en tres ocasiones, centrifugando cinco minutos a 1800 rpm y retirando el sobrenadante.
- 4.- Adicionar el buffer RLT al sedimento celular (tabla 6), homogeneizar durante 30 segundos con una micropipeta 100-1000 μL para propiciar la lisis celular.

Cantidad de buffer RLT según el número de células.

Número de células	Volumen del buffer RLT (μL)
Menor que 5×10^6	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

- 5.- Adicionar una cantidad igual de etanol al 70% y homogeneizar completamente.
- 6.- Colocar 700 μL de la muestra en una columna de extracción y centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm y coleccionar el líquido en un microtubo de 2 mL (ADN); en caso de tener más de 700 μL , centrifugar consecutivamente en la misma columna.
- 7.- Adicionar 700 μL del buffer RDW1 a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm, descartar el líquido resultante.
- 8.- Agregar 500 μL del buffer RPE en la columna y centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm; adicionar 500 μL del buffer RPE nuevamente y centrifugar durante 2 minutos a 10,000 rpm, descartar el líquido resultante.
- 9.- Centrifugar la columna sola durante un minuto a máxima velocidad, para eliminar cualquier resto de líquido.

10.- Colocar la columna en un microtubo con tapa y adicionar de 30-50 μ L de agua libre de RNAasas, centrifugar durante un minuto a 10,000 rpm (ARN).

11.- Almacenar los microtubos resultantes de los pasos 6 y 11 a una temperatura máxima de -20°C hasta su análisis.

Anexo 6

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica ampliamente utilizada en el ámbito científico y en el área de la salud; parte de ADN genómico o de ADN complementario sintetizado a partir de un ARNm, para su amplificación. La amplificación de ADN genómico se emplea para la caracterización e identificación de especies y comparación de patrones, para conocer el parentesco entre especies. El último de los casos es útil para conocer la expresión genética de los individuos, también conocido como transcriptoma, el cual puede ser típico de alguna enfermedad. En el ámbito científico se puede evaluar el transcriptoma con el fin de evaluar la expresión genética inducida por diferentes estímulos.

Reactivos

- Síntesis de ADN complementario

Agua libre de ARNasas

Oligos dT

Buffer 5x

MgCl₂

dNTPs

Enzima RT

- PCR

Agua libre de ARNasas

Master Mix

Cebador sentido

Cebador antisentido

Equipo

Micropipetas 1-10 µL

Termociclador (BioRad T100 Thermal Cycler)

Procedimiento

Síntesis de ADN complementario

- 1.- En un microtubo adicionar 9 μL de ARN, 1 μL de oligo dT 50 μM y 1 μL de agua libre de ARNasas.
- 2.- Colocar el microtubo en un termociclador y accionar por 5 minutos a 70°C y durante 5 minutos a 4°C.
- 3.- Retirar el microtubo del termociclador y agregar 4 μL de buffer 5x, 3 μL de MgCl_2 , 1 μL de dNTPs y 1 μL de enzima RT.
- 4.- Programar el termociclador como se muestra en la tabla 3.

Ciclos de temperatura y tiempo para síntesis de ADN complementario

Tiempo (minutos)	Temperatura (grados Celsius)
5	5
90	42
15	70

- 5.- Guardar a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa

- 1.- Realizar una mezcla con 1 μL de agua libre de ARNasas, 5 μL de master mix, 1 μL de cebador sentido y 1 μL de cebador antisentido, homogeneizar con una micropipeta.*
- 2.- Disponer 8 μL de la mezcla en microtubos y adicionar 2 μL de ADN complementario.
- 3.- Colocar los microtubos en el termociclador y programar la variación de temperatura (tabla 8); correr los tiempos del 2 al 5 durante 38 ciclos.
- 4.- Almacenar a -20°C hasta su análisis por electroforesis en gel de agarosa.

* Multiplicar la cantidad de reactivos por los tubos a analizar en el termociclador.

Variación de temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa

Tiempo	Temperatura (grados Celsius)
7 minutos	94
30 segundos	94
45 segundos	50
45 segundos	72
7 minutos	72

Anexo 7

Electroforesis en Gel de Agarosa

Las moléculas se desplazan en una interface de acuerdo a su tamaño, disposición espacial y carga eléctrica. Estas características son empleadas en técnicas de biología molecular para conocer la expresión genética de células y tejidos, como en la electroforesis en gel de agarosa. La presencia de bandas que concuerden con el marcador de peso molecular (en pares de bases para ADN) y con el control positivo, expone la activación o presencia de un gen.

Reactivos

Buffer TAE 1x

Buffer de corrida

Agarosa

SYBR safe DNA Gel Stain

Equipo

Cámara para electroforesis

Peine para electroforesis

Placa de calentamiento

Micropipetas

Transiluminador de luz UV

Procedimiento

- 1.- Pesar 1.2 g de agarosa y disolver en 100 mL de buffer TAE 1x.
- 2.- Calentar en una placa de calentamiento o en un microondas la solución durante 2 minutos.
- 3.- Dejar enfriar 5 minutos y adicionar 10 μ L de SYBR safe DNA Gel Stain.
- 4.- Colocar la solución en la cámara de electroforesis, junto con el peine y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, o hasta su gelificación.
- 5.- Retirar el peine de electroforesis y cubrir la cámara con el buffer TAE 1x por completo.
- 6.- Adicionar 1 μ L del buffer de corrida a cada muestra y justar el volumen final a 6 μ L con agua libre de ARNasas.

- 7.- Depositar el marcador de pares de bases y las muestras en los pozos correspondientes.
- 8.- Accionar la cámara de electroforesis y dejarla correr durante 40 minutos a 80v.
- 9.- Observar las bandas formadas con luz ultra violeta en un transiluminador.