



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD  
XOCHIMILCO**

**División: Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos  
Licenciatura Químico Farmacéutico biológico**

**Viabilidad de células de médula ósea murina en  
presencia de extracto total proteico de *Candida  
albicans*.**

**Proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios  
activos, medicamentos y productos biológicos.**

**Alumna: Madeleyne Bravo Santiago**

**Matricula: 2132044389**

**Asesores: M en C. Alejandro Palma Ramos**

**M en C. Felipe Mendoza Pérez**

**Lugar de realización: UAM-X, laboratorio de inmunología UIDIS**

**Fecha de inicio y terminación: 10/Sep/2018 – 10/Mar/2019**

## Índice

1. Introducción	3
2. Justificación	4
3. Marco teórico	4
3.1 Sistema Inmunológico	4
3.2 Células que conforman el sistema inmune.	5
3.3 Aspectos fundamentales que los definen	6
3.3.1 Linfocitos B.	6
3.3.2 Linfocitos T.	7
3.4 Antígeno	8
3.5 <i>Candida albicans</i>	8
3.6 Candidina	9
3.7 Conteo celular y evaluación de viabilidad	9
4. Objetivo general	10
5. Objetivos específicos	10
6. Materiales y Método	10
6.1 Purificación de proteínas	10
6.2 Obtención de células murinas (linfocitos T y B) de medula ósea de ratón hembra cepa CD1	10
6.3 Cultivo celular, condiciones y concentraciones finales de los antígenos.	11
6.4 Conteo celular y evaluación de viabilidad	11
6.4.1 Cálculos	11
7. Resultados	12
Tabla 1. Control de células médula ósea murina.	12
Tabla 2. Promedio Control de células viables	13
<b>Gráfica 1.</b> Promedio del control de células viables en %.	13
<b>Gráfica 2.</b> Promedio del control de mortalidad celular en %.	14
Tabla 3. Viabilidad y mortalidad de células de medula ósea murina en presencia de candidina (1mg/ml) durante 48 horas.	14
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de viabilidad de células de medula ósea murina en presencia del péptido (1 mg/mL).	15
<b>Gráfica 4.</b> Control en % de mortalidad celular en presencia del péptido (1mg/mL).	15
Tabla 4. Viabilidad y mortalidad de células de medula ósea en presencia de los péptidos (candidina) a 0.5 mg/mL.	16
<b>Gráfica 5.</b> Porcentaje de viabilidad celular en presencia del péptido (0.5 mg/mL).	16

<b>Gráfica 6.</b> Control en % de mortalidad celular en presencia del péptido (0.5 mg/mL).	17
Tabla 5. Viabilidad y mortalidad de células de médula ósea murina en presencia de candidina (0.25 mg/mL).	17
<b>Gráfica 7.</b> Porcentaje de viabilidad celular en presencia del péptido (0.25mg/mL)	18
<b>Gráfica 8.</b> Porcentaje de mortalidad de células de médula ósea murina en presencia del péptido (0.25mg/mL).	18
Tabla 6. Viabilidad y mortalidad de células de médula ósea murina en presencia de candidina (0.125 mg/mL).	19
<b>Gráfico 9.</b> Porcentaje de viabilidad de celular de médula ósea murina en presencia del péptido a 0.125mg/mL.	19
<b>Gráfica 10.</b> Porcentaje de mortalidad de célula de médula ósea murina en presencia del péptido (0.125mg/mL).	20
8. Discusión	20
9. Conclusión	21
10. Referencias	21

## 1. Introducción

El sistema inmunológico es la defensa natural del cuerpo contra las infecciones. Por medio de una serie de pasos, el cuerpo combate y destruye organismos infecciosos invasores antes de que causen daño. Cuando el sistema inmunológico está funcionando adecuadamente, protege de infecciones que le causan enfermedad al hospedero. (Ramírez Navas, 2008)

El Sistema Inmunitario para poder realizar sus funciones de defensa y protección, está constituido por una variedad de células morfológica y funcionalmente diferentes, que se originan a partir de células primordiales pluripotenciales, que derivan de células pluripotentes de la médula ósea, órgano en que ocurre la hematopoyesis, proceso por el cual se forman, diferencian y maduran las células sanguíneas. (González Hernández, 2000)

La hematopoyesis ocurre en el hígado y el bazo del feto, a partir del nacimiento se suspende este proceso en estos órganos y se incrementa en la médula ósea. En la médula ósea las células hematopoyéticas se distribuyen en tres compartimientos morfofuncionales, que da origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfoide, después de un proceso de diferenciación y maduración se originan los linfocitos T y linfocitos B. En el proceso de diferenciación y maduración de las diferentes líneas celulares, participan varios factores de maduración y citocinas secretadas por células del estroma. (Abbas AK, 1995)

Los linfocitos, junto con las células presentadoras de antígeno (CPA) son la base celular de la respuesta inmune específica. Se dividen en tres grupos funcionales diferentes: los linfocitos T (LT) que participan en la inmunidad adquirida de tipo celular, los linfocitos B (LB) que participan en la inmunidad adquirida de tipo humoral y las células NK ("Natural Killer") que no expresan marcadores de células T ni de células B y que participan en la inmunidad natural o innata. (González Hernández, 2000).

En ambos casos la maduración implica una etapa independiente de antígeno, que ocurre en la médula ósea (línea B) y en el timo (línea T), y una etapa dependiente de antígeno que en ambas líneas celulares ocurre en los órganos linfoides. (González Hernández, 2000)

Un antígeno es una sustancia o macromolécula extraña que penetra o es introducida en el organismo, en el cual provoca una respuesta inmune dando lugar a la producción de otras macromoléculas denominadas anticuerpos (respuesta inmune humoral) o a la proliferación de células sensibilizadas (respuesta inmune celular), con los que reacciona específicamente. (Vega Robledo, 2009)

*Candida* origina en el hospedero una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral y celular que, junto con mecanismos de defensa inespecíficos, dificulta la invasión a los tejidos superficiales y profundos por este agente; esta respuesta inmune está presente en la mayoría de las personas sanas. (López Martínez, 2016)

La Candidina es el extracto total obtenido de *Candida albicans*, y es la conjunción de proteínas de superficie e internas que se utiliza en la reacción intradérmica para el estudio de hipersensibilidad tardía. Se ha demostrado que *C. albicans* o sus diferentes antígenos estimulan la respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro*. Se han realizado estudios de los principales componentes manoproteicos de *C. albicans* implicados en la inmunomodulación de las defensas del huésped. Entre las presentes en el extracto ácido se encuentra una proteína de 65 K Da (MP65), que es el principal blanco sobre el que se monta una respuesta por parte de las células T, esencial en la defensa contra infecciones causadas por *Candida albicans*. (Palma RA, 2012)

## 2. Justificación

Debido a que monta una respuesta inmunológica se busca observar si las células de médula ósea resisten la presencia del extracto total proteico de *C. albicans* para posteriormente hacer estudios y observar si el extracto total de *C. albicans* estimula la maduración de linfocitos T y B.

## 3. Marco teórico

### 3.1 Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico es la defensa natural del cuerpo contra las infecciones. Por medio de una serie de pasos, el cuerpo combate y destruye organismos infecciosos invasores antes de que causen daño. Cuando el sistema inmunológico está funcionando adecuadamente, protege de infecciones que le causan enfermedad al hospedero. (Ramírez Navas, 2008)

El Sistema Inmunitario para poder realizar sus funciones de defensa y protección, está constituido por una variedad de células morfológica y funcionalmente diferentes, que se originan a partir de células primordiales pluripotenciales, que derivan de células

pluripotentes de la médula ósea, órgano en que ocurre la hematopoyesis, proceso por el cual se forman, diferencian y maduran las células sanguíneas. (González Hernández, 2000)

La hematopoyesis ocurre en el hígado y el bazo del feto, a partir del nacimiento se suspende este proceso en estos órganos y se incrementa en la médula ósea. En la médula ósea las células hematopoyéticas se distribuyen en tres compartimientos morfofuncionales, que da origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfoide, después de un proceso de diferenciación y maduración se originan los linfocitos T y linfocitos B. En el proceso de diferenciación y maduración de las diferentes líneas celulares, participan varios factores de maduración y citocinas secretadas por células del estroma. (Abbas AK, 1995)

Desde el punto de vista de sus características estructurales podemos encontrar órganos como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos que se encuentra intercomunicando algunos de los órganos mencionados. Si se toma en cuenta las funciones que realizan, entonces se pueden clasificar dichos órganos en primarios y secundarios. En los primeros tienen lugar la generación de las células que conforman al sistema inmune (linfopoyesis) y además existe un microambiente idóneo de modo que los linfocitos adquieren su repertorio de receptores específicos para cada tipo de antígeno. Mientras que los segundos se encargan de hospedar las células capacitadas funcionalmente para interactuar con microorganismo o antígeno, atrapados por estos órganos, en un entorno adecuado para que las mismas interactúen con dichos agentes extraños al organismo y lo eliminen.

Estos órganos están interconectados por vasos sanguíneos y vasos linfáticos, de forma tal que constituyen un sistema unitario, entrelazado y bien comunicado. Estos vasos transportan las células del sistema inmune, de las cuales el actor principal es el linfocito.

### 3.2 Células que conforman el sistema inmune.

Células linfoides: desde el punto de vista funcional podemos encontrar tres tipos de células linfoides; los linfocitos originados de la médula ósea, linfocitos B, los que se originan del Timo, los linfocitos T y las células asesinas naturales o comúnmente denominadas NK ( del inglés Natural Killer).

Los linfocitos T y B son los responsables de la respuesta inmune específica.

Estas células en su estado de no contacto con el antígeno (Ag) se denominan vírgenes, son pequeñas de aproximadamente unos 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, con poco citoplasma, el cual forma un anillo estrecho alrededor del núcleo de cromatina condensada; poseen escasas mitocondrias, y un retículo endoplásmico y complejo de Golgi pobremente desarrollados. Esta variante celular en ausencia del Ag específico, tienen una vida corta, entre unos días a unas pocas semanas y son eliminados mediante una muerte celular programada.

En cambio sí se ponen en contacto con el antígeno a partir de sus receptores específicos, salen de la fase G0 y entran en el ciclo celular (G0, G1, S, G2 y M). en la fase G2 corresponden a los denominados linfoblastos: aumentan su tamaño (15 $\mu\text{m}$ ), el núcleo se vuelve de cromatina laxa, aparece un nucléolo patente y la proporción del citoplasma con relación al núcleo se hace mayor, donde se puede observar la presencia de retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi, así como abundantes mitocondrias. Estos linfoblastos proliferan y finalmente se diferencian en dos subpoblaciones:

1. **Células efectoras**, de vida corta, con RER bien desarrollado en capas concéntricas y vesículas de Aparato de Golgi.
2. **Células de memoria**, que están en G0, con vida larga (algunas duran toda la vida del individuo).

Sin embargo a pesar de las características morfológicas semejantes de estos dos tipos de linfocitos, existen otros aspectos que los diferencian, como lo son los denominados grupos de diferenciación más conocidos como los CD (del inglés Clúster of Differentiation) y las funciones que ellos realizan.

### 3.3 Aspectos fundamentales que los definen

**3.3.1 Linfocitos B.** Reconocen al antígeno en forma soluble, por medio de sus inmunoglobulinas de membrana (mIg), que forman parte del complejo receptor de las células B (BCR). En cada linfocito hay unas 150,000 moléculas de mIg que han sido sintetizadas por él. Todas estas moléculas poseen la misma especificidad antigénica.

En ausencia de estímulo antigénico, estos linfocitos B maduros vírgenes mueren por apoptosis al cabo de unos pocos días. Si, en cambio, se une por sus BCR al Ag complementario específico, se pone en marcha la selección y proliferación clonal, que termina (al cabo de 4-5 días) con la diferenciación de dos subpoblaciones : una de células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Ac), y otra de células B de memoria.

Las transformaciones este linfocito en célula plasmática trae como consecuencia un cambio evidente en sus características morfofuncionales lo cual se pone de manifiesto en que:

1. Carecen de inmunoglobulina de membrana.
2. Son mayores y con más proporción de citoplasma que las B que las proceden.
3. SU RER está muy desarrollados, así como su aparato de Golgi. Esto lo explica la gran cantidad de Ac secretados que producen; esos anticuerpos poseen la misma especificidad antigénica que la de las mlg de la célula B original.
4. No circulan por la sangre ni por los vasos linfáticos, si no que se localizan en los órganos linfoides secundarios u los lugares de la respuesta inmunológica.
5. Viven pocos días; al ser células en fase de diferenciación terminal, carecen de capacidad mitótica, y mueren por apoptosis.

**3.3.2 Linfocitos T.** poseen un receptor de membrana (TCR) asociado no covalentemente al llamado complejo CD3, lo que conjuntamente se denomina complejo receptor de las células T existen dos tipos de TCR, que definen dos poblaciones diferentes de linfocitos T, las denominadas TCR2 ( $\gamma\delta$ ) y TCR1 ( $\alpha\beta$ ).

La mayoría (85%) de las células T poseen el TCR2, y a su vez se pueden decidir en dos tipos:

Las TCR2 CD4+ denominadas células auxiliaoras o cooperadoras (TH), las cuales reconocen al antígeno expuesto en el complejo de histocompatibilidad mayor tipo II (MHC-II) presentes en las células presentadoras de antígeno, lo que desencadena su activación, secretando citoquinas, las cuales a su vez juegan un papel clave en la activación de otras células (B, T, etc.). A microscopio, la mayoría muestran el llamado corpúsculo de Gall (un grupo de lisosomas primario junto con gotitas de lípidos).

La otra población son las TCR2 CD8+ que generalmente funcionan como células T citotóxicas. Un 65% de ellas poseen cuerpo de Gall. Reconocen al antígeno expuesto en moléculas de complejo de histocompatibilidad mayor tipo I (MHC-I) de aquellas células infectadas con virus o cancerosas, lo cual, junto con las señales adecuadas de citoquinas, provoca la activación y proliferación clonal, con diferenciación a linfocitos T catalíticos (CTL), que eliminan a las células propias enfermas.

De igual manera que el caso de los linfocitos B, paralelamente a la activación, proliferación y diferenciación, tiene lugar una subpoblación de linfocitos de memoria.



Los linfocitos TCR1 solo corresponden al 15% de los T totales, no son circulantes, se localizan en ciertos epitelios. Al parecer están especializados en reconocer ciertos patógenos como por ejemplo. Las micobacterias, que tienden a entrar por las mucosas.

Los linfocitos T intervienen en la respuesta denominada celular.

### 3.4 Antígeno

Un antígeno es una sustancia o macromolécula extraña que penetra o es introducida en el organismo, en el cual provoca una respuesta inmune dando lugar a la producción de otras macromoléculas denominadas anticuerpos (respuesta inmune humoral) o a la proliferación de células sensibilizadas (respuesta inmune celular), con los que reacciona específicamente. (Vega Robledo, 2009)

Composición: Las proteínas son las que originan una mejor respuesta, que son potentes estimuladoras de las células T a su vez los polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos casi no se unen a MHC, lo que disminuye su potencia.

Peso molecular. Es importante el tamaño (superior a 80 Kda), polisacáridos de alto peso molecular frecuentemente resultan inmunogénicos; sin embargo, existen moléculas grandes poco complejas y consecuentemente menos potentes. Por el contrario. Otras de menor tamaño pero con una gran complejidad estructural son más efectivas; los lípidos y ácidos nucleicos tienen una menor complejidad que las proteínas y los carbohidratos.

La cantidad de este que interacciona con el individuo, es de vital importancia, ya que dosis pequeñas o muy elevadas inducen tolerancia o respuestas alteradas, Influye también en su efectividad la frecuencia de exposición a las moléculas.

### 3.5 *Candida albicans*

Es considerada un hongo patógeno oportunista en mamíferos, entre ellos el hombre, que puede causar varias formas de candidiasis, desde infecciones superficiales en mucosas hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida, predominantemente, en individuos con el sistema inmune debilitado.

Es un hongo dimorfo perteneciente al Phylum Ascomycota, que presenta pseudohifas, hifas y blastoconidios subséricos, este saprofito coloniza la vagina y los tractos digestivos y respiratorios humanos. Puede infectar la piel, uñas y membranas mucosas, pero la presentación diseminada que se desarrolla en pacientes inmunodeprimidos es la más seria.

El género *Candida* incluye aproximadamente a 154 especies, entre ellas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos siendo *C. albicans* la más relevante en términos de patogenicidad. (Pfaller y Diekema, 2007)

### 3.6 Candidina

Las levaduras del género *Candida* son hongos con los que el hombre tiene contacto en su edad más temprana, desde el alumbramiento por el paso a través del canal del parto o bien, con los primeros contactos maternos; a partir de ese momento, *Candida* formará parte de la biota normal de mucosas y piel durante toda la vida.

La absorción continua de los antígenos de *Candida* origina en el hospedero una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral y celular que, junto con mecanismos de defensa inespecíficos, dificulta la invasión de los tejidos superficiales y profundos por este agente; esta respuesta inmune está presente en la mayoría de las personas sanas. La IgG anti-*Candida* puede ser demostrada mediante la técnica de ELISA, mientras que la existencia de células sensibilizadas contra este antígeno se puede poner en evidencia con la aplicación intradérmica del antígeno (*candidina*), *Candidina* es el extracto total obtenido de *Candida albicans*, y es la conjunción de proteínas de superficie e internas que se utiliza en la reacción intradérmica (reacción de hipersensibilidad tardía local palpable y medible).

Se ha demostrado que *C. albicans* o sus diferentes antígenos estimulan la respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro*, esto depende en gran parte del grado de compatibilidad genética de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos. Se han realizado estudios de los principales componentes manoproteicos de *C. albicans* implicados en la inmunomodulación de las defensas del huésped. Entre las presentes en el extracto ácido se encuentra una proteína de 65 K Da (MP65), que es el principal blanco sobre el que se monta una respuesta por parte de las células T, esencial en la defensa contra infecciones causadas por *Candida albicans*. (Palma RA, 2012)

### 3.7 Conteo celular y evaluación de viabilidad

El azul tripano es un colorante sintetizado por primera vez en 1904 por el científico alemán Paul Ehrlich. Utilizado para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas. Las células viables, con membrana intacta, no se incorporan el

azul de tripano, por el contrario, si atraviesa la membrana de las células muertas, se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio.

#### 4. Objetivo general

1. Observar la viabilidad de células de médula ósea murina en presencia de diferentes concentraciones de extracto total proteico de *Candida albicans* (candidina).

#### 5. Objetivos específicos

1. Obtención de candidina en medio RPMI a concentraciones de 1mg, 0.5mg, 0.25mg, 0.125mg.
2. Obtención de cultivos primarios de médula ósea murina.
3. Estudio de la viabilidad de las células de médula ósea murina.
4. Estudio de la viabilidad de las células de médula ósea murina, estimulados con candidina a diferentes concentraciones (1mg, 0.5mg, 0.25mg, 0.125mg).

#### 6. Materiales y Método

##### 6.1 Purificación de proteínas

El crecimiento de *Candida albicans* (ACC 10231) se efectuó en medio de Sabouraud durante 5 días a 37°C. Se centrifugó y se preparó la biomasa del medio y se procedió a la sonicación que consta de periodos de 15 minutos de sonicación y 15 minutos de descanso, temperatura a 40°C, amplitud 70%, pulsos 59 segundos de sonicación x 59 segundos de descanso, lo que se denomina un ciclo. Se realizaron 5 ciclos diarios durante 5 días. Se centrifugo, y al sobrenadante se le precipitaron las proteínas con solución saturada de sulfato de amonio, diluyendo con la muestra hasta 50% de saturación. Se mantuvo durante 24 horas, se centrifugó y se re suspendió el precipitado en 3mL de agua; después se dializó contra solución salina-reguladora de boratos pH8.4 durante 48 horas, se congeló en un ultra congelador 24 horas y posteriormente se liofilizó por otras 24 horas. Se determinó la concentración de proteínas con el método de Lowry y se ajustó el antígeno con una concentración de 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL; a esto se le llamo extracto total.

##### 6.2 Obtención de células murinas (linfocitos T y B) de medula ósea de ratón hembra cepa CD1

De manera aséptica, se transfieren 3mL se solución de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) a un tubo de centrifugado de 15 mL. Se mezclan células de la médula ósea, recogido

anteriormente con solución Alserver a un volumen final de 2 mL y se vierte cuidadosamente sobre los 3mL de Lymphoprep a temperatura ambiente en un tubo de centrifuga de 15mL. Después se centrifuga el tubo a 400 xg a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos. Se retira la capa de plasma hasta aproximadamente 2 o 3 mL antes de la capa de mononucleares, y posteriormente también se retira esta junto con la mitad del volumen del medio de separación restante y se transfieren a un tubo de centrifuga se adiciona un volumen igual de solución Alserver a la capa de linfocitos y se centrifuga 10 minutos a temperatura ambiente a una velocidad suficiente para sedimentar sin dañar a las células. Se lavan las células nuevamente con la solución Alserver y se resuspenden en medio RPMI ajustando a  $10^6$  cel/mL.

### 6.3 Cultivo celular, condiciones y concentraciones finales de los antígenos.

La incubación de las células de medula ósea murina con el antígeno se realiza en un medio de RPMI 1640 enriquecido con suero de ternera al 10% y mezcla de antibióticos a 0.1% (5,000 unidades de penicilina y 5 mg de estreptomycin en cloruro de sodio a 0.9%, Sigma Cell culture) en atmosfera parcial de CO<sub>2</sub> a 5%, a una temperatura de 37°C tomando alícuotas de 50µL de muestra a las 0, 12, 24, 48, 72 horas.

Se colocaron 1mL de la suspensión de células murinas en un pozo de una caja de cultivo de células de 12 pozos. Después se preparó una solución de 1 mg/mL y se colocaron 0.5 mL, 0.25 mL, 0.125 mL en 0.5 mL, 0.75 mL, 0.875 mL, de medio, de las soluciones previamente preparadas de péptido liberado al medio, extracto total o mezcla de ambas muestras, las concentraciones finales para los antígenos fueron de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL; extracto total /medio.

Se utilizaron como testigo positivo tiempo cero de los cultivos.

### 6.4 Conteo celular y evaluación de viabilidad

Se tomó una alícuota de 50 µL de células a evaluar, posteriormente se le agrega 50 µL de azul tripano diluido al 4%, se mezcla, se colocan 10 µL en la cámara de Neubauer y se observa al microscopio.

#### 6.4.1 Cálculos

Para calcular la concentración celular presente en la suspensión celular original

Concentración = cuenta células vivas/4x factor de dilución x 10000.

Para calcular viabilidad celular (expresada como el porcentaje de células que están vivas):

Número total de células vivas (blancas) ÷ número total de células muertas y vivas (tanto azules como blancas) x 100.

## 7. Resultados

Se utilizó como control, células de médula ósea murina sin péptidos, y se realizó la cuenta celular a los tiempos, 0, 24, 48, 72, y 96 horas. En la tabla 1 se presentan los resultados.

Tabla 1. Control de células médula ósea murina viables.

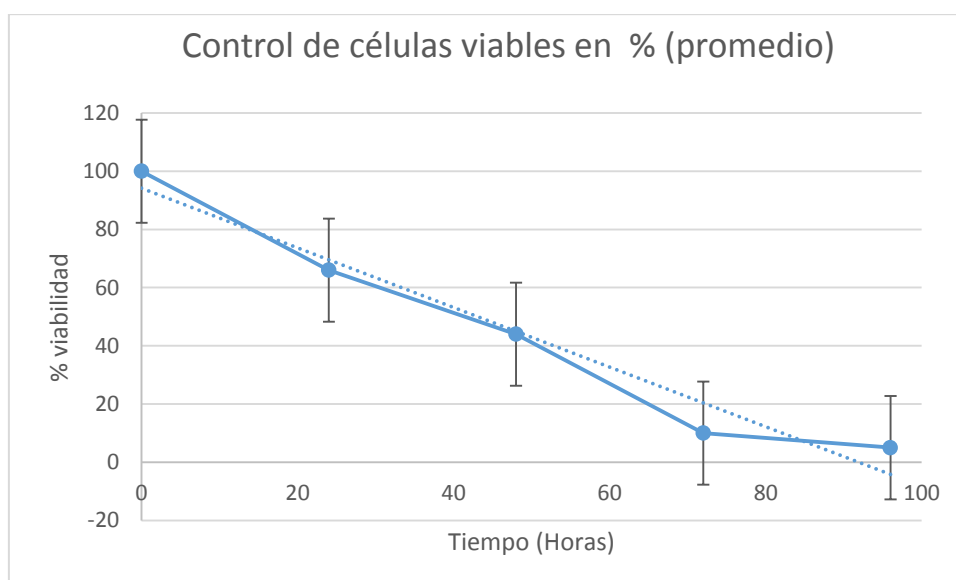
<b>Prueba 1</b>			
<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>Concentración celular cel/mL</b>	<b>% de viabilidad</b>	<b>% mortalidad</b>
<b>0</b>	320000	100	0
<b>24</b>	190000	59	41
<b>48</b>	144000	45	55
<b>Prueba 2</b>			
<b>0</b>	2370000	100	0
<b>24</b>	1280000	54	46
<b>48</b>	910000	38	62
<b>72</b>	200000	8	92
<b>96</b>	140000	5	95
<b>Prueba 3</b>			
<b>0</b>	2160000	100	0
<b>24</b>	1705000	78	22
<b>48</b>	720000	33	67
<b>72</b>	230000	10	90
<b>96</b>	60000	3	97
<b>Prueba 4</b>			
<b>0</b>	2860000	100	0
<b>24</b>	2090000	73	27
<b>48</b>	1720000	60	40
<b>72</b>	350000	12	88
<b>96</b>	170000	6	94

La tabla 2, presenta el tiempo de viabilidad de las células murinas de médula ósea (Promedio de cuatro pruebas) en donde a las 24- 48 horas se obtiene un promedio de 66 – 44 % de células viables.

Tabla 2. Promedio Control de células médula ósea viables

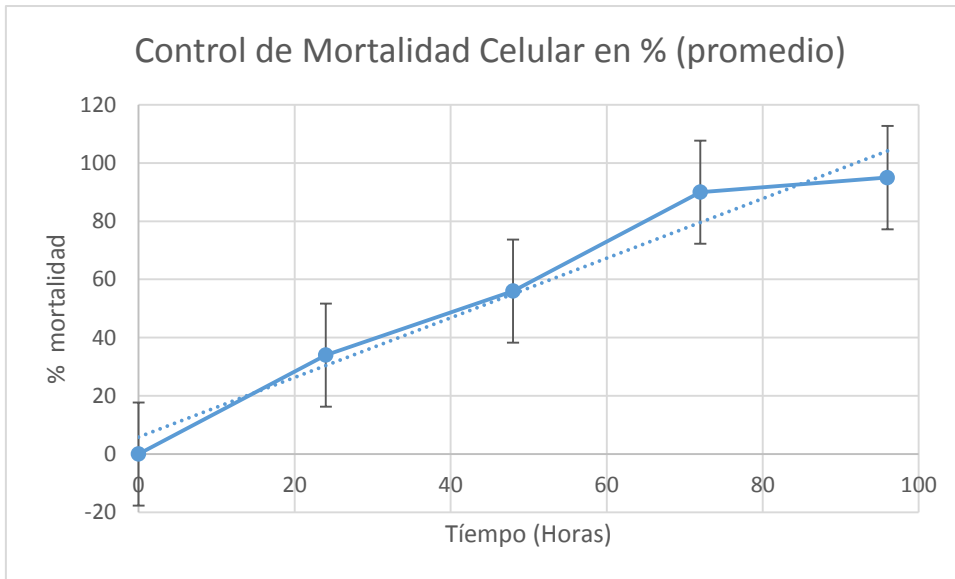
Tiempo (Horas)	Concentración celular cel/ mL	% de viabilidad celular	% de mortalidad celular
0	1927500	100	0
24	1316250	66	34
48	873500	44	56
72	260000	10	90
96	92500	5	95

Al presentar estos resultados en forma gráfica se observa el siguiente comportamiento (Gráfica 1 y gráfica 2).



Gráfica 1. Promedio del control de células viables en %.

Comportamiento de viabilidad. La gráfica 1, muestra el comportamiento de la viabilidad de las células medula ósea sin péptido a diferentes tiempos, 0, 24, 48, 72, y 96 horas, el porcentaje de viabilidad disminuye de 100% a 66% y 44% en 24 y 48 horas respectivamente.



**Gráfica 2.** Promedio del control de mortalidad celular en %.

El comportamiento de mortalidad (gráfica 2), muestra el aumento en la mortalidad de las células de medula ósea sin péptido a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, y 96 horas), en donde el porcentaje de mortalidad es mayor a partir de las 48 horas (> 50 %).

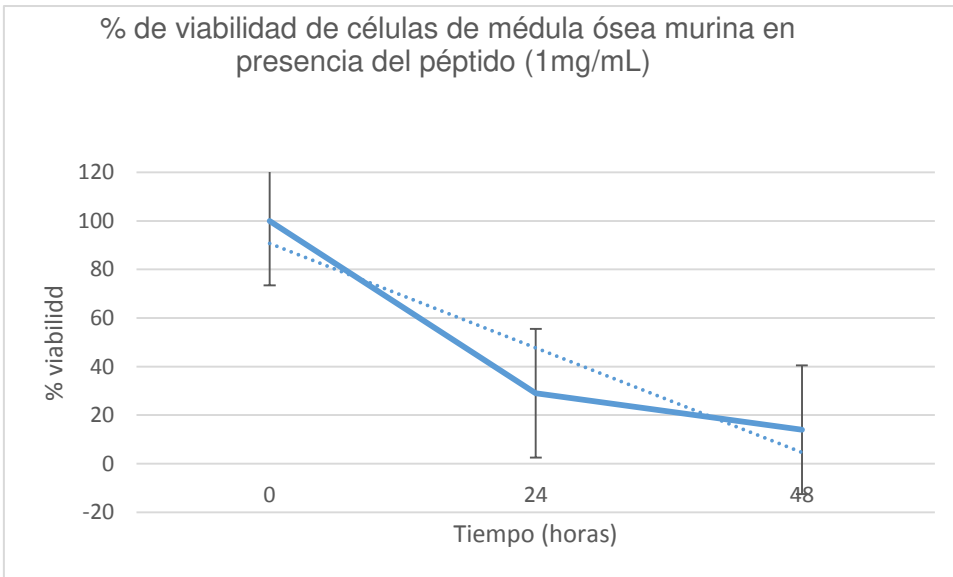
Cuando se adicionó candidina al medio se probó con cuatro concentraciones diferentes (1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25mg/mL y 0.125 mg/mL) dando los siguientes resultados de viabilidad y mortalidad.

En el primer ensayo se probó con 1 mg/mL, observándose lo siguiente (Tabla 3)

**Tabla 3.** Viabilidad y mortalidad de células de medula ósea murina en presencia de candidina (1 mg/ml) durante 48 horas.

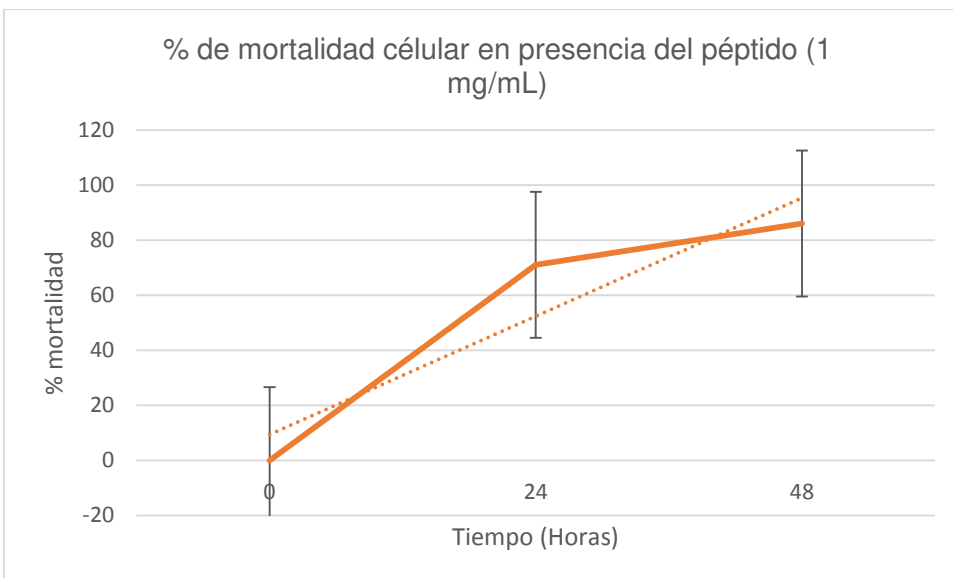
Tiempo (Horas)	Concentración celular cel/ mL	% de viabilidad	% de mortalidad
<b>0</b>	70000	100	0
<b>24</b>	20000	29	71
<b>48</b>	10000	14	86

Se observa que la viabilidad de células medula ósea expuestas a 1mg/mL de péptido (candidina) disminuye considerablemente a las 24 horas, teniendo una viabilidad del 29 % y una mortalidad de 71%.



**Gráfica 3.** Porcentaje de viabilidad de células de médula ósea murina en presencia del péptido (1 mg/mL).

La Gráfica 3, muestra el comportamiento de la viabilidad de las células de médula ósea, en presencia del péptido a una concentración de 1 mg/mL, a diferentes tiempos, 0, 24, 48 horas, en donde se observa que la viabilidad disminuye del 100% a 29%, en 24 horas.



**Gráfica 4.** Porcentaje de mortalidad celular en presencia del péptido (1 mg/mL).



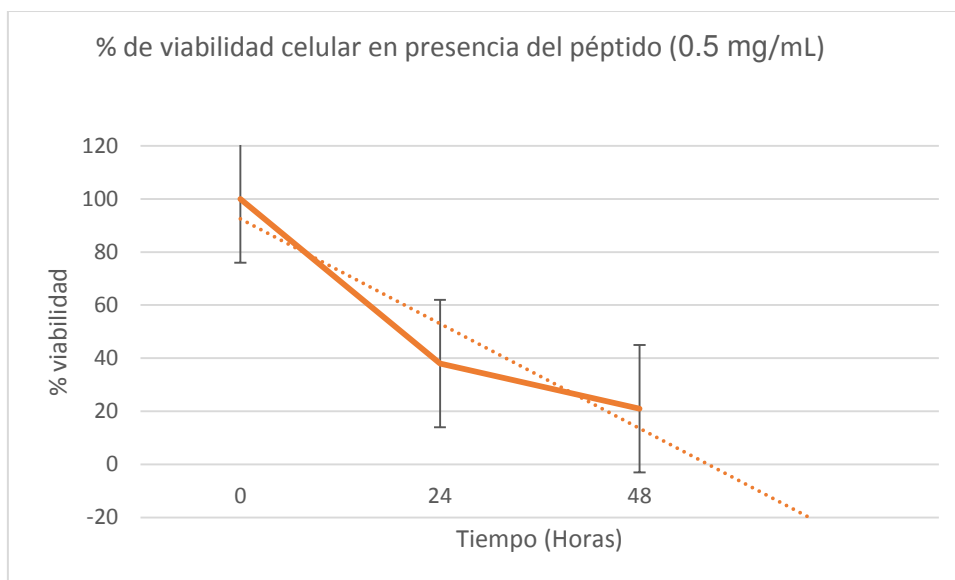
En la gráfica 4 se observa que la mortalidad de las células medula ósea, en presencia del péptido a una concentración de 1mg/mL, a diferentes tiempos (0, 24, 48 horas), es de 71% en 24 horas.

Al realizar el segundo ensayo, en la cual se coloca la concentración 0.5 mg/mL de péptido, obteniendo los siguientes datos (tabla 4) de viabilidad y mortalidad de células de médula ósea murina.

Tabla 4. Viabilidad y mortalidad de células de medula ósea en presencia de los péptidos (candidina) a 0.5 mg/mL.

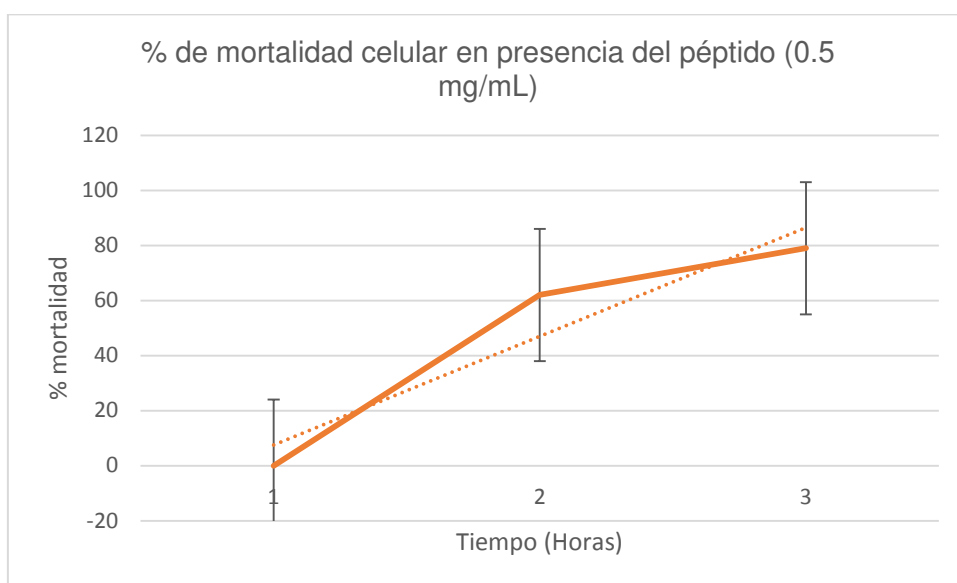
Tiempo (Horas)	Concentración celular cel/ mL	% de viabilidad	% de mortalidad
0	480000	100	0
24	180000	38	62
48	99500	21	79

La tabla 4 representa el comportamiento de las células de medula ósea murina, expuestas a 0.5 mg/mL de péptido (candidina), observando que la viabilidad disminuye hasta un 38% en un lapso de 24 horas, y la mortalidad es mayor al 50%.



Gráfica 5. Porcentaje de viabilidad celular en presencia del péptido (0.5 mg/mL).

La viabilidad en presencia del péptido en concentración de 0.5mg/mL, se representa en el gráfico 5, obteniendo que, la viabilidad disminuye a 38% en las primeras 24 horas.



**Gráfica 6.** Porcentaje de mortalidad celular en presencia del péptido (0.5 mg/mL).

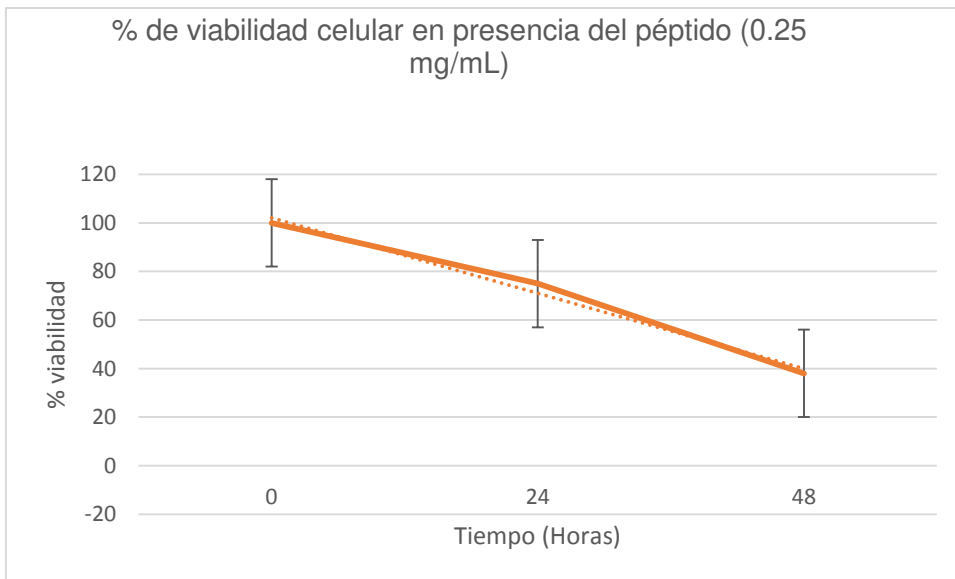
La mortalidad de las células medula ósea, en presencia del péptido a una concentración de 0.5 mg/mL, a diferentes tiempos, 0, 24, 48 horas, se presenta en un 62% en las primeras 24 horas, teniendo cerca de 79% de mortalidad a las 48 horas. (Gráfica 6)

El tercer ensayo se realizó agregando el péptido a una concentración de 0.25 mg/mL, obteniendo los siguientes resultados (tabla 5).

**Tabla 5.** Viabilidad y mortalidad de células de medula ósea murina en presencia de candidina (0.25 mg/mL).

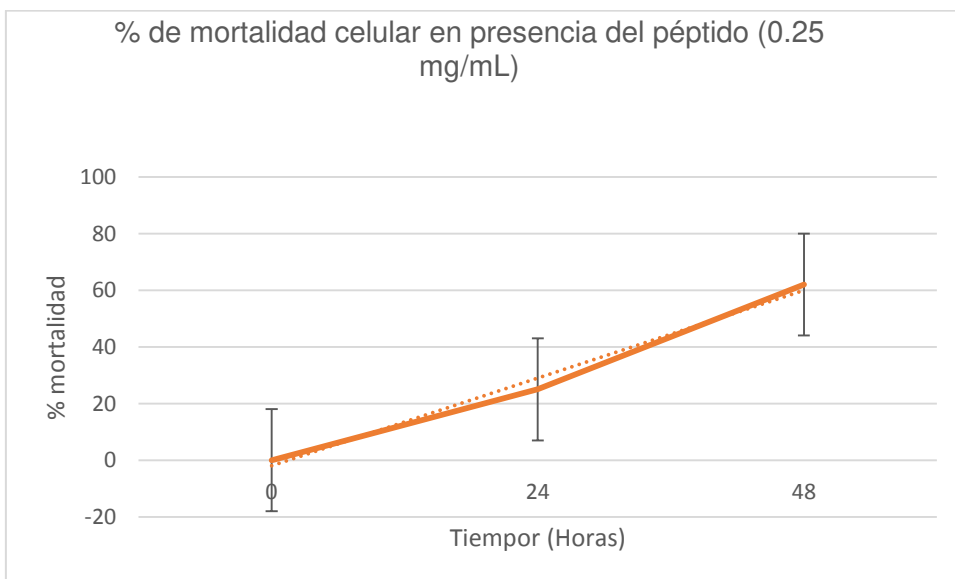
Tiempo (Horas)	Concentración celular cel/ mL	% de viabilidad	% de mortalidad
0	80000	100	0
24	60000	75	25
48	30000	38	62

En la tabla 5 se observa que la viabilidad de células de medula ósea murina expuesta a 0.25 mg/mL del péptido (candidina) no se ve afectada por el péptido ya que la viabilidad es de 75% en las primeras 24 horas, y la mortalidad es del 25%.



**Gráfica 7.** Porcentaje de viabilidad celular en presencia del péptido (0.25mg/mL)

La viabilidad de las células de médula ósea en presencia del péptido a una concentración de 0.25 mg/mL, representada en la gráfica 7, no se ve disminuida ya que transcurridas las 24 horas, se puede determinar que el 75 % son viables, y el 38 % a las 48 horas.



**Gráfica 8.** Porcentaje de mortalidad de células de médula ósea murina en presencia del péptido (0.25mg/mL).

La gráfica 8, muestra el comportamiento de la mortalidad de las células medula ósea, en presencia del péptido a una concentración de 0.25 mg/mL, a diferentes tiempos, 0, 24, 48 horas, mostrando que la mortalidad es significativa, a las 48 horas y es de 62%.

Por último se realizó un cuarto ensayo, donde el péptido se agregó con una concentración baja (0.125 mg/mL) obteniéndose los siguientes datos, tabla 6.

Tabla 6. Viabilidad y mortalidad de células de medula ósea murina en presencia de candidina (0.125 mg/mL).

Tiempo (Horas)	Concentración celular cel/ mL	% de viabilidad	% de mortalidad
0	80000	100	0
24	70000	88	12
48	40000	50	50

Se observa que la viabilidad de células de medula ósea murina expuesta a 0.125 mg/mL del péptido (candidina), a las 24 horas es de 88%, y una mortalidad de 12 %, la disminución es considerable transcurridas las 48 horas, que baja al 50% la viabilidad y la mortalidad es del 50%.

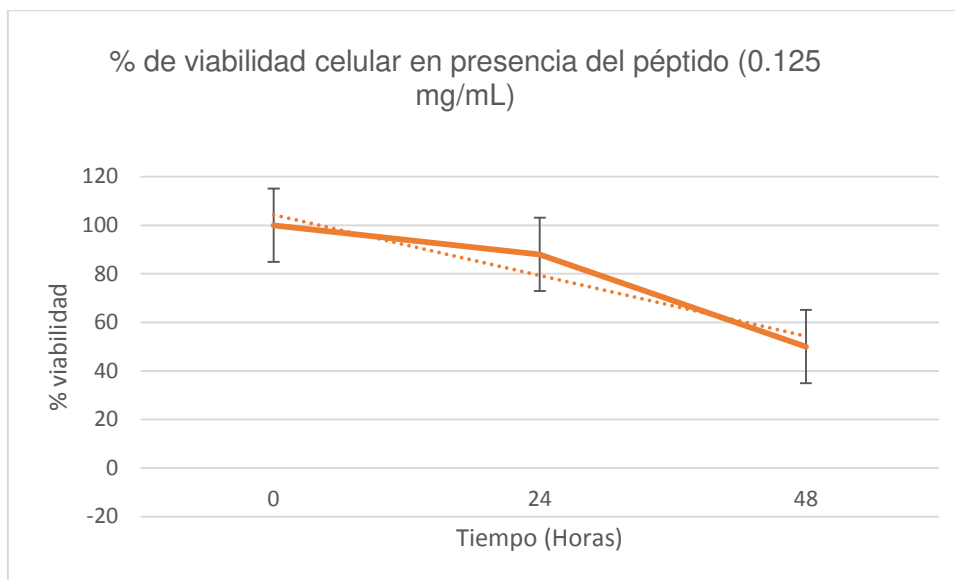
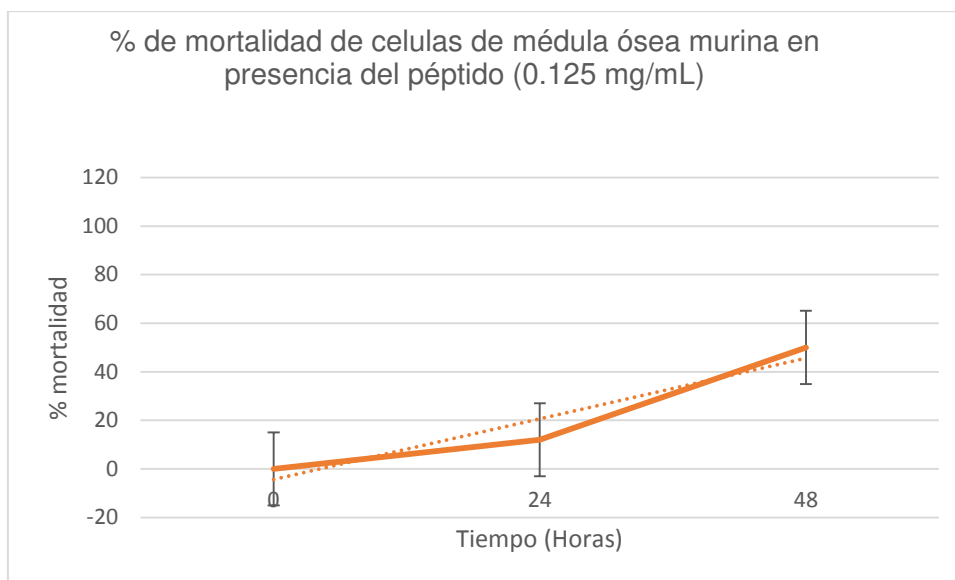


Gráfico 9. Porcentaje de viabilidad de celular de médula ósea murina en presencia del péptido a 0.125mg/mL.

El comportamiento de la viabilidad representada por la gráfica 9, muestra que, las células de médula ósea, en presencia del péptido a una concentración de 0.125 mg/mL, no disminuye significativamente a las 24 horas, pero a las 48 horas es del 50 %.



**Gráfica 10.** Porcentaje de mortalidad de célula de médula ósea murina en presencia del péptido (0.125mg/mL).

La gráfica 10 muestra que la mortalidad de las células de médula ósea es del 12 % a las 24 horas y del 50% a las 48 horas.

## 8. Discusión

Basándonos en los ensayos realizados, se observa que a mayor concentración de péptido, es menor la viabilidad de las células, a una concentración de 1 mg/mL de péptido la viabilidad es menor a 50% en las primeras 24 horas. Con la concentración de 0.5 mg/mL, la concentración se sigue considerando alta ya que la viabilidad es menor a 50% a las 24 horas, teniendo el 21% a las 48 horas. La concentración del péptido puede influir en la viabilidad, debido a que a mayor concentración (1mg/mL, 0.5mg/mL) puede presentar un efecto tóxico, provocando así la muerte celular, o bien, puede estimular la activación de las células de medula ósea murina, y estas después de ser activadas provocan su muerte.

Sin embargo, a menor concentración del péptido (0.25 mg/mL), la viabilidad es mayor al 50% a las 24 horas y de 38% a las 48. Con la concentración de 0.125 mg/mL las células se comportan de manera similar al control.

La viabilidad de las células de medula ósea se ve influenciada por la concentración del péptido, a una concentración de 0.5 mg/mL o mayor a esta, el péptido presenta un efecto tóxico provocando la muerte, a una concentración de 0.25 mg/mL o menor las células presentan un comportamiento similar a la del control, teniendo una viabilidad mayor al 50% a las 48 horas.

## 9. Conclusión

La viabilidad de las células de medula ósea murina de ratones hembras CD1 se mantiene en los tiempos de 24 a 48 horas en las concentraciones de 0.25 y 0.125 mg/mL de péptidos del extracto total de *Candida albicans* (candidina).

## 10. Referencias

1. Ramírez Navas Josué David. (2008). SISTEMA INMUNOLOGICO. 19 MAYO 2018, de ipiales, colombia Sitio web: <http://recursos.salonesvirtuales.com/assets/bloques/sistema-inmunologico.pdf>
2. González Hernández Luis. (2000). CÉLULAS Y ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNE. 2 MAYO 2018, de Cátedra de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias - UCV Sitio web: <https://marianelacastes.files.wordpress.com/2013/05/cc3a9lulas-y-c3b3rganos-del-sistema-inmune.pdf>
3. Palma RA, Castrillón RLE, Becerril PDE, Zamora AR, Aguirre HRM, Espinosa AVK, González PJR, Padilla DC. (2012). Estimulación de células mononucleares humanas in vitro con extracto total y péptidos liberados al medio por *Candida albicans*. 19 mayo 2018, de medigraphic Sitio web: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=39426>
4. Vega Robledo Gloria Bertha. (2009). Antígenos e inmunógenos. 7/septiembre/2018, de Coordinación de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un091j.pdf>
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pober. JS. Inmunología celular y molecular. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, 1995.
6. López-Martínez Rubén, Elva Bazán-Mora, Luis J Méndez-Tovar. (2016). Intradermorreacción con candidina en niños hospitalizados. 9/septiembre/2018, de Revista Latinoamerica de patología clínica Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2016/pt161c.pdf>
7. Ortega Aramburu JJ. Tratamiento de las inmunodeficiencias primarias con progenitores hemopoyéticos. Inmunología 2000; 19:53-56.
8. Matamoros N. Inmunodeficiencias primarias. Perspectivas actuales de diagnóstico y tratamiento. Med Clin (Barc Jan 29; 114(3):94-95.

9. Faiboim L, Gefner J. Introducción a la inmunología humana.5ª edición. Editorial Panamericana, Argentin. 2006.
10. Ferreira A, Afani S, Lanza B, Aguillón, J Sepúlveda C. Inmunología básica y clínica. Ed. Mediterráneo, Santiago, Chile. 2005.
11. Laforet Aguilera Leslie. ESTUDIO DE PGA 26, UNA PROTEÍNA IMPLICADA EN LA ARQUITECTURA DE LA PARED CELULAR DE *Candida Albicans*. Universitat de Valecia. 2010.
12. Conteo Celular y evaluación de viabilidad. Mar 10, 2008; Last modified by: oct 13, 2013, version: 2.0
13. Mori L, De Libero G. Presentation of lipid antigens to T cell. Immunology Letters 2008; 117: 1-8.



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD  
XOCHIMILCO**

**División: Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos  
Licenciatura Químico Farmacéutico biológico**

**Viabilidad de células de médula ósea murina en  
presencia de extracto total proteico de *Candida  
albicans* (candidina)**

**Proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios  
activos, medicamentos y productos biológicos.**

**Alumna: Madeleyne Bravo Santiago      Matrícula: 2132044389**

**Asesores: M en C. Alejandro Palma Ramos  
M en C. Felipe Mendoza Pérez**

**Lugar de realización: UAM-X, laboratorio de inmunología UIDIS**

**Fecha de inicio y terminación: 10/Sep/2018 – 10/Mar/2019**



## Introducción

El sistema inmunológico es la defensa natural del cuerpo contra las infecciones. Por medio de una serie de pasos, el cuerpo combate y destruye organismos infecciosos invasores antes de que causen daño. Cuando el sistema inmunológico está funcionando adecuadamente, protege de infecciones que le causan enfermedad al hospedero. (Ramírez Navas, 2008)

El Sistema Inmunitario para poder realizar sus funciones de defensa y protección, está constituido por una variedad de células morfológica y funcionalmente diferentes, que se originan a partir de células primordiales pluripotenciales, que derivan de células pluripotentes de la médula ósea, órgano en que ocurre la hematopoyesis, proceso por el cual se forman, diferencian y maduran las células sanguíneas. (González Hernández, 2000)

La hematopoyesis ocurre en el hígado y el bazo del feto, a partir del nacimiento se suspende este proceso en estos órganos y se incrementa en la médula ósea. En la médula ósea las células hematopoyéticas se distribuyen en tres compartimientos morfo-funcionales, que da origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfoide, después de un proceso de diferenciación y maduración se originan los linfocitos T y linfocitos B. En el proceso de diferenciación y maduración de las diferentes líneas celulares, participan varios factores de maduración y citocinas secretadas por células del estroma. (Abbas AK, 1995)

Los linfocitos, junto con las células presentadoras de antígeno (CPA) son la base celular de la respuesta inmune específica. Se dividen en tres grupos funcionales diferentes: los linfocitos T (LT) que participan en la inmunidad adquirida de tipo celular, los linfocitos B (LB) que participan en la inmunidad adquirida de tipo humoral y las células NK ("Natural Killer") que no expresan marcadores de células T ni células B y que participan en la inmunidad natural o innata. (González Hernández, 2000)

En ambos casos la maduración implica una etapa independiente de antígeno, que ocurre en la médula ósea (línea B) y en el timo (línea T), y una etapa dependiente de antígeno que en ambas líneas celulares ocurre en los órganos linfoides. (González Hernández, 2000)

Un antígeno es una sustancia o macromolécula extraña que penetra o es introducida en el organismo, en el cual provoca una respuesta inmune dando lugar a la producción de otras macromoléculas denominadas anticuerpos (respuesta inmune humoral) o a la

proliferación de células sensibilizadas (respuesta inmune celular), con los que reacciona específicamente. (Vega Robledo, 2009)

*Candida* origina en el hospedero una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral y celular que, junto con mecanismos de defensa inespecíficos, dificulta la invasión a los tejidos superficiales y profundos por este agente; esta respuesta inmune está presente en la mayoría de las personas sanas. (López Martínez, 2016)

La candidina es el extracto total obtenido de *Candida albicans*, y es la conjunción de proteínas de superficie e internas que se utiliza en la reacción intradérmica para el estudio de hipersensibilidad tardía. Se ha demostrado que *C. albicans* o sus diferentes antígenos estimulan la respuesta proliferativa de linfocitos *in vitro*. Se han realizado estudios de los principales componentes manoproteicos de *C. albicans* implicados en la inmunomodulación de las defensas del huésped. Entre las presentes en el extracto ácido se encuentra una proteína de 65 K Da (MP65), que es el principal blanco sobre el que se monta una respuesta por parte de las células T, esencial en la defensa contra infecciones causadas por *Candida albicans*. (Palma RA, 2012)

#### Objetivo general

Observar la viabilidad de células de médula ósea murina en presencia de diferentes concentraciones de extracto total proteico de ***Candida albicans*** (candidina).

#### Objetivos específicos

Obtención de candidina en medio RPMI a concentraciones de 1mg, 0.5mg, 0.25mg, 0.125mg.

Obtención de cultivos primarios de médula ósea murina.

Estudio de la viabilidad de las células de médula ósea murina.

Estudio de la viabilidad de las células de médula ósea murina, estimulados con candidina a diferentes concentraciones (1mg, 0.5mg, 0.25mg, 0.125mg).

#### Conclusión

La viabilidad de las células de medula ósea murina de ratones hembras CD1 se mantiene en los tiempos de 24 a 48 horas en las concentraciones de 0.25 y 0.125 mg/mL de péptidos del extracto total de *Candida albicans* (candidina).

## Referencias

1. Ramírez Navas Josué David. (2008). SISTEMA INMUNOLOGICO. 19 MAYO 2018, de ipiales, colombia Sitio web: <http://recursos.salonesvirtuales.com/assets/bloques/sistema-inmunologico.pdf>
2. González Hernández Luis. (2000). CÉLULAS Y ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNE. 2 MAYO 2018, de Cátedra de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias - UCV Sitio web: <https://marianelacastes.files.wordpress.com/2013/05/cc3a9lulas-y-c3b3rganos-del-sistema-inmune.pdf>
3. Palma RA, Castrillón RLE, Becerril PDE, Zamora AR, Aguirre HRM, Espinosa AVK, González PJR, Padilla DC. (2012). Estimulación de células mononucleares humanas in vitro con extracto total y péptidos liberados al medio por Candida albicans. 19 mayo 2018, de medigraphic Sitio web: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=39426>
4. Vega Robledo Gloria Bertha. (2009). Antígenos e inmunógenos. 7/septiembre/2018, de Coordinación de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un091j.pdf>