



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE *Polypodium leucotomus* SÓLO Y CON VITAMINAS EN células humana monocito-macrófago de sangre periférica

Dra. Amparo Estepa Pérez
Dra. María del Mar Ortega-Villaizán Romo

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

4 de Julio de 2014

RELACION DE ENSAYOS REALIZADOS

Para la realización de los ensayos que se describen posteriormente se utilizó la siguiente línea celular de humanos de sangre periférica (línea celular SC; ATCC: CRL-9855) Salvo indicación, todas la línea celular se mantuvo en frascos de cultivo de 75 cm² de superficie (Costar, Cambridge) a 37°C y en presencia de 5% CO₂ en el medio indicado para cada tipo celular.

Por tratamiento se entenderá en todos los casos la incubación de las líneas celulares, en paralelo, con el extracto total y con el producto final.

1. Evaluación de la viabilidad celular del extracto total y del producto final en la línea celular monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

El incremento de la capacidad de proliferación de las células SC en respuesta a los distintos tratamientos se estimó mediante un ensayo desarrollado por (Mosmann 1983) que cuantifica la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Como resultado de la reducción, que es proporcional al número de células en cultivo, aparece un compuesto cuantificable por absorbancia (OD 570nm) de color azul (cristales de formazan). Para ello, las monocapas celulares se crecieron hasta 60% de confluencia en placas de 96 pocillos (Costar) y se trataron con el extracto total y el producto final a distintas concentraciones en un volumen de 100 µL/pocillo de medio de cultivo libre de suero. Tras los diferentes tiempos de incubación (de 48 a 72 h a 37°C dependiendo de la línea celular), las monocapas de células se lavarán con tampón PBS pH 7.4 y a continuación se añadió la solución de MTT (Sigma) y se dejó transcurrir la reacción siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se midió la densidad óptica a 570 nm en un lector de placas (Anthos labtec instruments). Los datos se expresan como % del crecimiento en comparación con las células control (células no tratadas). En todos los casos se realizaron tres ensayos independientes cada uno de ellos por triplicado.

2. Evaluación de la capacidad anti-inflamatoria del extracto total y del producto final en la línea celular monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

Monocapas celulares se crecieron hasta 100% de confluencia en placas de 96 pocillos (Costar) y se trataron con 200 ng/ml de LPS (lipopolisacárido) purificado de E. Coli (Sigma) para inducir una respuesta inmune inflamatoria caracterizada por el incremento de la producción celular de, entre otras, las citoquinas pro-inflamatorias, interleucina 1-beta (IL1-β), interleucina 6 (IL6) y factor de la necrosis tumoral-alfa (TNF-α).

Para valorar la capacidad anti-inflamatoria de los distintos tratamientos, células incubadas con LPS y con una respuesta inflamatoria previamente caracterizada se trataron con los distintos compuestos. Tras 24 h de incubación a 37°C, se volvieron a valorar los niveles de expresión, supuestamente reducidos por el efecto de los tratamientos, de las distintas citoquinas pro-inflamatorias mediante PCR cuantitativa (qPCR), utilizando primers específicos. En todos los casos se realizaron al menos tres ensayos independientes cada uno de ellos por triplicado.

3. Evaluación del stress oxidativo producido por el extracto total y del producto final en la línea celular monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. En este sentido, para valorar la capacidad anti-oxidante de los distintos tratamientos, fibroblastos de pulmón pre-tratados durante 2 h con los distintos compuestos se co-incubaron con peróxido de hidrogeno. Tras 24 h incubación a 37°C, se cuantificó la producción de especies reactivas de oxígeno utilizando la sonda fluorimetrica dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y matar a los patógenos. En este sentido, se analizó la producción de radicales libres después de tratar las células monocito-macrófago de sangre periférica con el extracto total o producto final. Para ello se utilizó la sonda fluorimetrica dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En todos los casos se realizaron al menos tres ensayos independientes cada uno de ellos por triplicado.

4. Evaluación del efecto antiviral producido por el extracto total y del producto final en la línea celular monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

La evaluación de la capacidad antiviral del extracto total y del producto final se llevó a cabo mediante el análisis de la producción de Mx, una proteína inducida por interferon en la respuesta de defensa antiviral del hospedador. Para ello, se midió la cantidad de mx producida por las células indicadas después del tratamiento con el extracto total y el producto final mediante qPCR, utilizando primers específicos. En todos los casos se realizaron al menos tres ensayos independientes cada uno de ellos por triplicado.

5. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto total y del producto final en E.coli

Los ensayos para valorar la capacidad antibacteriana del extracto total y del producto final se llevaron a cabo utilizando la cepa BL-21 (DE3) de la bacteria E. coli. Los ensayos se realizaron a partir de una única colonia de E. coli BL-21 (DE3) crecida en medio LB a 37°C 12-16h. Una alícuota de este cultivo se transfirió a medio LB fresco (dilución 1/1000) y se dejó crecer durante 3h a 37°C para alcanzar la fase logarítmica. Finalmente, se medirá la DO a 620 nm y se determinó el número de ufc/ml mediante recuento de colonias en placas de LB-agar.

RESULTADOS

1. Evaluación de la proliferación y viabilidad celular del extracto total y del producto final en la línea celular monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

En la Figura 1 se puede observar como en SC, el extracto sólo no genera citotoxicidad en las células a ninguna de las concentraciones analizadas. Sin embargo, el extracto combinado con vitaminas genera citotoxicidad en ambas líneas celulares a concentraciones superiores a 0,05 mg/ml.

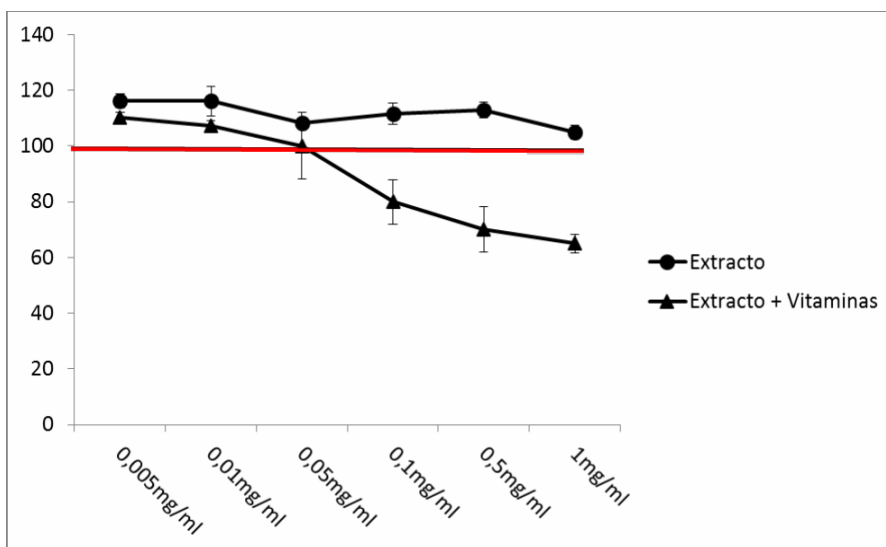


Figura 1: Viabilidad celular en monocito-macrófago humanos (SC) tratados con el extracto sólo y combinado con vitaminas, a distintas concentraciones, evaluado mediante MTT. La línea en el valor 100 del eje Y indica la proliferación en las células control.

2. Evaluación de la capacidad anti-inflamatoria del extracto total y del producto final en las líneas celulares monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

En **monocito-macrófago humanos (SC)** hemos observado igualmente una respuesta anti-inflamatoria generada por el tratamiento con el extracto sólo o combinado con vitaminas, después de haber inducido una **inflamación** tanto **leve** como **aguda con LPS**. En ambos casos, hemos observado un aumento dosis-dependiente de los niveles de transcritos de la citoquina anti-inflamatoria IL10 (Figura 2 y 3). Por otro lado, igualmente hemos observado un aumento dosis-

dependiente de los niveles de transcritos de la quimioquina IL8, quimiotáctico de neutrófilos (Figura 2 y 3), en las células tratadas con el extracto sólo o combinado con vitaminas.

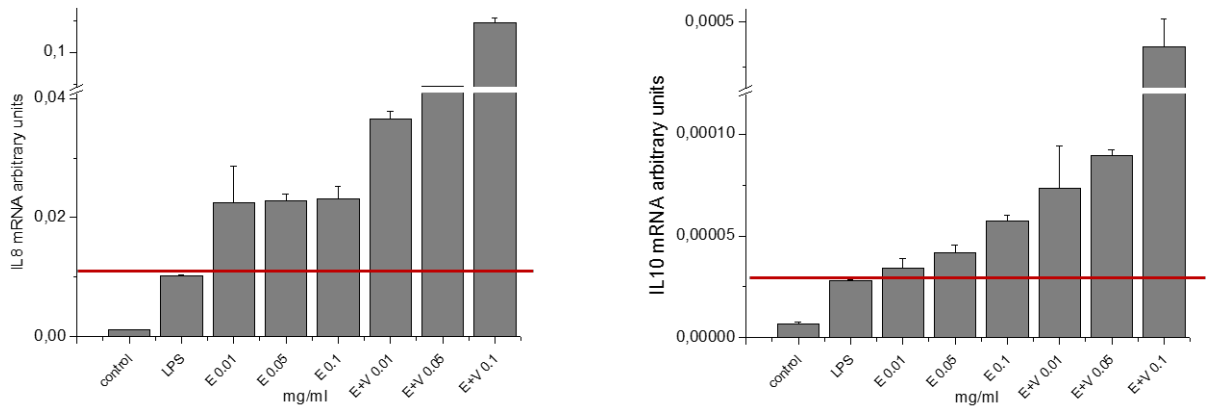


Figura 2: Síntesis de IL8 (quimioquina, quimiotáctico de neutrófilos) e IL10 (citoquina anti-inflamatoria) en **monocito-macrófagos humanos (SC)**, tratados con el extracto sólo (E) o combinado con vitaminas (Ev), a distintas concentraciones (mg/ml), tras inducir una **inflamación leve con LPS**. La síntesis de IL8 e IL10 fue estimada mediante la medición de transcritos de estos genes por PCR cuantitativa. La línea roja indica la expresión de los genes en las células tratadas con LPS.

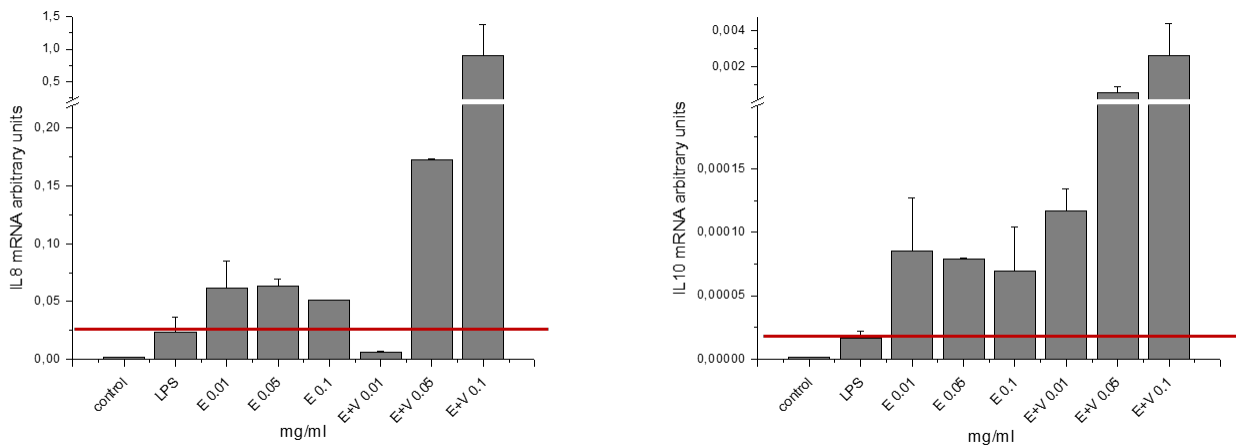


Figura 3: Síntesis de IL8 (quimioquina, quimiotáctico de neutrófilos) e IL10 (citoquina anti-inflamatoria) en **monocito-macrófagos humanos (SC)**, tratados con el extracto sólo (E) o combinado con vitaminas (Ev), a distintas concentraciones (mg/ml), tras inducir una **inflamación aguda con LPS**. La síntesis de IL8 e IL10 fue estimada mediante la medición de transcritos de estos genes por PCR cuantitativa. La línea roja indica la expresión de los genes en las células tratadas con LPS.

Igualmente, hemos observado una disminución de la inflamación, es decir de los niveles de transcritos de IL1beta, TNFalfa y COX-2, tres moléculas pro-inflamatorias, en las células tratadas con el extracto sólo, después de haber inducido una inflamación tanto leve como aguda con LPS (Figura 4 y 5). Sin embargo, las células tratadas con el extracto combinado con vitaminas, después de inducir una inflamación leve, muestran un aumento de la expresión de IL1beta y COX-2 a las concentraciones más altas.

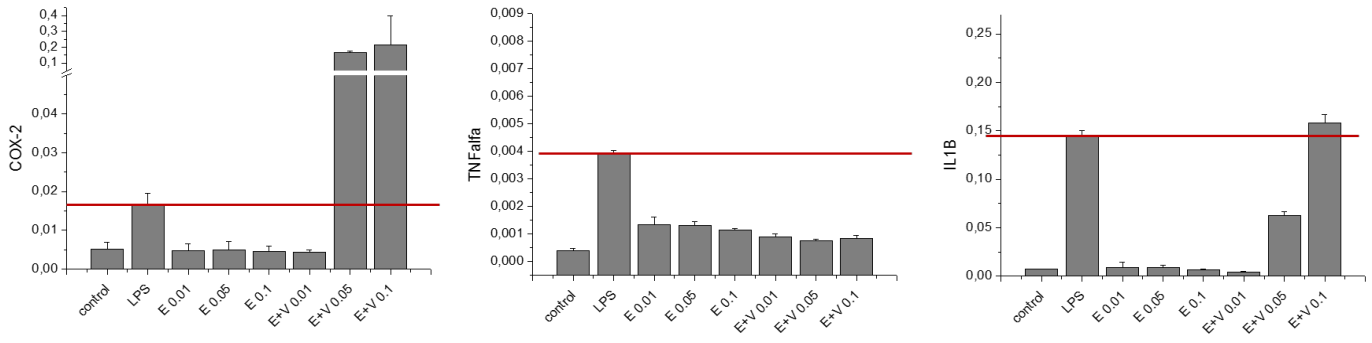


Figura 4: Síntesis de COX-2 (enzima pro-inflamatoria), TNF α (citoquina pro-inflamatoria) e IL1beta (citoquina pro-inflamatoria) en **monocito-macrofagos humanos (SC)**, tratados con el extracto sólo (E) o combinado con vitaminas (Ev), a distintas concentraciones (mg/ml), mientras se induce una **inflamación leve con LPS**. La síntesis de IL1beta y COX-2 fue estimada mediante la medición de transcritos de estos genes por PCR cuantitativa. La línea roja indica la expresión de los genes en las células tratadas con LPS.

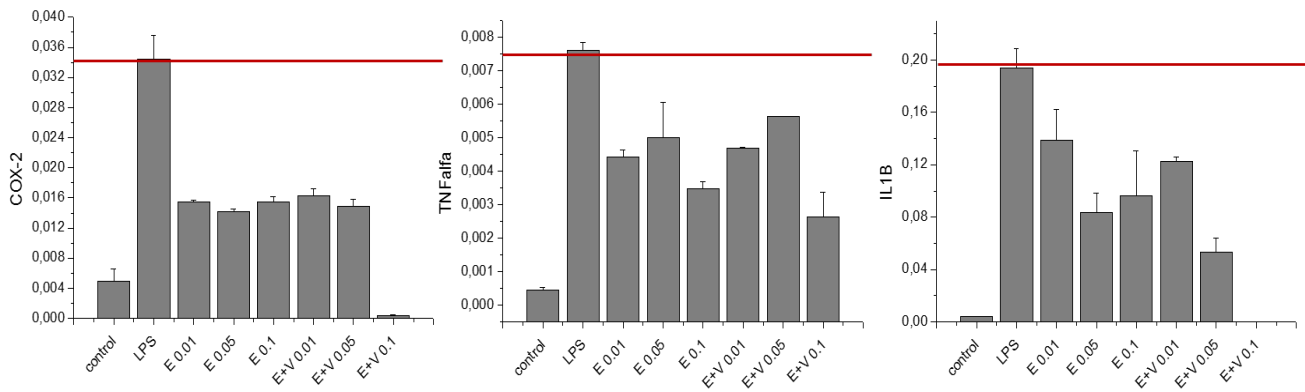


Figura 5: Síntesis de COX-2 (enzima pro-inflamatoria), TNF α (citoquina pro-inflamatoria) e IL1beta (citoquina pro-inflamatoria) en **monocito-macrofagos humanos (SC)**, tratados con el extracto sólo (E) o combinado con vitaminas (Ev), a distintas concentraciones (mg/ml), mientras se induce una **inflamación aguda con LPS**. La síntesis de IL1beta y COX-2 fue estimada mediante la medición de transcritos de estos genes por PCR cuantitativa. La línea roja indica la expresión de los genes en las células tratadas con LPS.

En resumen, los resultados obtenidos nos indican el efecto anti-inflamatorio del extracto sólo o combinado con vitaminas, en monocito- macrófagos humanos.

3. Evaluación del stress oxidativo producido por el extracto total y del producto final en las líneas celulares monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

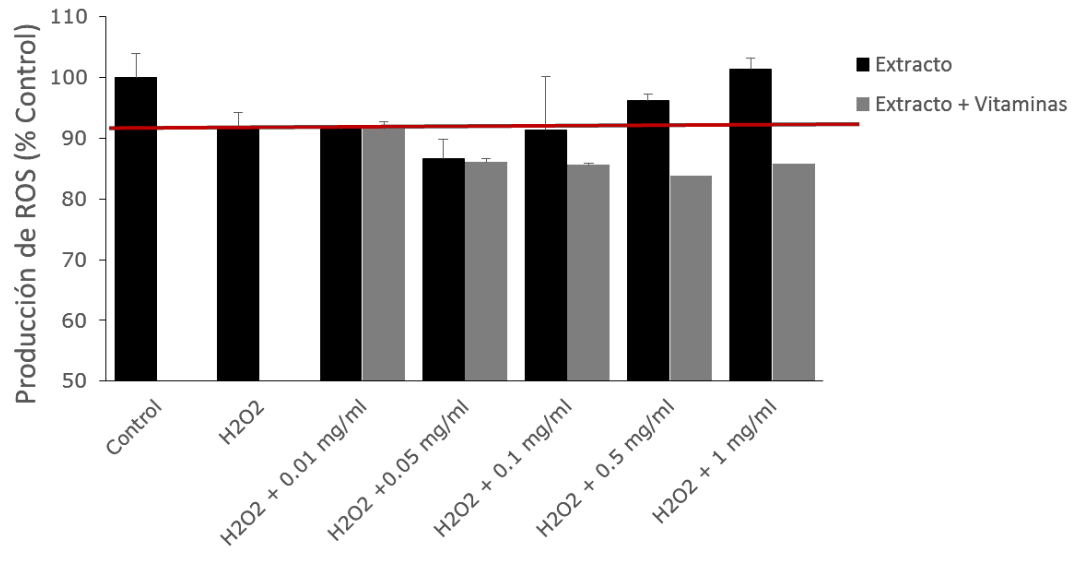


Figura 6: Efecto antioxidante del extracto sólo o con vitaminas en monocito-macrófagos humanos (SC). Las células fueron tratadas sin (control) o con varias concentraciones del extracto durante 2 horas y a continuación se le añadió el H₂O₂ a 400 µM y las células se incubaron por 22 horas. El efecto anti-oxidante se midió mediante la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) utilizando la sonda fluorimétrica dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA).

En la figura 6 podemos observar que en **monocito-macrófagos humanos (SC)** el extracto disminuye ligeramente la producción de ROS inducida por el tratamiento con H₂O₂, a bajas concentraciones del extracto. Sin embargo, a concentraciones altas (a partir de 0,5 mg/ml) el extracto es ligeramente pro-oxidante. Por otro lado, la figura 11 también muestra que el extracto combinado con vitaminas disminuye la producción de ROS de forma dosis-dependiente.

4. Evaluación del efecto antiviral inducida por el extracto total y del producto final en las líneas celulares monocito- macrófago de sangre periférica (SC / CRL-9855).

el extracto combinado con vitaminas induce la síntesis de transcritos de Mx en monocito-macrófagos

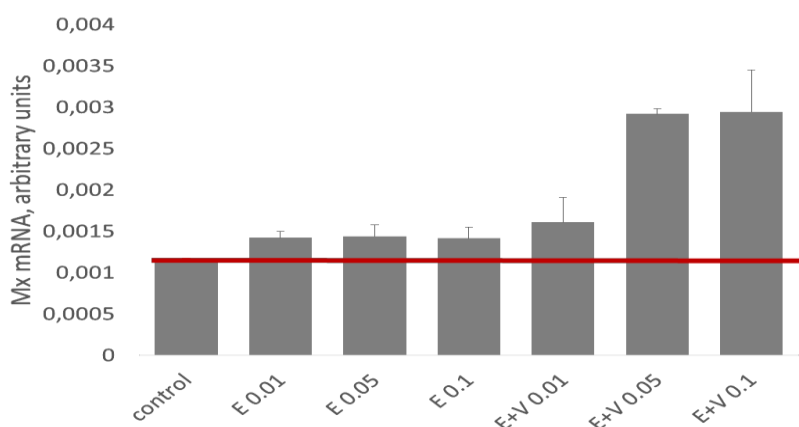


Figura 7: Síntesis de Mx en **monocito-macrófagos humanos (SC)**, tratados con el extracto sólo (E) o combinado con vitaminas (Ev), a distintas concentraciones (mg/ml). La síntesis de Mx fue estimada mediante la medición de transcritos de estos genes por PCR cuantitativa. La línea roja indica la expresión de Mx en las células sin tratar.

5. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto total y del producto final en E.coli

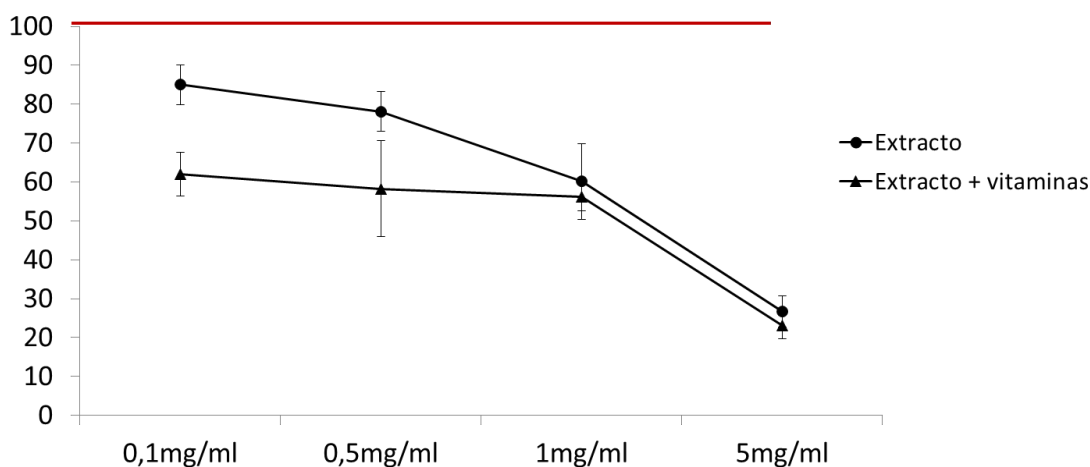


Figura 8: Actividad anti-bacteriana del extracto sólo o combinado con vitaminas a distintas concentraciones. La línea en el valor 100 del eje Y indica la proliferación en las bacterias control (sin tratar).



CONCLUSIONES

- El extracto total no genera citotoxicidad SC a concentraciones entre 0.005 y 1 mg/ml. Sin embargo, el extracto con vitaminas genera citotoxicidad a concentraciones superiores a 0,05 mg/ml.
 - Tanto el extracto sólo como el extracto combinado con vitaminas exhiben una actividad anti-inflamatoria.
 - Se observa una ligera actividad anti-oxidante del extracto en monocito-macrófagos a las concentraciones inferiores. Por otro lado el extracto con vitaminas y anti-oxidante en monocito-macrófagos, a todas las concentraciones analizadas.-
- El extracto sólo y combinado con vitaminas muestra una actividad anti-viral y antibacteriana.



