



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TRIPTOLIDE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO  
NÍTRICO Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES  
HUMANAS DE VENA UMBILICAL ESTIMULADAS CON LIPOPOLISACÁRIDOO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía  
Ing. Stephanie Santander

Autora  
Gabriela Isabel Gálvez Salazar

Año  
2015

### **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

.....  
**Stephanie Carolina Santander Vásquez**  
**Ingeniera en Biotecnología**  
**C.I. 1715361661**

### **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

.....  
Gabriela Isabel Gálvez Salazar  
C.I. 1721796652

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Centro de Investigación Traslacional (CIT) y a todos sus investigadores. Especialmente a Manuel Baldeón y Cherilyn Sirois por brindarme su conocimiento. A Stephanie Santander, por su paciencia, guía en mi formación profesional y por ofrecerme su amistad.**

**DEDICATORIA**

A Dios por darme la vida y la sabiduría.  
A mi mami por ser mi mejor amiga,  
confidente y brindarme su apoyo  
incondicional en todos los momentos  
de mi vida. A mis hermanos por  
brindarme alegría. A mi papi por sus  
enseñanzas.

## RESUMEN

La disfunción del endotelio se caracteriza por la expresión anormal de genes inflamatorios presentes en patologías crónicas como la sepsis. Los datos muestran que el triptolide obtenido a partir de *Tripterygium wilfordii* Hook F, reduce la expresión de los marcadores inflamatorios bloqueando la señalización de TLR-4 en las células inmunes. En este estudio se determinó el efecto del triptolide sobre la expresión de los genes (IL-1 $\beta$ , IL-6, TFN- $\alpha$ , iNOs HIF-1 $\alpha$ ), relacionados con los procesos inflamatorios mediante RT-qPCR y la expresión fenotípica de las moléculas de adhesión ICAM-I y P-selectina mediante citometría de flujo en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con lipopolisacárido (LPS). Las HUVEC mostraron un aumento en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TFN- $\alpha$ , iNOs e ICAM-I después de ser expuestas durante 24 horas al LPS. Sin embargo, al tratar las células con triptolide el efecto del LPS fue menos agresivo, provocando que la expresión de los genes analizados anteriormente aumentara en menor medida. Además se observó que el efecto inhibitorio del triptolide fue dosis dependiente. Por otro lado, la expresión de HIF-1 $\alpha$  no fue alterada por la acción del LPS ni del triptolide por separado, mientras que la expresión incrementó cuando se combinaron ambos tratamientos. El mismo efecto anti-inflamatorio observado en las HUVEC ha sido reportado en otros estudios realizados con células inmunes. En conjunto, los datos indicaron que el tratamiento con triptolide disminuye la respuesta inflamatoria producida por la estimulación con LPS. Evitar la disfunción del endotelio mediante el tratamiento con triptolide en enfermedades crónicas e inflamatorias podría disminuir la agresividad de la respuesta a estas patologías.

## ABSTRACT

Endothelium dysfunction is characterized by the abnormal expression of inflammatory genes shown in chronic pathologies like sepsis. Data indicated that Triptolide from *Tripterygium wilfordii* Hook F reduces the expression of inflammatory markers inhibiting TLR-4 signaling in immune cells. This study determined the effect of Triptolide on the expression of inflammatory related genes (IL-1 $\beta$ , IL-6, TFN- $\alpha$ , iNOs), nuclear factor HIF-1 $\alpha$ , and the fenotypic expression of adhesion molecules ICAM-I and P-selecting in HUVEC treated with lipopolysaccharide (LPS). Gene expression was measured with RT-qPCR while ICAM-I and P-selectin expression was measured by flow-cytometry. LPS treatment increased the expression of the studied genes and ICAM-I after 24 hours of treatment. The increased expression of the indicated genes was decreased when cells were simultaneously treated with triptolide. The inhibitory effect excerpted by triptolide was dose dependent. Contrary, expression of HIF-1 $\alpha$  was not altered by LPS or Triptolide treatment but was increased when LPS and Triptolide were combined. Similar to the anti-inflammatory effects of Triptolide treatment observed in LPS-stimulated immune cells, Triptolide decreased the expression of inflammatory markers in human endothelial cells. Taken together, data indicated that Triptolide treatment reduce the inflammatory effect of LPS in HUVEC. Correction of endothelium dysfunction by Triptolide in inflammatory and chronic diseases could alter the progression of these pathologies.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| Antecedentes .....   | 1  |
| Planteamiento del problema .....                                 | 2  |
| Hipótesis de la investigación .....                              | 2  |
| Alcance .....  | 3  |
| Justificación .....  | 3  |
| Objetivos de la investigación .....                              | 4  |
| Objetivo general.....  | 4  |
| Objetivos específicos .....                                      | 4  |
| 1. DESARROLLO DEL TEMA.....                                      | 5  |
| Capítulo I.....  | 5  |
| 1. Marco teórico.....  | 5  |
| 1.1. Incidencia y causas del shock séptico .....                 | 5  |
| 1.2. Tratamiento.....  | 18 |
| 1.3. <i>Tripterygium wilfordii</i> Hook F .....                  | 20 |
| Capítulo II .....  | 28 |
| 2. Metodología .....   | 28 |
| 2.1. Cultivo in vitro de las células HUVEC.....                  | 28 |
| 2.2. Tratamiento con triptolide y estimulación con LPS .....     | 29 |
| 2.3. Cuantificación de la concentración de óxido nítrico .....   | 30 |
| 2.4. Extracción de ARN total.....                                | 30 |
| 2.5. Tratamiento de ARN con DNasa I.....                         | 30 |
| 2.6. Expresión génica por PCR en tiempo real .....               | 31 |
| 2.7. Análisis de la expresión de las citocinas proinflamatorias. | 33 |

|  |    |
|--|----|
| 2.8. Expresión de las moléculas de adhesión por citometría de flujo.....   | 33 |
| 2.9. Análisis estadístico .....  | 35 |
| Capítulo III .....   | 36 |
| 3. Resultados.....   | 36 |
| 3.1. Efecto del triptolide en la producción de óxido nítrico en células endoteliales estimuladas con LPS.....                                    | 36 |
| 3.2. Efecto del triptolide en la expresión de las citocinas inflamatorias en células endoteliales estimuladas con LPS .....                      | 37 |
| 3.3. Efecto del triptolide en la expresión de las moléculas de adhesión en la membrana celular de células endoteliales estimuladas con LPS ..... | 44 |
| Capítulo IV.....   | 47 |
| 4. Discusión.....  | 47 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....   | 52 |
| Capítulo V .....   | 52 |
| Conclusiones.....  | 52 |
| Recomendaciones .....  | 53 |
| REFERENCIAS .....  | 54 |
| ANEXOS .....   | 60 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1.- Dosis de estimulación de las células HUVEC con LPS y sus respectivas dosis de tratamientos con triptolide.....                          | 9  |
| Tabla 2.- Secuencias de cebadores empleados para la expresión de las citocinas proinflamatorias y acceso respectivo de las secuencias en CBI..... | 32 |
| Tabla 3.- Condiciones de la reacción para RT-qPCR.....  | 32 |
| Tabla 4.- Anticuerpos primarios y secundarios empleados para cuantificar la expresión de las moléculas de adhesión.....                           | 34 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Modificación de los diferentes grupos funcionales del triptolide .....   | 22 |
| Figura 2.- Efecto del triptolide en la producción de óxido nítrico en las células endoteliales estimuladas con LPS. ....           | 37 |
| Figura 3.- Efecto del triptolide en la expresión de iNOs en las células endoteliales estimuladas con LPS.....                      | 38 |
| Figura 4.- Efecto del triptolide en la expresión de TNF- $\alpha$ en las células endoteliales estimuladas con LPS.....             | 39 |
| Figura 5.- Efecto del triptolide en la expresión de IL-1 $\beta$ en las células endoteliales estimuladas con LPS.....              | 40 |
| Figura 6.- Efecto del triptolide en la expresión de IL-6 en las células endoteliales estimuladas con LPS.....                      | 41 |
| Figura 7.- Efecto del triptolide en la expresión de HIF-1 $\alpha$ en las células endoteliales estimuladas con LPS.....            | 43 |
| Figura 8.- Efecto del triptolide en la expresión de P-selectina en las células endoteliales estimuladas con LPS.....               | 45 |
| Figura 9.-Efecto del triptolide en la expresión de ICAM-I en las células endoteliales estimuladas con LPS.....                     | 46 |
| Figura 10.- Efecto regulador del triptolide en la señalización intracelular de la vía del LPS - TLR4 en células endoteliales. .... | 51 |

## **INTRODUCCIÓN**

### **Antecedentes**

La sepsis es una enfermedad que afecta a más de 750.000 estadounidenses cada año (National Institute of General Medical Sciences, 2014). En Latinoamérica no existen datos estadísticos de esta enfermedad pero al extrapolar estas tasas de incidencia se estima que existen 19 millones de casos de sepsis en todo el mundo (Angus y van der Poll, 2013, p. 841). Según Restrepo (2007), el número de casos y fallecimientos por sepsis en países subdesarrollados es mayor en comparación a la de los países desarrollados. Esto puede deberse a las inapropiadas condiciones sanitarias y a las limitaciones de los servicios de salud. Cabe recalcar que en el Ecuador no existen datos epidemiológicos de los casos de sepsis. (INEC, 2009).

La sepsis fue definida en 1991 por Roger Bone como una “sospecha de infección más el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” la cual es causada por microorganismos (origen parasitario, fúngico, bacteriano o viral) que invaden el cuerpo limitándose a una región del cuerpo o de forma generalizada afectando a todo el organismo (Bone et al., 1992).

Durante el desarrollo de esta enfermedad, el organismo manifiesta una respuesta inmune e inflamatoria ante un proceso infeccioso, lo que desencadena una serie de respuestas celulares y humorales incontroladas. Además, se activa el sistema del complemento, el cual activa y atrae a los leucocitos al sitio de la infección. Durante este proceso de defensa, el endotelio vascular es activado permitiendo la migración y adhesión de las células inmunes estimuladas (Munshi, Fernandis, Cherla, Park, y Ganju, 2002).

El tratamiento para ésta enfermedad aún no se ha establecido debido a la dificultad que implica su diagnóstico. Sin embargo, a los pacientes se administran dosis elevadas de antibióticos, anti-inflamatorios y se toman medidas de apoyo para mantener la presión arterial y estabilizar la respiración (Briseño, 2006).

Debido a que estas acciones no resultan exitosas, es necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para tratar y controlar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). Por otra parte, las terapias actuales se asocian con varios efectos secundarios como el deterioro del sistema inmunológico, la toxicidad gastrointestinal, la enfermedad cardiovascular, la insuficiencia renal y la lesión hepática. (Fauci et al., 2009)

Entre las diferentes alternativas terapéuticas para la sepsis está el uso de sustancias tradicionales como el triptolide, un compuesto aislado de *Tripterygium wilfordii*, una hierba autóctona del sur de China (Matta et al., 2009). Algunos estudios señalan que el triptolide posee efectos inmunosupresores y antiinflamatorios, por lo tanto la medicina tradicional china lo emplea como tratamiento para trastornos relacionados con la inmunidad (Hoyle et al., 2010).

### **Planteamiento del problema**

La sepsis es un problema de salud mundial, caracterizado por provocar una respuesta inmune e inflamatoria incontrolada ante un proceso infeccioso, que puede provocar la muerte.

Debido a la dificultad de realizar su diagnóstico y la ausencia de un fármaco establecido para tratar esta enfermedad, la conducta que se lleva a cabo es administrar antibióticos y anti-inflamatorios para tratar los efectos secundarios que produce la enfermedad.

### **Hipótesis de la investigación**

El triptolide regula el proceso inflamatorio en las células endoteliales, disminuyendo la expresión de las citocinas proinflamatorias, las moléculas de adhesión y modulando la expresión del factor de hipoxia inducible 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ).

## **Alcance**

El alcance de este estudio radica en evaluar el efecto del triptolide sobre la producción de óxido nítrico, las citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) estimuladas con LPS, con la finalidad de evaluar una posible alternativa terapéutica que permita controlar el proceso inflamatorio durante el desarrollo de un proceso séptico.

## **Justificación**

Debido a la elevada tasa de mortalidad que provoca la sepsis y a la falta de tratamientos eficaces para contrarrestar el proceso agresivo de la inflamación, es necesario evaluar nuevas alternativas de tratamientos.

Por esta razón se evaluará que el triptolide regula el proceso inflamatorio en las células endoteliales. Se espera que el triptolide disminuya la expresión de los genes proinflamatorios (iNOs, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ), evite la producción excesiva de óxido nítrico y reduzca la expresión de las moléculas de adhesión, así evitando el desarrollo del síndrome de disfunción múltiple de órganos causado por la sepsis.

Los resultados de esta investigación abrirán nuevas vías en el uso del triptolide para el tratamiento de la sepsis.

## **Objetivos de la investigación**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del triptolide sobre la producción de óxido nítrico, las citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales humanas de vena umbilical estimuladas con LPS.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar el efecto del triptolide en la concentración de óxido nítrico en el medio de cultivo de células HUVEC estimuladas con LPS mediante el método de Griess.
- ✓ Medir la expresión de las citocinas proinflamatorias a partir de la expresión del ARN mensajero de las células HUVEC estimuladas con LPS y tratadas con triptolide.
- ✓ Cuantificar la expresión de las moléculas de adhesión endotelial ICAM-I y P-selectina en células HUVEC estimuladas con LPS y tratadas con triptolide mediante citometría de flujo.

## **1. DESARROLLO DEL TEMA**

### **Capítulo I**

#### **1. Marco teórico**

##### **1.1. Incidencia y causas del shock séptico**

Según datos epidemiológicos del National Institute of General Medical Sciences (NIH), la sepsis afecta a más de 750.000 estadounidenses cada año, de los cuales entre el 28 y 50 % muere (National Institute of General Medical Sciences, 2014). Según estudios realizados por Karlsson et al., Blanco et al., y Martin et al., en otros países que poseen ingresos económicos elevados, como España, Inglaterra, Bélgica y Dinamarca, indican que las tasas de sepsis son similares en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (Angus y van der Poll, 2013, p.841).

Sin embargo, la incidencia de la sepsis grave es desconocida en otros lugares del mundo donde la atención en UCI es deficiente o escasa. Si se realiza una extrapolación de las tasas de incidencia de sepsis en los Estados Unidos, se estima que existen 19 millones de casos en todo el mundo (Angus y van der Poll, 2013, p. 841).

Según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador las infecciones bacterianas sistémicas son la mayor causa de morbimortalidad infantil en el primer mes de vida con un porcentaje del 3.9% y una tasa de morbilidad infantil de 94.5/10000 habitantes (INEC, 2009). La sepsis neonatal bacteriana y la meningitis provocan una morbilidad del 10-40% por cada 1000 niños (Pacheco y González, 2002, p. 241). No existen datos epidemiológicos de los casos de sepsis que se desarrollan en personas adultas en el Ecuador (INEC, 2009).

El shock séptico es una de las causas de muerte más frecuentes relacionada con el shock y se produce como consecuencia de infecciones adquiridas en los cuidados hospitalarios o en el medio ambiente. Entre las causas típicas del shock séptico esta la neumonía que aproximadamente representa la mitad de todos los casos, seguido de las infecciones de tracto urinario e intraabdominal (Angus y van der Poll, 2013, p. 841).

Según un estudio epidemiológico desarrollado por el departamento de Anestesiología, Medicina de Cuidados Críticos y el Centro de Investigación del Cuidado de la Salud de la Universidad de Pittsburgh (EE.UU), se demostró que de 14000 pacientes de la UCI en 75 países, el 62% padecía sepsis crónica debido a bacterias Gram-negativas, mientras que el 47% era debido a bacterias Gram-positivas y el 19% restante fue por hongos (Angus y van der Poll, 2013, p. 841). Entre las bacterias Gram-negativas más comunes que producen esta enfermedad están *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella*; mientras que las bacterias Gram positivas más comunes son: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Angus y van der Poll, 2013, p. 841) (Mayr, Yende y Angus, 2014, pp. 4-6).

### **1.1.1. Shock séptico**

La sepsis fue definida en 1991 por Roger Bone como una “sospecha de infección más el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” que presenta como resultado alteraciones fisiológicas a nivel endotelial (Bone et al., 1992) (Kalil, 2014, p. 5).

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), es una manifestación clínica que se deriva de la respuesta sistémica a la infección (fiebre o hipotermia, taquiquea, taquicardia, hiperleucositosis o leucopenia) (Guyton y Hall, 2011, p. 280). Un paciente debe cumplir mínimo con dos de los cuatro síntomas para poseer la certeza de padecer SIRS. Los síntomas son:

- Frecuencia cardíaca superior a 90 latidos/minuto.
- Temperatura superior a 38°C o inferior a 36°C.
- Leucocitosis (> 12000/L) o leucopenia (< 4000/μL).
- Frecuencia respiratoria elevada (20 respiraciones/ minuto) o la tensión arterial de CO<sub>2</sub> inferior (32 mm Hg)

Sin embargo, cabe recalcar que un paciente puede poseer una infección grave sin cumplir los criterios de SIRS; por otra parte, los criterios que se toman en cuenta en el SIRS pueden estar presentes en otras enfermedades que no son provocadas por un proceso infeccioso como el lupus eritomatoso sistémico, la artritis, la espondilitis anquilosante, la enfermedad de Crohn, la gota y las artropatías (Kalil, 2014, p.5).

La sepsis se define como una “respuesta sistémica provocada por una infección microbiana”, por lo tanto existe una probabilidad muy alta de la presencia de SIRS, lo que incrementa la posibilidad de ocasionar una disfunción endotelial y en consecuencia un daño multiorgánico (Kalil, 2014, p.5).

En cambio, la sepsis grave se define como la “sepsis que se complica por la disfunción de órganos” a diferencia del shock séptico que se lo define como un “estado de insuficiencia circulatoria aguda que se caracteriza por la hipotensión arterial o perfusión tisular” (Kalil, 2014, p.6).

Finalmente, el síndrome de disfunción múltiple de órganos (MODS) se define como la “presencia alterada de la función de los órganos, la cual no puede mantener la homeostasis sin intervención”. Eventualmente el MODS puede causar un síndrome de insuficiencia múltiple de órganos e incluso la muerte (Kalil, 2014, pp. 6-7).

### 1.1.2. Factores de riesgo

La sepsis se ha incrementado de forma alarmante en los últimos años a nivel mundial, debido a que la mayor parte de la población mundial en la actualidad es de avanzada edad y por lo tanto son más propensos a contraer enfermedades crónicas (ejemplos.- el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y diferentes tipos de cáncer) y enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos, que cada vez son más resistentes a los antibióticos (Angus y van del Poll, 2013, pp. 847-848). Además el aumento de procedimientos invasivos, el incremento en la administración de inmunosupresores y de los agentes quimioterapéuticos son otros de los factores que aumentan el número de casos de sepsis a nivel mundial (National Institute of General Medical Sciences, 2014).

Los factores de riesgo que desarrollan la sepsis grave están relacionados con la predisposición del paciente a una infección y a la probabilidad de una disfunción orgánica (Angus y van der Poll, 2013, ). La disfunción multiorgánica aún es poco entendida pero se cree que probablemente se relaciona con el microorganismo infectante, la composición genética y el estado de salud del paciente. La incidencia de la sepsis grave es superior en los hombres, las personas mayores, los lactantes y las personas de raza negra (Angus y van der Poll, 2013, pp. 840- 841) (Kalil, 2014, pp.17-18)

Otros posibles factores que influyen en el desarrollo de esta enfermedad son: la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el cual representa el factor de riesgo más elevado para contraer infecciones; el abuso del alcohol ya que está asociado con mayores tasas de bacteriemia y retrasa la aparición de los síntomas de la enfermedad; factores ambientales como el estado civil de las personas ya que mediante una encuesta realizada en Estados Unidos se observó que las personas solteras, viudas o divorciadas son más propensas a contraer la enfermedad; variación genética ya que posiblemente existen polimorfismos en los genes que codifican para mediadores proinflamatorios y anti-inflamatorios; el lugar donde se encuentra el domicilio ya que puede estar

expuesto a contaminantes, irritantes, alérgenos, tóxicos los cuales generan factores de estrés y alteran el funcionamiento del sistema inmunológico (Vogel, 2012, pp. 204-207).

### **1.1.3. Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas que provoca la sepsis son muy variables debido a los diferentes tipos de shock séptico pero probablemente dependen de: el sitio inicial de la infección, el patrón de disfunción orgánica, el agente causal, el intervalo antes de iniciar el tratamiento y del estado de salud del paciente (Angus y van der Poll, 2013, p. 843).

Sin embargo, las características más representativas del shock séptico son: fiebre, escalofríos, confusión, ansiedad, dificultad para respirar, vasodilatación, náuseas, vomito, elevado gasto cardiaco, estasis sanguínea, desarrollo de microcoágulos de sangre en zonas extensas del cuerpo (Guyton y Hall, 2011, p.280) y alternativamente los síntomas típicos (fiebre o hipotermia, taquipnea, taquicardia, leucocitosis o leucopenia) de la inflamación sistémica que a veces pueden estar ausentes en la sepsis grave, especialmente en individuos mayores (Kalil, 2014, p. 1).

El desarrollo de microcoágulos afecta al flujo sanguíneo y en consecuencia a los órganos del cuerpo al privarlos de oxígeno y nutrientes. Y en el cuadro clínico más crítico provoca el desarrollo de un shock séptico donde disminuye la presión arterial y el corazón se debilita causando daños graves e incluso la muerte (Bone et al., 1992, p. 1644-1646).

#### 1.1.4. Fisiopatología

La mayoría de casos de sepsis son provocados por hongos o bacterias que generalmente no causan enfermedad. Sin embargo, existen ocasiones en que los microorganismos se aprovechan de alguna deficiencia en las defensas innatas del hospedador, lo que les permite ingresar y sobrevivir en este organismo (Fauci et al., 2009, pp.1695-1696).

También existen casos en que los causantes de sepsis son microorganismos patógenos, los cuales tienen la capacidad de evadir las defensas innatas del hospedador mediante toxinas y factores de virulencia (Fauci et al., 2009, p.1696). Entre las diversas estrategias que han desarrollado los microorganismos patógenos para evadir la destrucción que lleva a cabo la primera línea de defensa ( monocitos, macrófagos, células mieloides y células endoteliales) están: cubrirse a sí mismos con una cápsula de polisacárido gruesa la cual no es identificada por los receptores de las células , otra manera es crecer dentro de los fagosomas de los macrófagos inhibiendo su fusión con los lisosomas y su acidificación (Janeway, Travers y Walport, 2012, pp. 37-39, 41-43).

El endotelio al ser una de las primeras líneas de defensa contra microorganismos patógenos puede ser infectado directamente induciendo un modulación fenotípica y genotípica (expresión de citocinas, quimiocinas, proteasas de serina, fibrina, plaquetas activadas, entre otros) de estas células (Aird, 2003, pp. 3766-3767).

Los Microorganismos patógenos o no patógenos ingresan al organismo de los seres humanos, el organismo posee mecanismos extremadamente sensibles para identificar y reaccionar a moléculas microbianas conservadas como es el caso de la fracción del lípido A de lipopolisacárido (LPS) también conocida como endotoxina (Fauci et al., 2009, pp. 1696).

Los microorganismos pueden ser reconocidos debido a que poseen patrones de repetición de estructura molecular sobre su superficie, los cuales se conocen como Patrones Moleculares relacionados con el Patógeno (PAMP's) (Janeway et al., 2012, pp. 187-188). Entre estas estructuras se presentan los ácidos lipoteicoicos que se encuentran ubicados en las paredes celulares de las bacterias grampositivas a diferencia de las bacterias gramnegativas que se reconocen por el lipopolisacárido de la membrana externa. Existen otros casos en que pueden reconocer las subunidades proteínicas repetitivas de los flagelos, ADN bacteriano que posee repeticiones no metiladas del dinucleótido CpG o ARN bicatenario de los virus (Janeway et al., 2012, pp. 85-86).

Mientras que los receptores que reconocen a los PAMP's se denominan Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRR's), los cuales ayudan a estimular de forma directa la fagocitosis a diferencia de otros que se secretan como moléculas las cuales ayudan a promover la fagocitosis de los patógenos mediante activación del complemento u opsonización (Janeway et al., 2012, p. 85). En las células endoteliales los PRR's que se encuentran son: receptores tipo Toll, NOD y RIG (Opitz, Eitel, Meixenberger y Suttorp, 2009, p. 1103).

Durante este proceso son los receptores tipo Toll (TLR), los cuales se caracterizan porque son receptores de señalización que permiten distinguir entre los diferentes tipos de patógenos y además ayudan a dirigir una respuesta inmunitaria apropiada (Janeway et al., 2012, p. 86). En los seres humanos existen 10 genes de TLR que expresan diez proteínas, las cuales reconocen un grupo distinto de patrones moleculares que no son propios del organismo. Entre los TLR de mayor importancia en las respuestas bacterianas están: TLR-4, TLR-2, y TLR-3 (Janeway et al., 2012, pp. 86-89).

Las células endoteliales expresan únicamente dos TLRs (TLR-2; TLR4), predominantemente TLR-4 y TLR-2 en niveles mínimos (Peters, Unger, Brunner y Kirkpatrick, 2003, pp. 49-51). El TLR-4 en las células endoteliales indica principalmente la presencia de LPS, pero este no puede llevar a cabo esta función por si solo ya que requiere la asociación con otras dos proteínas de superficie celular que son CD14 y MD-2 (Janeway et al., 2012, p. 89). El

CD14 se une al LPS creando el complejo CD14: LPS, el cual se cree que es el ligando real de TLR-4 ya que aún no ha sido demostrado totalmente esta interacción. Mientras que en el interior de la célula se une MD-2 a TLR-4 permitiendo que esta interacción brinde la dirección correcta de TLR4 hacia la superficie y el reconocimiento de LPS (Janeway et al., 2012, p. 89). En el momento que se lleva a cabo la interacción entre TLR-4:MD-2 con LPS:CD-14 envía una señal al núcleo de la célula activando el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual desencadena rápidamente la producción y liberación de mediadores como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) encargado de amplificar la señal de LPS y transmitirla a otras células y tejidos (Fauci et al., 2009, p.1696).

Otro tipo de receptores que poseen las células endoteliales son los receptores tipo NOD, los cuales permiten detectar la invasión microbiana e iniciar un proceso inflamatorio en el hospedador. Los péptidos intracelulares NOD1 y NOD2, se caracterizan por reconocer fragmentos definidos de peptidoglucano de la pared celular bacteriana (Fauci et al., 2009, p.1696).

NOD1 se encarga de detectar la presencia de bacterias gramnegativas ya que se une al ácido  $\alpha$ -glutamil diaminopimélico (IE-DAP), el que es un producto de desintegración de los proteoglucanos de las bacterias gramnegativas. Mientras que NOD2 actúa como detector general de infecciones bacterianas ya que se une al dipéptido muramil, presente en los proteoglucanos de bacterias gramnegativas y grampositivas (Janeway et al., 2012, pp. 86-88).

Durante el proceso de reconocimiento de una infección bacteriana, llevada a cabo por los diferentes tipos de receptores, se activa el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) mediante las vías Toll y NOD, lo que provoca la producción de varios mediadores como citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como también conduce a la expresión de moléculas coestimuladoras indispensables para inducir una respuesta inmunitaria adaptativa (Janeway et al., 2012, pp. 88-89)

Entonces una vez que el organismo detecta una infección bacteriana mediante el reconocimiento de moléculas microbianas por parte los fagocitos hísticos y (monocitos, macrófagos, neutrófilos) células endoteliales, este empieza a

desarrollar un proceso inflamatorio, el cual es un mecanismo inmunitario innato para eliminar microorganismos (Janeway et al., 2012, pp. 44). Este proceso se caracteriza por producir y liberar quimiocinas, citocinas, prostanoïdes y leucotrienos; lo que produce ciertos cambios como son: el incremento de la corriente sanguínea del tejido infectado, el aumento de permeabilidad de los vasos sanguíneos y en consecuencia recluta neutrófilos en el lugar de la infección, produciendo dolor (Fauci et al., 2009, p.1696).

Las citocinas que se producen durante este proceso se caracterizan por ejercer efectos autocrinos y paracrinos, como es el TNF- $\alpha$  que estimula a las células endoteliales y a los leucocitos a liberar otras citocinas, aumentar la producción de leucotrienos y prostaglandinas y además a expresar moléculas de superficie celular las que incrementan la adherencia de neutrófilos al endotelio. Entre las quimiocinas predominantes que se producen durante un proceso inflamatorio están: interleucina (IL) 8 encargada de atraer los neutrófilos a lugar de infección, IL-1 $\beta$ , interferón (IFN) gamma e IL-12 (Fauci et al., 2009, p.1697)

Otro signo característico de un proceso de respuesta inflamatoria es la trombosis intravascular, la que se caracteriza por contener a los microorganismos y evitar que la inflamación e infección se propaguen a los demás tejidos. La coagulación sanguínea se produce por la estimulación de IL-6 y otros mediadores, esto a su vez estimula la expresión del factor hístico de los monocitos que conjuntamente con otros factores favorecen al proceso de coagulación (Fauci et al., 2009, p.1697).

Por lo tanto, cuando el hospedador reconoce a un microorganismo invasor genera rápidamente varias respuestas inmunitarias, las que permiten eliminarlos y recuperar el tejido. Entre estas están moléculas antiinflamatorias que neutralizan, inactivan señales microbianas (LPS, factores intracelulares) o disminuyen la producción de mediadores proinflamatorios generados por los macrófagos y neutrófilos. Además generan citocinas anti-inflamatorias (IL-10, IL-4) y moléculas que promueven el restablecimiento del tejido como son las moléculas derivadas de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales (resolvinas, lipoxinas y protectinas) (Fauci et al., 2009, p.1697).

Así como existen casos en que el organismo puede controlar una invasión microbiana localizada, existen otros casos donde es imposible controlar un proceso infeccioso como es el caso de una infección generalizada, por lo que se puede desarrollar una disfunción múltiple de órganos e incluso un choque séptico. En estos casos más complejos, el organismo intensifica la respuesta a la infección por lo que se desarrolla una mezcla compleja de citocinas, elevadas concentraciones de moléculas proinflamatorias, anti-inflamatorias y lesiones endoteliales (Fauci et al., 2009, p.1697).

Las lesiones endoteliales se cree que constituyen el principal mecanismo para desarrollar una disfunción múltiple de órganos ya que éstas se desarrollan debido a las bacterias circulantes, a los mediadores de origen leucocitario y proinflamatorios y a los trombos formados por plaquetas-leucocitos-fibrina que también contribuyen al origen de las mismas. Además las células endoteliales al ser estimuladas con TNF- $\alpha$  producen y liberan citocinas, factor activador plaquetario, moléculas procoagulantes, óxido nítrico, moléculas de adherencia celular (estimulan la adherencia de neutrófilos a las células endoteliales), entre otros mediadores; los cuales atraen a los fagocitos a los sitios infectados y activan las células endoteliales incrementando la permeabilidad vascular (Fauci et al., 2009, pp.1696-1699).

Durante este proceso el uso de oxígeno también es alterado debido a un estado de "hibernación" en el cual la producción de ATP disminuye a medida que se reduce la fosforilación oxidativa, la cual se produce porque existe una disfunción mitocondrial la cual es causada por el óxido nítrico o sus metabolitos, así contribuyendo al desarrollo de una disfunción multiórgánica (Fauci et al., 2009, p.1697).

Si el desarrollo de la enfermedad continua esta puede llegar a evolucionar hasta un choque séptico donde existe una infección generalizada que no puede ser controlada por el organismo y los pacientes aumentan su frecuencia respiratoria y cardíaca, tienen fiebre o hipotermia y liberan grandes cantidades de mediadores los cuales ya no poseen la capacidad de revertir la inflamación

y la infección, por lo que provocan la dilatación de los vasos sanguíneos y la disminución de la presión arterial (Guyton y Hall, 2011, pp. 280-281).

Debido a la hipotensión que desarrolla el paciente, el corazón compensa esta falla trabajando a mayor velocidad, la que no puede permanecer por mucho tiempo ya que el músculo cardíaco se debilita y no puede ofrecer un suministro adecuado de oxígeno y sangre a los tejidos del cuerpo. En consecuencia no llegan todos los nutrientes necesarios a los tejidos generando una falla multiorgánica e incluso la muerte (Guyton y Hall, 2011, pp. 280-281).

En un proceso de respuesta inflamatoria se lleva a cabo el reclutamiento de leucocitos como se dijo anteriormente, pero para que se pueda llevar a cabo este proceso se requiere la expresión de las moléculas de adhesión celular, las cuales son inducidas sobre las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos (Abbas et al., 2012, pp. 37-38).

Existen tres familias de moléculas de adhesión clasificadas según su estructura que son: selectinas, integrinas y proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas (Abbas et al., 2012, p. 38).

### Selectinas

Las selectinas, son glucoproteínas de membrana, las cuales se unen a grupos de carbohidratos específicos presentes en las membranas plasmáticas. Esta clase de moléculas de adhesión, se inducen sobre los leucocitos y el epitelio activado e inician las respectivas interacciones de baja afinidad entre leucocitos y endotelio (Abbas et al., 2012, p. 39).

Existen tres tipos de selectinas, de las cuales dos son expresadas por las células endoteliales y la restante por los leucocitos. Las dos moléculas expresadas por las células endoteliales son E-selectina (CD62E) y P-selectina (CD62P), mientras que la molécula de adhesión expresada en los leucocitos es

L-selectina (CD62L) (Abbas et al., 2012, pp. 39-40) (Barreriro y Sánchez, 2009, pp. 552-554).

P-selectina, fue descubierta en las plaquetas y además es almacenada en los cuerpos de Weibel Palade situados en el citoplasma de las células endoteliales. Esta molécula se expresa en la superficie celular como respuesta a: citocinas, histamina (mastocitos), trombina y productos microbianos. En cambio la E-selectina, se expresa en la superficie de las células endoteliales como respuesta a IL-1, TNF y productos microbianos (Ej. LPS) después de transcurrir una o dos horas de tener contacto con los mismos (Abbas et al., 2012, pp. 39-40).

A diferencia de las dos anteriores la L-selectina (CD62L) es expresada únicamente por los leucocitos y se expresa en mayor cantidad en la superficie de los mismos en el momento que las células endoteliales son activadas por acción de las citocinas. La expresión de esta molécula de adhesión en los neutrófilos sirve para ligar a las células endoteliales que fueron activadas por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Abbas et al., 2012, pp. 39-40).

Una vez que las células endoteliales expresan las moléculas de adhesión respectivas, estas requieren de ciertos ligandos expresados por los leucocitos para ser reconocidos. Los ligandos que expresan los leucocitos se encuentran en el ápice de las microvellosidades, lo que permite una interacción más fácil con las moléculas de superficie de las células endoteliales (Abbas et al., 2012, pp. 39-40).

Estos ligandos son carbohidratos, los cuales se encuentran en algunas glicoproteínas de las membranas celulares como: células T de memoria y efectoras (previamente activadas), monocitos y granulocitos. El ligando que reconoce a P-selectina se llama PSGL-1 a diferencia de E-selectina y L-selectina que pueden ser reconocidas por diferentes moléculas incluyendo PSGL-1 (Abbas et al., 2012, pp. 39-40).

PSGL-1, es un tipo de glicoproteína (mucina) que reconoce a los tres tipos de selectinas. Se considera como el ligando principal de P-selectina y se expresa en linfocitos activados, células mieloides y macropartículas derivadas de los monocitos. Mientras que PSGL-1 y CD44 son los ligandos (mucinas) que reconocen a E-selectina y L-selectina es reconocida por sialomucinas como PSGL-1, MAdCAM-1, entre otras, las cuales en conjunto son conocidas como adresasinas del nódulo periférico (PNA<sub>d</sub>) (Barreriro y Sánchez, 2009, pp. 552-554).

### Integrinas

Las integrinas, son glicoproteínas heterodiméricas transmembrana que se expresan en la superficie celular. Están compuestas por dos cadenas polipeptídicas, una subunidad  $\alpha$  larga (120-170 kDa) y una subunidad  $\beta$  pequeña (90-100 kDa) (Barreriro y Sánchez, 2009, pp. 552-554). Estas interaccionan con otros ligandos que permiten la adhesión entre la célula y la matriz extracelular o entre célula y célula (Abbas et al., 2012, pp. 40-41).

Existen más de treinta integrinas de las cuales dos son las más importantes: VLA-4 (Very Late antigen 4, CD49d/CD29 o  $\beta_2 \alpha_4$  o) y LFA-1 (Antígeno asociado a función leucocitaria 1 también conocido como  $\beta_2 \alpha_1$  o CD11a/CD18), la cual se caracteriza por ser el miembro más prominente de la familia de integrinas  $\beta_2$  (Barreriro y Sánchez, 2009, pp. 555-557).

Las integrinas de igual manera que las selectinas requieren de ligandos, en este caso son las moléculas de adhesión. Para el ligando LFA-1 es la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-I, CD54) y para VLA-4 es la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-I, CD106) (Abbas et al., 2012, pp. 40-41).

ICAM-I, se caracteriza porque participa en el rodamiento, detención y adhesión de los leucocitos en los vasos sanguíneos que se encuentran en los sitios que existe inflamación y en los órganos linfoides mediante la unión de los ligando de la superfamilia de Ig de ICAM-I e ICAM-II (CD102) que son expresados en el

endotelio vascular (Barreriro y Sánchez, 2009, pp. 555-557). Y además es expresada por las células dendríticas, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales que han sido activadas por citocinas) (Abbas et al., 2012, pp. 40-41).

VCAM-I al igual que ICAM-I es una proteína perteneciente a la superfamilia de las Ig, la cual es expresada por células endoteliales estimuladas con citocinas y está implicada en el reclutamiento, rodamiento y detención firme de los leucocitos en los vasos sanguíneos donde se produce un proceso inflamatorio (Abbas et al., 2012, pp. 40-41).

Como se dijo anteriormente, el proceso de aislamiento de los leucocitos (neutrófilos, linfocitos monocitos) desde la sangre hasta los diferentes tejidos se lleva a cabo mediante un proceso de adhesión, el cual consta de diferentes tipos de células, moléculas de adhesión y quimiocinas. En donde las quimiocinas producidas por estímulos externos, leucocitos u otras células intervienen en procesos inflamatorios ya que son indispensables para reclutar, estimular el movimiento y migración de los leucocitos circulantes. Además inducen el agrupamiento de las integrinas en la membrana celular y son necesarias para la migración de las células dendríticas a los procesos inflamatorios) (Abbas et al., 2012, pp. 41-43).

## **1.2. Tratamiento**

El tratamiento para esta enfermedad no es específico debido a la dificultad de su diagnóstico, ya que, no se puede conocer cuando una infección localizada se ha convertido en sistémica y por lo tanto requiere soporte hemodinámico más agresivo. Además, no existe ningún criterio estándar para diagnosticar disfunción endotelial (Angus y van der Poll, 2013, p. 847).

Como no existe un tratamiento ni diagnóstico específico para esta enfermedad, es necesario indagar nuevas alternativas terapéuticas, tomando en cuenta que

el presupuesto destinado para el estudio y tratamiento de la sepsis, es menor que el de otras enfermedades (Kalil, 2014, p.18). Y el costo por caso de shock séptico es de \$22.100 por paciente y anualmente es de \$16.7 billones solamente en Estados Unidos (Kalil, 2014, p. 17).

En la actualidad, el tratamiento empírico principal son dosis elevadas de antibióticos administrados mediante vía intravenosa con la finalidad de provocar muerte bacteriana. Junto con los antibióticos se administran antiinflamatorios para contrarrestar el proceso inflamatorio agresivo producido por la sepsis y medidas de apoyo para estabilizar la respiración y el mantenimiento de la presión arterial. Sin embargo, no siempre es exitoso por lo que la tasa de mortalidad tiende a elevarse (Angus y van der Poll, 2013, pp. 847-848).

Debido a que ninguno de los tratamientos nombrados anteriormente es completamente exitoso y las terapias actuales se asocian con varios efectos secundarios como: el deterioro del sistema inmunológico, la toxicidad gastrointestinal, la enfermedad cardiovascular, la insuficiencia renal y la lesión hepática; es necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para tratar y controlar la SRIS (Fauci et al., 2009, pp.1699-1701).

Entre las diferentes alternativas terapéuticas para la sepsis está el estudio del efecto de varias sustancias tradicionales como el triptolide, un compuesto aislado de *Tripterygium wilfordii*, hierba autóctona del sur de China (Matta et al., 2009, p. 22). Algunos estudios señalan que posee efectos inmunosupresores y antiinflamatorios razón por lo que la medicina tradicional china lo emplea como tratamiento para trastornos relacionados con la inmunidad (Hoyle et al., 2010, p. L830).

### 1.3. *Tripterygium wilfordii* Hook F

*Tripterygium wilfordii* Hook F (TWHF) es una planta medicinal, la cual crece principalmente en el sur de China y comúnmente es conocida como lei gong teng lo que significa viña del dios del trueno. Los primeros estudios que demostraron sus aplicaciones medicinales se realizaron en el año 1476; sin embargo, en los años 1960 atrajo la atención del mundo ya que se demostró mediante varios estudios clínicos realizados en China, que los compuestos de esta planta fueron efectivos para tratar artritis reumatoide (Zhou, Yang, Ding, Chao Li, Miao., 2012, p. 457).

A partir de TWHF se han aislado aproximadamente 400 compuestos en los últimos treinta años, entre los cuales están: más de 46 diterpenoides, 26 alcaloides, 20 compuestos nuevos triterpenoides y otras moléculas pequeñas (Wong, Yuan y Luk, 2012, p. 312).

Los compuestos anteriormente nombrados se obtienen a partir de las hojas o raíz de TWHF mezclándolos con agua y metanol (o etanol) (Wong et al., 2012, p. 312). Dependiendo de la forma de la preparación del compuesto obtenido se emplea como tratamiento para otras enfermedades como son: espondilitis anquilosante, nefropatía por IgA, psoriasis, lupus sistémico, entre otras. De la totalidad de compuestos obtenidos a partir de TWHF existen tres compuestos que poseen una gran bioactividad anti-inflamatoria, anticancerígena y generan efectos inmunosupresores y estos son: triptolide, celastrol y tripchlorolide (Wong et al., 2012, p. 312).

TWHF posee varias acciones farmacológicas pero la más investigada es la actividad inmunosupresora ya que inhibe su respuesta celular pro-inflamatoria (Wong et al., 2012, p. 312) (Li, Jiang y Zhang, 2014, pp.68-69).

### **1.3.1. Triptolide compuesto obtenido de *Tripterygium wilfordii* Hook F**

Kupchan empezó a investigar los extractos etanólicos de TWHF en 1972, a partir del cual separó diferentes compuestos y aclaró la estructura del triptolide y sus análogos (tripdiolide, triptonide, triptolidenol, 16-hydroxytriptolide y triptriolide), determinando que el triptolide y sus análogos poseen actividades inmunosupresoras, anti-fertilidad y anticancerígenas, a excepción del triptolide que además posee actividad anti-inflamatoria (Zhou et al., 2012).

El triptolide es un diterpeno triepóxido que presenta como desventajas, poca solubilidad en agua, alta toxicidad y bajo rendimiento por lo tanto no puede ser empleado sistemáticamente de forma clínica. Por tal motivo, actualmente se ha modificado la estructura del triptolide y se sintetizan numerosos compuestos análogos con la finalidad de incrementar su rendimiento y disminuir su toxicidad (Zhou et al., 2012) (Li, Jiang y Zhang., 2014, pp. 69-74).

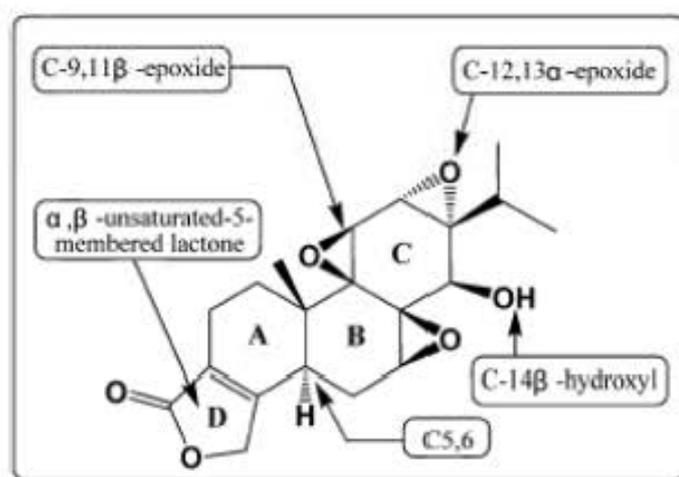
#### **1.3.1.1. Modificaciones estructurales**

Años atrás TWHF se empleaba en la agricultura como pesticida, lo que se utilizó como antecedente para asumir que el triptolide es altamente tóxico en humanos. Pero a pesar de ser tóxico se comprobó sus actividades biológicas en modelos animales y en clínicas, lo que demostró que su toxicidad es dosis-dependiente provocando muerte en algunos modelos animales con dosis mínimas o causando reacciones adversas que generalmente ocurren en el tracto gastrointestinal y piel (náuseas, vómito, diarrea, sangrado gastrointestinal, úlceras duodenales, cambios en la pigmentación de la piel y erupciones en la piel). Pero estas consecuencias podrían ser solucionadas ya sea ajustando apropiadamente la dosis del triptolide o modificándolo sintéticamente (Zhou et al., 2012).

La modificación de varios grupos funcionales de la estructura del triptolide ha permitido generar compuestos análogos los cuales: disminuyen su toxicidad, aumentan su solubilidad en agua y mejoran su bioactividad ampliando sus aplicaciones terapéuticas (Zhou et al., 2012, pp. 459-465).

Este proceso de modificación estructural del triptolide se basa en la relación estructura-actividad (SAR), es decir que determina los grupos químicos que generan un efecto biológico en el organismo. Lo que permite realizar la respectiva modificación de la actividad biológica o del efecto del compuesto, cambiando su estructura química (Zhou et al., 2012, pp. 459-465).

Para generar los diversos efectos del triptolide y obtener sus compuestos análogos se realizó modificaciones de los siguientes grupos funcionales: grupo hidroxilo C-14, grupo epóxido, anillo de lactona y la posición C5 y C6 del triptolide. Los cuales brindan su amplio espectro de actividad biológica (Zhou et al., 2012, p. 460).



**Figura 1. Modificación de los diferentes grupos funcionales del triptolide**

Tomado de Zhou, Yang, Ding, Li, y Miao, 2012, p. 460.

### 1.3.2. Propiedades del triptolide

A pesar de que el triptolide posee una actividad biológica muy amplia tiene varias consecuencias debido a su toxicidad, ya que afecta a tejidos y órganos provocando que esta terapia no sea fácilmente aplicable. Sin embargo, el triptolide es el único compuesto de TWHF que posee un espectro bioactivo amplio ya que ha demostrado ser: inmunosupresor, anti-inflamatorio, anti-fertilidad, anticancerígeno y anti-cistogénesis (Zhou et al., 2012, p. 460).

#### Actividades biológicas

El triptolide presenta algunas actividades específicas como:

Anti-inflamatoria.- posee una actividad inmunosupresora es decir que generalmente suprime la inmunidad celular, la cual se encarga de inhibir la respuesta proinflamatoria suprimiendo la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, IL-23, prostaglandina  $E_2$ , ciclooxigenasa (COX-2) e IFN- $\gamma$ . Esto se debe a que el primer blanco en donde actúa el triptolide es en el factor nuclear (NF)- $\kappa$ B, suprimiendo las respuestas pro-inflamatorias por atenuación de la señalización intracelular incluyendo la señalización de los receptores tipo Toll (TLRs) (Wong et al., 2012, pp. 312-313).

En el caso de atenuar la señalización de los TLRs, se disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias ya que cuando existe la estimulación de estos receptores induce a la producción de las mismas. Como es el caso del lipopolisacárido bacteriano (LPS), el cual activa al TLR4 generando la producción de TNF- $\alpha$  y varias citocinas. Esto se ha demostrado en varios estudios realizados con macrófagos de ratón, en donde se comprueba que el triptolide suprime la respuesta inflamatoria atenuando la expresión génica de los TLRs (Wong et al., 2012, p. 313-314).

Además, el triptolide tiene la capacidad de inhibir la función y proliferación de las células T cuando son estimuladas por factores externos como es el caso del LPS, exotoxinas y ácidos teicoicos. También disminuye la producción de IL-2,

el cual es un importante factor de crecimiento celular y estimula a la diferenciación de las células T (Zhou et al., 2012, pp. 468-469).

Por tanto, el triptolide provoca actividades inmunosupresoras y anti-inflamatorias ya que inhibe la proliferación celular e induce a procesos apoptóticos. Disminuyendo la liberación de citocinas y mediadores pro-inflamatorios que generan las células (Zhou et al., 2012, p. 468).

Anticancerígena.- esta propiedad se debe a su elevada citotoxicidad, la cual induce a procesos apoptóticos de las células cancerígenas de diferentes tejidos (colon, mama, ovario, sangre, próstata, pulmón y riñón), inhibe procesos de metástasis tumoral y neo-angiogénesis atenuando la proliferación, migración y formación de células endoteliales a concentraciones de 15 a 60 ng, lo que se demostró de forma in vitro con células HUVEC (Zhou et al., 2012, pp. 466-468).

Además, se ha demostrado que el triptolide posee efectos antitumorales mediante estudios comparativos, los cuales verifican que su efecto es superior a otras drogas (adriamicina, mitomicina, taxol, cisplatino), pero su desventaja es que demora más de 24 horas en inducir apoptosis o citotoxicidad a diferencia de otras drogas (viscristina, doxorubicina) (Zhou et al., 2012, pp. 466-468).

Este efecto se debe a que el triptolide posee la capacidad de intervenir en el ciclo celular inhibiendo funciones biológicas esenciales para supervivencia de las células, degrada ADN, libera el citocromo C para generar apoptosis mediante la vía mitocondrial de la célula y suprime la expresión de los oncogenes ya que el triptolide inhibe la transcripción del gen por erradicación de la actividad del ARN polimerasa de células cancerígenas. También se ha demostrado que el triptolide activa la caspasa 9 y la proteína p53 las cuales inducen la muerte celular de células cancerígenas mediante un proceso apoptótico, mostrando su potencial acción anticancerígena (Wong et al., 2012, p. 314).

Anti-fertilidad.- al realizar los estudios de las dos propiedades del triptolide anteriormente nombradas se reportó que produce como efecto secundario amenorrea en mujeres e infertilidad y anomalías en la esperma en hombres (Zhou et al., 2012, p. 468).

Esto se confirmó mediante estudios en ratones, ya que demostraron que generan infertilidad en ratones machos debido a la suspensión de la motilidad de los espermatozoides en el epidídimo y a la reducción en el número de esperma (Zhou et al., 2012, p. 468).

Las dosis (0.05 mg/kg) del triptolide en ratones que se utilizan para generar este efecto son más bajas que las empleadas para el efecto inmunosupresor. Sin embargo, al administrar dosis más bajas, el efecto de infertilidad era reversible. Por lo tanto, este es un potencial anticonceptivo para hombres siempre y cuando se logre optimizar una dosis idónea, la cual no genere infertilidad permanente o afecte a la espermatogénesis (Zhou et al., 2012, p. 468).

Anti-quistogénesis.- en este caso el triptolide es un agente contra la enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD). La cual se produce principalmente por fallas crónicas renales como consecuencia de las mutaciones genéticas que se produce en policistina 1 o policistina 2 (Zhou et al., 2012, p. 469).

La acción del triptolide en esta enfermedad es disminuir la formación y carga quística. Esto se demostró en ratones para los cuales se emplearon dosis de 0.07 mg/Kg (Zhou et al., 2012, p. 469).

### **1.3.3. Mecanismo de acción**

Anteriormente, se creía la hipótesis que el triptolide actuaba directamente en ciertos factores de transcripción como son: factor nuclear- $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B), factor de

transcripción de choque térmico 1 (HSF1), activador de la proteína-1 (AP-1), factor nuclear de células T activadas (NF-AT) y el factor de hipoxia inducible 1 (HIF-1 $\alpha$ ). Pero, conforme a nuevas investigaciones, se hizo hincapié en el efecto inhibitorio sobre el NF- $\kappa$ B ya que se observó el efecto del triptolide en diversos ensayos realizados con células inmunes, fibroblastos, células epiteliales y células cancerosas. Lo que permitió afirmar que, es responsable de múltiples actividades biológicas, tales como: anti-inflamación, inmunosupresión, anti-proliferación, inducción de la apoptosis, anti-angiogénesis y la lucha contra la metástasis (Zhou et al., 2012, p. 472).

Según varios estudios se cree que el triptolide ejerce sus acciones modulando la actividad transcripcional del factor nuclear (NF)- $\kappa$ B ya que cumple un papel muy importante en el control de la activación de varios genes inflamatorios (Wu et al., 2005, p. 142).

El NF- $\kappa$ B se encuentra en el citosol como un heterodímero complejo junto a su proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ , la que regula su retención citoplasmática. En el caso que se generen señales oncogénicas o pro-inflamatorias activan I $\kappa$ B quinasa (IKK), la cual posteriormente fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  y se degrada, lo que conduce a la disociación de I $\kappa$ B $\alpha$  de NF- $\kappa$ B. Entonces, al liberarse NF- $\kappa$ B se transloca del citoplasma al núcleo para activar la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias y oncogenes (Wong et al., 2012, pp. 315-316) (Wu et al, 2005, p. 142).

Con la finalidad de aclarar el mecanismo de supresión de la inmunidad innata que produce el triptolide, se realizó un estudio en macrófagos peritoneales de ratón donde se demostró que el triptolide suprime la actividad fagocítica de los macrófagos estimulados por LPS, además inhibe la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el óxido nítrico y la expresión génica de múltiples citocinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, el triptolide probablemente inhibe la expresión de varios genes a través de la atenuación de la actividad del NF- $\kappa$ B (Wu et al., 2006, pp. 147-149).

Sin embargo, a partir del año 2005 se encontró que la inhibición transcripcional que genera el triptolide no se limita a las transcripciones bajo el control de NF- $\kappa$ B, ya que al parecer provoca un efecto general en los diversos factores de transcripción. Por lo tanto, el triptolide infiere como inhibidor de la transcripción global debido a los cambios estructurales que genera en el núcleo y nucléolo celular, así como la regulación negativa de los genes en las células que han sido tratados con triptolide (Zhou et al., 2012, p. 472).

Por lo tanto, se cree que la función del triptolide en los diferentes factores de transcripción es principalmente inhibir la transcripción de los ARNm de vida corta, lo que provoca la reducción de la expresión de sus proteínas (Zhou et al., 2012, p. 472).

## Capítulo II

### 2. Metodología

#### 2.1. Cultivo in vitro de las células HUVEC

Los protocolos empleados para el cultivo de las células HUVEC (CRL-1730™, ATCC, EEUU) fueron estandarizados en el laboratorio del Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas (UDLA).

El cultivo de la línea celular HUVEC, se mantuvo en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X (DMEM 1X) (11885-084, Gibco, EEUU) suplementado con Fetal Bovine Serum (FBS) al 20% (10270-106, Gibco, EEUU) y antibiótico penicilina-estreptomina al 1% (15240-062, Gibco, EEUU) en una incubadora (8000 WJ, Thermo Scientific, EEUU) a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa de 90% (Duran et al., 2014, p.8).

Para los experimentos de este estudio, las células HUVEC fueron sembradas a partir de un cultivo preexistente y se procedió a realizar pases sucesivos. Para ello se retiró el medio de cultivo, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X, pH 7.4 (Phosphate-Buffered Salines) (10010-023, Gibco, EEUU) e inmediatamente se agregó 3 mL de TryPLE™ Express 1X (12605-010, Gibco, EEUU) en cada caja de cultivo durante 4-6 minutos a 37°C para levantarlas (Bala, Ambwani y Karmakar, 2011, p. 217).

Posteriormente, se añadió medio de cultivo y se recuperó el medio con las células en un tubo Falcón de 50 mL, se contaron las células en una cámara Neubauer y se sembraron 5x10<sup>6</sup> células por pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos (657160, Greiner Bio-one, EEUU) ajustando el volumen a 3 mL con el medio descrito anteriormente y se procedió a incubar estas placas a 37°C durante 24 horas.

## 2.2. Tratamiento con triptolide y estimulación con LPS

Los protocolos empleados para el tratamiento de las células HUVEC que se usaron son los utilizados en estudios realizados anteriormente con células RAW 264.7 (TIB-71™, ATCC, EEUU) los cuales fueron estandarizados en el laboratorio CIT-UDLA.

Transcurridas las 24h de incubación, las células HUVEC fueron lavadas con PBS 1X, pH 7.4 como se indica en el apartado 2.1 con la finalidad de eliminar las células muertas, posteriormente fueron tratadas simultáneamente con triptolide (38748-32-2, Sigma-Aldrich, EEUU) y LPS (L3024, Sigma-Aldrich, EEUU).

Las diferentes concentraciones de triptolide y LPS aplicadas se obtuvieron a partir de estudios previos realizados en células RAW 264.7 en el CIT (Tabla #1)

**Tabla 1. Dosis de estimulación de las células HUVEC con LPS y sus respectivas dosis de tratamientos con triptolide**

| Tratamientos (T) | LPS (µg/mL) | TRIPTOLIDE (ng/mL) |
|------------------|-------------|--------------------|
| CONTROL          | -           | -                  |
| LPS              | +           | -                  |
| TR60             | -           | 60                 |
| TR60LPS          | +           | 60                 |
| TR50LPS          | +           | 50                 |
| TR40LPS          | +           | 40                 |

Las concentraciones del triptolide y del LPS fueron diluidas en el medio de cultivo DMEM 1X suplementado con FBS al 20%. Una vez aplicados los tratamientos las células se incubaron por 24h con las mismas condiciones de cultivo especificadas en el apartado 2.1.

### **2.3. Cuantificación de la concentración de óxido nítrico**

La concentración de óxido nítrico se determinó mediante el juego de reactivos Griess (G2930, Promega, EEUU). Para ello, después de transcurrir 24 horas de tratamiento, se procedió a recuperar 1.5 mL del sobrenadante de cada uno de los pocillos de las placas del cultivo tratado y finalmente se cuantificó la concentración de óxido nítrico por triplicado siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.4. Extracción de ARN total**

Los protocolos empleados para la extracción del ARN por el método del trizol a partir de las células HUVEC fueron estandarizados en el CIT.

Una vez obtenido el sobrenadante de las células tratadas, se procedió a realizar la extracción de ARN total con el TRIzol® reagent (15596026, Invitrogen™, EEUU) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Afonyushkin, Oskolkova, Binder y Bochkov, 2011, p.99).

Para ello, se retiró el medio de cultivo sobrante y se lavó 2 veces con PBS 1X, pH 7.4, después se agregó 450 µL de trizol en cada pocillo hasta que se lisaron las células y se formó una solución viscosa. Este procedimiento se describe en el inserto de TRIzol® reagent (monocapa de crecimiento) y es recomendable hacerlo en frío (4°C).

Una vez obtenido el ARN total, se dejó secar las muestras durante 3 horas y se resuspendió en 45 µL de agua Ultra Pure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (DEPC) (750023, Invitrogen™, EEUU), para luego ser almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

### **2.5. Tratamiento de ARN con DNasa I**

Las muestras de ARN total fueron analizadas por espectrofotometría (Synergy™ HT, BioTek, EEUU) mediante la relación 260/280 nm para obtener

la calidad y para la cuantificación  $1\text{DO}_{260}:40\mu\text{g}/\text{mL}$ . Una vez obtenidos los resultados se procedió a tratar con Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNAasa I) (18068-015, Invitrogen™, EEUU) para eliminar la contaminación con ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez terminado el tratamiento con DNasa I se cuantificó nuevamente mediante espectrofotometría y se realizó las respectivas diluciones en agua DEPC para obtener una concentración de  $200\text{ng}/\mu\text{L}$  de ARN total para todos los tratamientos.

## **2.6. Expresión génica por PCR en tiempo real**

Los protocolos para la expresión de las citocinas proinflamatorias y del factor nuclear (iNOs, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -actina como gen de referencia) fueron estandarizados en el CIT (Tabla #3), empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR) a partir del ARN total.

Para poder llevar a cabo las diversas reacciones se empleó el juego de reactivos SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-step qRT-PCR (11736-059, Invitrogen™, EEUU), con sus respectivos cebadores específicos (Tabla #2).

**Tabla 2.- Secuencias de cebadores empleados para la expresión de las citocinas proinflamatorias y acceso respectivo de las secuencias en National Center for Biotechnology Information (NCBI).**

| Gen            | Acceso #    | Primer set                         | Tm    | Tm promedio | Pb (producto) |
|----------------|-------------|------------------------------------|-------|-------------|---------------|
| B-actina       | X00351.1    | (F) 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'    | 66.03 | 62.86°C     | 353           |
|                |             | (R) 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCT-3' | 59.7  |             |               |
| TNF- $\alpha$  | NM_000594.3 | (F) 5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGC-3'      | 58.26 | 58°C        | 215           |
|                |             | (R) 5'-GGTGTGGGTGAGGAGCACAT-3'     | 62.13 |             |               |
| IL-1 $\beta$   | NM_000576.2 | (F) 5'-CTGTCCTGCGTGTGAAAGA-3'      | 58.42 | 53°C        | 70            |
|                |             | (R) 5'-TTGGGTAATTTTGGGATCTACA-3'   | 55.80 |             |               |
| iNOs           | NM_000625.4 | (F) 5'-GCCTCGCTCTGAAAGA-3'         | 56.1  | 58.6°C      | 500           |
|                |             | (R) 5'-TCCATGCAGACAACCTT-3'        | 52.82 |             |               |
| IL-6           | NM_000600.3 | (F) 5'-CCACTCACCTCTTCAGAACG-3'     | 57.93 | 61°C        | 115           |
|                |             | (R) 5'-CCTCTTTGCTGCTTTCACAC-3'     | 57.59 |             |               |
| HIF-1 $\alpha$ | NM_181054.2 | (F) 5'-CATAATGTGAGTTCGCATCT-3'     | 53.52 | 53.1°C      | 98            |
|                |             | (R) 5'-ATATCCAAATCACCAGCATC-3'     | 53.07 |             |               |

**Tabla 3.- Condiciones de la reacción para RT-qPCR**

|      |                                  | iNOs            | TNF- $\alpha$  | IL-1 $\beta$   | IL-6           | HIF- $\alpha$   | B-act          |
|------|----------------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| cDNA | Transcripción reversa            | 48°C<br>30 min  | 55°C<br>3 min  | 45°C<br>15 min | 45°C<br>15 min | 48°C<br>30 min  | 45°C<br>15 min |
|      | Activación termal-ADN polimerasa | 95°C<br>10 min  | 95°C<br>3 min  | 95°C<br>15 seg | 95°C<br>15 seg | 95°C<br>10 min  | 95°C<br>15 seg |
| qPCR | Ciclado                          | 50              | 40             | 47             | 40             | 50              | 40             |
|      | Desnaturalización                | 95°C<br>15 seg  | 95°C<br>15 seg | 95°C<br>15 seg | 95°C<br>15 seg | 95°C<br>15 seg  | 95°C<br>15 seg |
|      | Alineamiento                     | 58.6°C<br>1 min | 58°C<br>30 seg | 53°C<br>30 seg | 61°C<br>30 seg | 53.1°C<br>1 min | 58°C<br>30 seg |
|      | Extensión                        | 70°C<br>1 min   | 70°C<br>30 seg | 72°C<br>30 seg | 70°C<br>30 seg | 72°C<br>30 seg  | 70°C<br>30 seg |
|      | Extensión final                  |                 | 72°C<br>5 min  |                | 72°C<br>5 min  | 72°C<br>7 min   | 72°C<br>30 seg |

## **2.7. Análisis de la expresión de las citocinas proinflamatorias**

El análisis de la expresión de citocinas proinflamatorias se realizó mediante el método de Livak  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , también conocido como el método comparativo Threshold level ( $C_T$ ) en el termociclador para tiempo real (CFX96 Touch™, Bio-Rad, EEUU) (Schmittgen y Livak, 2008, p. 1103).

El método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ), se fundamenta en un análisis de expresión génica relativa, el cual asume que tanto el gen de referencia como el target tienen una amplificación óptima es decir aproximado de 100% de eficiencia. Además, para emplear este método, las eficiencias del gen de referencia y del target deben ser similares ya que el gen target es normalizado en relación al gen de referencia, lo que permite compensar la diferencia en la cantidad de la muestra (Bio-Rad, 2006, pp. 41-42).

## **2.8. Expresión de las moléculas de adhesión por citometría de flujo**

La expresión en la superficie celular de las moléculas de adhesión ICAM-I (CD54) y P-selectina (CD62) de las células HUVEC fueron analizadas mediante citometría de flujo (Orfao, 2006, p.59).

Las células HUVEC, fueron sembradas como se indica en el literal 2.1. Posteriormente, las células fueron estimuladas con LPS y tratadas con triptolide durante 14 horas y 3 horas para estimular la expresión de ICAM-I y P-selectina, respectivamente (Yoon, Choi, Lee, Cho y Rho, 2010, p. 3) (Duan et al., 2013, p.4) (Wolf, Howat, Abraham, Pearson y Lawson, 2013, p.21).

A continuación, las placas fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, pH 7.4 y se procedió a disociarlas con una solución de EDTA 0.5 mol/L (1mL/placa) a temperatura ambiente durante 3 minutos. Una vez desprendidas, las células fueron separadas por pipeteo y se adicionó tres volúmenes extra de PBS 1X, pH 7.4. Las células fueron transferidas a un tubo cónico de 15 mL, y se añadió

hasta 6 mL de PBS 1X, pH 7.4, se centrifugó a 450 gravedades durante 3 minutos. Se procedió a desechar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 6 mL de PBS 1X, pH 7.4 y se centrifugó a 450 gravedades durante 3 minutos. Finalmente se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 350  $\mu$ L de buffer (PBS 1X, pH 7.4 más FBS al 1%) (Rahman, 2014, p. 25).

Una vez preparadas las células estas fueron teñidas, por lo que se transfirió 150  $\mu$ L de células por cada tubo eppendorf de 1.5 mL. Cabe recalcar que se almacenó una alícuota adicional de las células control antes de teñirlas para emplearla como muestra blanco. Para iniciar con la tinción se emplearon los anticuerpos primarios y secundarios (Tabla #4).

**Tabla 4.- Anticuerpos primarios y secundarios empleados para cuantificar la expresión de las moléculas de adhesión.**

| <b>Molécula de adhesión</b> | <b>Anticuerpo primario</b>                           | <b>Anticuerpo secundario</b>  |
|-----------------------------|--|---|
| <b>ICAM-I (CD54)</b>        | Anti-Human CD54 (ICAM-1) Biotin (eBioscience)        | Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Life Technologies) |
|                             | Mouse IgG1 K Isotype Control Biotin (eBioscience)    | Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Life Technologies) |
| <b>P-selectina (CD62P)</b>  | Anti-Human CD62P (P-selectin) Purified (eBioscience) | Streptavidin, Alexa Fluor® 647 Conjugate (Life Technologies)              |
|                             | Mouse IgG1 K Isotype Control Purified (eBioscience)  | Streptavidin, Alexa Fluor® 647 Conjugate (Life Technologies)              |

Este proceso de tinción se llevó a cabo en frío ( $4^{\circ}C$ ), para lo que se preparó los anticuerpos primarios a una concentración de 4  $\mu$ g/mL y se agregó 150  $\mu$ L en cada tubo de las células con los diferentes tratamientos y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. A continuación, se procedió a lavar las células dos veces con 3 mL de PBS 1X, pH: 7.4, se centrifugó a 450 gravedades durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante resultante (Rahman, 2014, pp. 26-27).

Finalmente, se prepararon los anticuerpos secundarios a una concentración de 4  $\mu$ g/mL, se agregó 150  $\mu$ L, se dejó incubar en hielo por 30 minutos y se procedió con los lavados como se indica anteriormente (Rahman, 2014, pp. 26-

27). Se resuspendió el precipitado en 300  $\mu$ L de solución tampón (PBS 1X pH: 7.4 más FBS al 1%) y se leyeron por citometría de flujo. P-selectina fue leída mediante Alexa Fluor® 647, emitiendo fluorescencia en un rango de 496-546 nm y su pico máximo de emisión es 667 nm y el filtro que se empleó para detectar su medida máxima fue el canal FL4-A (nm/nm). ICAM-I fue leída mediante Alexa Fluor® 488, detectando su pico de excitación a los 495 nm y su pico máximo de emisión es 519 nm, el filtro que se empleó para revelar su medida máxima fue canal FL1-A (nm/nm) (Rahman, 2014, pp. 11, 13).

## **2.9. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos de la expresión de las citocinas, de la producción de óxido nítrico y de las moléculas de adhesión se realizaron empleando el programa estadístico GraphPad Prism 6 Demo creado por el Dr. Harvey Motulsky en California-EEUU.

La herramienta estadística que se empleó fue, la prueba de t para analizar la expresión de las citocinas proinflamatorias, la producción de óxido nítrico y la expresión de las moléculas de adhesión.

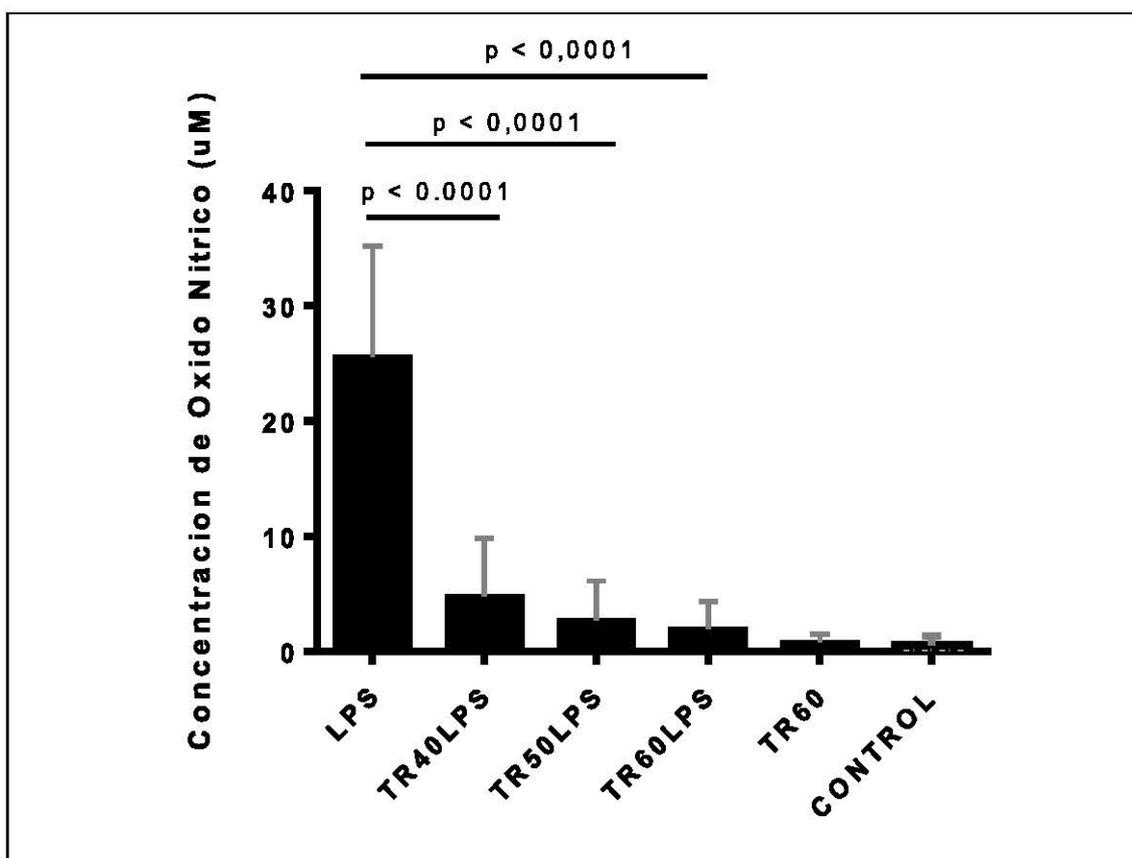
## Capítulo III

### 3. Resultados

La evaluación del efecto que produce el triptolide en la producción de óxido nítrico, las citocinas proinflamatorias y las moléculas de adhesión en las células HUVEC estimuladas con lipopolisacárido permitió obtener los siguientes resultados:

#### 3.1. Efecto del triptolide en la producción de óxido nítrico en células endoteliales estimuladas con LPS

Inicialmente se determinó el efecto del triptolide en la producción de óxido nítrico en las células endoteliales estimuladas con LPS. Las células HUVEC fueron estimuladas con LPS (1µg/mL) y triptolide como se indica en Materiales y Métodos. La figura 1 muestra que las células HUVEC tienen una mínima producción de óxido nítrico cuando no son estimuladas con LPS, mientras que el tratamiento con LPS incrementó significativamente la producción de óxido nítrico. Este incremento en la producción de óxido nítrico estimulado por el LPS fue significativamente atenuado cuando las células endoteliales fueron simultáneamente tratadas con triptolide. El efecto inhibitorio del triptolide se demostró fue dosis dependiente (Figura #1). El tratamiento de las células HUVEC con triptolide modificó significativamente la producción de óxido nítrico.



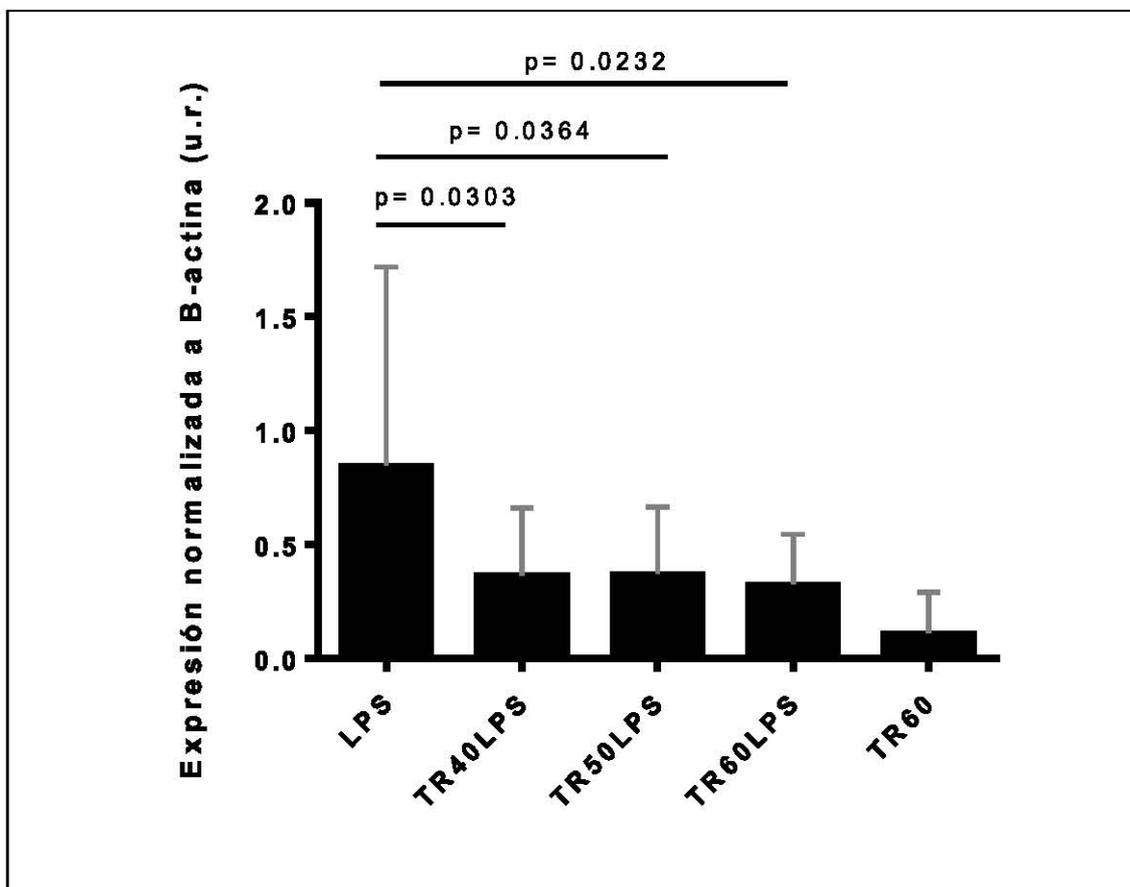
**Figura 2.- Efecto del triptolide en la producción de óxido nítrico en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis del triptolide por 24 horas. Las concentraciones de óxido nítrico fueron medidas por el método de Griess. La figura es el promedio de 5 experimentos realizados por triplicado.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas.

### **3.2. Efecto del triptolide en la expresión de las citocinas inflamatorias en células endoteliales estimuladas con LPS**

En la figura 3, se observa que la expresión del gen óxido nítrico sintetasa inducible (iNOs) se da después de 24 horas de tratamiento con LPS (1 $\mu$ g/mL). La estimulación de iNOs por el LPS fue significativamente disminuida cuando las células fueron simultáneamente tratadas con concentraciones crecientes de triptolide (Figura #3). El efecto inhibitorio del triptolide fue dosis dependiente. La

estimulación de las células HUVEC solamente con triptolide no cambió la expresión de ARNm.

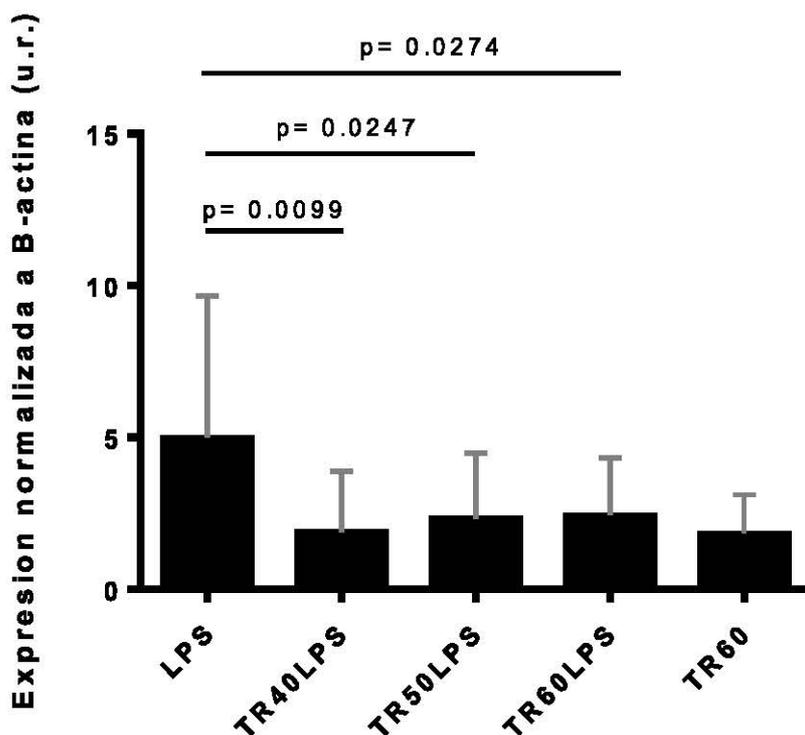


**Figura 3.- Efecto del triptolide en la expresión de iNOs en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis de triptolide por 24 horas. La expresión de iNOs fue medida por RT-qPCR, normalizada con respecto a  $\beta$ -actina y expresada en unidades relativas (u.r.). La figura representa el promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas.

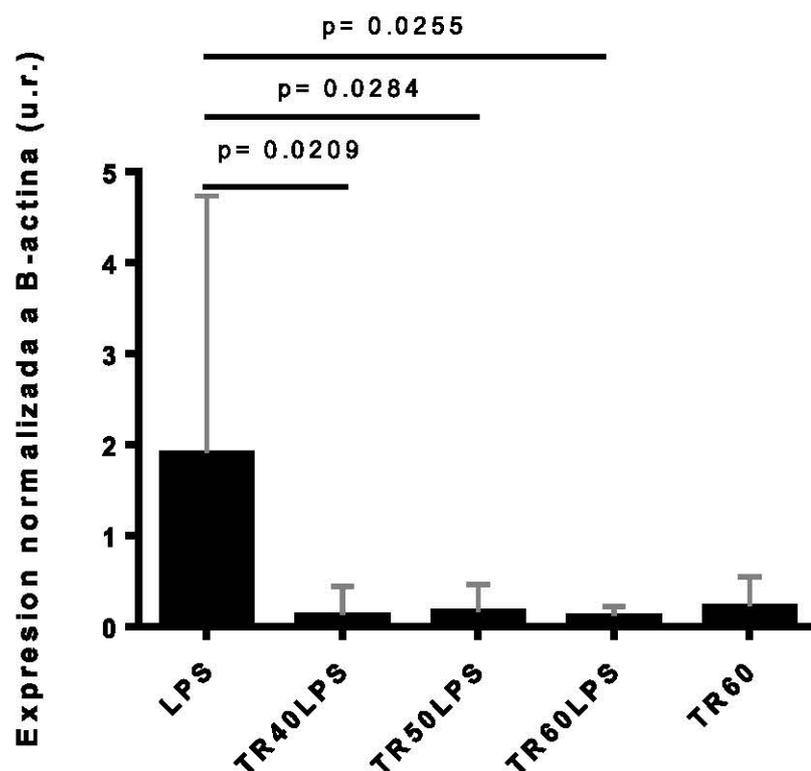
En relación a la expresión de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6, de manera similar a lo observado en la expresión de iNOs, la estimulación con LPS (1 $\mu$ g/mL) incrementó significativamente la expresión de estas citocinas

inflamatorias en las células endoteliales (Figuras #4-6). Por otro lado, el tratamiento con dosis crecientes de triptolide inhibió la expresión de las citocinas inflamatorias en células HUVEC tratadas con LPS (Figuras #4-6).



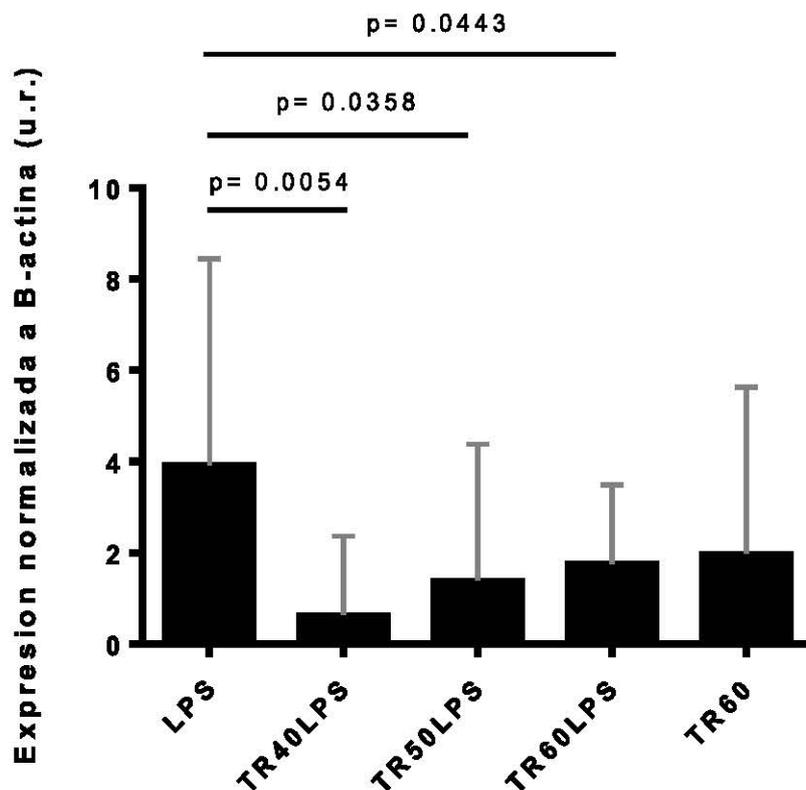
**Figura 4.- Efecto del triptolide en la expresión de TNF- $\alpha$  en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis de triptolide por 24 horas. La expresión de TNF- $\alpha$  fue medida por RT-qPCR, normalizada con respecto a  $\beta$ -actina y expresada en unidades relativas (u.r.). La figura muestra el promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 5.- Efecto del triptolide en la expresión de IL-1 $\beta$  en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis de triptolide por 24 horas. La expresión de IL-1 $\beta$  fue medida por RT-qPCR, normalizada con respecto a  $\beta$ -actina y expresada en unidades relativas (u.r.). La figura representa el promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas.

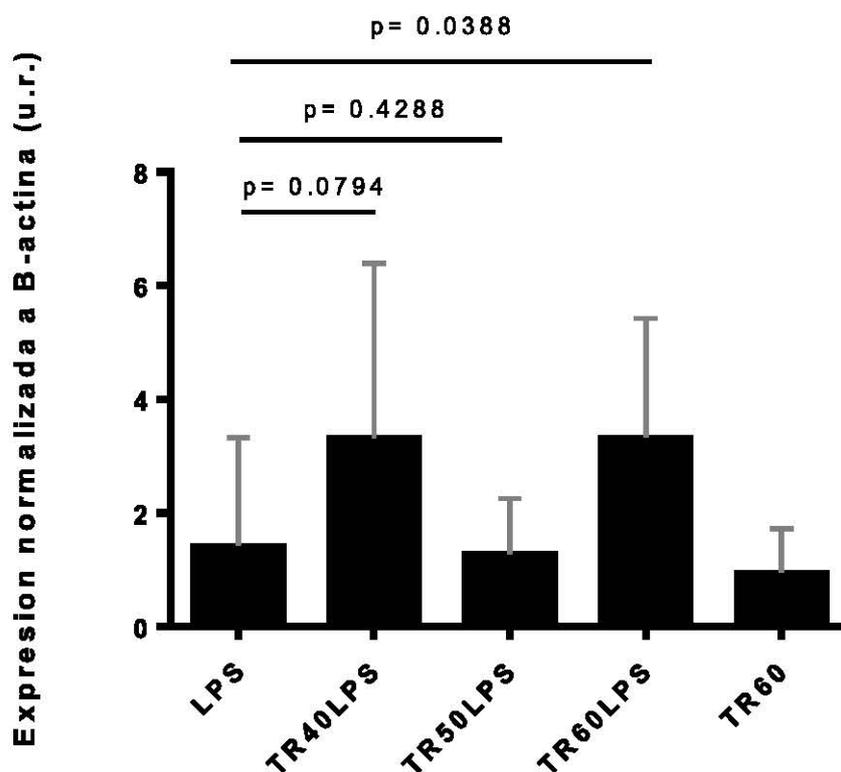


**Figura 6.- Efecto del triptolide en la expresión de IL-6 en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis de triptolide por 24 horas. La expresión de IL-6 fue medida por RT-qPCR, normalizada con respecto a  $\beta$ -actina y expresada en unidades relativas (u.r.). La figura representa el promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas.

Así como el LPS estimula la expresión de las citocinas proinflamatorias también genera efectos importantes en el metabolismo energético celular, al estimular la activación del factor nuclear HIF-1 $\alpha$ .

Como se indica en la figura 7, el tratamiento de las células endoteliales con LPS o triptolide no afectó significativamente la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Sin embargo, el tratamiento simultáneo de las células endoteliales con LPS y la dosis más alta del triptolide (60 ng/mL) sí mostró un incremento significativo en la expresión de HIF-1 $\alpha$  ( $p= 0.0388$ ) (Figura #7).



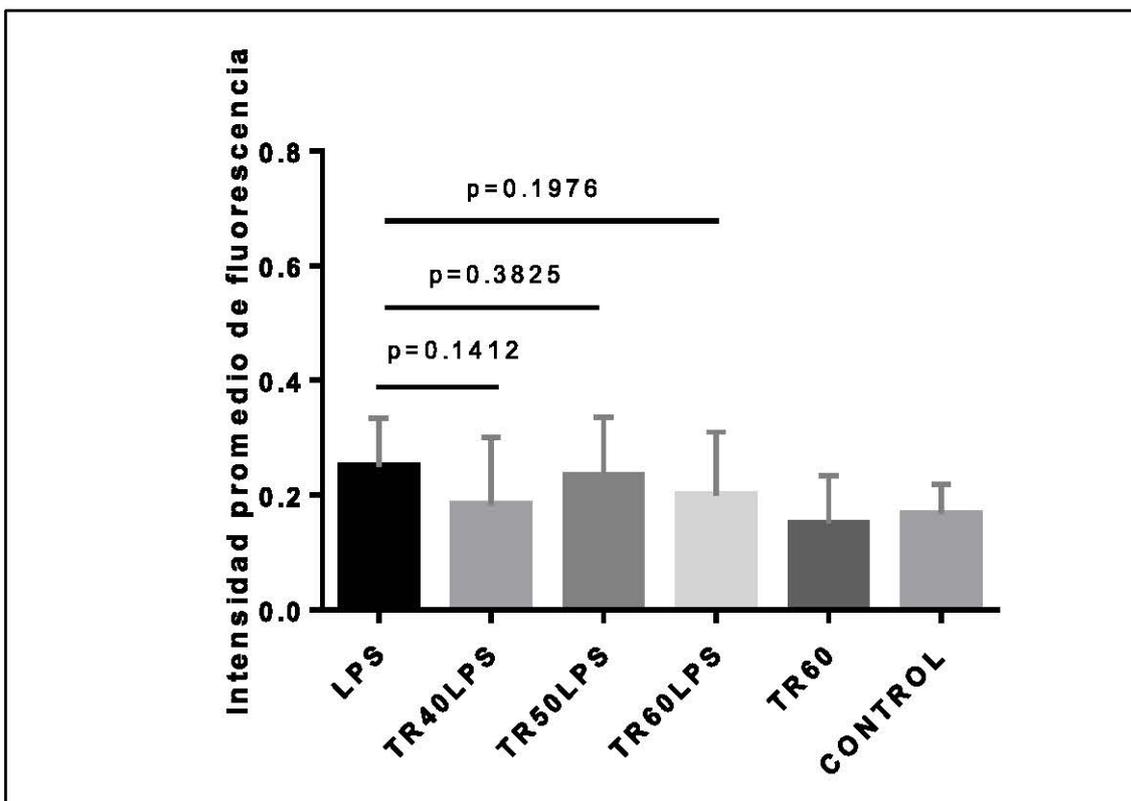
**Figura 7.- Efecto del triptolide en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis de triptolide por 24 horas. La expresión de HIF-1 $\alpha$  fue medida por RT-qPCR. La figura representa el promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas.

### **3.3. Efecto del triptolide en la expresión de las moléculas de adhesión en la membrana celular de células endoteliales estimuladas con LPS**

Además del incremento de la producción de óxido nítrico y de la expresión de las moléculas inflamatorias en el endotelio vascular durante la sepsis, existe también una alta expresión de las moléculas de adhesión como ICAM-I y P-selectina.

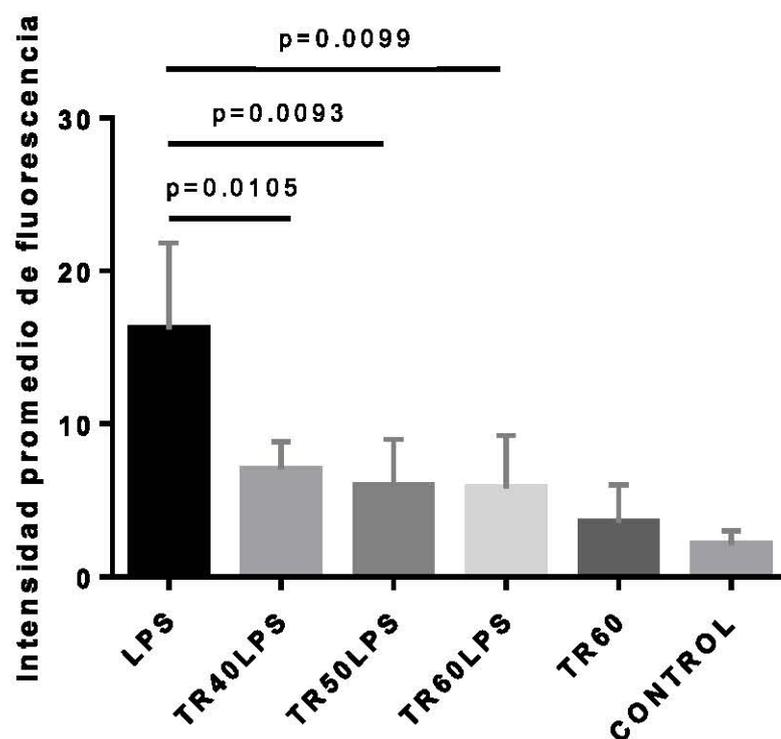
En la figura 8, se muestra la expresión de P-selectina en la superficie endotelial en las células HUVEC con y sin tratamiento con LPS y/o triptolide. En este análisis no se obtuvo diferencias significativas en la expresión de P-selectina con ninguno de los tratamientos indicados.



**Figura 8.- Efecto del triptolide en la expresión de P-selectina en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis de triptolide por 3 horas. La expresión de P-selectina se midió por citometría de flujo. La figura representa el promedio de 3 experimentos.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas (Anexo 1).

Contrario a lo observado con P-selectina, la estimulación de células HUVEC con LPS por 14 horas incrementó significativamente la expresión de ICAM-1 en la superficie celular. Por otra parte el tratamiento con triptolide no afectó significativamente su expresión. Sin embargo, dosis crecientes del triptolide disminuyeron la expresión de ICAM-1 en la superficie de células estimuladas con LPS (Figura #9).



**Figura 9.-Efecto del triptolide en la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales estimuladas con LPS.**

a) Las células endoteliales HUVEC fueron estimuladas en la presencia de LPS y/o diferentes dosis de triptolide por 14 horas. La expresión de ICAM-1 se midió por citometría de flujo. La figura representa el promedio de 3 experimentos.  $p < 0.05$  = diferencias estadísticamente significativas (Anexo 2).

## Capítulo IV

### 4. Discusión

Los datos del presente estudio demostraron que la estimulación de las células endoteliales HUVEC por LPS aumentó significativamente la producción de óxido nítrico; incrementó también la expresión a nivel de ARNm de iNOs, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6; y aumentó la expresión de ICAM-I en la superficie celular. El incremento generado por el LPS en la producción y en la expresión de estos marcadores inflamatorios fue inhibido significativamente por el triptolide. Por otro lado, el tratamiento con LPS o con triptolide de las células endoteliales no afectó la expresión del factor nuclear HIF-1 $\alpha$ , responsable de la activación del endotelio vascular. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con el LPS y altas dosis del triptolide aumentaron la expresión de HIF-1 $\alpha$ .

La diseminación de agentes infecciosos y sus productos en el organismo provoca la estimulación generalizada de macrófagos y de células endoteliales que expresan y liberan en forma masiva mediadores inflamatorios (citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, óxido nítrico, factores nucleares) que son causantes de la vasodilatación y del incremento de la permeabilidad vascular con la consecuente caída de la presión sanguínea. La estimulación de las células inmunes y endoteliales también altera el sistema de coagulación causando el fenómeno conocido como coagulación intravascular diseminada, lo que eventualmente lleva a una falla orgánica sistémica y potencialmente a la muerte (Fauci et al., 2009). El bloqueo de estos agentes inflamatorios o la limitación en su producción con sustancias como el triptolide pueden contribuir en el tratamiento de enfermedades inflamatorias comunes como: la artritis reumatoidea, el lupus eritematoso sistémico, el síndrome nefrítico y el cáncer (Li, Jiang y Zhang, 2014, pp. 67-68) (Shen et al., 2011, p. 1429).

Varios estudios han demostrado las propiedades anti-inflamatorias del triptolide en células inmunes activadas (Ma et al., 2007, p.1172). El triptolide inhibe la transcripción de las enzimas inducibles, ciclooxigenasa-2 (COX-2), iNOs, e IL-

1 $\beta$  en macrófagos (RAW 264.7) estimulados con LPS (Ma et al., 2007, pp. 1174-1175) (Kim et al., 2004, p.3). Más aún, un estudio comprensivo que analizó el perfil de genes que modula el triptolide en macrófagos estimulados con LPS demuestra que 44 (22.5%) de 195 genes estudiados fueron modulados por el triptolide (Gupta, Sundaram, Reuter y Aggarwal, 2010, p. 775-776). Entre los genes cuya expresión es disminuida por el triptolide se destacan: los receptores TLR 1, 3, 4, y 7; las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6; los receptores de citocinas y quimiocinas; las enzimas COX-2 e iNOs; los genes de señalización MAPK y Jak-STAT; el factor nuclear NF- $\kappa$ B; las moléculas de coestimulación CD86; las moléculas de adhesión integrina alpha M (Premkumar, Dey, Dorn y Raskin, 2010, pp. 3, 5-6). En ese estudio también se indica que el efecto inhibitorio del triptolide afecta a las dos vías de señalización intracelular MyD88 y TRIF que se estimulan luego de la activación de los receptores TLR. La activación de las vías de señalización MyD88 y TRIF convergen en la transactivación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, que es inhibida en presencia del triptolide (Premkumar, Dey, Dorn y Raskin, 2010, pp. 3, 5-6).

El efecto inhibitorio del triptolide puede darse a nivel del receptor o de las moléculas de señalización intracelular (Gupta et al., 2010, pp. 775-776) (McGettrick y O'Neill, 2013, p.22893). En concordancia con los efectos inhibitorios del triptolide en macrófagos de ratón estimulados con LPS, en el presente estudio también se observó una disminución en la expresión de los marcadores inflamatorios en las células endoteliales humanas. En el presente estudio, se trató simultáneamente las células endoteliales con LPS y triptolide, mientras que en los estudios señalados anteriormente con macrófagos, las células fueron tratadas con triptolide dos horas antes de la estimulación con LPS. Los datos del presente estudio indicarían que no es necesario pretratar las células endoteliales para lograr la inhibición de la vía del TLR. Sería importante ahora estimular las células endoteliales con LPS y luego tratarlas con triptolide para determinar si su efecto anti-inflamatorio se mantiene.

Es importante anotar que en éste estudio las dosis inhibitorias del triptolide fueron mayores a las utilizadas con macrófagos. Es posible que las vías

inflamatorias propias de las células inmunes, como los macrófagos, sean más sensibles al tratamiento con triptolide que las vías inflamatorias en las células endoteliales.

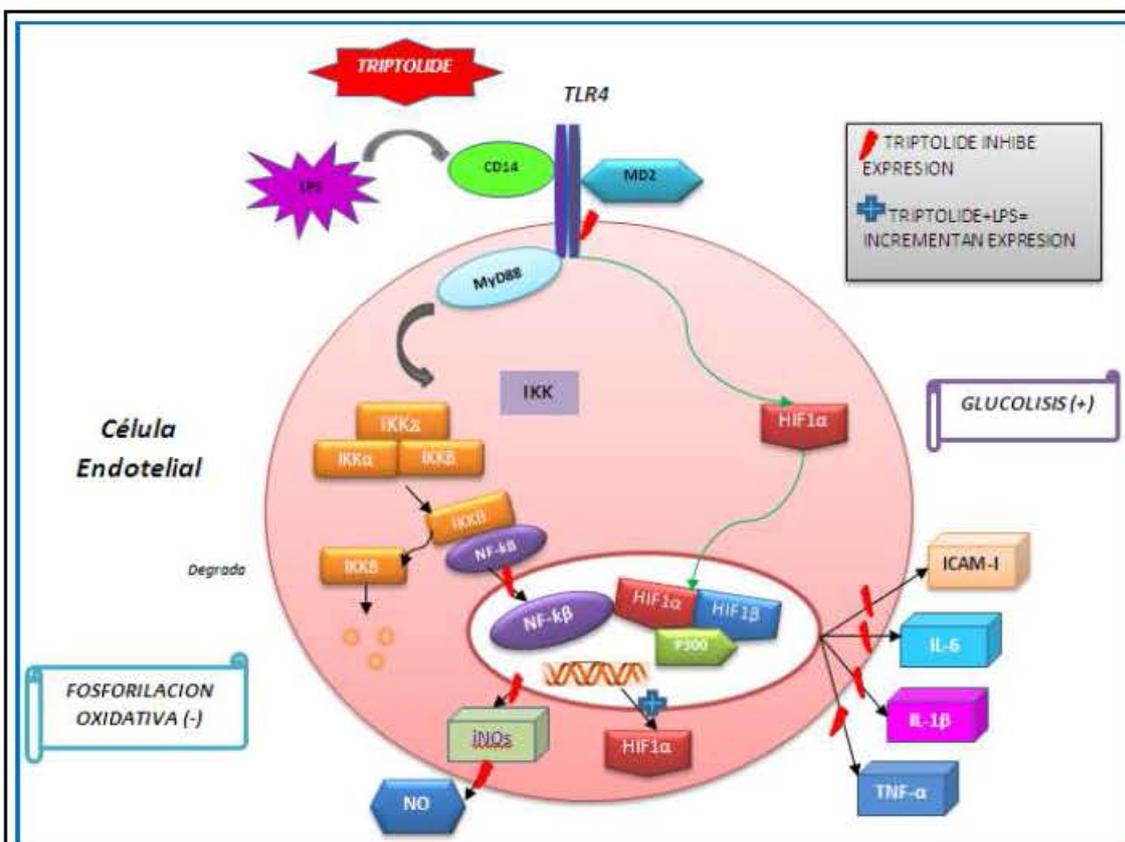
Varias de las moléculas proinflamatorias que se expresan en el endotelio vascular disfuncional también son expresadas durante la activación de las células inmunes. Así, la activación del endotelio vascular se caracteriza por un aumento en la expresión del receptor TLR 4; las citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6); los receptores de citocinas y quimiocinas; las enzimas COX-2 e iNOs; las moléculas de adhesión ICAM-I; y de los factores nucleares (NF- $\kappa$ B y HIF-1 $\alpha$ ) (Figura #10) (Morikawa et al., 2002, pp. 178-180) (Margaritis, Channon y Antoniades, 2014, pp. 1998-1200).

La activación de TLR4 con LPS activa a los factores nucleares NF- $\kappa$ B y HIF-1 $\alpha$  en células mieloides (células dendríticas) frecuentemente expuestas a agentes infecciosos, en tejidos inflamados con baja tensión de oxígeno (Figura #10) (Jantsch et al., 2011, pp. 551-552). Se ha establecido que la transcripción de HIF-1 $\alpha$  tiene un papel importante para la regulación de la expresión génica de genes pro-inflamatorios (Jantsch et al., 2011, pp. 551-556). Cabe recalcar que existe limitada información sobre la expresión del factor nuclear HIF-1 $\alpha$  en células endoteliales estimuladas con LPS.

Las concentraciones celulares de HIF-1 $\alpha$  son finamente reguladas por su síntesis y degradación mediante el proteosoma (McGettrick y O'Neill, 2013, p. 22894). Una vez sintetizado, HIF-1 $\alpha$  se dimeriza con la proteína constitutiva HIF-1 $\beta$  para afectar la expresión de alrededor de 100 genes involucrados en metabolismo, apoptosis, angiogénesis, ciclo celular, eritropoyesis, e inflamación (Jantsch et al., 2011, pp. 551-552). La expresión y estabilización de HIF-1 $\alpha$  por estimulación de TLR4 ocurre también en concentraciones normales de oxígeno y depende de la presencia de las moléculas de señalización MyD88 y NF- $\kappa$ B (Figura #10) (Jantsch et al., 2011, pp. 551-552). A diferencia de lo observado en células inmunes, en éste estudio, la estimulación de células endoteliales con LPS o triptolide no afectó significativamente la expresión de HIF-1 $\alpha$  (Figura #10). Por lo que se hace necesario realizar estudios para establecer la razón

por la que la vía de señalización TLR4-MyD88-NFκB no incrementa la transcripción de HIF-1α en células endoteliales. Contrariamente, la combinación de LPS y dosis altas del triptolide aumentaron significativamente la expresión de HIF-1α en HUVEC. Es posible que el tratamiento simultáneo con LPS y triptolide cambie las condiciones metabólicas de la célula endotelial favoreciendo la vía glicolítica a expensas de la vía de la fosforilación oxidativa lo que favorecería la síntesis de HIF-1α (Figura #10) (McGettrick y O'Neill, 2013, pp.22893-22894).

Entonces, si la combinación del LPS y del triptolide aumenta la expresión de HIF-1α; esto probablemente indicaría que la acumulación de HIF-1α, no es suficiente para inducir la expresión de los genes regulados por este factor en la inflamación. La completa activación de los genes proinflamatorios requiere la activación simultánea de HIF-1α y de NF-κβ (Jantsch et al, 2011, pp. 551-561) (Kim et al., 2004, p.3). En el presente sistema con células endoteliales, la presencia del triptolide bloqueó la activación del NF-κβ, lo que se evidenció en la disminución en la expresión de iNOs, TFN-α, IL-1β, IL-6, e ICAM-I.



**Figura 10.- Efecto regulador del triptolide en la señalización intracelular de la vía del LPS - TLR4 en células endoteliales.**

En nuestro conocimiento el presente es uno de los pocos estudios en los cuales se demuestra la acción anti-inflamatoria del triptolide en células endoteliales humanas. En conjunto los datos indican que el efecto inhibitorio del triptolide es independiente del tipo de célula, inmune o endotelial, en el que se lo utilice. Las células endoteliales están distribuidas en toda la economía y por su gran volumen tienen un papel preponderante en la fisiopatología de procesos inflamatorios sistémicos. La modulación inflamatoria del endotelio por el triptolide puede contribuir a disminuir la activación endotelial en todo el organismo. Es imperativo realizar estudios para establecer dosis del triptolide que siendo no tóxicas para el organismo puedan todavía ejercer su efecto positivo en enfermedades con un alto componente inflamatorio.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Capítulo V

#### Conclusiones

La expresión génica de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOs) es inhibida por el triptolide, por consiguiente la producción de óxido nítrico disminuye.

La expresión génica de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, demuestra que el triptolide posee propiedades anti-inflamatorias ya que disminuye su expresión en las células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC).

La expresión génica del HIF-1 $\alpha$  demuestra que la estimulación con LPS y el tratamiento con triptolide no estimulan su expresión, pero al aplicarlos simultáneamente incrementan la expresión de este factor nuclear, por lo que probablemente se requiere la activación simultánea de HIF-1 $\alpha$  y del NF- $\kappa$ B.

El triptolide inhibe la expresión de ICAM-1 (CD54) en la superficie celular de las células endoteliales estimuladas con LPS, por lo tanto se demuestra que el triptolide ejerce un efecto anti-inflamatorio.

La expresión de P-selectina (CD62-P) en la superficie celular de las HUVEC, no es estimulada por el LPS y el tratamiento con el triptolide no genera ningún cambio en su expresión.

## Recomendaciones

Estimular las células endoteliales con LPS y después de 12, 24 y 48 horas de tratamiento tratarlas con triptolide para determinar si el efecto anti-inflamatorio del triptolide se mantiene.

Analizar la expresión génica del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF-  $\kappa\beta$ ) de las células HUVEC, sometidas a las mismas condiciones de este estudio mediante RT-qPCR.

Analizar la expresión de los genes regulados por HIF-1 $\alpha$  como el interferón  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ).

Cuantificar la expresión de las moléculas de adhesión E-selectina y V-CAM mediante citometría de flujo.

Estudiar la expresión génica de P-selectina mediante RT-qPCR.

## REFERENCIAS

- Abbs, A., Lichtman, A y Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular* (Septima ed.). Madrid, España.: Elsevier.
- Afonyushkin, T., Oskolkova, O. V., Binder, B. R., y Bochkov, V. N. (2011). Involvement of CK2 in activation of electrophilic genes in endothelial cells by oxidized phospholipids. *J Lipid Res*, 52(1), 98-103.
- Aird, W. (2003). The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *The American Society of Hematology*, 101(10), 3765-3777.
- Angus, D. C., y van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369(9), 840-851.
- Bala, K., Ambwani, K., y Gohil, N. K. (2011). Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: implication on use of higher passage cells. *Tissue Cell*, 43(4), 216-222.
- Barreiro, O., y Sanchez-Madrid, F. (2009). Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 62(5), 552-562.
- Blanco J, Muriel-Bombin A y Sagredo V. (2008). Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Critical Care*; 12:R158.
- Bone, R., Balk, R., Cerra, F., Phillip, R., Fein, A., Knout, w., Schein, R., Sibbald, W. (1992). Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Accp/sccm consensus conference*, 101: 1644-1655.
- Briseño, I. (2006). Sepsis: tratamiento. *Medicrit*, 3(1): 1-13.
- Duan, M., Yao, H., Hu, G., Chen, X., Lund, A. K., y Buch, S. (2013). HIV Tat induces expression of ICAM-1 in HUVECs: implications for miR-221/-222 in HIV-associated cardiomyopathy. *PLOS One*, 8(3), e60170.
- Duran-Prado, M., Frontinan, J., Santiago-Mora, R., Peinado, J. R., Parrado-Fernandez, C., Gomez-Almagro, M. V., Alcain, F. J. (2014). Coenzyme

- Q10 Protects Human Endothelial Cells from beta-Amyloid Uptake and Oxidative Stress-Induced Injury. *PLOS One*, 9(10), e109223.
- Fauci, A., Longo, D., Kasper, D., Jameson, L., Hauser, S., Loscalzo, J., y otros. (2009). *Harrison principios de medicina interna (17 ed.)*. México, D.F.: Mc Graw Hill.
- Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., y Aggarwal, B. B. (2010). Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*, 1799(10-12), 775-787.
- Guyton, A., y Hall, J. (2011). *Tratado de fisiología médica (12 ed.)*. Barcelona, España.: Elsevier.
- Hernandez Ramirez, D. F., y Cabiedes, J. (2010). [Immunological Techniques that Support the Diagnosis of the Autoimmune Diseases]. *Reumatol Clin*, 6(3), 173-177.
- Hoyle, G. W., Hoyle, C. I., Chen, J., Chang, W., Williams, R. W., y Rando, R. J. (2010). Identification of triptolide, a natural diterpenoid compound, as an inhibitor of lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298(6), L830-836.
- INEC, 2009. *Epidemiología de las enfermedades infecciosas en el Ecuador*. Recuperado el 10 de octubre de 2014 de <http://es.slideshare.net/p0tter/epidemiologia-de-las-enfermedades-infecciosas-en-ecuador>
- Janeway, C., Travers, P., y Walport, M., . (2012). *Immunobiology (Octava ed.)*. New York, Estados Unidos de América: Garland Science.
- Jantsch, J., Wiese, M., Schodel, J., Castiglione, K., Glasner, J., Kolbe, S., Willam, C. (2011). Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *J Leukoc Biol*, 90(3), 551-562.
- Kalil A, 2014. *Septic Shock*. Recuperado el 10 de octubre de 2014 de <http://emedicine.medscape.com/article/168402-overview>.

- Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, et al., (2007). Incidence, treatment and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med* 2007; 33:435–43.
- Kim, Y. H., Lee, S. H., Lee, J. Y., Choi, S. W., Park, J. W., y Kwon, T. K. (2004). Triptolide inhibits murine-inducible nitric oxide synthase expression by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of nuclear factor-kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase. *Eur J Pharmacol*, 494(1), 1-9.
- Li, X. J., Jiang, Z. Z., y Zhang, L. Y. (2014). Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology. *J Ethnopharmacol*, 155(1), 67-79.
- Ma, J., Dey, M., Yang, H., Poulev, A., Pouleva, R., Dorn, R., Lipsky, PE., Kennelly, EJ., Raskin, I. (2007). Anti-inflammatory and immunosuppressive compounds from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry*, 68(8):1172-8.
- Margaritis, M., Channon, KM., Antoniadis, C. (2014). Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: beyond lipid lowering. *Antioxid Redox Signal*, 10; 20 (8):1198-215.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al., (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through. *New Engl J Med*; 348:1546–54.
- Matta, R. (2009). Modulation of the Inflammatory Response by Triptolide and MAP Kinase Phosphatase-1. Recuperado el 12 de octubre de 2014 de [https://etd.ohiolink.edu/ap/10?0::NO:10:P10\\_ACCESSION\\_NUM:osu1250262877](https://etd.ohiolink.edu/ap/10?0::NO:10:P10_ACCESSION_NUM:osu1250262877)
- Matta, R., Wang, X., Ge, H., Ray, W., Nelin, L. D., y Liu, Y. (2009). Triptolide induces anti-inflammatory cellular responses. *Am J Transl Res*, 1(3): 267-282
- Mayr, FB., Yende, S., Angus, DC. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5(1): 4-11.
- McGettrick, A. F., y O'Neill, L. A. (2013). How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *J Biol Chem*, 288(32), 22893-22898.
- Molinari, C., Uberti, F., Grossini, E., Vacca, G., Carda, S., Invernizzi, M., y Cisari, C. (2011). 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric

- oxide production in cultured endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 27(6), 661-668.
- Morikawa, S., Takabe W, Mataka C, Kanke T, Itoh T, Wada Y, Izumi A, Saito Y, Hamakubo T, Kodama T. (2002). The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 9(4):178-83.
- Munshi, N., Fernandis, A. Z., Cherla, R. P., Park, I. W., y Ganju, R. K. (2002). Lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells and its inhibition by vascular endothelial growth factor. *J Immunol*, 168(11): 5860-5866.
- National Institute of General Medical Sciences, 2014. Sepsis Fact Sheet. Recuperado el 10 de octubre de 2014 de [http://www.nigms.nih.gov/Education/Pages/factsheet\\_sepsis.aspx](http://www.nigms.nih.gov/Education/Pages/factsheet_sepsis.aspx)
- Opitz, B., Eitel, J., Meixenberger, K., Suttorp, N. (2009). Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Infections of the endothelium*, 102(6): 1103-1109.
- Orfao, A. (2006). *Guide to Flow Cytometry (Segunda ed.)*. California, Estados Unidos de América.
- Pacheco, C., y González, C. (2002). Sepsis Neonatal. *Medicina*, 8(3): 241-251.
- Peters, K., Unger, R., Brunner, J., Kirkpatrick, J., (2003). Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Research*, 60(1):49-57.
- Premkumar, V., Dey, M., Dorn, R., y Raskin, I. (2010). MyD88-dependent and independent pathways of Toll-Like Receptors are engaged in biological activity of Triptolide in ligand-stimulated macrophages. *BMC Chem Biol*, 10, 3.
- Rahman, M. (2014). *Introduction to Flow Cytometry*. Estados Unidos de América.
- Restrepo, M., Dueñas, C., González, M., Ortiz, G., Granados, M., Álvarez, C., Acosta, C., Arias, A., Atehortúa, L., Camargo, R., Carvajal, M., De la

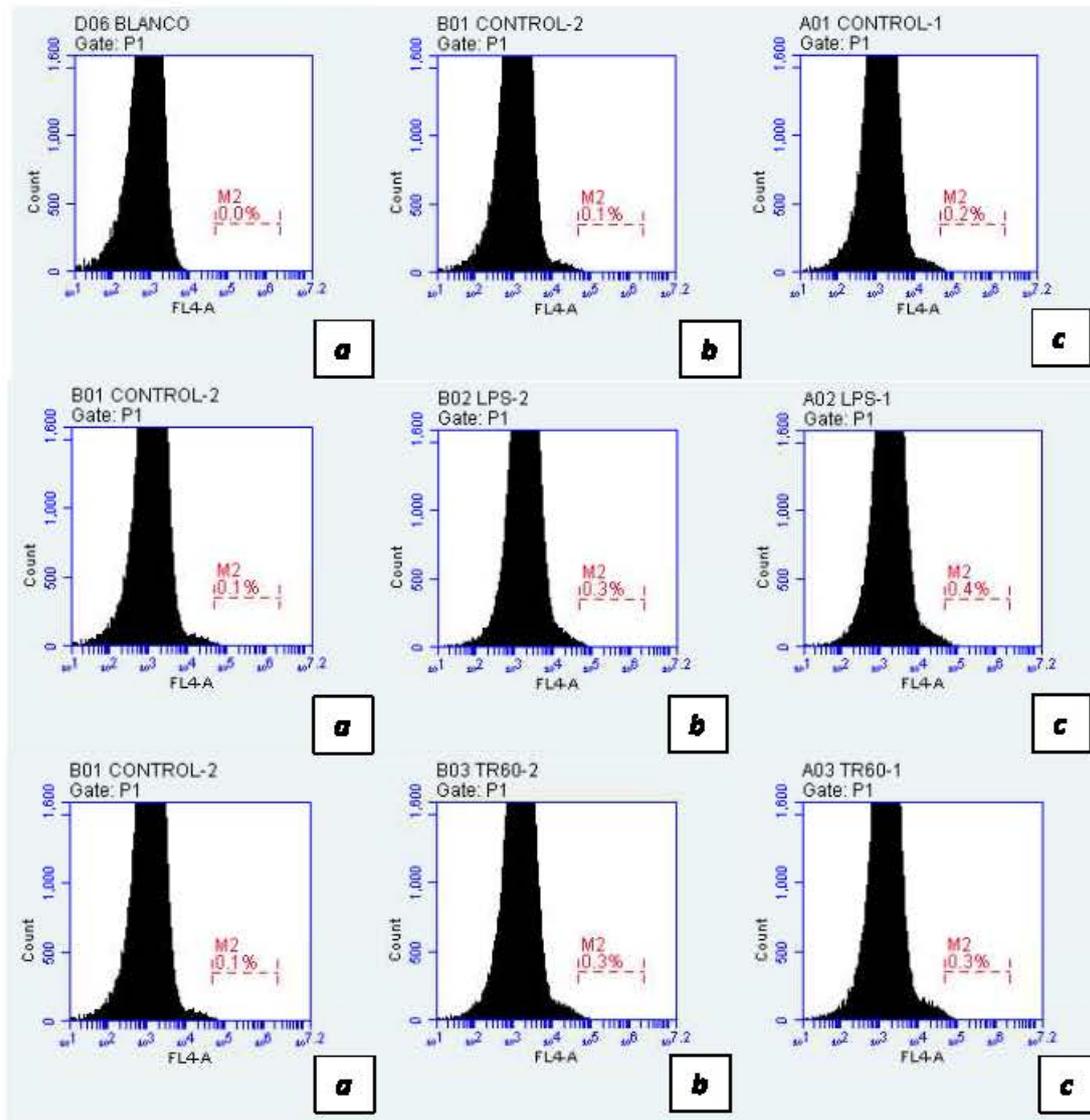
- Rosa, G., Durán, J., Echeverri, J., Hurtado, C., Martínez, E., Rebolledo, C., Saavedra, C., Sandoval, J., Velandia, J., Vélez, J. (2007). Consenso Colombiano en Sepsis. *Asociación Colombiana de Infectología*, 11(1): 46-56.
- Schmittgen, T. D., y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3(6): 1101-1108.
- Shen, D., Tong, X., Zhang, J., Zhang, P., Jin, J., Gao, X., y Ma, C. (2011). Inhibition of HSP90 by triptolide (TPL) augments Bortezomib-induced U266 cells apoptosis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (8), 1429-1434.
- Vogel, T. R. (2012). Update and review of racial disparities in sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*, 13(4), 203-208.
- Wadhwa, D., Bey, A., Hasija, M., Moin, S., Kumar, A., Aman, S., y Sharma, V. K. (2013). Determination of levels of nitric oxide in smoker and nonsmoker patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Implant Sci*, 43(5), 215-220.
- Wolf, S., Howat, S., Abraham, D., Pearson, J., Lawson, C. (2013). Agonistic anti-ICAM-1 antibodies in scleroderma: Activation of endothelial pro-inflammatory cascades. *Vascular Pharmacology*, 59(1-2): 19-26.
- Wong, KF., Yuan, Y., Luk, JM. (2012). Tripterygium wilfordii bioactive compounds as anticancer and anti-inflammatory agents. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39(3):311-20.
- Wu, Y., Cui, J., Bao, X., Chan, S., Young, O., Liu, D., Shen, P. (2006). Triptolide attenuates oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation and multiple cytokine gene expression in murine peritoneal macrophage. *Journal of Molecular Medicine*, 17, 141-150.
- Yoon, B. N., Choi, N. G., Lee, H. S., Cho, K. S., y Roh, H. J. (2010). Induction of interleukin-8 from nasal epithelial cells during bacterial infection: the role of IL-8 for neutrophil recruitment in chronic rhinosinusitis. *Mediators Inflamm*, 2010, 813610.

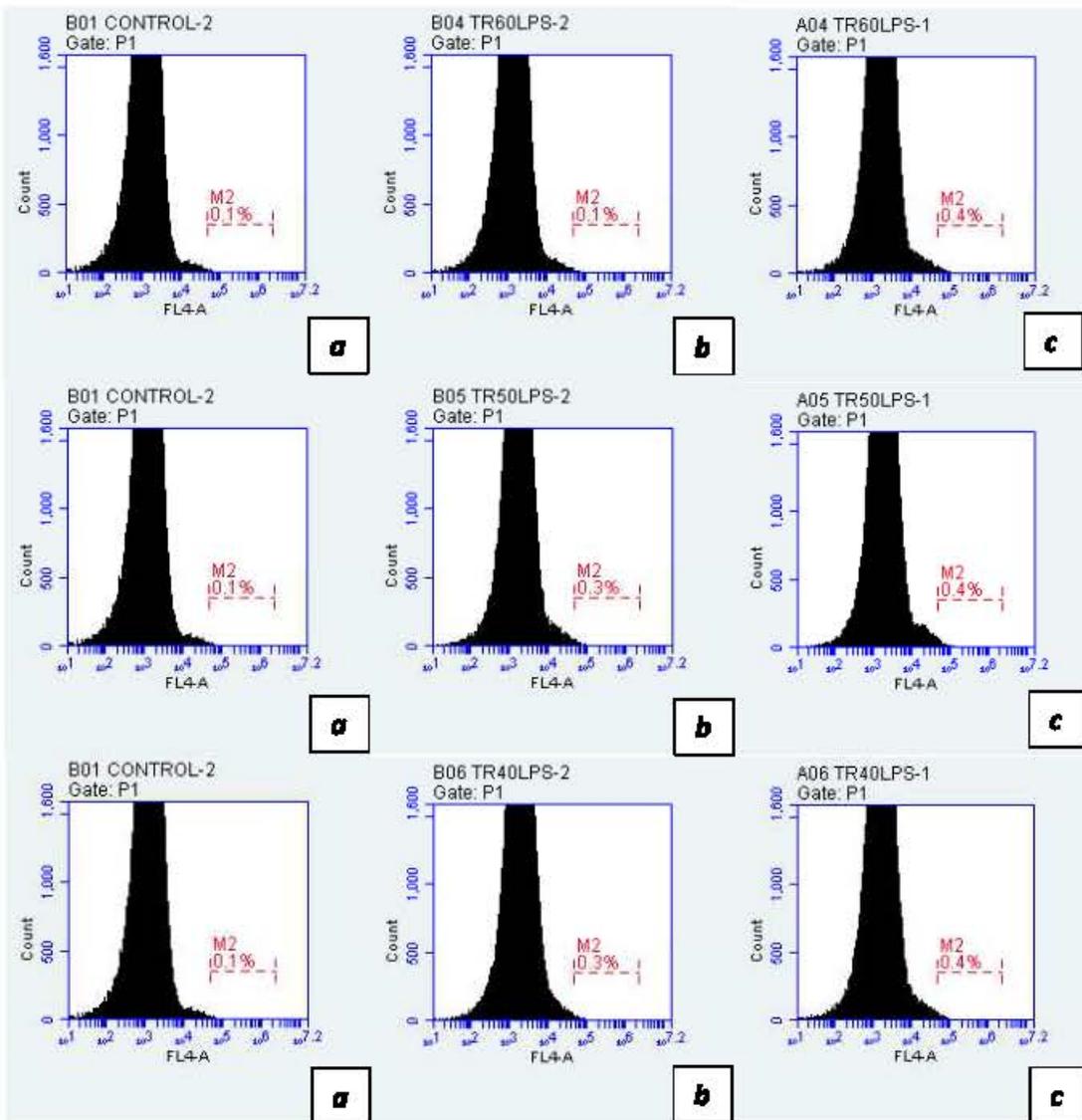
Zhou, Z. L., Yang, Y. X., Ding, J., Li, Y. C., y Miao, Z. H. (2012). Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms. *Nat Prod Rep*, 29(4), 457-475.

## **ANEXOS**

**Anexo 1.- Análisis de P-selectina en la superficie de las células HUVEC mediante citometría de flujo empleando células sin tratamiento (control) como blanco (a) un control de isotipo de ratón IgG 1 K (b) y un anticuerpo específico para P-selectina (AK-4) (c) para cada uno de los respectivos tratamientos.**

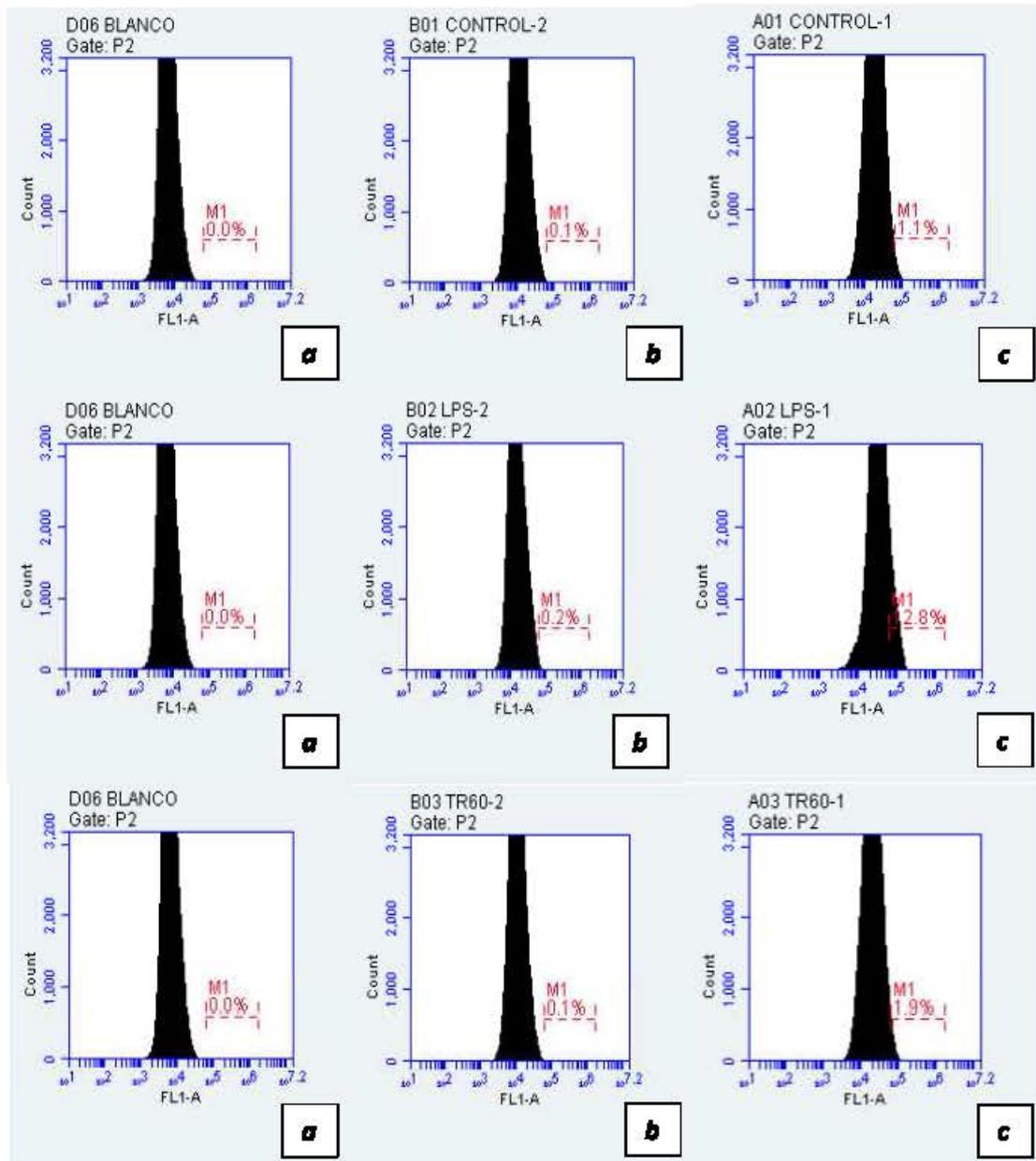
**En los histogramas (c) se observa el porcentaje de HUVEC que expresan P-selectina en cada uno de los tratamientos.**

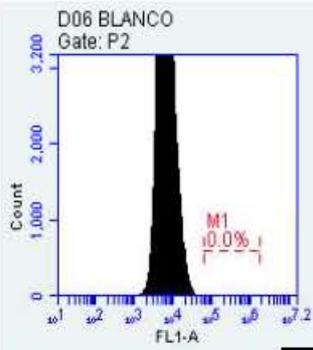




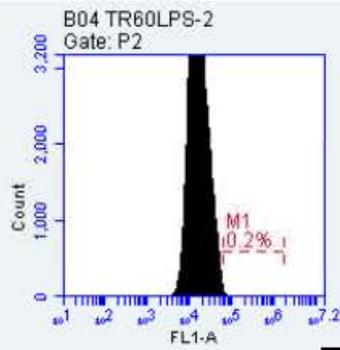
**Anexo 2.- Análisis de ICAM-I en la superficie de las células HUVEC mediante citometría de flujo empleando células sin tratamiento (control) como blanco (a) un control de isotipo de ratón IgG 1 K (b) y un anticuerpo específico para ICAM-I (HA58) (c) para cada uno de los respectivos tratamientos.**

**En los histogramas (c) se observa el porcentaje de HUVEC que expresan ICAM-I en cada de los tratamientos.**

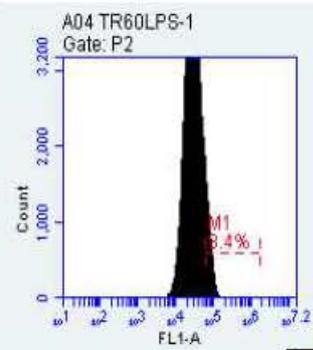




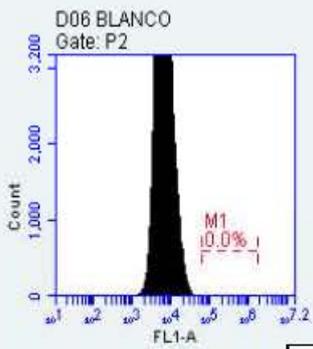
**a**



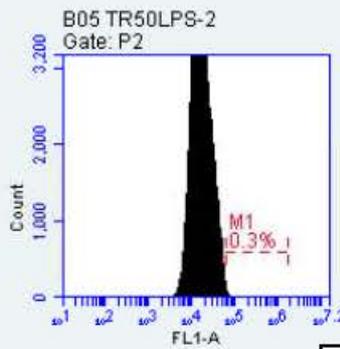
**b**



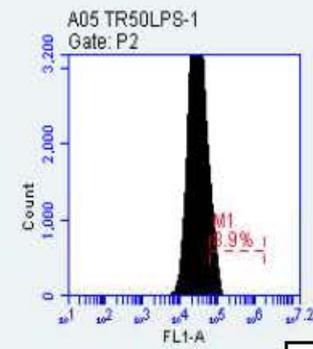
**c**



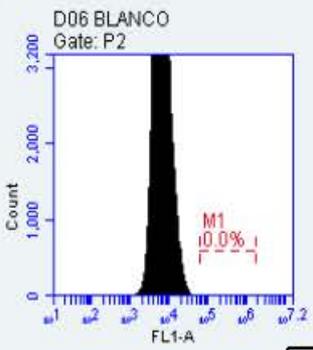
**a**



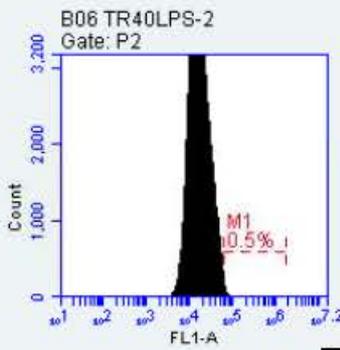
**b**



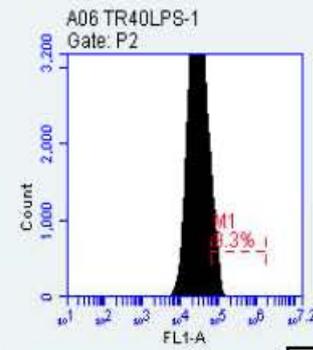
**c**



**a**



**b**



**c**