



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : JANNETE BETSABE HERNÁNDEZ RAMÍREZ

Matrícula : 2143024375 Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica

Domicilio : CALLE GOBERNADOR LICENCIADO JOAQUIN GARCIA LUNA #68B COL. GRANJAS VALLE DE GUADALUPE, ECATEPEC DE MORELOS

Teléfono : 5557911611 Celular : 5521427549

Correo Electrónico : hernandez.betsabe.cw@gmail.com CURP : HERJ950903MDFRMN10

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Determinación in vitro de la actividad antiinflamatoria del extracto proteico de Cotylorhiza tuberculata en células J774A.1

Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Biología Experimental

Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Entidad Federativa : Distrito Federal

Municipio : Localidad :

Fecha de Inicio Fecha de Término

Día	Mes	Año	Día	Mes	Año
18	7	2019	18	2	2019

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo Tipo: 2.- Interno

Orientación: 10.- Otros

FIRMAS

Mara Cristina Fresán Orozco 3829

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Ana Laura Esquivel Campos 33148

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Jannete Betsabé Hernández Ramírez

Alumno
Nombre, firma

Felipe Mendoza Pérez

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

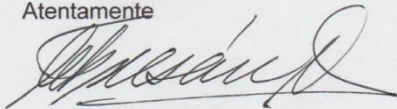
Ciudad de México, 23 de febrero de 2021

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
JEFE DEL DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS

Por medio de la presente informo a usted que la alumna **Jannete Betsabé Hernández Ramírez** con número de matrícula: **2143024375**, quién cursó la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, ha concluido satisfactoriamente su servicio social en el Laboratorio de Biología Experimental con el proyecto **Determinación *in vitro* de la actividad antiinflamatoria del extracto proteico de *Cotylorhiza tuberculata* en células J774A.1** en el periodo comprendido del 18 de julio 2018 al 18 de febrero 2019 cumpliendo con un total de 480 horas como marca el reglamento de Servicio Social

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



M. en C. María Cristina Fresán Orozco



Ciudad de México, 24 de febrero de 2021

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
DIRECTOR

Por este conducto hago de su conocimiento que la alumna **Jannete Betsabé Hernández Ramírez**, matrícula **-2143024375-** ha cumplido en tiempo y forma de los objetivos propuestos en el proyecto de servicio social titulado **“Determinación in vitro de la actividad antiinflamatoria del extracto proteico de *Cotylorhiza tuberculata* en células J77A.1”** de la carrera de Química Farmacéutica Biológica de esta Unidad. Dicho proyecto se llevó a cabo del 18 de julio de 2018 al 18 de febrero del 2019.

Sin más por el momento aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo, quedando de Ud.

Atentamente,
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"

Dra. Ana Laura Esquivel Campos
No. Ec. 33148

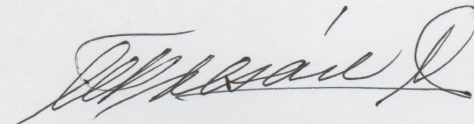
state of the art, definitions, and terms. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(2), 325-332.

- Shaikh R, Pund M M, & Gacche R N. (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6 (4), 355-361.
- Singh M., Kumar V., Singh I, Gauttam V. & Kalia A. N. (2010). Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Mirabilis Jalapa* Linn. Leaves. *Pharmacognosy Research*. 2(6). 364-367.
- Sommer C & White F. (2010). Cytokines, Chemokines, and Pain. *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, 279-302.
- Wallace J. L & Ferraz J. G. (2010). New pharmacologic therapies in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clinics North America*, 39(3), 709-720.

Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos.



Dra. Ana Laura Esquivel Campos
Profesora Titular
Departamento de Sistemas Biológicos
U.A.M. Xochimilco
Número económico: 33148



M. en C. María Cristina Fresán Orozco
Profesora Titular
Departamento de Sistemas Biológicos
U.A.M. Xochimilco
Número económico: 3829

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIOLÓGICA**

**Determinación *in vitro* de la actividad antiinflamatoria del
extracto proteico de *Cotylorhiza tuberculata* en células
J774A.1**

ALUMNA: Jannete Betsabé Hernández Ramírez

MATRÍCULA: 2143024375

ASESORAS:

María Cristina Fresán Orozco

Ana Laura Esquivel Campos

Fecha de Entrega: febrero 2021

INDICE

	Pág.
Introducción	3
Marco Teórico	4
▪ Inflamación	
▪ Fases de la Inflamación	
▪ Citocinas en la inflamación	
▪ <i>Cotylorhiza tuberculata</i>	
Desarrollo experimental	7
Resultados y análisis	10
Conclusiones	17
Objetivos y metas alcanzados	17
Bibliografía	18
Resumen	20

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una reacción de los tejidos vivos hacia la lesión y comprende respuestas sistémicas y locales (Saleem M *et al.*, 2011); en la actualidad existen diversos tratamientos para prevenir y disminuir la inflamación, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) representan una de las clases más comunes de medicamentos utilizados en todo el mundo, con un uso estimado de > 30 millones por día para la inflamación y trastornos relacionados (Wallace J. L. *et al.*, 2010). Desafortunadamente, además del excelente potencial antiinflamatorio de los AINE, los efectos secundarios graves tales como la ulceración gastrointestinal (GI), perforación, obstrucción y hemorragia han limitado el uso terapéutico de los AINE (Shaikh R. *et al.*, 2016) y aunque los fármacos sintéticos dominan el mercado, no se puede descartar el elemento de toxicidad que implican estos medicamentos (Singh M. *et al.*, 2010), por lo cual es importante la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica derivados de productos naturales como nuevas alternativas farmacológicas. En el presente trabajo se evaluará la actividad antiinflamatoria del extracto de medusa *Cotylorhiza tuberculata* en células J774A.1. Dicho extracto ha sido estudiado por su actividad biológica anticancerígena y antioxidante, aunque no se ha evaluado aun la actividad antiinflamatoria se sabe que metabolitos de extractos de medusa tienen potente actividad biológica (Leone A. *et al.*, 2013), por lo que es importante corroborar científicamente su efecto farmacológico así como determinar su mecanismo de acción, mediante su evaluación antiinflamatoria y citotóxica, lo que puede permitir contar con productos biológicos para combatir diferentes tipos de enfermedades inflamatorias que aquejan a la población.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad del extracto proteico de medusa *Cotylorhiza tuberculata* en un modelo de inflamación de macrófagos. Esto se evaluará mediante la cuantificación de citocinas proinflamatorias y la correlación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de *Cotylorhiza tuberculata* en la producción de las citocinas mediante su expresión génica y cuantificación en el sobrenadante celular.

MARCO TEÓRICO

Inflamación

La inflamación representa un mecanismo de defensa protector y vital para la salud; durante la respuesta inflamatoria se presenta vasodilatación e incremento en la permeabilidad de los capilares en el área afectada, debido a la liberación de histamina por parte de los mastocitos, así como células blancas, nutrientes y fibrinógeno que entran al área seguidos por neutrófilos y monocitos que luego se convierten en macrófagos. El macrófago es una célula fagocítica presente en el tejido conectivo de los vertebrados. Es a su vez una célula extraordinariamente versátil debido al papel que juega en la presentación y procesamiento de los antígenos, en la producción de moléculas con actividad biológica como proteasas, citocinas y factores de crecimiento (FC), y en el metabolismo de los lípidos (Robb C. *et al.*, 2016; Echeverri D *et al.*, 2004).

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes (Gallin, 1989; Koo *et al.*, 1989; Male *et al.* 1991)

Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y acúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es

producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor.

Fases de la inflamación

De forma condensada podemos dividir la inflamación en cinco etapas:

- 1- Liberación de mediadores. Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
- 2- Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- 3- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4- Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- 5- Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria. Existen numerosos mediadores moleculares de la inflamación, que incluyen citocinas y quimiocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, con atenuación de los efectos del mediador proinflamatorio que ayudan a "desconectar" con éxito la inflamación (Serhan C. N *et al.*, 2007).

Las citocinas son polipéptidos o glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles, variando entre 8 y 30 kDa. Se generan por medio de diversos tipos de celulares en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteinocinasas activadas por mitógeno. Así, las citocinas influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula inmunológica; también regulan la producción y actividad de otras citocinas, que pueden aumentar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta

inflamatoria. Entre las proinflamatorias están las interleucinas (IL-) 1, 2, 6, 7 y TNF- (factor de necrosis tumoral). Dentro de las antiinflamatorias se encuentran las interleucinas IL-4, IL10, IL-13 y FTC β (factor transformador de crecimiento β) 2,4 (Lin E. *et al.*, 2000).

La IL-1 es secretada por macrófagos y monocitos, así como también por células no inmunológicas, tales como fibroblastos y células endoteliales activadas durante la lesión celular, la infección, la invasión y la inflamación (Barros *et al.*, 2011).

Citocinas en la inflamación

Las citocinas desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio que es definido por el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Entre las citocinas proinflamatorias destacan las quimiocinas, grupo de péptidos de bajo peso molecular entre los que se encuentra la IL-8, que están implicados en la quimiotaxis y en la activación de los distintos tipos celulares que participan en la inflamación. Por otro lado, la IL-1 y el TNF tienen un efecto sinérgico sobre la inflamación, que también es promovida por el IFN a través del aumento del TNF. Existen numerosas citocinas antiinflamatorias, entre las que destacan la IL-10, el IL-1ra (receptor del antagonista de la IL-1) y los receptores solubles de la IL-1 (p68) y del TNF (p55 y p75). Por su lado, la IL-6 tiene a la vez propiedades proinflamatorias (es uno de los principales inductores de las proteínas de fase aguda) y antiinflamatorias, y en este sentido es capaz de promover la síntesis de IL-1ra y de los receptores solubles del TNF. (Filella *et al.*, 2002)

Los macrófagos, monocitos, eosinófilos, hepatocitos y la glía se encargan de segregar la IL-6 que es una glucoproteína de 22 a 27 kDa siendo la IL-1 y el FNT α potentes inductores de esta (Sommer C. *et al.*, 2010). El FNT α también conocido como caquectina, es una citocina proinflamatoria producida principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos -T, que abundan en el peritoneo y en el tejido esplácnico. También está presente en las neuronas y células de la glía, desempeñando funciones importantes tanto en la hiperalgesia inflamatoria como en la neuropática (Curfs J. H. *et al.*, 1997).

Para el tratamiento de la inflamación existen diversas alternativas de productos naturales. Actualmente, se reconoce que las medusas marinas están sujetas a la proliferación mundial en las zonas costeras, convirtiéndose en un problema ecológico y social crucial en las últimas décadas.

Por el contrario, bajo una perspectiva opuesta, la gran cantidad de biomasa de medusas podría considerarse como una valiosa fuente de compuestos bioactivos que incluyen péptidos bioactivos, colágeno y gelatina, oligosacáridos, ácidos grasos, enzimas, calcio, minerales solubles en agua y biopolímeros (Leone A, *et al.*,2013).

Cotylorhiza tuberculata

Cotylorhiza tuberculata, la medusa rizostómica más común en el mar Mediterráneo, está sujeta a brotes de la población de verano. Las abundancias de medusas altas se pueden encontrar en bahías cerradas como la bahía de Vlyho en la isla jónica de Lefkada-Grecia (Kikinger R,1992) y en las lagunas costeras, como el Mar Menor en el mar Mediterráneo occidental donde se han observado floraciones anuales desde 1995 (Pérez-Ruzafa A. *et al.*,2002).

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la actividad antiinflamatoria de extracto proteico de *Cotylorhiza tuberculata* usando como modelo la línea celular de macrófagos J774A.1.

Objetivos específicos:

- Cuantificación de proteínas del extracto de *Cotylorhiza tuberculata*.
- Cultivo y proliferación de células J774A.1.
- Determinar la viabilidad de células J774A.1 de *Cotylorhiza tuberculata*.
- Cuantificar los niveles de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias IL-1, IL-6 yTNF- α en sobrenadantes de cultivos de células J774A.1.

- Correlacionar la actividad anti-inflamatoria de los extractos de *Cotylorhiza tuberculata* en la producción de las citocinas IL-1, IL-6, y TNF- α mediante su expresión génica y cuantificación en el sobrenadante celular.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Durante el desarrollo del presente proyecto se procedió al cultivo de células de la línea celular de macrófagos J774A.1 en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂, hasta su confluencia. Cabe destacar que se requería contar con un cultivo estéril para el ensayo de actividad citotóxica; razón por la que se retrasó muchísimo el avance del mencionado proyecto, pues se requirieron más de diez intentos para conseguir el cultivo celular libre de contaminación.

Los macrófagos J774A.1 serían sembrados en DMEM enriquecido con suero fetal bovino (10%) en placas de cultivo de 96 pocillos y tratados con extractos de *Cotylorhiza tuberculata* en ensayos individuales usando diferentes concentraciones (dosis-respuesta). La densidad óptica (DO) se determinó a una longitud de onda de 540 nm en un lector de placas de ELISA (Marca BioRad). Sin embargo, para la fecha en la que se iban a llevar a cabo dichos ensayos, no se contaba con los extractos de *Cotylorhiza tuberculata*, motivo por el cual se trabajó con el extracto de *Stevia viscida* a una concentración de 10 mg/ml, de este extracto se realizaron 8 diluciones para así obtener concentraciones distintas (6.5, 12.5, 25, 50, 100 150, 200 y 250 µg/ml), se procedió a hacer el ensayo de actividad citotóxica para lo cual había que evaluar la viabilidad celular usando un ensayo de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT).

Los resultados obtenidos en el primer ensayo superaban el 100% por lo que se analizaron los cultivos y había contaminación bacteriana presente, por lo que se tomó la decisión de desechar los cultivos y comenzar nuevos cultivos con una nueva línea de macrófagos.

Una vez logrado el cultivo de la línea celular libre de contaminación se procedió hacer el ensayo de viabilidad, utilizando extracto de *Stevia*, se sembraron dos placas utilizando diferentes cantidades de macrófagos (5,000 y 50,000), las concentraciones del extracto, utilizadas fueron (6.5, 12.5, 25, 50, 100 150, 200 y

250 µg/ml). Esto se realizó para definir la cantidad de células a utilizar en el ensayo y se decidió trabajar con 50,000 células.

Después de determinar el número de células que se sembrarían se realizó el ensayo de viabilidad por triplicado, se sembraron 3 placas en las mismas condiciones (50,000 macrófagos por pozo), mismo analista, mismo día y mismas concentraciones de *Stevia* utilizadas en el ensayo anterior.

Para el siguiente ensayo se utilizó extracto de *Stevia* y extracto de *Cotylorhiza tuberculata*, este último tenía una concentración de 10 mg/ml y se realizaron dos diluciones de 200 y 400 µg/ml. Se utilizaron dos placas con 50,000 células en cada pozo, en la Placa A aparte del ensayo con extracto de *Stevia* también se utilizó para realizar el ensayo con *Cotylorhiza tuberculata*.

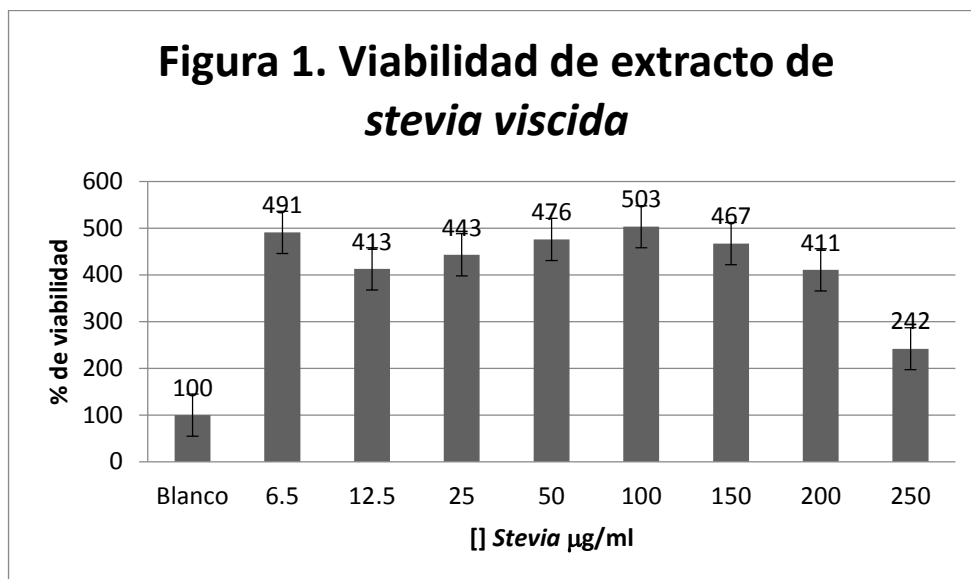
Por último, se realizaron 3 ensayos con extracto de *Stevia*, en 3 días diferentes y mismo analista, se sembraron 50,000 células por pozo y se trataron con las concentraciones de *Stevia* antes mencionadas (6.5, 12.5, 25, 50, 100 150, 200 y 250 µg/ml).

Cabe destacar que:

La determinación de la producción de óxido nítrico, la estimulación de macrófagos J77A.1 con la consiguiente determinación de niveles de interleucinas pro y antiinflamatorias, y la Extracción de RNA con la consecutiva síntesis de cDNA, que nos permitiría determinar la expresión génica de las citocinas, no fue posible llevarla a cabo en virtud de la interrupción de las actividades debido a la huelga de 3 meses realizada por el sindicato en la universidad.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para analizar la actividad citotóxica de extracto de *Stevia viscida* se utilizó el ensayo de MTT, para lo que en el primer ensayo realizado se obtuvieron los siguientes datos mostrados en la figura 1, podemos observar a simple vista que los porcentajes de viabilidad de cada una de las concentraciones están superiores al 100%.



Para determinar la cantidad de células a utilizar en el ensayo se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 2 y 3, se observa que la única concentración que está dentro de la desviación_estándar es la de 12.5 pero cabe señalar que supera el 100%, las demás concentraciones se encuentran fuera de la desviación estándar y en la placa con 5,000 células se encuentran dos concentraciones que están cercanas al 50% de viabilidad celular mientras que en la placa con 50, 000 células los porcentajes de viabilidad celular son arriba del 70%, es por esto que se decide, sembrar 50,000 células, además que esta cantidad de células es la que generalmente se utiliza en ensayos de viabilidad celular.

Figura 2. Viabilidad de extracto de *Stevia* en placa con 5,000 células

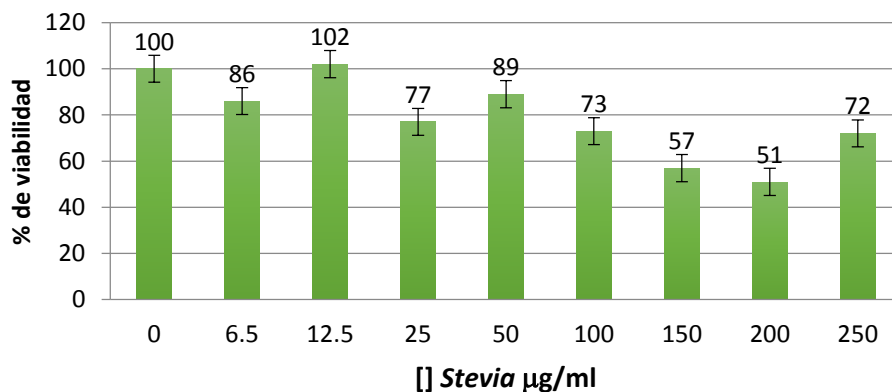
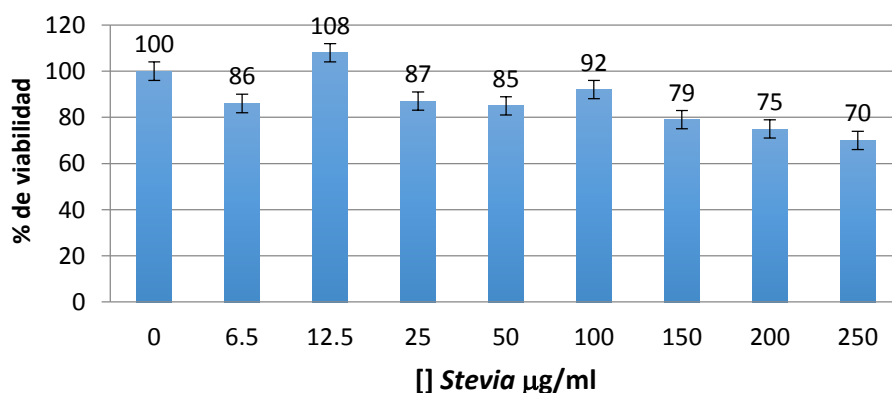


Figura 3. Viabilidad de extracto de *Stevia* en placa con 50,000 células

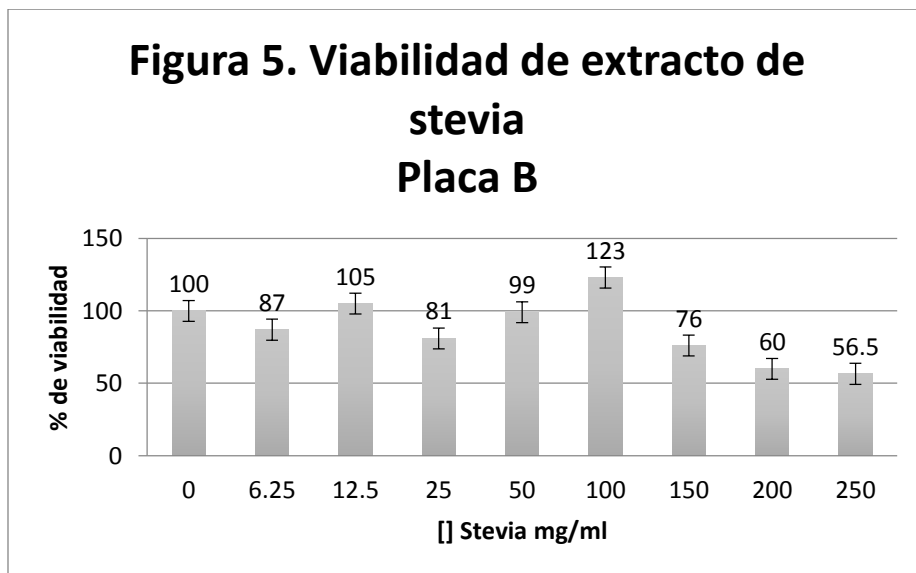
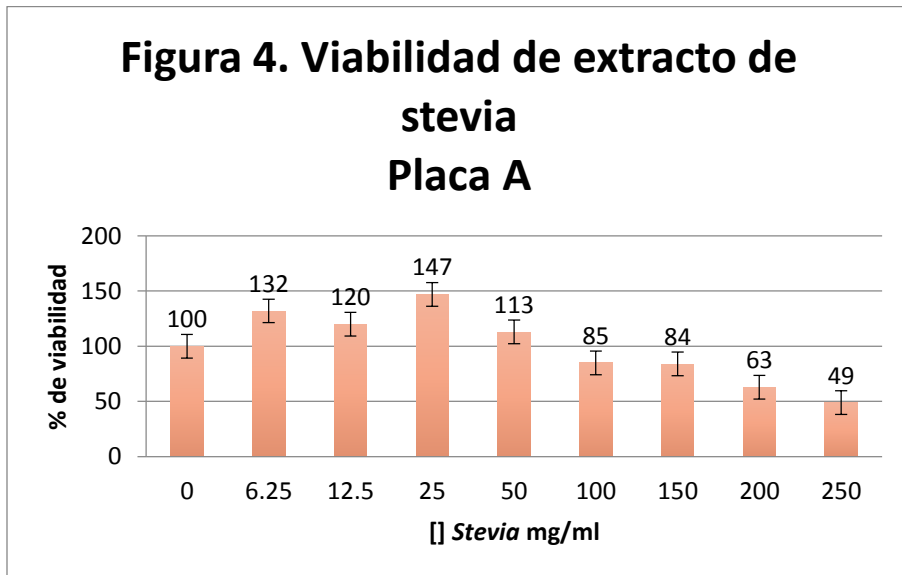


Se hizo un primer ensayo por triplicado, utilizando Placa A, B y C los resultados mostrados en la figura 4, 5 y 6 muestran porcentajes superiores al 100% sobre todo en la Placa A y C, como se menciona, fueron las mismas condiciones, el mismo analista, el mismo día y la variación de la hora fue mínima sin embargo al analizar los gráficos en cada concentración de cada placa, por ejemplo en la concentración de 25 µg/ml en la Placa A se obtuvo un porcentaje de células viables de 147%, en la Placa B 81% y en la Placa C 105%, este porcentaje se

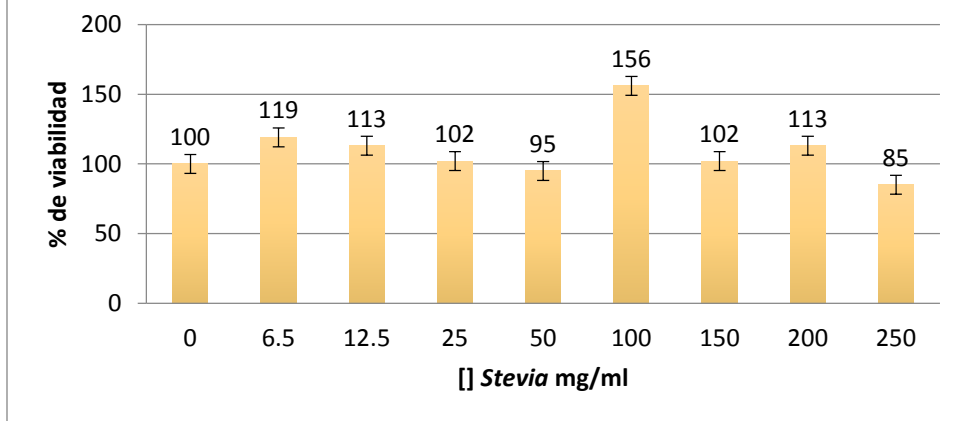
determinó con la siguiente fórmula

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{promedio de células no tratadas}} \times 100$$

Los datos se analizaron por ANOVA y se demostró que los datos obtenidos no son estadísticamente significantes ya que las medias no presentan diferentes y el valor de $p > 0.05$ y aunque principalmente se busca que las medias no sean diferentes en este caso debido a que la mayoría de los datos superaban el 100% no se podía aceptar como válido este ensayo.

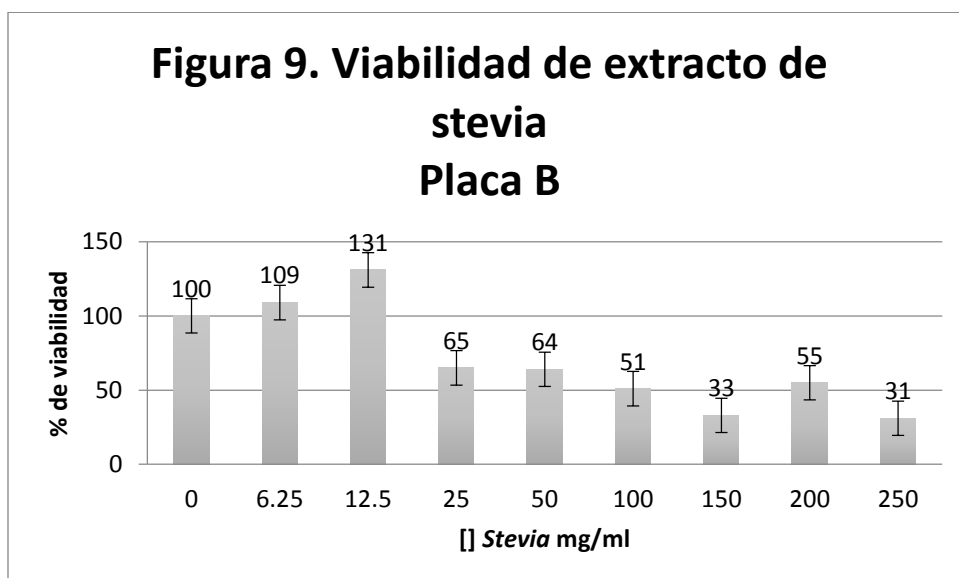
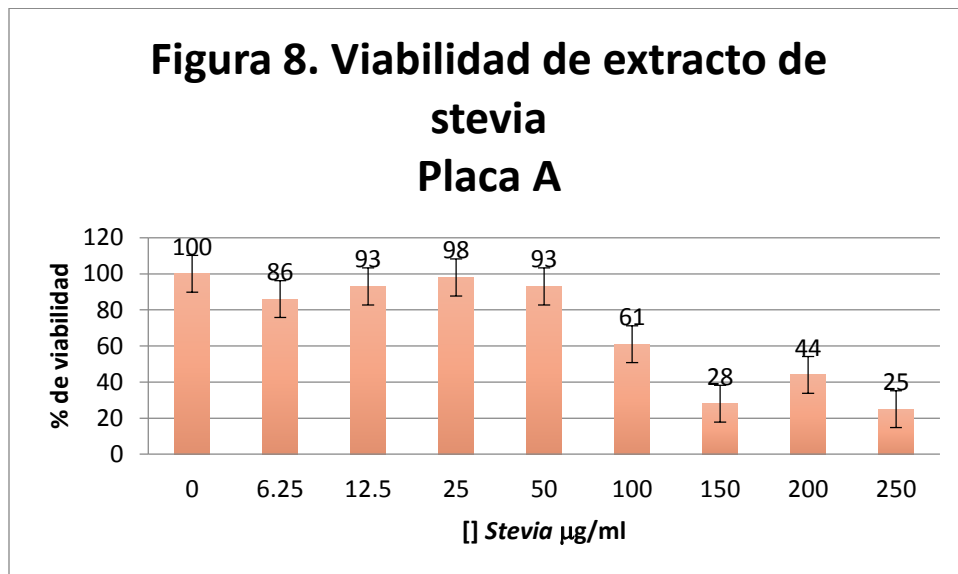


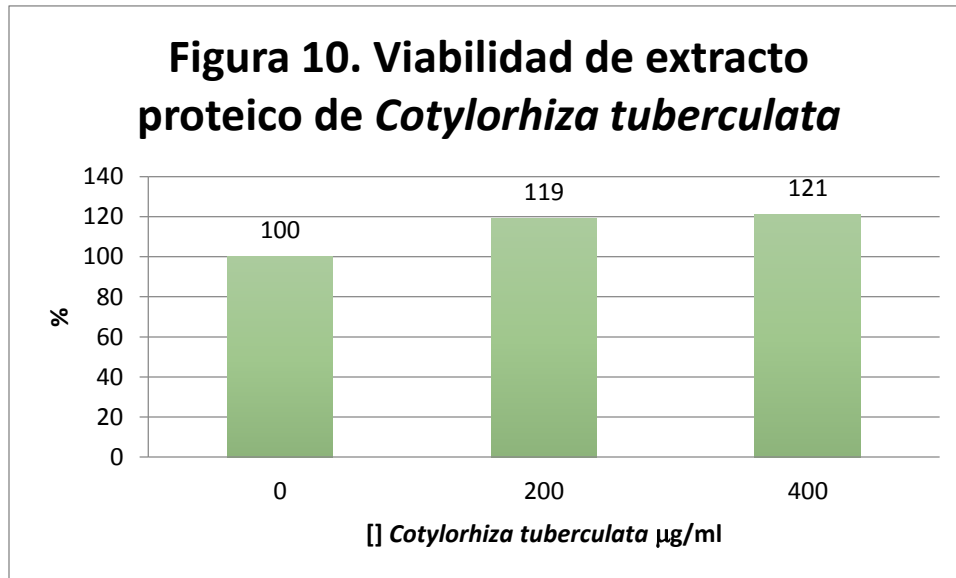
**Figura 6. Viabilidad de extracto de stevia
Placa C**



En el siguiente ensayo se determinó viabilidad celular tanto del extracto de *Cotylorhiza tuberculata* como de *Stevia viscida*, al analizar los ensayos realizados con el extracto de *Stevia* (Figura 8 y 9) se puede notar que nuevamente se obtienen datos superiores al 100% aunque en esta ocasión son únicamente en las concentraciones de 6.25 y 12.5 de la Placa B, en la placa A se puede observar mucho mejor la viabilidad celular de *Stevia* ya que se obtuvieron porcentajes de viabilidad cercanos al 100% en las primeras concentraciones y en las últimas son inferiores al 50%. sin embargo, debido a que aún se obtuvieron porcentajes superiores y que los errores estándar se traslapan, como vemos los datos son muy variables esto pudo deberse a que al momento de sembrar las células en la placa no se hizo de la manera correcta o la cantidad de células en algunos pozos fue mayor y al momento de incubar las células proliferan, también pudo tratarse de un error del analista al momento de añadir las distintas concentraciones de *Stevia* a los pozos, debido a esta variaciones se decidió realizar un ensayo más.

Al evaluar la viabilidad del extracto de *Cotylorhiza tuberculata* únicamente se utilizaron dos concentraciones y como se ve en la figura 10 ambas concentraciones dieron valores superiores al 100%.





Se realizaron 3 últimos ensayos con extracto de Stevia, en 3 días diferentes, mismo analista y las concentraciones utilizadas en los ensayos anteriores, se muestra en los gráficos 11, 12 y 13 que los porcentajes de viabilidad celular de las concentraciones de 6.5 µg/ml a la de 50 µg/ml son altos mientras que en las concentraciones de 100 µg/ml a 250 µg/ml se encuentran por debajo del 50% de viabilidad celular. En cuanto al análisis estadístico igualmente realizado por ANOVA inicialmente nos dice que los datos obtenidos son estadísticamente significativos y que el valor de $p < 0.05$; pero al hacer el análisis comparativo para cada una de las concentraciones nos demuestra lo que las gráficas ya hacían notar, (Figura 12) en las 4 primeras concentraciones no existe diferencia entre las medias y el valor de $p > 0.05$ y en las últimas 4 concentraciones si se presenta diferencia entre las medias y el valor de $p < 0.05$.

Figura 11. Viabilidad de extracto de stevia

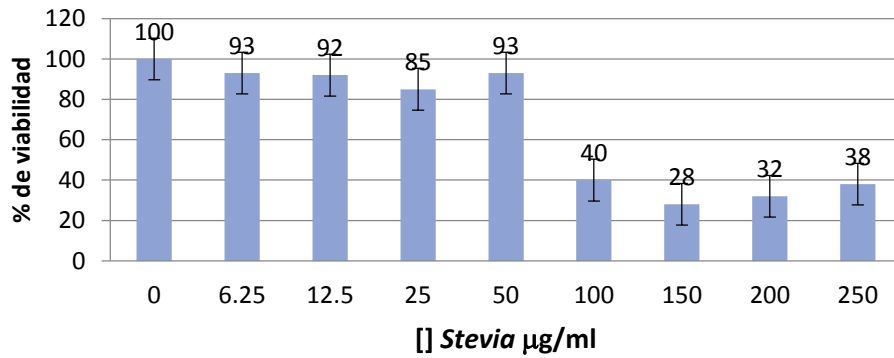


Figura 12. Viabilidad de extracto de stevia

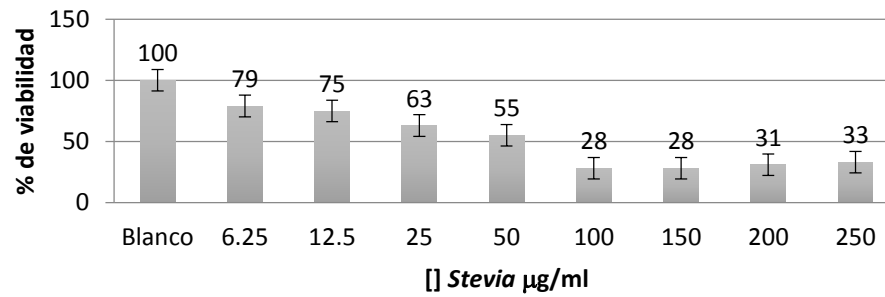


Figura 13. Viabilidad de extracto de stevia

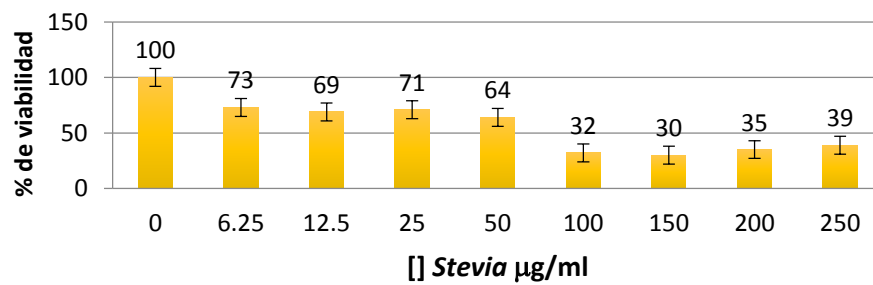
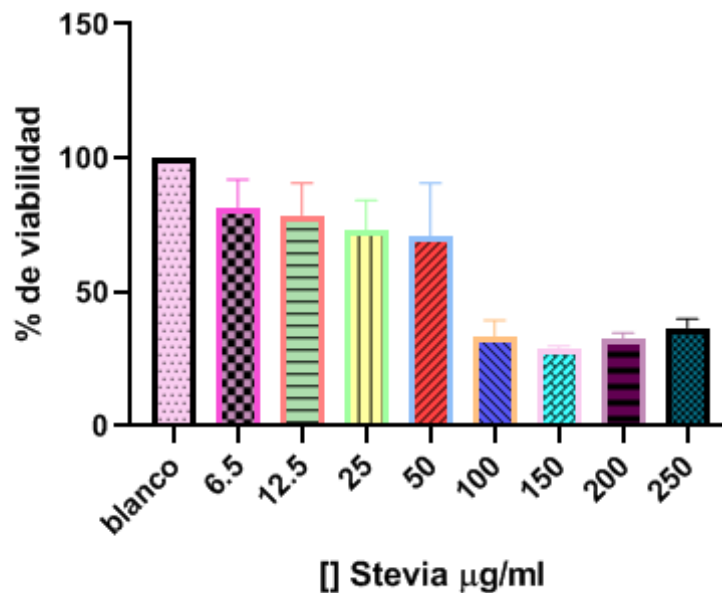


Figura 12. Análisis estadístico de viabilidad celular de *Stevia viscida*



CONCLUSIONES

La viabilidad celular de J774A.1 estimuladas con *Stevia viscida* y *Cotylorhiza tuberculata* se mantiene en parámetros óptimos de proliferación y desarrollo lo que sugiere su posible evaluación con LPS.

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Se logro el cultivo y proliferación de células J774A.1 en medio DMEM, en las condiciones establecidas por la técnica antes mencionada.

Una vez establecido el cultivo se realizó el ensayo de viabilidad celular con *Stevia viscida* como control de ensayo, el cual se realizó a una concentración de 10 mg/ml.

BIBLIOGRAFÍA

- Barros de Oliveira M, Sakata RK, Issy A, Gerola L. R & Salomão R. (2011). Citocinas y Dolor. *Brasileira de Anestesiología*, 61 (2), 137-142.
- Curfs J. H, Meis J. F, Hoogkamp-Korstanje J. A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology reviews*. 10(4), 742-780.
- Echeverri D., Fontanilla M. & Buitrago L. (2004). El macrófago en enfermedad vascular ¿El enemigo oculto? *Cardiología del adulto*, 11(3), 164-173.
- Filella X., R. Molina, AM. Ballesta (2002) Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral* Vol. 39. Núm. 2. 47-88
- Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1989: 721-733.
- Kikinger R. (1992). *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria: Scyphozoa) Life History of a Stationary Population. *Marine Ecology*.13(4), 333-362.
- Koo, CH; Sherman, JW; Band, L; Goetz I, E. Molecular diversity of human leukocyte receptors. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 1989; 191 (19).
- Leone A., Lecci R. M, Durante M. & Piraino S. (2013). Extract from the Zooxanthellate Jellyfish *Cotylorhiza tuberculata* Modulates Gap Junction Intercellular Communication in Human Cell Cultures. *Marine Drugs*. 11(5), 1728–1762.
- Lin E., Calvano S. E. & Lowry S. F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 127(2), 117-126.
- Male, DK; Champion, B; Cooke, A; Owen, M. Cell troffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York 1991.
- Pérez-Ruzafa A, Gilabert J., Gutiérrez J.M., Fernández A.I., Marcos C. & Sabah S. (2002). Evidence of a planktonic food web response to changes in nutrient input dynamics in the Mar minor coastal lagoon, Spain. In *Nutrients and Eutrophication in Estuaries and Coastal Waters*, 359-369.

- Robb C., Regan K., Downward D. & Rossi A. (2016). Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 38(4), 425–448.
- Saleem Mohamed, Azeem A. K, Dilip C, Sankar C, Prasanth N. V & Duraisami R. (2011). Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(2), 147-149.
- Serhan C. N., Brain S.D, Buckley C. D., Gilroy D. W., Haslett C., O'Neill L. A., Perretti M., Rossi A. G. & Wallace J. L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions, and terms. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(2), 325-332.
- Shaikh R, Pund M M, & Gacche R N. (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6 (4), 355-361.
- Singh M., Kumar V., Singh I, Gauttam V. & Kalia A. N. (2010). Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Mirabilis Jalapa* Linn. Leaves. *Pharmacognosy Research*. 2(6). 364-367.
- Sommer C & White F. (2010). Cytokines, Chemokines, and Pain. *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, 279-302.
- Wallace J. L & Ferraz J. G. (2010). New pharmacologic therapies in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clinics North America*, 39(3), 709-720.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIOLÓGICA**

**TÍTULO DEL PROYECTO: Determinación *in vitro* de la
actividad antiinflamatoria del extracto proteico de *Cotylorhiza
tuberculata* en células J774A.1**

ALUMNA: JANNETE BETSABÉ HERNÁNDEZ RAMÍREZ

MATRICULA: 2143024375

**DIRECCIÓN: Calle Gob. Joaquín García Luna #68B Col. Granjas
Valle de Guadalupe CP 55270 Ecatepec de Mor.**

TELÉFONO: 5521427549

CORREO ELECTRONICO: hernandez.betsabe.cw@gmail.com

ASESORES:

María Cristina Fresán Orozco

Ana Laura Esquivel Campos

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorio de Biología Experimental UAM-X

INICIO: JULIO 2018 - TERMINACIÓN: FEBRERO 2019

FECHA DE ENTREGA: Febrero 2021

Resumen

Introducción

La inflamación es una reacción de los tejidos vivos hacia la lesión y comprende respuestas sistémicas y locales (Saleem M *et al.*, 2011); en la actualidad existen diversos tratamientos para prevenir y disminuir la inflamación, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) representan una de las clases más comunes de medicamentos utilizados en todo el mundo, con un uso estimado de > 30 millones por día para la inflamación y trastornos relacionados (Wallace J. L. *et al.*, 2010). Desafortunadamente, además del excelente potencial antiinflamatorio de los AINE, los efectos secundarios graves tales como la ulceración gastrointestinal (GI), perforación, obstrucción y hemorragia han limitado el uso terapéutico de los AINE (Shaikh R. *et al.*, 2016) y aunque los fármacos sintéticos dominan el mercado, no se puede descartar el elemento de toxicidad que implican estos medicamentos (Singh M. *et al.*, 2010), por lo cual es importante la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica derivados de productos naturales como nuevas alternativas farmacológicas. En el presente trabajo se evaluará la actividad antiinflamatoria del extracto de medusa *Cotylorhiza tuberculata* en células J774A.1. Dicho extracto ha sido estudiado por su actividad biológica anticancerígena y antioxidante, aunque no se ha evaluado aun la actividad antiinflamatoria se sabe que metabolitos de extractos de medusa tienen potente actividad biológica (Leone A. *et al.*, 2013), por lo que es importante corroborar científicamente su efecto farmacológico así como determinar su mecanismo de acción, mediante su evaluación antiinflamatoria y citotóxica, lo que puede permitir contar con productos biológicos para combatir diferentes tipos de enfermedades inflamatorias que aquejan a la población.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad del extracto proteico de medusa *Cotylorhiza tuberculata* en un modelo de inflamación de macrófagos. Esto se evaluará mediante la cuantificación de citocinas proinflamatorias y la correlación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de *Cotylorhiza*

tuberculata en la producción de las citocinas mediante su expresión génica y cuantificación en el sobrenadante celular.

Objetivos

El objetivo general: de presente trabajo fue: Determinar la actividad antiinflamatoria de extracto proteico de *Cotylorhiza tuberculata* usando como modelo la línea celular de macrófagos J774A.1. y como objetivos específicos: **se plantearon:** Cuantificación de proteínas del extracto de *Cotylorhiza tuberculata*; Cultivo y proliferación de células J774A.1; Determinar la viabilidad de células J774A.1 de *Cotylorhiza tuberculata*; Cuantificar los niveles de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias IL-1, IL-6 yTNF- α en sobrenadantes de cultivos de células J774A.1 y Correlacionar la actividad anti-inflamatoria de los extractos de *Cotylorhiza tuberculata* en la producción de las citocinas IL-1, IL-6, y TNF- α mediante su expresión génica y cuantificación en el sobrenadante celular.

Conclusiones

La viabilidad celular de J774A.1 estimuladas con *Stevia viscida* y *Cotylorhiza tuberculata* se mantiene en parámetros óptimos de proliferación y desarrollo lo que sugiere su posible evaluación con LPS.

Objetivos y metas alcanzadas

Se logro el cultivo y proliferación de células J774A.1 en medio DMEM, en las condiciones establecidas por la técnica antes mencionada.

Una vez establecido el cultivo se realizó el ensayo de viabilidad celular con *Stevia viscida* como control de ensayo, el cual se realizó a una concentración de 10 mg/ml.

Bibliografía

- Barros de Oliveira M, Sakata RK, Issy A, Gerola L. R & Salomão R. (2011). Citocinas y Dolor. *Brasileira de Anestesiología*, 61 (2), 137-142.

- Curfs J. H, Meis J. F, Hoogkamp-Korstanje J. A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology reviews*. 10(4), 742-780.
- Echeverri D., Fontanilla M. & Buitrago L. (2004). El macrófago en enfermedad vascular ¿El enemigo oculto? *Cardiología del adulto*, 11(3), 164-173.
- Filella X., R. Molina, AM. Ballesta (2002) Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral* Vol. 39. Núm. 2. 47-88
- Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1989: 721-733.
- Kikinger R. (1992). *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria: Scyphozoa) Life History of a Stationary Population. *Marine Ecology*.13(4), 333-362.
- Koo, CH; Sherman, JW; Band, L; Goetz I, E. Molecular diversity of human leukocyte receptors. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 1989; 191 (19).
- Leone A., Lecci R. M, Durante M. & Piraino S. (2013). Extract from the Zooxanthellate Jellyfish *Cotylorhiza tuberculata* Modulates Gap Junction Intercellular Communication in Human Cell Cultures. *Marine Drugs*. 11(5), 1728–1762.
- Lin E., Calvano S. E. & Lowry S. F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 127(2), 117-126.
- Male, DK; Champion, B; Cooke, A; Owen, M. Cell troffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York 1991.
- Pérez-Ruzafa A, Gilabert J., Gutiérrez J.M., Fernández A.I., Marcos C. & Sabah S. (2002). Evidence of a planktonic food web response to changes in nutrient input dynamics in the Mar minor coastal lagoon, Spain. In *Nutrients and Eutrophication in Estuaries and Coastal Waters*, 359-369.
- Robb C., Regan K., Dorrward D. & Rossi A. (2016). Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 38(4), 425–448.

- Saleem Mohamed, Azeem A. K, Dilip C, Sankar C, Prasanth N. V & Duraisami R. (2011). Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(2), 147-149.
- Serhan C. N., Brain S.D, Buckley C. D., Gilroy D. W., Haslett C., O'Neill L. A., Perretti M., Rossi A. G. & Wallace J. L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions, and terms. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(2), 325-332.
- Shaikh R, Pund M M, & Gacche R N. (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6 (4), 355-361.
- Singh M., Kumar V., Singh I, Gauttam V. & Kalia A. N. (2010). Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Mirabilis Jalapa* Linn. Leaves. *Pharmacognosy Research*. 2(6). 364-367.
- Sommer C & White F. (2010). Cytokines, Chemokines, and Pain. *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, 279-302.
- Wallace J. L & Ferraz J. G. (2010). New pharmacologic therapies in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clinics North America*, 39(3), 709-720.

Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos.

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

Profesora Titular
Departamento de Sistemas Biológicos
U.A.M. Xochimilco
Número económico: 33148

M. en C. María Cristina Fresán Orozco

Profesora Titular
Departamento de Sistemas Biológicos
U.A.M. Xochimilco
Número económico: 3829

