

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y**  
**BIOTECNOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN EN CULTIVOS CELULARES Y EN HUMANOS DE  
IL-6 COMO MARCADOR DE ENFERMEDAD Y ENVEJECIMIENTO”**

**Trabajo de investigación presentado por los  
Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:**

- **Condori Salas Ramiro**
- **Rojas Humpire Ricardo Josué**

**Para optar el título profesional de QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Asesora:**

**Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar**

**AREQUIPA-PERÚ**

**2016**

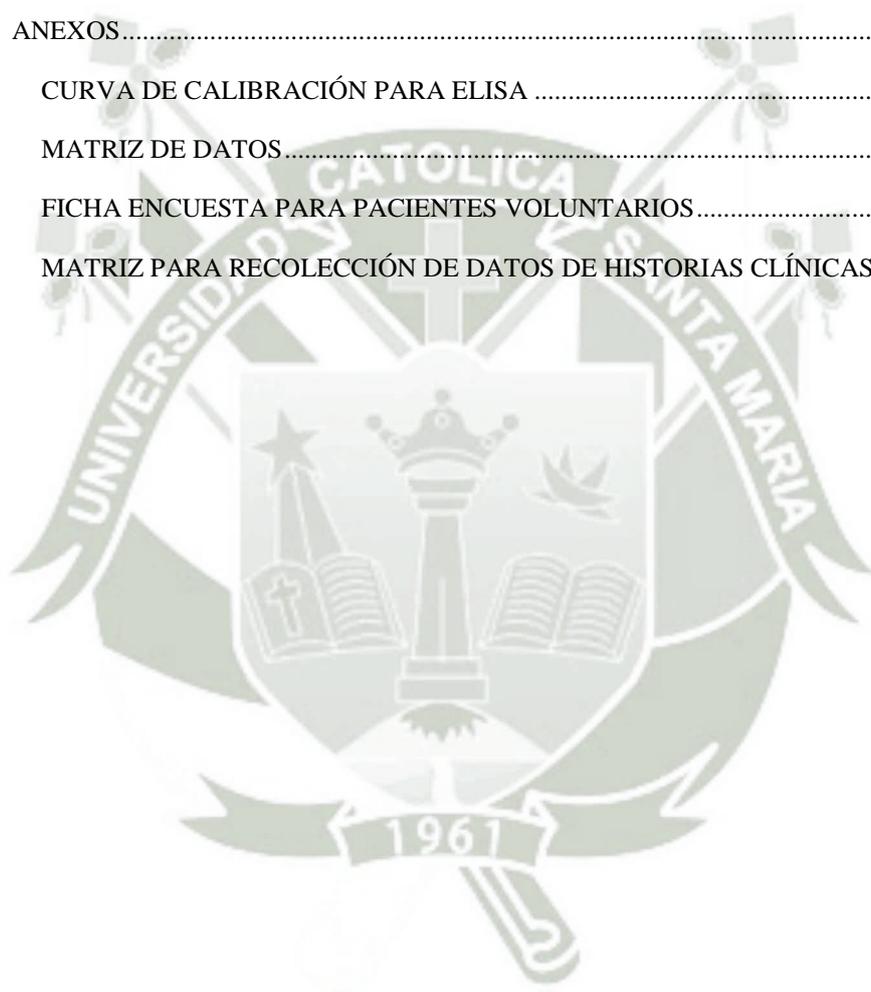
## ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN .....	1
HIPÓTESIS.....	2
OBJETIVOS .....	3
OBJETIVO GENERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO.....	6
1. HOMEOSTASIS CELULAR.....	6
1.1. CICLO CELULAR .....	6
1.2. SISTEMAS DE CONTROL .....	7
1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS DE CONTROL.....	8
1.2.2. RETROALIMENTACIÓN NEGATIVA .....	8
1.2.3. RETROALIMENTACIÓN POSITIVA.....	9
1.3. CONTROL DEL CICLO CELULAR.....	10
1.4. MUERTE CELULAR.....	12
1.4.1. NECROSIS.....	12
1.4.2. APOPTOSIS.....	13
1.5. ENVEJECIMIENTO CELULAR .....	14
2. RELACIÓN ENVEJECIMIENTO – ENFERMEDAD.....	14
2.1. TEORÍA DEL ENVEJECIMIENTO .....	17
2.1.1. TEORÍA QUÍMICA .....	18
2.1.2. TEORÍA BIOLÓGICA.....	19
3. CITOQUINAS.....	20
3.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CITOQUINAS.....	20
3.2. CLASES DE CITOQUINAS .....	22

3.3.	RECEPTORES DE CITOQUINAS .....	23
3.4.	ROLES FISIOLÓGICOS DE LAS CITOQUINAS .....	25
4.	INTERLEUCINA 6.....	38
4.1.	ESTRUCTURA DE LA IL-6.....	39
4.2.	RECEPTOR DE IL-6.....	40
4.3.	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.....	42
4.4.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA IL-6.....	43
5.	RELACIÓN ENTRE LA IL-6 Y ENVEJECIMIENTO.....	45
6.	RELACIÓN ENTRE IL-6 Y ENFERMEDAD .....	46
6.1.	ATEROESCLEROSIS .....	46
6.1.1.	ROL DE LA IL-6 EN LA ATEROESCLEROSIS .....	47
6.2.	DIABETES .....	47
6.2.1.	ROL DE LA IL-6 EN LA DIABETES TIPO II .....	48
6.3.	ARTRITIS REUMATOIDEA .....	48
6.3.1.	ROL DE LA IL-6 EN LA ARTRITIS REUMATOIDEA .....	49
6.4.	OSTEOPOROSIS .....	49
6.4.1.	ROL DE LA IL-6 EN LA OSTEOPOROSIS .....	50
6.5.	HIPERTENSIÓN.....	50
6.5.1.	ROL DE LA IL-6 EN LA HIPERTENSIÓN.....	51
6.6.	IL-6 Y CÁNCER .....	52
6.6.1.	CÁNCER COLORECTAL.....	52
6.6.2.	CÁNCER DE MAMA.....	53
6.6.3.	CÁNCER PANCREÁTICO .....	53
7.	CULTIVOS CELULARES .....	54
7.1.	TIPOS DE CELULAS PARA CULTIVO CELULAR .....	55
7.2.	METODOLOGÍA EN CULTIVOS CELULARES .....	57
7.2.1.	EL MEDIO DE CULTIVO.....	57
7.2.2.	SUBCULTIVO.....	58
7.2.3.	MANTENIMIENTO DEL CULTIVO .....	58
7.2.4.	PRESERVACIÓN DE LA CÉLULAS.....	59

CAPÍTULO II .....	61
MATERIALES Y MÉTODOS .....	62
1. TIPO DE ESTUDIO.....	62
2. MATERIALES.....	62
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	62
1.1. MATERIAL DE LABORATORIO .....	62
3. MÉTODOS.....	63
3.1. ENSAYO IN VITRO .....	63
3.1.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO.....	63
3.1.2. MUESTRA Y UNIDAD DE ESTUDIO .....	63
3.1.3. CULTIVO CELULAR .....	64
3.1.4. ENSAYO DE VIABILIDAD .....	64
3.1.5. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA .....	64
3.2. ENSAYO IN VIVO .....	65
3.2.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO.....	65
3.2.2. MUESTRA Y UNIDAD DE ESTUDIO .....	65
3.2.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	65
3.2.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	66
3.2.2.3. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA .....	66
3.2.3. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA .....	66
3.2.4. OBTENCIÓN DE DATOS.....	67
4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	67
CAPÍTULO III.....	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
1. ESTUDIO IN VITRO.....	70
1.1. NIVELES DE IL-6 EN CULTIVOS CELULARES.....	70
2. ESTUDIO IN VIVO.....	72
2.2. IL-6 Y EDAD.....	73
2.3. IL-6 Y ENFERMEDADES CRÓNICAS.....	76
2.3.1. ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON DIABETES .....	76

2.3.2.	ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON HIPERTENSIÓN .....	77
2.3.3.	ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON DISLIPIDEMIAS .....	78
2.3.4.	ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.....	79
2.3.5.	ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA.....	80
3.	CONCLUSIONES.....	82
4.	RECOMENDACIONES .....	83
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
6.	ANEXOS.....	94
6.1.	CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ELISA .....	94
6.2.	MATRIZ DE DATOS.....	95
6.3.	FICHA ENCUESTA PARA PACIENTES VOLUNTARIOS.....	98
6.4.	MATRIZ PARA RECOLECCIÓN DE DATOS DE HISTORIAS CLÍNICAS .....	99



## RESUMEN

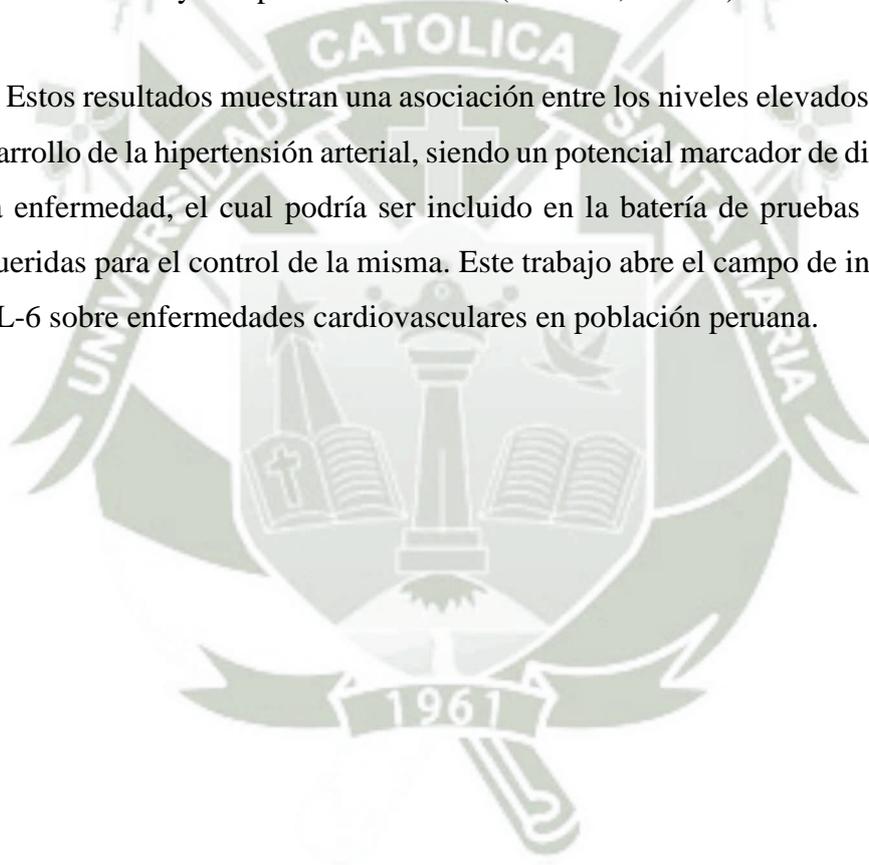
En la actualidad la búsqueda de biomarcadores confiables de envejecimiento y enfermedad es una preocupación en varias regiones del mundo dado el creciente aumento de la población centenaria, los cambios medioambientales y el aumento de enfermedades metabólicas relacionadas con la nutrición. A lo largo de los años se ha podido ver que la interleucina 6 (IL-6) tiene diversas actividades biológicas *in-vivo*, y su desregulación ha sido implicada en muchos procesos patológicos lo cual nos llevó a medir los niveles de IL-6 en cultivos de líneas celulares, así como en pacientes sanos y enfermos.

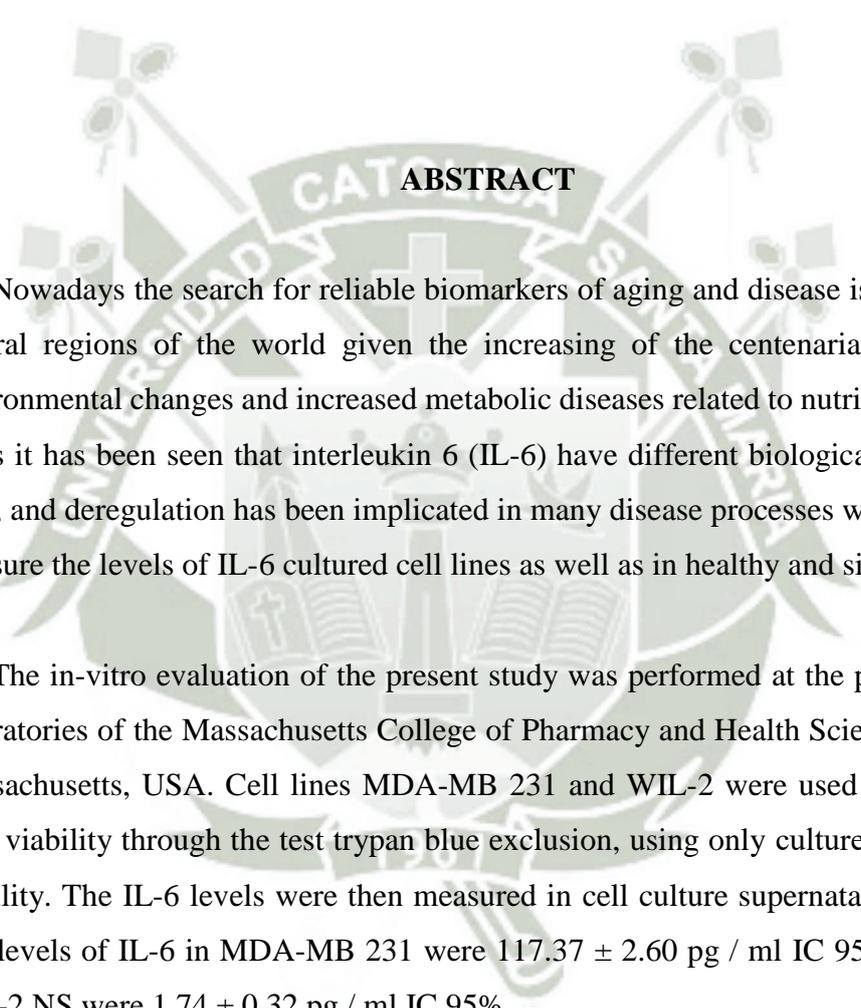
La evaluación *in-vitro* del presente trabajo se realizó en los laboratorios de farmacología del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, Boston, Massachusetts, USA. Se utilizaron las líneas celulares MDA-MB 231 y WIL-2 NS verificándose su viabilidad a través de la prueba de exclusión azul de tripán, usando sólo los cultivos con viabilidad  $\geq 95\%$ . Luego se midieron los niveles de IL-6 en sobrenadante de cultivos celulares por ELISA. Los niveles de IL-6 en MDA-MB 231 fueron  $117.37 \pm 2.60$  pg/ml IC 95%; en caso de la línea WIL-2 NS fueron  $1.74 \pm 0.32$  pg/ml IC 95%.

La fase *in-vivo* se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital de la Policía "Mayor PNP Julio E. Pinto Manrique", Arequipa, Perú. Se contó con la participación

de 200 pacientes, los cuales fueron reclutados en los servicios de análisis clínicos de dicho hospital y se midieron los niveles de IL-6 plasmático por ELISA, comparándolos luego con el historial clínico y encuesta de hábitos de estilo de vida realizado a los pacientes. De esta población se utilizaron 79 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión del presente estudio. Se concluyó que no hay asociación entre los niveles de IL-6 y la edad en varones ( $R=0.046$ ), mujeres ( $R=0.344$ ) y de manera global entre géneros ( $R=0.181$ ). Se efectuó la comparación entre enfermedades crónicas (Diabetes Mellitus, Hipertensión Arterial, Dislipidemia, Artritis Reumatoidea y Gastritis Crónica) y los niveles de IL-6, presentándose fuerte asociación entre los niveles elevados de IL-6 y la hipertensión arterial ( $P=0.019$ ,  $P<0.05$ ).

Estos resultados muestran una asociación entre los niveles elevados de IL-6 con el desarrollo de la hipertensión arterial, siendo un potencial marcador de diagnóstico para ésta enfermedad, el cual podría ser incluido en la batería de pruebas de laboratorio requeridas para el control de la misma. Este trabajo abre el campo de investigación de la IL-6 sobre enfermedades cardiovasculares en población peruana.





## ABSTRACT

Nowadays the search for reliable biomarkers of aging and disease is a concern in several regions of the world given the increasing of the centenarian population, environmental changes and increased metabolic diseases related to nutrition. Over the years it has been seen that interleukin 6 (IL-6) have different biological activities in vivo, and deregulation has been implicated in many disease processes which led us to measure the levels of IL-6 cultured cell lines as well as in healthy and sick patients.

The in-vitro evaluation of the present study was performed at the pharmacology laboratories of the Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, Boston, Massachusetts, USA. Cell lines MDA-MB 231 and WIL-2 were used NS verifying their viability through the test trypan blue exclusion, using only cultures with  $\geq 95\%$  viability. The IL-6 levels were then measured in cell culture supernatant by ELISA. The levels of IL-6 in MDA-MB 231 were  $117.37 \pm 2.60$  pg / ml IC 95%; if the line WIL-2 NS were  $1.74 \pm 0.32$  pg / ml IC 95%.

The in-vivo phase took place at the premises of the Hospital "PNP Mayor Julio E. Pinto Manrique" Arequipa, Peru. It was attended by 200 patients, who were recruited in the laboratory services and the levels of IL-6 plasma were measured by ELISA, then comparing them with the clinical history and habits survey lifestyle made to the patients. Of this population 79 patients who met the inclusion criteria of this study

were used. It was concluded that there is no association between the levels of IL-6 and age in males ( $R = 0.046$ ), women ( $R = 0.344$ ) and gender globally ( $R = 0.181$ ). Comparison between chronic diseases (Diabetes mellitus, Hypertension, Dyslipidemia, Rheumatoid Arthritis and Chronic Gastritis) and levels of IL-6 was performed, presenting strong association between elevated levels of IL-6 and high blood pressure ( $P = 0.019$ ,  $P < 0.05$ ).

These results show an association between elevated levels of IL-6 and the development of hypertension, being a potential diagnostic marker for this disease, which could be included in the battery of laboratory tests required for the control of itself. This work opens the field of research on IL-6 on cardiovascular disease in Peruvian population.



## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento y las enfermedades son procesos íntimamente relacionados. El avance del envejecimiento se caracteriza por disminución de la regeneración celular, disfuncionalidad orgánica, y degeneración de los tejidos (1). Todos estos procesos pueden desencadenar en una enfermedad por falta de reparación de tejidos, disminución de los sistemas de retroalimentación o disfuncionalidad de algún tejido especializado como el hematopoyético, etc. (2,3). Actualmente se sostiene las teorías del desgaste y programación biológica para explicar la razón de envejecer, siendo de preocupación el desarrollo de métodos para predecir la edad biológica, y ritmo de envejecimiento (1,4), algunos investigadores también ponen en manifiesto la preocupación por tener marcadores de salud y enfermedad, en pacientes de diferentes edades (5), dado que el estudio del envejecimiento es un proceso que empieza desde el declive del punto máximo de vitalidad, es de vital importancia saber si se envejece con calidad de vida (6).

Se han propuesto biomarcadores candidatos de envejecimiento humano en la literatura científica pero en todos los casos su variabilidad en los estudios transversales es considerable (3). Una razón plausible para esto es el intrínseca multicausalidad y naturaleza del proceso de envejecimiento. Dentro de los biomarcadores propuestos encontramos una cantidad marcadores clínicos e inmunológicos de interés. Las citoquinas ofrece una fuente de marcadores de interés dado sus roles en diferentes procesos biológicos y no solo inmunológicos como se creía antes (2).

La IL-6 es un citoquina pre y pro inflamatoria, de naturaleza pleiotropica con la capacidad actuar sobre todas las células gracias a la forma soluble del receptor que también posee, fenómeno que se conoce como transeñalización. Además fue la primera citoquina en la que su expresión anormal está directamente relacionada con la patogénesis de varias enfermedades, convirtiéndola en una atractivo biomarcador de estudio (4).

## HIPÓTESIS

Dado que la IL-6 tiene actividad mediada por receptores multifuncionales y cumple importantes funciones fisiológicas, es probable que su producción en cultivos celulares y en humanos esté alterada en procesos patológicos y durante el envejecimiento.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre el aumento de los niveles de IL-6 en enfermedades crónicas y envejecimiento.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los niveles de IL-6 en línea de células sanas.
- Determinar los niveles de IL-6 en línea de células de cáncer mamario.
- Determinar in vivo la relación de los niveles de IL-6 con la edad.
- Determinar los niveles de IL-6 en pacientes sanos.
- Determinar los niveles de IL-6 en pacientes con enfermedades crónicas.
- Determinar la relación de los niveles de IL-6 entre pacientes sanos y pacientes con enfermedades crónicas.



## MARCO TEÓRICO

### 1. HOMEOSTASIS CELULAR

La vida se sostiene gracias a la regulación de procesos finamente controlados con la finalidad de mantener la correcta funcionalidad de un sistema orgánico. Se conoce al equilibrio de los sistemas biológicos como homeostasis (1). Cuando uno de estos sistemas falla sobreviene una patología (2). La homeostasis sistémica es el resultado de la regulación de cada célula individual con su entorno inmediato, siendo de vital importancia el control homeostático celular para asegurar la homeostasis sistémica (3).

La homeostasis celular es la integración de la regulación del ciclo celular que permite mantener la integridad de un órgano mediante la supervivencia, proliferación y muerte celular (apoptosis) (4), para garantizar que las células optimas controlen su crecimiento evitando algún proceso patológico (ejemplo: cáncer, degeneración celular), y las respuestas de la célula con su entorno mediante sistemas de control (retroalimentación) (7).

#### 1.1. CICLO CELULAR

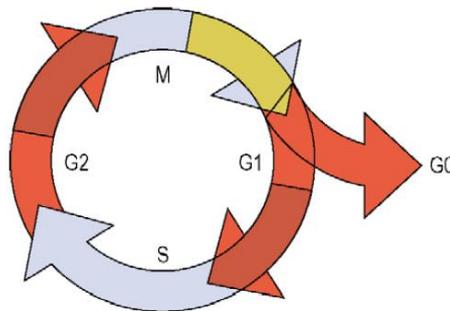
Las células se encuentran en dos estados claramente diferenciados, el de división y el de no división o interfase (Figura N°1), en la interfase la célula realiza sus funciones específicas y si está destinada a la división celular entra a la fase M(8).

La interfase tiene como primera etapa la denominada primera brecha o G1 donde la célula crece, desarrolla sus funciones y se prepara para la fase de replicación (9), algunos tipos celulares sobre todo las que no se dividen comprenden una etapa estacionaria en G1 donde realizan funciones especializadas y se mantienen en G1 por periodos indefinidos, para poder diferenciarla de la fase G1 transitoria se la conoce como G0 (10), después de G1 sigue la fase S etapa donde se replica el DNA, después

llega la etapa G2, que es anterior a la mitosis a continuación tiene lugar la mitosis con el nacimiento de dos nuevas células, y se repite el ciclo (3,5).

Se puede encontrar tres clases de células con referencia al ritmo de ciclo celular dentro de un organismo biológico superior (5).

- Células que carecen de la capacidad de dividirse: son células especializadas, que una vez diferenciadas permanecen en ese estado hasta que mueren como las células nerviosas, musculares y los eritrocitos.
- Células que no se dividen en condiciones normales: Son células que no inducen la síntesis del ADN y dividirse si no reciben el estímulo adecuado ejemplo de ellas las células hepáticas y los linfocitos B.
- Células que tienen un nivel relativamente alto de división celular: Son células que están en constante división celular en respuesta a la pérdida de las mismas en condiciones normales del organismo biológico como las células hematopoyéticas que dan lugar a los leucocitos y las células primordiales en la base de muchos epitelios que recubren las cavidades y superficie del cuerpo.



**Figura N°1:** Fases del ciclo celular.

Ref: Baynes J., Dominiczak M. *Bioquímica médica*. 3<sup>a</sup> ed. España: Elsevier; 2011.

## 1.2. SISTEMAS DE CONTROL

Existen muchos sistemas de control en el organismo, los más complejos son los sistemas de control genético que actúan para regular las funciones intracelulares y

extracelulares, muchos de estos sistemas se valen de procesos de retroalimentación mediados por diversas sustancias como las citoquinas (11).

### 1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS DE CONTROL

Los sistemas de control homeostático se basan en la retroalimentación o estímulo, evaluación y respuesta por parte de un sistema, se componen básicamente de los siguientes elementos (7):

- Variable: se entiende como una característica del ambiente interno que debe ser controlada.
- Sensor o Receptor: Es el encargado de detectar los cambios en la variable y envía la información a un integrador o centro de control.
- Integrador o Centro de Control: Aquí se recibe información del sensor sobre el valor de la variable, se interpreta el error que se ha producido y actúa para anularlo integrando datos del sensor y datos almacenados del punto de ajuste.
- Punto de ajuste: Es el valor normal de la variable que ha sido previamente almacenado en la memoria del sistema biológico.
- Efector: Es el encargado de los mecanismos que tiene un efecto sobre la variable y produce la respuesta, todavía la respuesta que se produce está monitorizada de forma continua por el sensor que vuelve a enviar la información al integrador de esta manera generándose un sistema de retroalimentación.

### 1.2.2. RETROALIMENTACIÓN NEGATIVA

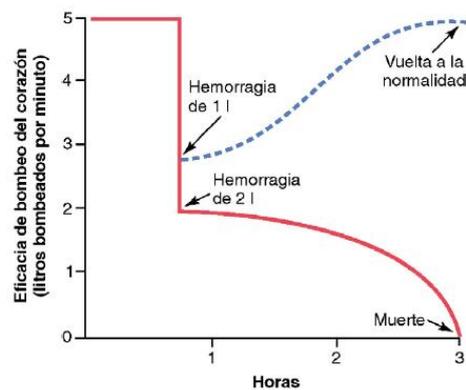
La gran mayoría de los sistemas de control del organismo actúan mediante una retroalimentación negativa ejemplo de este tipo de sistema son el control de la glicemia

en sangre o la presión arterial (7). Respecto a los mecanismos que regulan la presión arterial, una presión arterial elevada provoca una serie de reacciones que favorecen el descenso de la presión o una presión baja provoca una serie de reacciones que favorecen la elevación de la presión, en ambos casos, estos efectos son también negativos con respecto al estímulo que inició la reacción, por tanto, en general, si algún factor se vuelve excesivo o deficiente, un sistema de control inicia una retroalimentación negativa que consiste en una serie de cambios que devuelven ese factor hacia un determinado valor medio, con lo que se mantiene la homeostasis (12).

### 1.2.3. RETROALIMENTACIÓN POSITIVA

La mayoría de los sistemas de control del organismo actúan utilizando una retroalimentación negativa y no una retroalimentación positiva (7). Esto se debe a la naturaleza de la retroalimentación positiva, donde permite que un estímulo se intensifique, algo que podría llevar a la muerte como consecuencia. Aunque los mecanismos de retroalimentación negativa del organismo, pueden superar los grados leves de retroalimentación positiva (Figura N°2). La retroalimentación positiva a veces es útil, y el organismo la usa su favor (12).

La coagulación sanguínea es un ejemplo de retroalimentación positiva. Cuando se rompe un vaso sanguíneo y comienza a formarse un coágulo, dentro de este se activan muchas enzimas denominadas factores de coagulación, algunas de estas enzimas actúan sobre otras enzimas inactivadas que están en la sangre inmediatamente adyacente, con lo que se consigue que coagule más sangre, este proceso continúa hasta que se tapona el orificio del vaso y cesa la hemorragia (13). A veces, este mecanismo se va de las manos y provoca la formación de coágulos no deseados, siendo la razón de la mayoría de los ataques cardíacos, por formación de un coágulo en la superficie interna de una placa aterosclerótica de la arteria coronaria hasta bloquearla (3). Siempre que la retroalimentación positiva sea útil, la misma forma parte de un proceso global de retroalimentación negativa (7).



**Figura N°2:** Recuperación del bombeo cardiaco retroalimentación negativa y la muerte se debe a la retroalimentación positiva.

Ref: Hall J, Guyton A. Tratado de fisiología médica. 12<sup>a</sup> ed. España: Elsevier; 2011.

### 1.3. CONTROL DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular está sujeto a un estricto control genético que vigila cada uno de los pasos que realiza, de tal modo que si no se cumplen los requisitos para pasar a la siguiente etapa el ciclo se detiene (8). Se tienen cuatro transiciones fundamentales en el ciclo celular la primera referente al paso de la fase G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub> también conocida como iniciación de la proliferación, después el paso de G<sub>1</sub> a S o iniciación de la replicación después la G<sub>2</sub> a M o iniciación de la mitosis y por último de la metafase a anafase o de iniciación de la segregación cromosómica (13).

El ciclo celular está controlado por dos tipos de genes (8):

- Genes que codifican para proteínas necesarias para el ciclo como enzimas y precursores de síntesis de ADN.
- Genes que codifican para proteínas que regulan positiva y negativamente el ciclo celular.

Dentro de los que regulan positivamente el ciclo celular tenemos a los protooncogenes donde sus productos activan la proliferación celular consiguiendo que las células en G<sub>0</sub> salgan de ese estado y pasen a la fase S, entre estos genes están los

que codifican proteínas del sistema de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Figura 3).

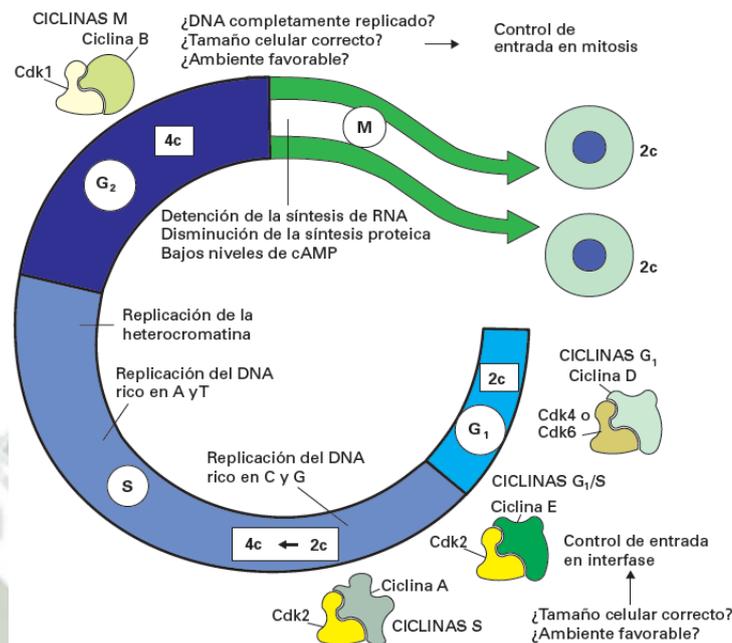
En la mayoría de células eucariotas hay cuatro tipos de ciclinas:

- Ciclinas G1: Actúan al final de G1 y promueven la entrada en fase S, representadas por la ciclina D.
- Ciclina G1/S: Se activa al final de G1 y comienzos de S, representadas por la ciclina E.
- Ciclinas S: Actúan durante la fase S y son necesarias para iniciar la replicación del ADN, representados por la ciclina A.
- Ciclinas M: Promueven la mitosis, representando por la ciclina B.

Los genes que regulan negativamente el ciclo celular se denominan genes de verificación o genes supresores tumorales, la finalidad de estos genes es asegurar la fidelidad del genoma durante su replicación y segregación, formando rutas de verificación (13).

Entre los genes de verificación tenemos los que codifican para los siguientes productos:

- Proteínas que previenen mutaciones de genes en el ciclo.
- Proteínas que inactivan las Cdk por fosforilación/desfosforilación.
- Proteínas inhibidoras del ciclo como la p53, p21 y p16.
- La proteína del retinoblastoma (Rb).
- Proteínas que inducen a la salida del ciclo bien hacia diferenciación celular o apoptosis.



**Figura N°3: Ciclinas y regulación del ciclo celular**

Ref: Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez M, Fraile B, Anadon R, et al. 3a Ed. España: McGrawHill; 2007.

## 1.4. MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso importante para la regulación de la homeostasis celular, se conocen dos tipos de muerte celular la necrosis y la apoptosis (13).

### 1.4.1. NECROSIS

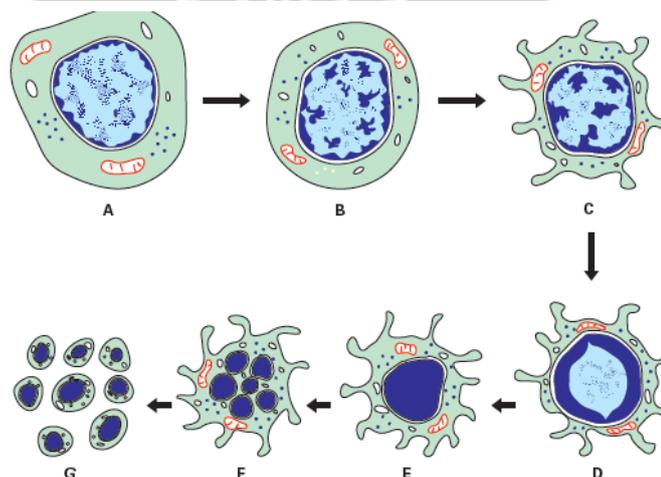
El origen de las alteraciones necróticas suele ser un desequilibrio osmótico (8). La permeabilidad de la membrana se altera y se establece un flujo anormal de iones hacia el interior que va acompañado de una entrada pasiva de agua, la entrada de calcio inhibe la formación de ATP a la vez que estimula la síntesis de algunas enzimas proteolíticas, algunos organelos se dilatan y otros se rompen (3). Finalmente la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior y promueve una respuesta inflamatoria, la salida del contenido

intracelular es el responsable del fenómeno necrótico viéndose afectadas las células adyacentes por el proceso inflamatorio generado (8).

### 1.4.2. APOPTOSIS

Esta muerte celular programada es necesaria para el buen funcionamiento del organismo dado que elimina las células funcionalmente anormales y excedentes celulares normales (3). En los embriones machos de mamíferos, las células del conducto de Müller mueren por apoptosis en el momento de la diferenciación de órganos genitales, la metamorfosis, la pérdida de la región interdigital en amniotas y la formación de la región paladar o de la retina son otros ejemplos de muerte celular programada. Esto también ocurre en células somáticas adultas, como en tejidos sometidos a constante recambio como el epitelial, donde alcanza mayores proporciones es en el sistema hematopoyético y en organelos linfoides (8).

La apoptosis comprende siete fases (Figura N°4) A: célula normal. B: La célula muestra un volumen disminuido y los orgánulos quedan más comprimidos. La cromatina comienza a condensarse. C: La membrana plasmática se deforma, dando lugar a repliegues. D: El volumen celular continúa disminuyendo. La cromatina muy condensada se dispone en la periferia del núcleo. E: La cromatina se colapsa y la envoltura nuclear continua presente. F: El núcleo se fragmenta. G: La célula queda reducida a fragmentos, constituidos por la membrana plasmática que engloba material nuclear y citoplasmático.



**Figura N°4:** *Fases de la apoptosis en linfocitos humanos.*

*Ref: Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez M, Fraile B, Anadon R, et al. 3a Ed. España: McGrawHill: 2007.*

**1.5. ENVEJECIMIENTO CELULAR**

A medida que avanza la edad se producen alteraciones estructurales y fisiológicas en todos los órganos y sistemas, con mayor riesgo de padecer alguna enfermedad. El envejecimiento parece ser el fruto de múltiples causas cuyos efectos se van acumulando, como los resultantes de la dieta y algunos elementos del entorno ambiental y social (13).

Las células sufren alteraciones a medida que pasan los años, las apariciones de estas están muy relacionadas con la edad, las mejores conocidas son (8):

- Alteraciones morfológicas: Los núcleos se vuelven hiperlobulados y a veces múltiples, las mitocondrias se hacen pleomórficas y vacuoladas, el retículo rugoso endoplásmico disminuye, el complejo de Golgi se deforma y aumentan las lipofuscinas se produce endurecimiento de la matriz extracelular y las fibras elásticas se fragmentan y desintegran.
- Alteraciones moleculares: Disminuye la capacidad de incorporar nutrientes y reparación del ADN, así como la síntesis de ácidos nucleicos, factores de transcripción, proteínas, citoquinas y reguladores del ciclo celular, mientras que aumentan las lesiones oxidativas.
- Disminución de la proliferación celular: La proliferación se hace más lenta y el número de células de muchos órganos disminuye, la capacidad de división celular en cultivo es limitada y tras varios ciclos celulares las células alcanzan la senescencia celular, los fibroblastos de humano en cultivo se dividen un determinado número de veces, que es inversamente proporcional a la edad del individuo del que han sido tomados (12).

**2. RELACIÓN ENVEJECIMIENTO – ENFERMEDAD**

El envejecimiento como parte de la vida es la culminación de un circuito cíclico que conocemos como ciclo vital, donde se desarrollan una serie de modificaciones fisiológicas, psicológicas y sociales, se presenta una declinación del organismo directamente proporcional al tiempo (13).

La medicina actual se enfoca en detectar los múltiples problemas que el anciano presenta y como confluirá en la pérdida de sus funciones fisiológicas (12). El envejecimiento fisiológico afecta a todos los órganos y sistemas, todos esos cambios tendrán grandes variaciones individuales, no todas las personas envejecen igual ni al mismo ritmo, ocurriendo lo mismo entre los diferentes órganos y sistemas dentro del organismo, el envejecimiento no es sincrónico (16).

Muchos de los cambios asociados al envejecimiento son el resultado de pérdidas graduales que comienzan en la edad adulta a merced de los sistemas de compensación orgánicos, los cuales se hacen evidentes cuando la pérdida es importante (12), la mayoría de los sistemas del organismo pierden anualmente un 1% de su función después de los 35 años en promedio (16), y es poco frecuente la muerte por la acción única de la edad, siendo más habitual que vaya acompañada de lesiones o enfermedades (6). Una de las teorías más aceptada para explicar este proceso, es afirmar que el envejecimiento y la muerte natural están producidos por genes suicidas que destruyen las células corporales a partir de un momento determinado de la vida (17), tal y como ocurre en el desarrollo embrionario, la muerte parcial genéticamente programada de ciertos grupos celulares permiten la configuración y la estructuración definitivas de los órganos corporales (8). Algunos autores sostienen que aceptando la salud, como la función óptima para la edad y que esta disminuye con el envejecimiento, podría ser mantenida hasta el fin de la vida (5). Esto quiere decir que podría retrasarse el principio de una enfermedad crónica hasta las fases más tardías de la vida y vivir el mayor tiempo posible sin enfermedad (6). Son excepcionales las personas de edad avanzada que están libres de toda enfermedad, según estadísticas las personas mayores de 65 años tienen algún tipo de enfermedad crónica que no siempre ocasiona alteraciones de la calidad de vida (5), por ello el concepto de anciano sano no siempre va ligado a la ausencia de enfermedad en el ámbito de la medicina, sino que es substituido por el de anciano válido. Se estima que al menos el 1% de la población anciana está totalmente inmovilizada, un 6% padece graves limitaciones en

las actividades de la vida diaria, para las que necesitan ayuda, y hasta un 10% más presenta incapacidad moderada, las cifras se disparan por encima de los 80 años (13). El perfil del paciente geriátrico es el de un anciano mayor de 65 años con presencia de pluripatología, tendencia a la cronicidad e incapacidad, condicionamientos mentales, sociales, y una gran necesidad de rehabilitación. Gran parte de las patologías que sufre el anciano son debidas al amplio grupo de las enfermedades crónicas, presentándose también en los adultos de todas las edades: circulatorias, articulares, nutritivas, metabólicas, sensoriales, psíquicas, etc (18).

Algunos de los caracteres anómalos de la enfermedad en la vejez son (16):

- Las anomalías sintomáticas: Más que signos concretos de una enfermedad aparecen problemas inespecíficos como manifestaciones complejas de un deterioro funcional considerándose la disnea un equivalente anginoso, etc.
- Síndromes geriátricos: Son la causa más frecuente de incapacidad, son potencialmente reversibles pero, poco conocidos y valorados, normalmente se atribuyen a la vejez los síndromes como la incontinencia urinaria, inmovilismo, cuadros de confusión, caídas, deterioro cognitivo, ceguera, sordera etc. Estos síndromes conducen muchas veces a una institucionalización prematura y abuso farmacológico acompañado de una infrautilización de la rehabilitación.
- Fragilidad o alto riesgo: A partir de los 80 años se incrementa significativamente la probabilidad de presentación de la enfermedad o accidente, sobre todo el factor riesgo o fragilidad se ve incrementado en los sectores de la población desfavorecidos económica o socialmente.

La ciencia actual trata de alargar el periodo de vida del ser humano a través de diferentes métodos (5), las herramientas genómicas son muy útiles para este propósito estudiando poblaciones y familias longevas con el propósito de encontrar la respuesta a la búsqueda de una vida más duradera (12), por otro lado contar con marcadores de envejecimiento y estado de salud es importante para la evaluación de los centenarios con respecto a su calidad de vida (6).

## 2.1. TEORÍA DEL ENVEJECIMIENTO

Muchas teorías respecto al envejecimiento y mortalidad plantean la hipótesis de que el cuerpo humano finalmente sucumbe a la acumulación de daño con el tiempo (1), debido a diversos factores ambientales que son reactivos con biomoléculas orgánicas, estas teorías notan que si bien hay mecanismos de reparación y recambio para restituir o remplazar muchas clases de moléculas dañadas, estos mecanismos no son absolutamente perfectos (Figura N°5) (13).

Podemos dividir a las teorías del envejecimiento en dos categorías generales, la teoría química y biológica (1), siendo ambas complementarias e integrando la suposición de que el desgaste, falta de regeneración y reparación celular son el origen de la problemática de envejecer. Se ha avanzado bastante en los recientes años con respecto a investigación en envejecimiento, uno de los logros más significativos del área se dio en el 2008 con la creación de súper ratones longevos con edad equivalente a ciento veinte años y funcionalidad orgánica relativa al de un ratón joven investigación dirigida por la Dra. María Blasco Marhuenda directora del CNIO (centro nacional de investigaciones oncológicas) (19).



**Figura N°5:** Cambios de proteínas del cristalino y del cartílago costal con la edad.  
Ref: Baynes J., Dominiczak M. *Bioquímica médica*. 3ª ed. España: Elsevier; 2011

### 2.1.1. TEORÍA QUÍMICA

Dentro de las teorías químicas del envejecimiento la más relevante es la relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (17). Muchos procesos biológicos requieren de la oxidación (catalizada por enzima) de moléculas orgánicas por oxígeno molecular, estos procesos incluyen la hidroxilación de cadenas laterales de prolina y lisina en colágeno, la destoxicación de xenobióticos o la degradación de nucleótidos de purina a ácido úrico (1). Las enzimas redox a menudo emplean grupos prostéticos como nucleótidos de flavina, centros de hierro-azufre, o iones metálicos unidos a hemo para ayudar en la difícil tarea de generar radicales libres altamente reactivos. En la cadena de transporte de electrones se emplean transportadores especializados como la ubiquinona y citocromos para transportar sin riesgos electrones no apareados, entre sus diversos complejos multiproteicos y dentro de los mismos, en ocasiones estos intermediarios altamente reactivos escapan hacia la célula en la forma de especies reactivas de oxígeno como superóxido y peróxido de hidrógeno. El escape desde la cadena de transporte de electrones constituye con mucho la principal fuente de ROS en casi todas las células de mamífero (20).

En la llamada teoría de los radicales libres, los investigadores han enfocado la atención en las mitocondrias (1). La mitocondria no sólo es la principal fuente de ROS en la célula a través de la cadena de transporte de electrones, sino que el daño oxidativo de los componentes de esta vía puede llevar a incremento del escape de peróxido de hidrógeno, superóxido, etc., hacia el citoplasma. El daño de las mitocondrias probablemente afectaría de modo adverso la eficiencia con la cual desempeña su función más importante, la síntesis de ATP (8). Una lentificación importante de la tasa de síntesis de ATP podría fácilmente llevar a los tipos de declinaciones a gran escala de la función fisiológica que ocurren en el envejecimiento (14), un segundo contribuidor al daño mitocondrial es el hecho de que varios componentes de la cadena de transporte de electrones son codificados por el genoma propio de la mitocondria. El genoma mitocondrial del ser humano codifica para RNA ribosómico pequeño, grande, 22 tRNA, componentes de la cadena de transporte de electrones y bomba de protones. La mitocondria carece de los mecanismos de vigilancia y reparación del DNA nuclear, en consecuencia, las mutaciones inducidas

por aductos o ROS se convierten en mutaciones que se acumularan con el tiempo, si bien ya no se considera que la hipótesis mitocondrial proporcione una explicación para todos los cambios que se asocian con el envejecimiento humano y sus comorbilidades, probablemente es un contribuidor de importancia, por el papel fundamental desempeñado de la mitocondria en las vías de activación apoptótica (13).

### 2.1.2. TEORÍA BIOLÓGICA

Una segunda corriente de opinión sostiene que el reloj de cuenta regresiva putativo que controla el envejecimiento y el lapso usa telómeros para llevar un registro del número de veces que cada célula somática se divide (14).

Los telómeros están compuestos de largas cadenas repetitiva de hexanucleótidos ricas en GT que cubren los extremos de cromosomas eucariontes, a diferencia del DNA circular cerrado de genomas bacterianos, el DNA genómico de eucariontes es lineal, Si se dejan sin protección, los extremos expuestos de estos polinucleótidos lineales estarían disponibles para participar en eventos de recombinación genética en potencia carcinogénicos, una segunda función de los telómeros es proporcionar algo de DNA desechable para adaptarse al desperdicio que ocurre cuando las moléculas de DNA lineal se replican, este desperdicio es una consecuencia del hecho de que todas las DNA polimerasas funcionan de manera unidireccional, de 3' a 5' si bien en el DNA circular cerrado éste no es un problema, cuando se trata de replicar los extremos 5' de un DNA bicatenario lineal por medio de síntesis 3' a 5' discontinua y ligadura de fragmentos de Okazaki pequeños, simplemente no hay suficiente espacio en el extremo para dar cabida al cebador de RNA pequeño, polimerasa, etc (13).

La síntesis del extremo 5' de cada cadena generalmente se le restará 100 (pares de bases) bp o más, cada vez que una célula se divide. Una vez que se agota el abasto de DNA de telómero, a grandes rasgos 100 divisiones celulares para el ser humano, toda la mitosis cesa y la célula somática entra en un estado de senescencia, a medida que más células entran en senescencia, gradualmente se pierde la capacidad para remplazar células perdidas o dañadas (21).

Los organismos son capaces de producir progenie que contiene telómeros de longitud completa gracias a la intervención de la enzima telomerasa, la telomerasa es una ribonucleoproteína que se expresa en células madre y en casi todas las células cancerosas, no así en células somáticas. Usando una plantilla de RNA, la telomerasa añade secuencias de repetición de hexanucleótido ricas en GT que varían desde algunos cientos (en levaduras) hasta varios miles (en seres humanos) de nucleótidos de longitud a los extremos de moléculas de DNA lineal para restituir sus telómeros a longitud completa, cuando células somáticas son procesadas mediante ingeniería genética en el laboratorio para que expresen telomerasa, se siguen dividiendo en cultivo mucho tiempo después, que una línea celular control. La capacidad para evitar la senescencia usando una enzima que mantiene los telómeros a longitud completa representa la evidencia más convincente de la operación de un reloj de telómero (13).

### **3. CITOQUINAS**

#### **3.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CITOQUINAS**

Las citoquinas son proteínas de aproximadamente 30 KDa implicadas en la comunicación celular, muchas citoquinas son llamadas interleucinas debido a que algunos leucocitos las secretan y pueden actuar sobre otros leucocitos (22).

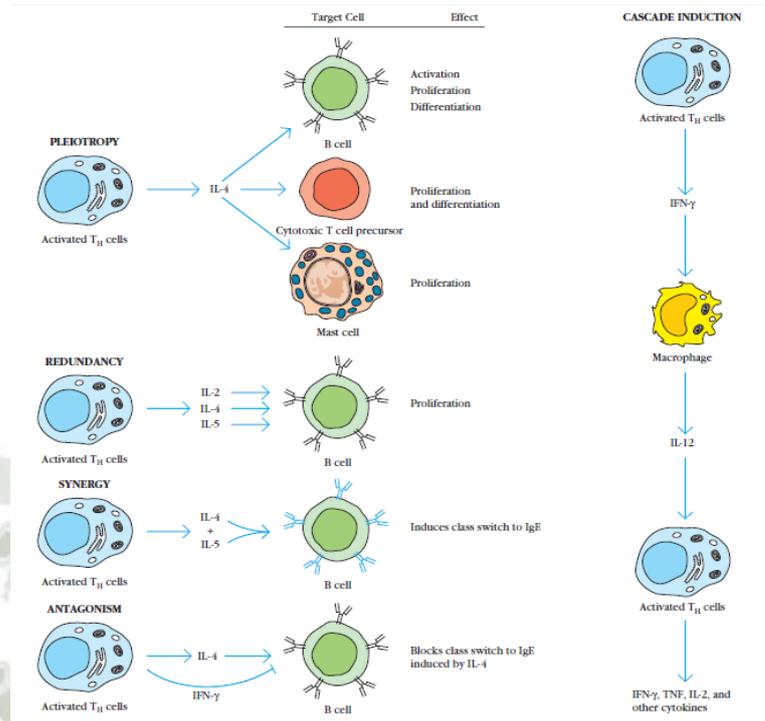
Se han descrito hasta 37 interleucinas (IL-1 a IL-37) y hay razones para suponer que aún se descubrirán otras citoquinas y que su grupo se expandirá aún más, algunas citoquinas se conocen con nombres comunes, como interferones y factores de necrosis tumoral, aunque algunos interferones recientemente descritos, como los miembros de la familia de interferones  $\lambda$ , también reciben una designación de interleucina, un subconjunto más de citoquinas son las quimiocinas, citoquinas de bajo peso molecular que intervienen en la quimiotaxis y otros aspectos de la conducta de los leucocitos, estas moléculas, que tienen un papel importante en la reacción inflamatoria (23).

En general las citoquinas se unen a receptores específicos en la membrana de las células blanco e inician vías de transducción de señales que al final alteran la expresión génica en las células blanco, la susceptibilidad de la célula blanco a una citoquina

particular depende de la presencia de receptores de membrana específicos, los receptores de citoquina pueden estar constituidos por varias cadenas distintas, y que el receptor para una citoquina dada puede existir en diversas combinaciones, estas combinaciones de cadenas varían en la afinidad con que se unen a la citoquina, y también pueden variar en su capacidad de iniciar una vía de transducción de señales después de la unión (24).

Las citoquinas muestran los atributos de pleiotropía, redundancia, sinergia, antagonismo e inducción en cascada, que les permiten regular la actividad celular en una forma interactiva coordinada (Figura 6) , una citoquina determinada que posee diferentes efectos biológicos en distintas células blanco tiene una acción pleiotrópica, se dice que dos o más citoquinas que realizan funciones similares son redundantes; la redundancia dificulta atribuir una actividad particular a una citoquina aislada, se observa sinergia de citoquinas cuando la acción combinada de dos citoquinas en la actividad celular es mayor que los efectos de las citoquinas individuales, en algunos casos, las citoquinas muestran antagonismo, es decir, los efectos de una citoquina inhiben o neutralizan las acciones de otras citoquinas, tiene lugar una inducción en cascada cuando la acción de una citoquina en una célula blanco induce a la célula a liberar una o más citoquinas distintas, que a su vez pueden inducir a otras células blanco a producir otras citoquinas (25).

Las citoquinas se secretan en respuesta a estímulos bien definidos y su secreción es de escasa duración, por lo general de unas cuantas horas a unos días, a diferencia de las hormonas, que suelen actuar a larga distancia en forma endocrina, casi todas las citoquinas lo hacen en una distancia corta de manera autocrina o paracrina, además, las citoquinas se producen en diversas células y se unen asimismo a una diversidad de ellas (26).



**Figura N°6:** Atributos de las citoquinas. Pleiotropía, redundancia, sinergismo, antagonismo e inducción en cascada.

Ref: Owen J, Punt J, Stranford Sh, Jones P. Kuby Immunology. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2013

### 3.2. CLASES DE CITOQUINAS

En los últimos años se mantuvo investigación rigurosa con respecto al descubrimiento, funcionamiento roles fisiológicos y patológicas de las citoquinas avanzando satisfactoriamente en el campo clínico de aplicación de este conocimiento, otro aspecto importante es la clasificación de las mismas en base a su actividad, afinidad por receptor, o similitud de subunidad efectora, los estudios moleculares en genómica y proteómica han dado a conocer seis familias de citoquinas (25).

- Familia de la interleucina 1
- Familia de las eritropoyetinas o citoquinas de clase I
- Familia del interferón o citoquinas de clase II
- Familia del factor de necrosis tumoral
- Familia de la interleucina 17
- Familia de las quimiocinas

### 3.3. RECEPTORES DE CITOQUINAS

Los receptores para citoquinas son seis de igual forma que las familias de citoquinas, la denominación de cada uno tiene referencia a la familia de citoquinas de afinidad, la investigación de los receptores de citoquinas fue en principio a ritmo lento dado sus concentraciones escasas en la membrana celular que de igual manera que la concentración de citoquinas en el medio extracelular, desde el uso de la clonación de genes que codifican para receptores de citoquinas la investigación en este campo ha avanzado considerablemente en la caracterización y dilucidación de los mismos (25)

- Receptor de la interleucina 1
- Receptor de eritropoyetinas o citoquinas de clase I
- Receptor de interferones o citoquinas de clase II
- Receptor del factor de necrosis tumoral
- Receptor de la interleucina 17
- Receptor de las quimiocinas

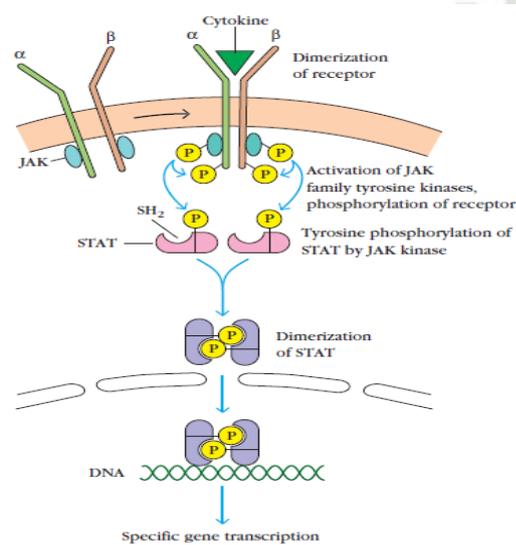
La mayoría de los receptores de unión a citoquinas que funcionan en el sistema pertenece al sistema la familia de receptores de citoquina de clase I, conocida también como familia de receptores de eritropoyetina, los miembros de esta familia tienen motivos de secuencias de aminoácidos conservadas en el dominio extracelular que consisten en cuatro residuos cisteína mantenidos en su posición (CCCC) y una secuencia conservada de triptófano-serina-(cualquier aminoácido)-triptófano-serina (WSXWS, donde X es el aminoácido no conservado) (27).

Si bien algunos receptores de citoquina importantes no se encuentran en las familias de clases I y II, la mayor parte se incluye en estas dos familias, los receptores de citoquina de clases I y II carecen de elementos de señalización, no obstante, observaciones iniciales demostraron que uno de los primeros fenómenos después de la interacción de una citoquina con uno de estos receptores es una serie de fosforilaciones de tirosina en proteínas, si bien estos resultados fueron desconcertantes al inicio, se explicaron cuando surgió un modelo unificador de estudios de los fenómenos moleculares desencadenados por la unión de interferón -  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a su receptor, un miembro de la familia clase II, el IFN- $\gamma$  se descubrió por su capacidad de inducir a las

células a bloquear o inhibir la multiplicación de una amplia variedad de virus, la actividad antivírica es una propiedad que comparte con IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , el descubrimiento de la principal vía de señalización originada por la interacción del IFN- $\gamma$  con su receptor llevó a reconocer que la transducción de señales a través de la mayor parte de los receptores de citoquinas de clases I y II (Figura 7), si no es que la totalidad de ellos, incluye las siguientes etapas (26) :

- El receptor de citoquina se compone de subunidades separadas, una cadena  $\alpha$  necesaria para la unión de la citoquina y la transducción de señales y una cadena  $\beta$  que se requiere para la señalización, pero a menudo solo con una acción menor en la unión.
- Diferentes tirosinquinasa de proteína inactivas se unen con distintas subunidades del receptor, la cadena  $\alpha$  del receptor se vincula con una familia novedosa de tirosinquinasa de proteína, la familia de quinasas Janus (JAK), la unión de JAK y la subunidad de receptor ocurre de manera espontánea y no requiere la unión de una citoquina, sin embargo, en ausencia de la citoquina, la JAK carece de actividad de tirosinquinasa de proteína.
- Las JAK activadas crean sitios de acoplamiento para los factores de transcripción de STAT mediante la fosforilación de residuos tirosina específicos en subunidades del receptor de citoquina. Una vez que se activan las JAK relacionadas con receptor, fosforilan tirosinas específicas en las subunidades del receptor del complejo, los miembros de una familia de factores de transcripción conocida como STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción) se unen a estos residuos tirosina fosforilados. Los STAT específicos tienen acciones esenciales en las vías de señalización de una extensa variedad de citoquinas, la unión de STAT a subunidades del receptor es mediada por el enlace del dominio SH2 en el STAT al sitio de acoplamiento creado por la fosforilación mediada por JAK de una tirosina particular en subunidades del receptor.
- Después de experimentar fosforilación mediada por JAK, los factores de transcripción STAT se transponen de los sitios de acoplamiento del

receptor en la membrana hacia el núcleo, donde inician la transcripción de genes específicos, mientras están acoplados a subunidades del receptor, los STAT sufren la fosforilación catalizada por JAK de una tirosina fundamental, a ello le sigue la disociación de los STAT de las subunidades del receptor y su dimerización, luego los dímeros STAT se transponen al interior del núcleo e inducen la expresión de genes que contienen secuencias reguladoras apropiadas en sus regiones promotoras.



**Figura N°7:** Modelo general de transducción de señales mediadas por receptores de citoquinas de la clase I y II.

Ref: Tomado de Owen J, Punt J, Stranford Sh, Jones P. Kuby Immunology. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2013.

### 3.4. ROLES FISIOLÓGICOS DE LAS CITOQUINAS

Como ya se comentó anteriormente las citoquinas presentan propiedades de sinergismo, antagonismo, redundancia, pleiotropía e inducción en cascada, además por la distancia de la célula diana pueden ser autocrinas, paracrinas o endocrinas, razón de su constante investigación dado que algunas involucran importantes roles dentro de la inmunidad. Investigaciones de las últimas décadas los vinculan al metabolismo, procesos patológicos en exacerbaciones y el progreso de envejecimiento (29).

A continuación se citaran las citoquinas descubiertas en los últimos años, con los ítems de sinonimia, fuente de secreción y actividad biológica (25).

<b>Cuadro N°1: Citoquinas principales actividades biológicas y fuentes de producción</b>		
<b>Citoquina y sinónimos</b>	<b>Fuente de secreción</b>	<b>Actividad biológica</b>
<b>Interleucina 1: (IL-1) Factor activador de linfocito (LAF); Factor celular mononuclear (MCF); pirógeno endógeno (EP).</b>	Monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK, células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, adipocitos, astrocitos y algunas células de músculo liso.	Inducción de la inflamación local y efectos sistémicos, como fiebre, respuesta de fase aguda, y estimulación de la producción de neutrófilos.
<b>Interleucina 2: (IL-2) factor de crecimientos de las células T (TCGF)</b>	Células T activadas	Estimula la proliferación y diferenciación de las células T y B, Activa las células NK.
<b>Interleucina 3: (IL-3) Factor multipotencial estimulador de colonias (M-CSF).</b>	Células activadas, mastocitos, basófilos y eosinófilos.	Factor de crecimiento para células hematopoyéticas; pero no de células linfoides.
<b>Interleucina 4: (IL-4): Factor 1 estimulador de células B(BSF- 1)</b>	Células T, mastocitos, basófilos y células estromales de médula ósea.	Promueve la diferenciación de células T, estimulación crecimiento y diferenciación de las células B, promueve respuestas alérgicas.
<b>Interleucina 5: (IL-5) Factor estimulador de</b>	Células T (particularmente aquellos con el sub- conjunto	Induce la formación y diferenciación de eosinófilos, estimula el

<b>colonia de eosinófilos (E-CSF)</b>	TH2), mastocitos, eosinófilos	crecimiento y diferenciación de células B.
<b>Interleucina 6: (IL-6) Factor 2 de estimulación de células B (BSF-2); factor de crecimiento hibridoma / plasmocitoma (HPGF ); Factor estimulante de hepatocitos(HSF)</b>	Algunas células T y B, macrófagos, células estromales de la médula ósea, fibroblastos, células endoteliales, musculares, adipocitos y astrocitos.	Regula las funciones de las células B y T, tiene efectos sobre la hematopoyesis in vivo. Induce la inflamación y la respuesta de fase aguda.
<b>Interleucina 7: (IL-7) linfopoyetina - 1 (LP- 1)</b>	La médula ósea y células del estroma tímico, células epiteliales intestinales.	El factor de crecimiento de células T y B progenitores
<b>Interleucina 8: (IL-8) proteína de activación neutrófilo atrayente (NAP - 1 ); factor de activador de neutrófilos (NAF); quimiocina CXCL8</b>	Monocitos, macrófagos, linfocitos, granulocitos y fibroblastos, células endoteliales, epiteliales y hepatocitos.	Quimioatrayente y activador de neutrófilos y basófilos, actividad angiogénica.
<b>Interleucina 9: (IL-9) P40; factor de crecimiento III De células T.</b>	Algunos subconjuntos de células T helper activadas.	Estimula la proliferación de los linfocitos T y los precursores hematopoyéticos, puede estar implicado en la alergia y el asma
<b>Interleucina 10: (IL-10) Factor inhibitorio de síntesis de citoquinas (CSIF)</b>	Subconjuntos activados de células, macrófagos y células dendríticas T CD4 y CD8.	Mejora la proliferación de células B, timocitos, células cebadas; en cooperación con TGF -

		<p><math>\beta</math>, estimula la síntesis y la secreción de IgA.</p> <p>Antiinflamatorio;</p> <p>antagoniza la generación del subconjunto TH1 de las células T helper.</p>
<b>Interleucina 11: (IL-11)</b>	La médula ósea, células del estroma y fibroblastos estimulados por la IL-1.	Factor de crecimiento para plasmocitos, megacariocitos, macrófagos y células progenitoras
<b>Interleucina 12: (IL-12)</b> <b>Factor Estimulador de células NK (NKSF); Factor de maduración de linfocitos citotóxicos (CLMF).</b>	Macrófagos, células B y células dendríticas.	Inducción de la diferenciación de TH1 subconjunto de células T helper; induce la producción de IFN- $\gamma$ por las células T y células NK.
<b>Interleucina 13: (IL-13)</b>	Las células T activadas (particularmente aquellos del subconjunto TH2), mastocitos, y células NK	Regula la síntesis de IgE y suprime las respuestas inflamatorias, participa en la patología del asma y algunas condiciones alérgicas
<b>Interleucina 14: (IL-14)</b> <b>Factor de crecimiento de células B y alto peso molecular</b>	Las células T activadas.	Mejora la proliferación de células B; inhibe la síntesis de anticuerpos.

<p><b>Interleucina 15: (IL-15)</b></p>	<p>Muchos tipos de células, pero principalmente células dendríticas y células del linaje de monocitos.</p>	<p>Estimula las células NK y T proliferación y el desarrollo de células; ayuda a activar las células NK.</p>
<p><b>Interleucina 16: (IL- 16 ) Factor quimioatrayente de linfocitos (LCF)</b></p>	<p>Las células T activadas y algunos otros tipos de células.</p>	<p>Quimioatrayente para células CD4 T, monocitos y eosinófilos. La unión de IL- 16 por CD4 inhibe la infección por VIH de las células CD4</p>
<p><b>Interleucina 17: (IL-17) CTLA-8.</b></p>	<p>Células T CD4 subconjunto TH17, CD8, células T gamma delta, células NK, linfocitos intra epiteliales y algunas otras células.</p>	<p>Promueve inflamación, mediada por IL - 1, IL- 6, TNF-alfa, G-CSF, GM -CSF y quimioatrayentes de monocitos y neutrófilos.</p>
<p><b>Interleucina 18: (IL-18) Factor inductor interferón gamma (IGIF).</b></p>	<p>Las células del linaje de monocitos y células dendríticas.</p>	<p>Promueve diferenciación del subconjunto TH1 de las células T helper, Induce la producción de IFN- <math>\gamma</math> por las células T y aumenta la citotoxicidad de las células NK.</p>
<p><b>Interleucina 19: (IL-19)</b></p>	<p>Monocitos estimulados por LPS y células B</p>	<p>Induce especies reactivas de Oxígeno y citoquinas</p>

		proinflamatorias, promueve apoptosis y diferenciación de linaje TH2 mediante la inhibición de INF- $\gamma$ y aumento de IL- 4 e IL- 3
<b>Interleucina 20: (IL-20)</b>	Los monocitos y queratinocitos.	Efectos en los tejidos epidérmicos y psoriasis, promueve la diferenciación de linaje TH2.
<b>Interleucina 21: (IL-21)</b>	Células T CD4 activadas.	Mejora la actividad citotóxica y la producción de IFN- $\gamma$ de células NK y CD8 activadas, activación de células B y células T foliculares en los centros germinales.
<b>Interleucina 22: (IL-22). Factor derivado de células T relacionados con IL-10 (IL-TIF)</b>	Células T CD4 en particular las del subconjunto TH17	Actividad sobre la homeostasis de la piel y la patogénesis, tiene efectos pro y anti - inflamatorios
<b>Interleucina 23:(IL-23)</b>	Células dendríticas activadas y macrófagos	Induce la diferenciación de TH17.
<b>Interleucina 24: (IL-24) IL-10B; MDA7 (Proteína 7 asociado a diferenciación de melanoma).</b>	Melanocitos, células NK, células B, subconjuntos de células T, fibroblastos, y células de melanoma.	Induce producción de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ y bajos niveles de IL-1, IL-12 y GM-CSF en

		<p>PBMC humano, actividad anticancerígena selectiva en células de melanoma mediante la inhibición de la proliferación y en células de carcinoma de mama mediante la promoción de la apoptosis.</p>
<p><b>Interleucina 25: (IL-25) IL-17E; Factor de crecimiento derivado de estroma (SF20).</b></p>	<p>Subconjunto TH2 de células T cooperadoras, mastocitos, basófilos, eosinófilos, linfocito, macrófagos epiteliales del pulmón, células del tracto GI y el útero</p>	<p>Induce la producción de citoquinas TH2 y suprime citoquinas TH17, participación en la patología de vías respiratorias, a través de la producción de citoquinas, actividad proinflamatoria.</p>
<p><b>Interleucina 26: (IL-26) AK155.</b></p>	<p>Subconjunto de células T y NK</p>	<p>Miembro de la familia de la IL-10. Puede tener funciones similares a la IL-20.</p>
<p><b>Interleucina 27: (IL-27)</b></p>	<p>Producida por las células dendríticas, macrófagos, células endoteliales, y células plasmáticas.</p>	<p>Induce la expansión clonal de las células T CD4 vírgenes, y actividad antitumoral mediada por células T CD8.</p>
<p><b>Interleucina 28: (IL-28) Interferón <math>\lambda</math> 2/3 (IFN-L 2/3)</b></p>	<p>Monocitos derivados de las células dendríticas</p>	<p>Participa en la respuesta inmune</p>

		antiviral, induce la proliferación de células T reguladoras.
<b>Interleucina 29: (IL-29)</b> <b>Interferón <math>\lambda</math> 1 (IFN-L1)</b>	Monocitos derivados de las células dendríticas	Funciona de manera similar a IL-28 A / B
<b>Interleucina 30: (IL-30)</b>	Las células presentadoras de antígeno.	Subunidad de IL-27 heterómero; desempeña funciones similares a la IL -27.
<b>Interleucina 31: (IL-31)</b>	Principalmente células T Th2 activadas; puede ser inducida en monocitos activados.	Involucrada en el reclutamiento de células polimorfonucleares, monocitos y células T a un sitio de inflamación de la piel.
<b>Interleucina 32: (IL-32)</b>	Células NK activadas y PBMCs	Citoquinas proinflamatorias con propiedades mitogénicas , induce TNF - alfa
<b>Interleucina 33: (IL-33)</b> <b>Alto factor nuclear de vénulas endoteliales (NF-HEV).</b>	Alta vénula endotelial y células musculares lisas.	Induce la producción de citoquinas TH2 por las células T , mastocitos , eosinófilos y basófilos
<b>Interleucina 34: (IL-34).</b>	Muchos tipos de células	Promueve el crecimiento y desarrollo de células mieloides.
<b>Interleucina 35: (IL-35)</b>	Las células T reguladoras.	Induce y activa las células T reguladoras.

		Suprime las respuestas inflamatorias
<b>Interleucina 36 <math>\alpha, \beta, \lambda</math>: (IL-36 <math>\alpha, \beta, \lambda</math>).</b>	Células dendríticas , monocitos , células T, queratinocitos y células epiteliales	Induce la producción de citoquinas proinflamatorias y expresar MHC de clase II, CD80, y CD86.
<b>Interleucina 37: (IL-37)</b>	Los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales.	Inhíbe la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria.
<b>APRIL : ( inductor de proliferación de citoquinas)</b>	Células T, monocitos, macrófagos, y células dendríticas.	Promueve las proliferación de células B y T, induce la recombinación y cambio de clase a IgA.
<b>BAFF : (factor activador de células B humano)</b>	Células T, células del linaje de monocitos y células dendríticas	Factor de diferenciación y la supervivencia de las células B inmaduras.
<b>Cardiotropina-1: (CT-1)</b>	Muchos tipos de células, incluyendo el corazón y el músculo esquelético.	Estimula la expresión hepática de las proteínas de fase aguda; induce la hipertrofia de los miocitos cardíacos; aumenta la adhesión de los monocitos.
<b>Factor neurotrófico ciliar : (CNTF)</b>	Astrocitos y células de Schwann	Induce la expresión de proteínas de fase aguda en el hígado,

<b>Neurotransmisor asociado a la membrana factor estimulante (MANS)</b>		pirógeno endógeno, promueve la supervivencia y la regeneración de los nervios.
<b>Factor estimulante de colonias de granulocitos: (G-CSF).</b>	Células estromales de médula ósea y macrófagos	Esencial para el crecimiento y la diferenciación de neutrófilos.
<b>Factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos: (GM-CSF).</b>	Células T, macrófagos, fibroblastos, y células endoteliales.	El factor de crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas, factor de diferenciación de linajes de granulocitos y monocitos.
<b>Factor estimulante de colonia de macrófagos: (M-CSF) Factor estimulante de colonias 1 (CSF- 1).</b>	Muchos tipos de células, incluyendo los linfocitos, monocitos, fibroblastos, células epiteliales, y otros.	Crecimiento, diferenciación, y factor de supervivencia para de macrófagos, macrófagos y granulocitos.
<b>Interferón alfa: (INF-<math>\alpha</math>) Interferón tipo 1; interferón de leucocitos; interferón de linfoblasto.</b>	Componentes microbianos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células infectadas por virus.	Induce resistencia a la proliferación de células infectadas, aumenta la expresión de moléculas MHC de clase I en las células nucleadas

<p><b>Interferón beta: (INF-β)</b> <b>Interferón tipo 1; interferón de fibroblastos.</b></p>	<p>Componentes microbianos fibroblastos, células dendríticas, células infectadas con virus</p>	<p>Induce resistencia a la proliferación de células infectadas. Inhibe virus. Aumenta la expresión de moléculas MHC clase I.</p>
<p><b>Interferón gama: (IFN-γ)</b> <b>interferón tipo 2;</b> <b>Interferón inmune; Factor activador de macrófagos (MAF).</b></p>	<p>Células TH1 y algunas células CD8 T y células NK</p>	<p>Activa los macrófagos e induce la expresión de MHC de clase II. Actividades antivirales y antiproliferativos débiles.</p>
<p><b>Interferón lambda :(IFN-λ)</b> <b>Igual que la IL- 28 e IL- 29</b></p>		
<p><b>Factor inhibidor de leucemia:(LIF)</b> <b>Activador inhibitorio de diferenciación (DIA);</b> <b>Factor retardante de diferenciación (DRF)</b></p>	<p>Células T, las células del linaje de monocitos, fibroblastos, el hígado y el corazón.</p>	<p>Mantiene cultivos de células madre embrionarias, promueve hematopoyesis, estimula la respuesta de fase aguda en hepatocitos, resorción ósea, mejora el transporte de glucosa, la resistencia a la insulina y causa pérdida de grasa corporal.</p>

<p><b>Linfotoxina alfa:(LT-<math>\alpha</math>)</b> <b>Factor de necrosis tumoral beta (TNF-<math>\beta</math>); citotoxina (CTX).</b></p>	<p>Las células T activadas, células B, células NK, macrófagos, infectados con el hepatovirus</p>	<p>Citotóxico para algunos tumores, desarrollo ganglios linfáticos y placas de Peyer, formación de células B, esplénicas y células T, induce inflamación, diferenciación de células NK</p>
<p><b>Factor inhibidor de la migración de macrófagos: (MIF)</b></p>	<p>Células T, hepatocitos, monocitos, macrófagos, y células epiteliales.</p>	<p>Activa los macrófagos e inhibe su migración.</p>
<p><b>Oncostatina M: (OSM)</b> <b>Onco M; ONC.</b></p>	<p>Las células T activadas, monocitos y macrófagos adherentes</p>	<p>Inhibición del crecimiento de células tumorales; regulación del crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas, neurogénesis, y osteogénesis, estimula proteínas de fase aguda en el hígado.</p>
<p><b>El factor de células madre : ( SCF ) ligando Kit ( KitL ) o factor de acero (SLF )</b></p>	<p>Células estromales de médula ósea, células de cerebro, riñón, pulmón y placenta</p>	<p>Desarrollo de hematopoyético, gonadal y linajes pigmentarias; activo en ambas formas unidas a la membrana y secretada</p>

<p><b>Trombopoyetina (THPO):</b> <b>factor estimulante de</b> <b>colonias de megacariocitos;</b> <b>factor estimulante de</b> <b>trombopoyesis (TSF)</b></p>	<p>Hígado, riñón y músculo esquelético</p>	<p>Crecimiento específico de megacariocitos y factor de diferenciación que regula la producción de plaquetas</p>
<p><b>Linfopoyetina estroma</b> <b>tímico : (TSLP)</b></p>	<p>Células epiteliales, queratinocitos, basófilos</p>	<p>Actúa sobre células dendríticas y CD4 T inducir linaje TH2 y proliferación, proliferación de células B y su diferenciación</p>
<p><b>Factor de crecimiento</b> <b>transformante beta:</b> <b>(TGF-β)</b> <b>Factor inhibitorio de</b> <b>diferenciación.</b></p>	<p>Algunas células T sobre todo las T helper, macrófagos, plaquetas, y muchas otras células.</p>	<p>Inhibe el crecimiento, diferenciación, inhibe la inflamación y mejora la cicatrización de heridas. Induce el cambio de clase de IgA</p>
<p><b>Factor de necrosis tumoral</b> <b>alfa: (TNF-α)</b> <b>Caquectina, Miembro de la</b> <b>superfamilia ligando 2</b> <b>TNF(TNFSF2)</b></p>	<p>Monocitos, macrófagos, células T activadas, células NK, neutrófilos y fibroblastos</p>	<p>Mediadores de inflamación y funciones inmunes, regula el crecimiento varios tipos de células. Citotóxico para muchos tipos celulares transformadas, promueve la angiogénesis, resorción ósea, y</p>

		procesos trombóticos, suprime el metabolismo lipogénico.
<b>Factor de necrosis tumoral beta : (TNF-β) El mismo que linfotoxina-α</b>	-	-

Tomado de Owen J, Punt J, Stranford Sh, Jones P. Kuby Immunology. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2013

#### 4. INTERLEUCINA 6

Hacia finales de la década de 1960 se descubrió que las células T jugaban un papel importante en la producción de anticuerpos, lo que planteo la idea que tales células producían moléculas que estimulaban a los linfocitos B para producir anticuerpos, ya para el año 1985 se descubrió una molécula que la desbrubieron como factor 2 estimulante de células B, simultáneamente se clono y estudio en varios laboratorios donde se le dio muchos nombres como interferón beta 2 por el parecido que comparte con el interferón, factor de crecimiento hibridoma/plasmacitoma por la capacidad de estimular el crecimiento de plasmacitoma murino, factor estimulante de hepatocitos por su papel en la formación de proteínas de fase aguda en hígado, ya en el año 1989 se encontró que estas moléculas que tenían un número igual de aminoácidos y secuencia similar de nucleótidos se unificaron las ideas y se las denomino interleucina 6(28).

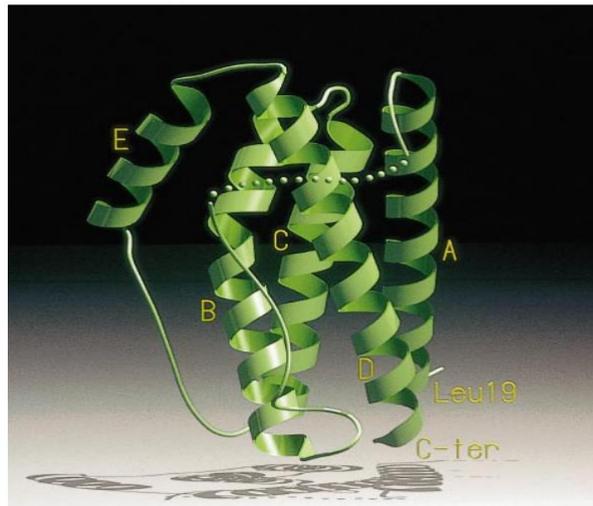
La interleucina 6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica, perteneciente a la familia de las eritropoyetinas, interactúa con su receptor de citoquinas de clase I (receptor de eritropoyetinas), el receptor tiene actividad tirosinoquinasa desencadenando su mecanismo por la activación de la ruta de señalización JAK/STAT la que concluye modulando la expresión genética (22).

#### 4.1. ESTRUCTURA DE LA IL-6

La interleucina 6 (IL-6) se caracteriza por comprender cuatro hélices alfa (A, B, C y D) formando una topología up-up-down-down, la unión de las hélices es posible gracias a un bucle largo que une las hélices A y B, uno corto entre las hélices B y C, y finalmente un bucle largo entre las hélices C y D, fuera del haz que contiene estas cuatro hélices principales hay una pequeña hélice adicional la hélice E (Figura Nro. 8)(27,30), a esta familia también pertenecen IL-11, factor inhibitorio de leucemia, cardiotrofina-1 y oncostatina M entre otros (25).

La IL-6 humana se sintetiza como una proteína precursora de 212 aminoácidos (aa) (31, 32), después de la remoción de la secuencia señal de 28 aa, el segmento de 184 aa sufre múltiples N- y O-glicosilaciones generando proteínas de pesos variables que comprenden entre 22-28 kDa, dependiendo del tipo celular donde se genera. Ejemplo de esto la IL-6 secretada por monocitos muestra un patrón de glicosilación similar al de fibroblastos, que comprende de 5 o 6 formas diferentes (32), la IL-6 murina consta de 211 aa que incluye un péptido señal de 24 residuos y sólo presenta múltiples O-glicosilaciones.

El gen de la IL-6 humana se ubica en el cromosoma 7, en el caso de la IL-6 murina se encuentra en el cromosoma 5, se han clonado los genes para la IL-6 en humanos, ratones y ratas. En todos los casos contiene cuatro intrones y cinco exones, la región que codifica para la proteína está relativamente conservada entre especies, en el caso del humano y el murino es del 65%. Las secuencias IL-6 humana y murina presentan una baja similitud, siendo a nivel de cDNA de 65% y a nivel proteico de 42%. Sin embargo, ambas IL-6 son biológicamente activas en sistemas heterólogos (27).



**Figura N°8:** Modelo en 3D de la IL-6 Humana

Ref: Ferrer Villahoz B. *Influencia de la citoquina interleucina 6 (IL-6) adipocitaria y muscular en el control del metabolismo [tesis]*. Bellaterra (España): Universidad Autónoma de Barcelona; 2013. 251 p.

#### 4.2. RECEPTOR DE IL-6

El receptor de IL-6 (IL-6R) carece de un motivo conocido de transducción de señal, por lo que el complejo IL-6/IL-6R debe asociarse a la proteína transmembrana gp130, esta proteína se encuentra asociada a la tirosina quinasa no receptora Janus Kinase (JAK) (32), diversos estudios han demostrado que ambas proteínas se encuentran fuertemente unidas (28).

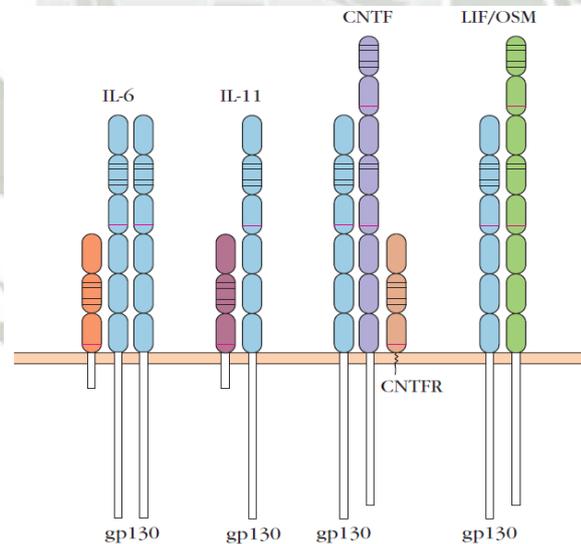
IL-6R es una glicoproteína del tipo I de 80 KDa, que no posee actividad enzimática intrínseca y una vez unida a la IL-6 forma un heterodímero con la glicoproteína 130 (gp 130) responsable de la transducción de señales, el receptor está conformado por un péptido señal, una región extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático corto (27).

Este receptor posee tres dominios extracelulares D1, D2 y D3, el receptor tiene en común con otros receptores de citoquinas del tipo I el dominio N-terminal de los dominios de unión a citoquinas (CBD)(D2), que tiene cuatro cisteínas conservadas y una región rica en prolinas, y el dominio C-terminal (D3) con una secuencia conservada de triptófano-serina-cualquier aminoácido-triptófano-serina (25).

La proteína transductora de señales gp 130, es una proteína del complejo de señalización de IL-6 y del resto de receptores de su familia, posee seis dominios extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (27).

La IL-6 tiene tres sitios diferentes de unión a receptor, el sitio 1 está formado por los residuos c-terminales de la hélice D y los residuos C-terminales de la parte del bucle AB y determina la unión específica a IL-6R, el sitio 2 está formado por residuos localizados en medio de las hélices A y C, y el sitio 3 contiene los residuos localizados en el extremo N-terminal del bucle AB y los residuos del extremo C-terminal de la hélice D, tanto el sitio 2 como el sitio 3 son necesarias para reclutar dos moléculas de gp 130 (27).

Uno de los principales reguladores de la señalización de citoquinas es la existencia de receptores solubles. La forma soluble del IL-6R (sIL-6R) se une a la IL-6 con afinidad comparable a la unión con IL-6R de membrana, la unión de IL-6 con sIL-6R activa la gp 130 la cual se encuentra prácticamente en todas las células, de esta forma aunque la expresión del receptor de IL-6 y IL-6R se restringe a pocos tipos celulares la existencia de una forma soluble sIL-6R permite que todas las células respondan a IL-6, este proceso se conoce como trans-señalización (33).



**Figura N°9:** Subfamilias del receptor de IL-6. Receptor de IL-6, IL-11, Factor neutrofílico ciliar (CNTF), Factor inhibidor de leucemia/Oncotastina M (LIF/OSM)

Ref: Owen J, Punt J, Stranford Sh, Jones P. *Kuby Immunology*. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2013.

### 4.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La vía de señalización de IL-6 utiliza tirosina quinasas de la familia de las quinasas janus (JAK) y factores de transcripción de la familia de los transductores de señales y activadores de transcripción (STAT) como principales mediadores de transducción de señales. Una vez que IL-6 a su complejo receptor se inicia la activación de proteínas tirosina quinasa de la familia de JAK: JAK 1, JAK2, JAK3 y Tyk2 (28), JAK3 está restringida al linaje hematopoyético y células musculares de la vasculatura, estas enzimas están asociadas con la subunidad gp 130, la activación de JAK lleva a la fosforilación de tirosinas de los receptores de tirosinas lo que permitirá el reclutamiento de las STATs, los STATs también se fosforilan forman dímeros y se translocan al núcleo, donde se regulan la transcripción de genes diana, la tirosina fosfatasa SHP2 también se une a la gp 130 fosforilada, de este modo permite que se forme un nexo con la vía de la proteína quinasa activadora de mitogeno (MAPK), otra vía que es activada por la IL-6 es de la del trifosfatodil inositol quinasa (PI3K) o sustrato del receptor de insulina (IRS)(27).

Las STATs se activan en el citoplasma pero ejercen su función en el núcleo, por consiguiente después de la fosforilación son transportadas al compartimiento nuclear, el transporte de moléculas de afuera a adentro o de dentro hacia afuera requiere de energía, las proteínas que se transportan al núcleo presentan una secuencia de localización nuclear (NLS), este NSL es reconocido por el receptor NSL importina alfa, que junto a la importina beta median el acoplamiento de la proteína a transportar a la cara citoplasmática del complejo del poro nuclear (27).

El sitio de unión a la importina alfa de STAT1 está localizada en una señal de localización nuclear específica inusual dentro del dominio de unión al DNA que se comporta como una NLS, la STAT3 posee una secuencia homóloga a la descrita que también funciona como NLS, STAT1 y STAT 2 también actúan con la importina alfa para ser translocados al núcleo, después de la dimerización y translocación al núcleo de las STATs estos se unen a potenciadores de secuencia específicos y estimulan o bien, en ciertos casos, reprimen la transcripción de genes diana (27) como se aprecia en el modelo general de transducción de señales de los receptores de citoquinas de clase I y II (Figura 7).

Los sistemas de señalización de la IL-6 están regulados por un sistema de retroalimentación negativa, por supresiones de la señalización de citoquinas (SOCS) y proteínas inhibitoras de las STATs activadas (PIAS) (33).

#### **4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA IL-6**

El sistema inmune es esencial para la supervivencia de un organismo biológico, reconoce y elimina virus, bacterias y otros patógenos, en este contexto se descubrió que la IL-6 permite la diferenciación de células B en plasmocitos, células secretoras de anticuerpos (34), se demostró que ratones deficientes de IL-6 a pesar que se desarrollan con normalidad, presentaban una respuesta alterada ante infecciones, con defectos severos en la producción de anticuerpos y con la abolición de la respuesta de fase aguda originada por el hígado tras una infección o trauma, la inflamación es un mecanismo de defensa en el que los leucocitos migran de la vasculatura hacia el tejido dañado para destruir los agentes que causan el deterioro del tejido, siempre y cuando sea limitada es beneficiosa (35).

El musculo esquelético representa aproximadamente el 40% del peso del cuerpo, en los últimos años se planteaba la idea que los músculos producen y liberan mioquinas que trabajan como hormonas y ejercen efectos endocrinos específicos en órganos distantes o trabajan vía mecanismos autocrinos o paracrinos ejerciendo sus efectos en las vías de señalización del propio musculo (27).

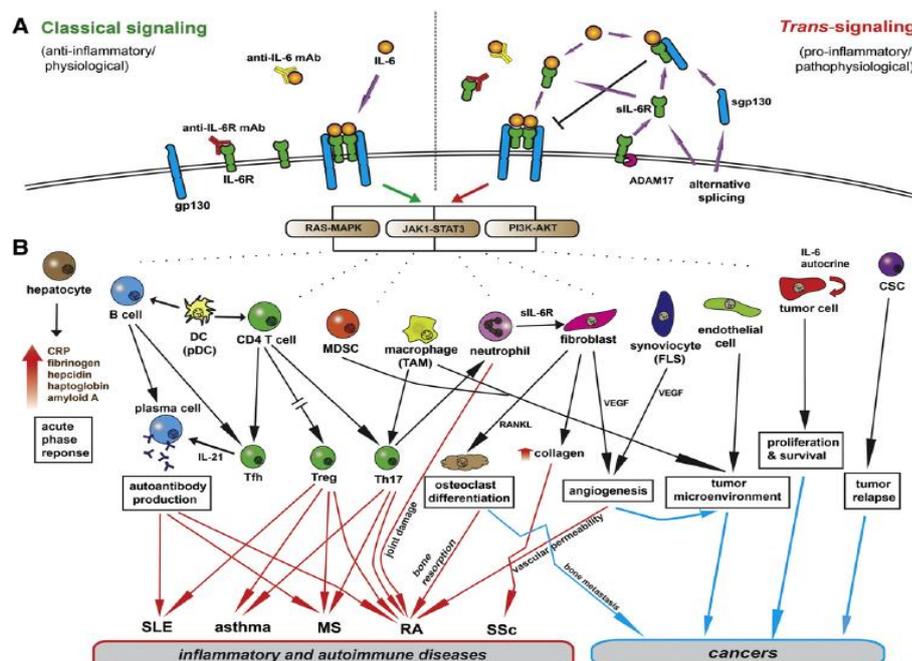
Este conocimiento sentó las bases para entender la comunicación entre el musculo y otros tejidos como el adiposo, hepático, pancreático, óseo, nervioso e inmunológico. Muchas mioquinas ejercen sus efectos en el propio musculo como la miostatina, IL-4, IL-6, IL-7 y IL-15 que están implicadas en la hipertrofia muscular y en la miogenesis (27).

Estudios en tejido hepático, revelaron funciones de la IL-6 en procesos de regeneración hepática, síntesis de proteínas de fase aguda, implicada en el aumento de la glicemia durante el ejercicio, inhibe la síntesis de glucógeno, aumenta la síntesis de triglicéridos, disminuye la señalización de la insulina aumentando el riesgo de producir resistencia a la misma (27, 31).

La hemotopoyesis es regulada por una variedad de factores de crecimiento e inductores de diferenciación, es sabido que la IL-3 y la IL-6 juegan un papel importante en la diferenciación y proliferación de células progenitoras multipotenciales hematopoyéticas, la IL-1 fue considerada como la principal inductora de diferenciación hematopoyética junto con la IL-3, pero estudios revelaron que su efecto era indirecto y a través de la IL-6 (36).

Se ha reportado la actividad de la IL-6 en tejido adiposo, en la cual ejerce efectos paracrinos entre adipocitos, en cultivo de tejido adiposo humano la IL-6 incrementa la secreción de leptina y reduce la adiponectina e incrementa la lipólisis en estudios in vivo. La administración de IL-6 recombinante humana aumenta la oxidación de grasas y produce aumento de los ácidos grasos y triglicéridos circulantes esto indicaría que la IL-6 podría ser un modulador del metabolismo lipídico (27, 37).

Procesos importantes del sistema nervioso están involucrados con la actividad de la IL-6 como la neuroinflamación produciendo astrogliosis y microgliosis, la diferenciación neuronal, la astroglíogenesis, la supervivencia de neuronas, implicada en el comportamiento emocional, dolor, control del sueño y vigilia, aprendizaje y memoria, control de la homeostasis energética(27, 39).



**Figura N°10:** Ruta de señalización de la IL-6 y su rol en la patogénesis de enfermedades humanas. Ref: Tomado de Yao X, Huang J, Zhong H, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014; 141(2):125-129).

## 5. RELACIÓN ENTRE LA IL-6 Y ENVEJECIMIENTO

La evidencia ha vinculado polimorfismos de las citoquinas IL-10 e IL-6 con longevidad y envejecimiento, las personas que están genéticamente predispuestos para producir altos niveles de IL-6 tienen una menor capacidad para llegar a los límites extremos de la vida humana, mientras que se aumenta el genotipo de producción de altos niveles de IL-10 se vincula con los centenarios (37).

Longitud de los telómeros está relacionada con la cantidad de divisiones que tendrá una célula antes de su muerte lo cual está estrechamente asociado al tiempo de vida de cada organismo biológico, por otro lado la muerte progresiva de células sin regeneración o reposición de las mismas tiene un papel importante en las enfermedades asociadas con la edad (16,19).

Los pacientes con mieloma múltiple (MM) tienen telómeros más cortos y se encuentran asociados a un menor periodo de vida con mayor probabilidad de mortalidad por infección o enfermedad cardíaca. La longitud de los telómeros de las células MM son significativamente más corto que en leucocitos normales. Investigaciones en telómeros, correlacionan negativamente la edad con niveles elevados de IL-6 (37), la sobreproducción de IL-6, se asocia con un espectro de condiciones relacionadas con la edad tanto como cardiovasculares, reumatoides, metabólicas, oncológicas, y el declive funcional (38), al describir el patrón de cambio de la IL-6 en adultos mayores sometidos a estrés crónico por seis años, concluyó que el mecanismo mediante el cual los factores de estrés crónicos pueden acelerar riesgo de enfermedades relacionadas con la edad y una forma prematura envejecimiento se debe a un aumento de la IL-6 (37).

Las arrugas en la piel son una manifestación del envejecimiento, el exceso de luz solar, hábito de fumar, la exposición al viento, el calor y productos químicos provoca que las capas externas la piel se arrugue. La radiación ultravioleta (UV) del sol es considerada como uno de los principales causas del foto envejecimiento de la piel humana y cáncer de piel. La IL-6 es producida por los queratinocitos in vivo e in vitro, y la liberación se muestra favorecida por la luz UV (9). Se examinó el plasma de

personas con tratamiento UV para evaluar la actividad de IL-6 y la capacidad de inducir la proliferación de una línea celular de hibridoma dependientes de IL-6 (B9 cell), en contraste con las muestras de plasma obtenido antes de UV exposición, las muestras post-UV contenían niveles significativos de IL-6 presentando el máximo nivel pico a las 12 h después de la irradiación UV, la actividad de IL-6 en plasma se neutralizó con un antisuero dirigido contra IL-6 humana (37).

El envejecimiento prematuro aumenta el riesgo de desarrollar melanomas y otros tipos de cáncer de piel, un estudio observó que la IL-6 fue inducida por UV-A y UV-B, y que niveles altos de marcadores inflamatorios como PCR e IL-6 se asocian de forma independiente con la degeneración macular relacionada con la edad (37).

## **6. RELACIÓN ENTRE IL-6 Y ENFERMEDAD**

La IL-6 es una citoquina multifuncional pre y proinflamatoria con una amplia gama de actividades inmunes y una fuerte capacidad de reacción de fase aguda en defensa del organismo. La sobreexpresión de esta citoquina está implicada en el desarrollo de varias enfermedades de carácter inflamatorio crónico, dentro de las más relevantes se encuentran, la aterosclerosis, diabetes, artritis reumatoidea, osteoporosis e hipertensión (37).

### **6.1. ATEROESCLEROSIS**

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias donde el material graso se deposita en la pared de los vasos sanguíneos, ocasionando un deterioro progresivo y una reducción del flujo sanguíneo. Los síntomas de la aterosclerosis no se manifiestan hasta que se produce una complicación (39).

La etiopatogenia de la enfermedad aterosclerótica se relaciona con la concentración elevada de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los depósitos de LDL se oxidan activando componentes del sistema inmunitario innato incluyendo macrófagos, anticuerpos naturales, proteínas inflamatorias como la proteína C reactiva y del complemento (1).

### 6.1.1. ROL DE LA IL-6 EN LA ATEROESCLEROSIS

La captación de la LDL oxidada (LDL ox) por macrófagos es una característica de la lesión aterosclerótica temprana, y puede ser mediada por la interleucina-6, la administración de IL-6 en ratones, aumento la cantidad de macrófagos degradadores de LDL ox y expresión de CD36 mRNA (37).

La angiotensina II desempeña un papel importante en la aterogénesis, aumentando colesterol en macrófagos y formando células espumosas. Aumentando la contracción de los vasos sanguíneos e induciendo hiperplasia de células del músculo liso vascular. Adicionalmente angiotensina II aumenta significativamente la expresión de IL-6 ARNm en músculo liso vascular de forma dosis-dependiente. La inducción de la expresión de IL-6 mediada por Angiotensina II es dependiente de  $Ca^{+2}$  intracelular, fosforilación de tirosinas y activación de la vía proteína-kinasa activada por mitógeno (MAPK) (37).

Un estudio investigó la expresión de IL-6 ARNm en arterias ateroscleróticas de pacientes sometidos a vascularización quirúrgica, utilizando reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (Q-PCR) e hibridación in-situ. Los resultados revelaron, que la expresión de IL-6 fue 10 a 40 veces mayor en arterias ateroscleróticas frente a un control y que la expresión de IL-6 fue en la capa íntima engrosada de lesiones ateroscleróticas, considerando la participación de IL-6 en el desarrollo de la aterosclerosis humana. Adicionalmente estudios clínicos revelan concentraciones elevadas de IL-6 en pacientes con dislipidemia IIa y IIb abriendo campo de investigación de esta citoquina en dicha enfermedad (37).

## 6.2. DIABETES

La diabetes es un síndrome con trastorno metabólico e hiperglucemia inadecuada causado por deficiencia de la secreción de insulina o por la combinación de resistencia a dicha hormona y secreción inadecuada de ella como compensación. La diabetes tipo 1 se debe a la destrucción de las células B en los islotes pancreáticos, sobre todo por

un proceso autoinmunitario; estos pacientes son proclives a la cetoacidosis. La diabetes tipo 2 es la forma más frecuente y es resultado de la resistencia a la insulina con un defecto en la secreción compensatoria de ésta (3).

### **6.2.1. ROL DE LA IL-6 EN LA DIABETES TIPO II**

Niveles elevados de IL-6 son reportados en estados resistencia a la insulina como obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo II (DM II) (36). La creciente evidencia sugiere que la IL-6 que se produce en adipocitos, es capaz de inducir resistencia a la insulina. Teniendo como resultado aumento la masa adiposa y, posteriormente, el índice de masa corporal (IMC).

La variante genética IL-6-174 G/C se ha asociado con mayor concentración plasmática de IL-6 (37), resistencia a la insulina, y aumento de riesgo cardiovascular. Un ensayo clínico, determino si niveles elevados de marcadores inflamatorios, IL-6 y la proteína C-reactiva (PCR) se asociaban con desarrollo de DM II en mujeres sanas de mediana edad, los resultados fueron positivos después del ajuste de índice de masa corporal, antecedentes familiares de diabetes, tabaquismo, ejercicio, consumo de alcohol, y terapia de reemplazo hormonal, se concluyó que los niveles elevados de IL-6 y PCR predicen desarrollo de DM II (38).

### **6.3. ARTRITIS REUMATOIDEA**

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica de causa desconocida que afecta sobre todo las membranas sinoviales de múltiples articulaciones. La mayor frecuencia se observa entre la cuarta o quinta décadas de la vida en mujeres, y de la sexta a la octava décadas en varones. Sin tratamiento, la artritis reumatoide causa destrucción articular con incapacidad subsiguiente y disminución de la esperanza de vida (39). Los datos histopatológicos de la articulación incluyen sinovitis crónica con formación de pannus que erosiona el cartílago, hueso, ligamentos y tendones. En fase aguda son frecuentes el derrame y otras manifestaciones de

inflamación. En la fase tardía, este conjunto de alteraciones puede causar anquilosis fibrosa (3).

### **6.3.1. ROL DE LA IL-6 EN LA ARTRITIS REUMATOIDEA**

La inflamación es un proceso diseñado para combatir la infección o el daño tisular (33). Cuando es efectiva, la respuesta inflamatoria asegura la resolución exitosa de la situación y la restauración de la arquitectura tisular normal, sin embargo, un control inapropiado de este mecanismo contribuye a la patología de varias enfermedades.

El papel que desempeña la IL-6 en la fisiopatología de la artritis reumatoidea (AR) es muy importante. Las concentraciones de IL-6, y IL-6R en líquido sinovial de pacientes con AR, es elevada y se correlacionan directamente con la gravedad de la enfermedad, tanto como como las concentraciones séricas elevadas de esta citoquina. Se ha sugerido que la determinación de IL-6 puede servir como biomarcador de enfermedad reumatoidea (40).

Ratones transgénicos que carecen de genes funcionales de IL-6 muestran una resistencia a la inducción de artritis por antígenos a pesar de que expresan concentraciones normales de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-1, luego al tratar a los animales de experimentación con inyecciones subcutáneas de IL-6 se les confiere susceptibilidad para el desarrollo de artritis inducida por antígeno (35). Como la cantidad de IL-6 es mayor en el líquido sinovial que en suero, se sugiere que la fuente de esta sobreproducción es precisamente la cavidad articular, diferentes células producen IL-6, entre ellas los fibroblastos, sinoviocitos, linfocitos, células endoteliales y monocitos. La IL-6 puede estar involucrada en la patogénesis de la osteoporosis, daño óseo y cartilaginosa de pacientes con AR. El tratamiento con anticuerpos monoclonales contra IL-6 en ratas ovariectomizadas previene el desarrollo de osteoporosis, además, debido a su acción sobre las células endoteliales puede intervenir en el tráfico de células inflamatorias hacia la cavidad articular (38).

## **6.4. OSTEOPOROSIS**

La osteoporosis se caracteriza por densidad mineral ósea baja; es un trastorno frecuente y se acompaña de mayor riesgo de fracturas. La investigación se ha enfocado a los medios para prevenir la osteoporosis y las fracturas vinculadas con ella. Las estrategias de prevención primaria incluyen complementación con calcio y vitamina D, así como programas de ejercicio (39). La detección de osteoporosis en mujeres mayores de 60 años de vida; identifica a las mujeres con baja densidad mineral ósea las cuales requieren tratamiento con bisfosfonatos para disminuir las fracturas. No se ha establecido la utilidad de la detección de osteoporosis en mujeres más jóvenes y en varones (39).

#### **6.4.1. ROL DE LA IL-6 EN LA OSTEOPOROSIS**

Durante la juventud, las mujeres están protegidas contra la osteoporosis debido a que cuentan con nivel suficiente de estrógenos. Los estrógenos tienen la capacidad de bloquear la síntesis de IL-6 por parte de los osteoblastos y de antagonizar los receptores de IL-6. La menopausia natural o quirúrgica produce niveles elevados de IL-6 e incremento de IL-6 ARNm en células óseas con aumento de la secreción de IL-6 en células mononucleares, esto es de suma importancia ya que la IL-6 estimula la osteoclastogénesis y la actividad de los osteoclastos. En enfermedades que cursan con recambio óseo rápido e hipercalcemia como la enfermedad de Paget o el mieloma múltiple se han reportado niveles aumentados de IL-6 (34).

#### **6.5. HIPERTENSIÓN**

Se puede definir a la hipertensión arterial como la elevación crónica de la presión arterial (igual o mayor de 140 mmHg para la presión sistólica, y/o igual o mayor de 90 mmHg para la presión diastólica) (41). El control básico de presión arterial se realiza en base a la interacción del flujo sanguíneo, dependiente de los latidos cardiacos (gasto cardiaco), del volumen de sangre circulante controlado por la función renal, y de las resistencias periféricas de los vasos sanguíneos a través de las resistencias arteriolas, en condiciones normales estas variables son autoreguladas en orden de mantener una

presión arterial normal necesaria para la perfusión sanguínea de acuerdo a las necesidades orgánicas (42).

La hipertensión arterial es más valores elevados o bajos del valor normal, es un síndrome cardiovascular progresivo que se presenta a partir de etiologías complejas y correlacionadas. Los marcadores tempranos del síndrome están a menudo presentes antes que la elevación de la presión arterial se haga sostenida; por lo tanto, la hipertensión no se debe clasificar solamente por discretos umbrales de presión arterial. La progresión del síndrome se asocia fuertemente a anormalidades en la función y estructuras cardíacas y vasculares, dañando el corazón, los riñones, el cerebro, la vasculatura en general, y otros órganos (42).

### **6.5.1. ROL DE LA IL-6 EN LA HIPERTENSIÓN**

Estudios experimentales demuestran la relación de la IL-6 en la patogénesis de la hipertensión. En el estudio de Lee Et al (2005), se usaron ratones KO (con supresión del gen para IL-6) y un grupo WT (tipo salvaje) a los cuales se les indujo aumento de presión mediante la administración de angiotensina II y altas concentraciones sal en la dieta. Los ratones KO mostraron ser resistentes a los incrementos de presión arterial, el experimento concluyó que la IL-6 contribuyó de manera significativa en la elevación de la presión en el grupo WT pero no el grupo con el grupo KO (43). Sturgis Et al (2009) estudiaron el rol de la aldosterona en la hipertensión mediada por angiotensina sobre la IL-6, se usaron ratones KO y WT con inducción de hipertensión con dosis de angiotensina II, se evaluó el rol de la aldosterona con un inhibidor del receptor de mineralocorticoides (espironolactona). Los resultados concluyeron que la IL-6 contribuye al aumento de presión arterial, pero no mediada por el receptor de mineralocorticoides, se hipotetiza que la aldosterona estimula la producción de IL-6 y esta contribuye a la acción de la angiotensina II, además de sus acciones inflamatorias más conocidas (44).

Estudios clínicos con marcadores inflamatorios ponen en manifiesto la importancia del proceso inflamatorio en el desarrollo de la hipertensión arterial. Un estudio realizado por Bautista Et al (2005), demostró la relación de los marcadores inflamatorios más importantes PCR (proteína C reactiva), IL-6 y TNF- $\alpha$ . Concluyendo

que se presenta relación de riesgo con IL-6 y TNF- $\alpha$  de manera independiente para hipertensión arterial en pacientes de Bucaramanga, Colombia (45).

## **6.6. IL-6 Y CÁNCER**

El cáncer es una enfermedad crónica que se caracteriza por la proliferación de células disfuncionales, angiogénesis e inhibición de la apoptosis, muchas de estas funciones se ven afectadas por la expresión de proteínas inflamatorias como el factor nuclear kappa de las células B (NF- $\kappa$ B), y la IL-6 (34). Trabajos experimentales han demostrado la contribución especial de esta citoquina en el desarrollo y progreso del cáncer, sobre todo en los mecanismos de supervivencia y proliferación celular. Dentro de los más relevantes se encontró al cáncer colorectal, cáncer de mama y pancreático (40).

### **6.6.1. CÁNCER COLORECTAL**

La expresión de IL-6 / sIL-6R juega un papel importante en la patogénesis de cáncer colorectal. Se han reportado niveles elevados de IL-6 en tejidos tumorales y suero de pacientes con cáncer colorectal.

Los niveles de IL-6 en pacientes con cáncer colorectal se asocian con el estadio tumoral, carga tumoral, metástasis y la supervivencia global. La IL-6 juega un importante papel en la modulación de las células Th17 en el desarrollo de la patología, y también en el reclutamiento de las células inmunes que producen citoquinas pro-inflamatorias, además, la IL-6 ha demostrado ser localizada en los sitios de la infiltración de macrófagos, lo que sugiere una interacción entre IL-6 y las células inmunes en el microambiente tumoral, dos reconocidos polimorfismos para el gen de IL-6 se han asociado con una reducción significativa del riesgo de cáncer colorectal.

En un estudio de 46 pacientes con cáncer colorectal, el análisis multivariado mostró que el nivel de suero IL-6 y la proporción de granulocitos en sangre y linfocitos fueron factores de riesgo independientes de mal pronóstico, lo que sugiere que los

niveles de IL-6 pueden ser significativamente predictivo de la progresión del cáncer colorectal (46,40).

### **6.6.2. CÁNCER DE MAMA**

Los altos niveles circulantes de IL-6 se asocian con cáncer de mama metastásico y una pobre supervivencia de los pacientes. La sobreexpresión de IL-6 regula el factor epidérmico de crecimiento vascular (VEGF) en el cáncer de mama, que pueden promover la angiogénesis y contribuir al potencial metastásico del mismo. La expresión es más abundante en los tumores agresivos y está inversamente asociada con niveles de receptor de estrógeno en muestras de pacientes con cáncer de mama. El polimorfismo 174G/C en el promotor de IL-6 se asocia con susceptibilidad al cáncer de mama y el pronóstico con un fenotipo agresivo (35,38).

En un estudio reciente sobre los cánceres de mama triple negativo (TNBCs), la inhibición de la expresión de IL-6 e IL-8, inhibían drásticamente la supervivencia de células tumorales in vitro, y suprimiendo el injerto de tumor en estudios in vivo. Un análisis multivariable de las muestras de pacientes reveló que la expresión de IL-6 e IL-8 son factores predictivos de TNBC (13, 29).

### **6.6.3. CÁNCER PANCREÁTICO**

Líneas celulares de cáncer pancreático humano secretan IL-6, IL-10, y TGF- $\beta$ , que luego trabajar juntos para suprimir la proliferación de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos e inducen un fenotipo tolerogénico. Estas citoquinas también regulan la disminución de la expresión de co-estimulantes incluyendo HLA-DR, CD40, CD80 para prevenir que las células dendríticas induzcan una respuesta linfocítica adecuada, lo que inhibe la respuesta del sistema inmunológico contra células tumorales.

Un experimento in-vitro reveló que el VEGF está regulado por la IL-6 e IL-1 $\alpha$  en células tumorales pancreáticas. Estudios clínicos indican que las concentraciones

séricas de IL-6 están asociados a diferentes estados del cáncer de páncreas, las concentraciones de IL-6 fueron significativamente mayores que los controles. Los pacientes con altos niveles de IL-6 tuvieron menor tasa de supervivencia que los pacientes con niveles bajos de IL-6. La tasa de supervivencia en los pacientes con niveles séricos elevados de IL-6 e IL-1 $\beta$  se mostró acortados de manera global (33, 46, 40, 36).

## 7. CULTIVOS CELULARES

Los cultivos de células y tejidos son técnicas que implican el aislamiento y mantenimiento *in vitro* de células aisladas de tejidos u órganos enteros derivados de animales, microbios o plantas. En general, las células animales tienen requerimientos nutricionales más complejos y necesitan condiciones más estrictas para el crecimiento y mantenimiento, por comparación, los microbios y plantas requieren condiciones menos rigurosas, creciendo y proliferando con facilidad. Independientemente de la fuente de material utilizado, el cultivo de células se rige por los mismos principios generales que requieren un cultivo puro estéril de las células y se ve la necesidad de adoptar técnicas asépticas apropiadas, además de la utilización de condiciones adecuadas para el crecimiento de las células. Una vez establecidas las células en cultivo pueden explotarse de muchas maneras diferentes, el cultivo de células es ideal para el estudio de los procesos intracelulares que incluyen síntesis de proteínas, mecanismos de transducción de señales y el metabolismo de fármacos (47). También han sido ampliamente utilizados para comprender los mecanismos de acción de fármacos, interacción célula-célula y genética, además, la tecnología de cultivo celular se ha adoptado en la medicina, donde anomalías genéticas pueden ser determinadas por análisis cromosómico de células derivadas, como es el caso del diagnóstico precoz de neonatos en mujeres embarazadas, del mismo modo, las infecciones virales se pueden ensayar tanto cualitativa y cuantitativamente en células aisladas en cultivo. En la industria las células se utilizan rutinariamente para probar tanto los efectos farmacológicos y toxicológicos de compuestos de farmacéuticos (48).

## 7.1. TIPOS DE CÉLULAS PARA CULTIVO CELULAR

Los tipos de células usadas en cultivo celular caen en dos categorías: cultivo primario o línea celular (47).

Los cultivos primarios son células derivadas directamente de los tejidos, seguido de disociación enzimática o de fragmentos de tejido referente a explantes; estos son por lo general las células de preferencia. Los cultivos primarios deben conservar sus características y reflejar la verdadera actividad del tipo de célula in vivo, la desventaja en el uso de cultivo primario, es que su aislamiento puede ser de trabajo intensivo y puede producir una población heterogénea de células. Además, los cultivos primarios tienen una relativamente vida útil limitada y puede ser utilizado sólo durante un período limitado de tiempo en el cultivo (47).

Los cultivos primarios se pueden obtener de muchos tejidos diferentes y la fuente de tejido utilizado generalmente define el tipo de célula aislada, como las células aisladas del endotelio de los vasos sanguíneos se denominan células endoteliales. Del mismo modo los que son aislados desde la capa media de los vasos sanguíneos y otros tejidos similares de músculo liso de las células, aunque ambos se pueden obtener del mismo tejido. Las células endoteliales son diferentes en morfología y función, generalmente creciente como una sola monocapa que se caracteriza por una morfología de adoquines, las células musculares lisas por otra parte son alargadas, con proyecciones de husillos como en los extremos y crecen en capas aun cuando se mantiene en el cultivo. Además de estos tipos de células hay otros cultivos primarios ampliamente usados derivados de una amplia gama de tejidos, incluyendo fibroblastos de tejido conectivo, los linfocitos de la sangre, las neuronas de nervioso tejidos y hepatocitos de tejido hepático (49).

Las líneas celulares consisten en un solo tipo de célula que ha adquirido la capacidad para el crecimiento infinito, esto ocurre generalmente después de la transformación de las células por uno de varios medios que incluyen tratamiento con agentes carcinógenos o la exposición a virus tales como el virus de simio 40 (SV40), virus de Epstein-Barr virus (EBV) o el virus de la leucemia murina de Abelson (A-MuLV) entre otros. Estos tratamientos causan que las células pierden su capacidad para regular crecimiento y como resultado, las células transformadas crecen

continuamente por lo que tienen vida infinita; el inconveniente de esto es que las células transformadas generalmente pierden parte de sus características originales in vivo, como por ejemplo ciertas líneas celulares establecidas no expresan determinados genes específicos de tejido, otro ejemplo de esto es la incapacidad de las líneas celulares de hígado para producir factores de coagulación, líneas celulares continuas; sin embargo, tienen varias ventajas sobre los cultivos primarios, además de la inmortalidad, requieren menos de suero para el crecimiento y tienen un tiempo de duplicación más corto (50).

Diferentes líneas celulares están disponibles actualmente de diversos bancos de células, las cuales hace que sea más fácil de obtener estas células sin tener que generarlos, uno de los mayores proveedores de líneas celulares es la Colección Europea de Cultivos Celulares de Animales (ECACC) con sede en Salisbury, Reino Unido (51).

Cuadro N°2: Ejemplos de líneas celulares provistas por recursos comerciales

Línea celular	Morfología	Especie	Tejido de origen
BAE-1	Endotelial	Bovino	Aorta
BHK-21	Fibroblasto	Hámster sirio	Hígado
CHO	Fibroblasto	Hámster chino	Ovario
COS-1/7	Fibroblasto	Mono verde africano	Hígado
HeLa	Epitelial	Humano	Cérvix
HEK-293	Epitelial	Humano	Hígado
HT-29	Epitelial	Humano	Colon
MRC-5	Fibroblasto	Humano	Pulmón
NCI-H660	Epitelial	Humano	Pulmón
NIH/3T3	Fibroblasto	Ratón	Embrión
THP-1	Monocito	Humano	Sangre
V-79	Fibroblasto	Hámster chino	Pulmón
HEP 1	Hepatocito	Humano	Hígado

Tomado de Wilson K, Walker J. Principles and Techniques of biochemistry and molecular biology. 7th ed. New York: Cambridge university press; 2010.

## 7.2. METODOLOGÍA EN CULTIVOS CELULARES

### 7.2.1. EL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo celular utilizado para el crecimiento de células animales es una mezcla compleja de nutrientes (aminoácidos, un hidrato de carbono tal como glucosa, y vitaminas), sales inorgánicas (por ejemplo, que contiene magnesio, sodio, potasio, calcio, fosfato, cloruro, sulfato, e iones bicarbonato) y antibióticos de amplio espectro. En ciertas situaciones puede ser esencial incluir un fungicida, tales como la anfotericina B, aunque esto no siempre es necesario; por conveniencia y facilidad de supervisar el pH del medio se incluye indicador de rojo de fenol en el medio, esto cambiará de rojo a amarillo en un rango de pH de 7.2 hasta 7.4 ; otro ingrediente básico clave en el medio de cultivo celular es suero, generalmente bovino o fetal de ternera, esto se utiliza para proporcionar un amortiguador para el medio de cultivo, pero lo más importante es que proporciona nutrientes adicionales y factores de crecimiento similares a las hormonas que promueven el crecimiento saludable de las células. El realizar cultivos de células en ausencia de suero no suelen resultar exitosas, a pesar de que las células pueden producir factores de crecimiento propias (47,49). Sin embargo, a pesar de estos beneficios, cada vez se cuestiona el uso de suero, debido a que es un medio susceptible a infección por virus y micoplasma, o enfermedades del ganado como la de la enfermedad de las vacas locas, los cuales (encefalitis espongiiforme bovina) han introducido un inconveniente adicional para realizar un cultivo celular con este producto y ha aumentado la necesidad de productos alternativos; en este aspecto, los fabricantes de reactivos varios de cultivo de células han desarrollado medios sin suero suplementado con varios componentes incluyendo la albúmina, transferrina, insulina, factores de crecimiento y otros elementos esenciales necesarios para el crecimiento celular óptimo (49).

El uso de los cultivos está demostrando ser muy útil especialmente para la industria farmacéutica y biotecnológica, tanto como para las empresas que participan en la fabricación de medicamentos o productos biológicos de uso humano y animal (49, 51).

### **7.2.2. SUBCULTIVO**

El subcultivo es el proceso por el cual las células se siembran, este proceso también conocido como paso de cultivo es esencial para mantener a las células en un estado saludable y viable, de lo contrario, pueden morir después de un cierto período en cultivo continuo. La razón de ello es que las células adherentes crecen en una capa continua que eventualmente ocupa toda la superficie de la placa de cultivo y en este punto que se dice que son confluentes, una vez confluentes, las células dejan de dividirse y entra en un estado de reposo en el que dejan de crecer (Senescencia) y finalmente mueren; por lo tanto, para mantener las células viables, deben ser subcultivadas antes de que alcancen la inhibición completa. Idealmente, las células deben cultivarse justo antes de que lleguen a un estado confluyente. El método preciso utilizado depende en gran medida de si las células son adherentes o están en suspensión (47).

### **7.2.3. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO**

Es importante que después de la siembra los frascos estén claramente etiquetados con la fecha, el tipo de células y el número de veces que las células han sido subcultivadas o pases; por otra parte, una estricto régimen de alimentación y el subcultivo debe establecerse a intervalos regulares sin permitir que el medio se agote de nutrientes o las células se multipliquen en exceso y permitir un ambiente confluyente, esto se puede lograr siguiendo una procedimiento estándar, pero de rutina, para mantener las células en un estado viable bajo óptimas condiciones de crecimiento; además, los cultivos deben ser examinados todos los días bajo un microscopio invertido, buscando en particular los cambios en la morfología y densidad celular (47,49).

Una parte importante para determinar el estado de los cultivos en crecimiento es la vigilancia de células flotantes, los cuales no suelen ser una buena señal y puede indicar las células en dificultades o moribundos; la presencia de células anormalmente grandes pueden también ser útil para determinar el bienestar de las células, ya que el número de tales células aumenta a medida se hacen más pasajes o se hace menos viable el cultivo. Los extremos en el pH se deben evitar sustituyendo regularmente medio gastado por medio fresco, esto puede llevarse a cabo en días alternos hasta que los cultivos tengan aproximadamente el 90% de confluencia, momento en que las células se utilizan ya sea para la experimentación y/o subcultivo (47,49).

#### **7.2.4. PRESERVACIÓN DE LA CÉLULAS**

Las células se pueden conservar para su uso posterior por congelación en nitrógeno líquido, este proceso se conoce como la criopreservación y es una manera eficiente de mantener las células de interés. En efecto, es aconsejable que cuando se tienen buenos cultivos, se tomen alícuotas de células para almacenar en el estado congelado; esto proporciona una fuente renovable de células que podría ser utilizado en futuro. La congelación puede sin embargo resultar en varios cambios letales dentro de las células, incluyendo la formación de hielo cristales y los cambios en la concentración de electrolitos y en el pH; para minimizar éstos se hace uso de un agente crioprotector como DMSO que se suele añadir a las células antes de la congelación con el fin de bajar el punto de congelación y así prevenir la formación de cristales de hielo dentro de las células (47,49,52).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. TIPO DE ESTUDIO

- Tipo de investigación: Exploratorio correlacional.
- Tipo de diseño: No experimental, transversal correlacional.

### 2. MATERIALES

#### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Línea celular WIL-2 NS (Linfocitos B).
- Línea celular MDA-MB 231 (Células de cáncer de mama).
- Pacientes sanos de diferentes edades.
- Pacientes con enfermedad de diferentes edades.

#### 1.1. MATERIAL DE LABORATORIO

- Frascos para cultivo celular Falcon® de 50 ml.
- Placas para cultivo de 6,24 y 96 pozos.
- Pipetas graduadas de 1, 5, 10 y 25 ml.
- Tubos de ensayo.
- Micropipetas graduadas de 5, 20, 100 y 1000  $\mu$ L.
- Tubos de centrifuga Falcon® de 15 y 50 ml.
- Tubos eppendorf de 1.5 - 2ml.
- Espectrofotómetro para microplacas Mindray MR-96<sup>a</sup>
- Lavador automático para microplacas Mindray MW-12.
- Microscopio invertido Olympus.
- Cellometer® Auto T4.
- Centrifuga.
- Incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Nevera.

- Congelador.
- Criopreservador.
- Cabina de bioseguridad Clase II tipo A2 ESCO.
- Baño termostático.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. ENSAYO IN VITRO

##### 3.1.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO

Laboratorio de Post Grado de Ciencias Farmaceuticas, Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, Boston, Massachusetts, USA.

##### 3.1.2. MUESTRA Y UNIDAD DE ESTUDIO

###### LINEA CELULAR WIL-2 NS

- Organismo: Homo sapiens, Humano.
- Tipo celular: Linfocito B.
- Enfermedad: Ninguna.
- Edad: 5 años.
- Género: Hombre.
- Etnia: Caucásica.
- Fuente: ATCC® Company.

###### LINEA CELULAR MDA-MB 231

- Organismo: Homo sapiens, Humano.
- Tejido: Glándula mamaria/ mamas, derivado de una sitio metastásico por efusión pleural.
- Tipo celular: Epitelial.
- Enfermedad: Adenocarcinoma.
- Edad: 51 años.
- Género: Femenino.
- Etnia: Caucásica.
- Fuente: ATCC® Company.

### 3.1.3. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares MDA-MB 231 y WIL-2 NS se obtuvieron de ATCC® Company. Cada línea fue iniciada con un cultivo primario en medio de crecimiento específico. El medio de cultivo fue adquirido de ATCC® Company. Se usó el medio DMEM para la línea MDA-MB 231 y RPMI para la línea WIL-2 NS. Cada medio fue preparado con 10 % de suero fetal bovino y 1% de antibiótico. Se verifica el crecimiento celular cada 12 horas, en un promedio de 5 a 8 días. Posterior al cultivo primario se realiza un subcultivo, previa verificación de la viabilidad del cultivo, solo fueron usados los cultivos que tuvieron viabilidad  $\geq 95\%$ . Los posteriores cultivos secundarios fueron usados para medición de la IL-6 por ELISA.

### 3.1.4. ENSAYO DE VIABILIDAD

La prueba de exclusión de azul de tripán de Life Technologies, se utilizó para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Se basa en la capacidad de las membranas intactas de células vivas para excluir ciertos colorantes, como el azul de tripán, mientras que las células muertas no lo hacen.

Primero se preparó una suspensión de células, se extrajo una alícuota de 1 ml y mezcló con 0.1 ml de solución stock de azul de tripán, luego se realizó el conteo de las células en el Cellometer® Auto T4. El instrumento proporcionó la viabilidad del cultivo y el número de células por mililitro disponibles en el frasco del mismo.

### 3.1.5. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA

Se usó la técnica inmunológica, Human IL-6 ELISA Kit de ThermoScientific, para el análisis de las concentraciones de IL-6.

Previo al análisis de las muestras, se realizó una curva de calibración del ensayo, el estándar se reconstituyó en 1ml de agua ultrapura para después diluirlo a las concentraciones de 400 pg/ml, 160 pg/ml, 64 pg/ml, 25.6 pg/ml, 10.24 pg/ml y 0 pg/ml

en medio de cultivo celular dependiendo de la línea celular respectiva. El procesamiento de los estándares es el mismo que las muestras en investigación.

Primero se añadió en los micropozos 50  $\mu$ l anticuerpo secundario biotinilado junto con 50  $\mu$ l de las diluciones estándares o sobrenadante de cultivo celular en investigación por triplicado, dejando incubar por 2 horas. Después se sometió lavado con solución de lavado, se añadió 100  $\mu$ l de la solución estreptavidina-peroxidasa (enzima), este se une al anticuerpo biotinilado para completar los cuatro miembros del sándwich, se dejó incubar por 30 min. Después se sometió a lavado con solución de lavado, se añadió 100  $\mu$ l de solución TMB (sustrato), que recibe la acción de la enzima unida para producir color, se deja incubar por 30 min, pasado el tiempo se añadió la solución de STOP y se procedió a medir las absorbancias. La intensidad del producto coloreado se detectó a una longitud de onda cercana a 450nm. La absorción es directamente proporcional a la concentración de IL-6 presente en la muestra original.

### **3.2. ENSAYO IN VIVO**

#### **3.2.1. ÁMBITO GEOGRÁFICO**

Laboratorio de análisis clínicos, Hospital Regional PNP Arequipa "Mayor PNP Julio E. Pinto Manrique", Arequipa, Perú.

#### **3.2.2. MUESTRA Y UNIDAD DE ESTUDIO**

Los pacientes que participaron en el presente estudio fueron personas adultas residentes de la ciudad de Arequipa, Perú.

##### **3.2.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Paciente con historial clínico en el hospital "Mayor PNP Julio E. Pinto Manrique".
- Monitoreo de enfermedad o Chequeo general.

- Ayuno mínimo de 8 horas.

### **3.2.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes con más de una enfermedad crónica degenerativa.
- Pacientes con actividad física moderada a intensa.

### **3.2.2.3. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA**

Los pacientes fueron previamente informados acerca del estudio realizado, de los cuales solo se extrajo muestra de los que dieron consentimiento del mismo. Las muestras fueron obtenidas por venopunción entre las 7:00 – 8:00 am en tubos rojos Vacutainer™, se procedió a centrifugar para obtención de suero, y fueron analizadas en el intervalo de 3 horas desde la extracción.

### **3.2.3. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA**

Se usó la técnica inmunológica, Human IL-6 ELISA Kit de ThermoScientific, para el análisis de las concentraciones de IL-6.

Previo al análisis de las muestras, se realizó una curva de calibración del ensayo, el estándar se reconstituyó en 1ml de agua ultrapura para después diluirlo a las concentraciones de 400 pg/ml, 160 pg/ml, 64 pg/ml, 25.6 pg/ml, 10.24 pg/ml y 0 pg/ml en solución de dilución de estándares proporcionada por el Kit. El procesamiento de los estándares es el mismo que las muestras en investigación.

Primero se añadió en los micropozos 50 µl anticuerpo secundario biotinilado junto con 50 µl de las diluciones estándares o suero de pacientes en evaluación por triplicado, dejando incubar por 2 horas. Después se sometió a lavado con solución de lavado, se añadió 100 µl de la solución estreptavidina-peroxidasa (enzima), este se une al anticuerpo biotinilado para completar los cuatro miembros del sándwich, se dejó incubar por 30 min. Después se sometió a lavado con solución de lavado, se añadió 100 µl de solución TMB (sustrato), que recibe la acción de la enzima unida para producir color, se deja incubar por 30 min, pasado el tiempo se añadió la solución de

STOP y se procedió a medir las absorbancias. La intensidad del producto coloreado se detectó a una longitud de onda cercana a 450nm. La absorción es directamente proporcional a la concentración de IL-6 presente en la muestra original.

### **3.2.4. OBTENCIÓN DE DATOS**

Los datos clínicos se obtuvieron a través de una encuesta elaborada de hábitos y estilos de vida (Anexos ficha encuesta para pacientes voluntarios) como de la revisión de historias clínicas de cada uno de los pacientes que acudieron a los servicios médicos y contaban con historia clínica en el Hospital Regional PNP Arequipa "Mayor PNP Julio E. Pinto Manrique", Arequipa, Perú.

## **4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Los resultados fueron evaluados mediante el paquete estadístico EPI-INFO Versión 6.0 (OMS - CDC) a través del cual se calcularon los siguientes estadígrafos:

- Medidas de tendencia central, media, error estándar
- Coeficiente Rho (correlación de Pearson)
- Test t-Student para grupos independientes.



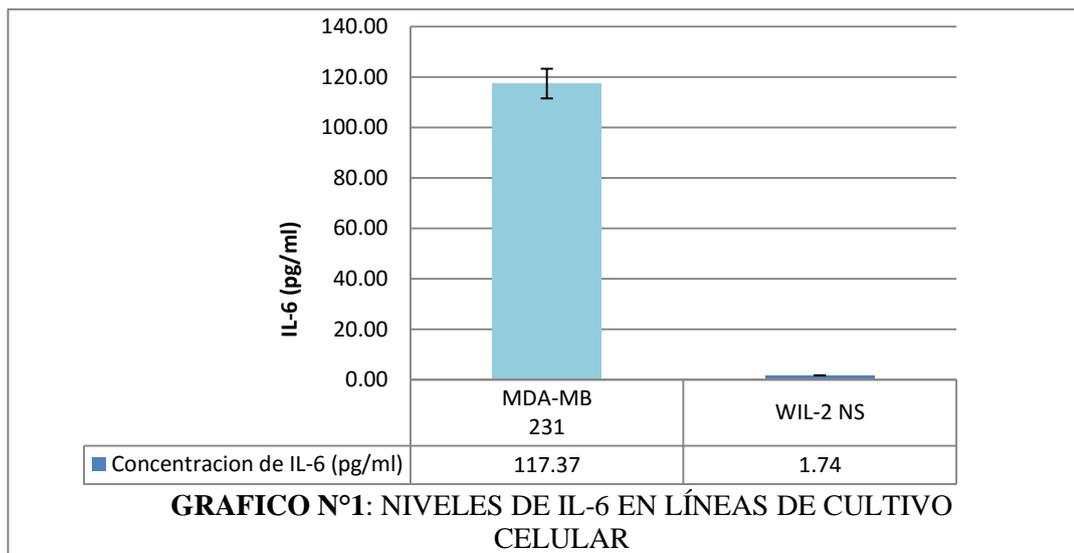
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. ESTUDIO IN VITRO

#### 1.1. NIVELES DE IL-6 EN CULTIVOS CELULARES

**TABLA N°1: NIVELES DE IL-6 EN LÍNEAS CELULARES WIL-2 NS Y  
MDA-MB 231**

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	IL-6 (pg/ml) N=9	
	WIL-2 NS	MDA-MB 231
<b>Media Aritmética (Promedio)</b>	<b>1.74</b>	<b>117.37</b>
Error estándar de la media	0.05	0.43
Mediana	1.74	117.39
Moda	1.74	115.87
Desviación Estándar	0.16	1.30
Varianza	0.02	1.68
Rango	0.44	3.26
Valor Mínimo	1.52	115.87
Valor Máximo	1.96	119.13
<b>Intervalo de confianza (IC) 95%</b>	<b>1.74 ± 0.32</b>	<b>117.37 ± 2.60</b>



Se midieron los niveles IL-6 en sobrenadante de cada cultivo celular por triplicado. Todos los cultivos se mantuvieron en ambientes controlados de CO<sub>2</sub> y temperatura, monitoreando constantemente su viabilidad y tomándose muestras de cultivos con viabilidad  $\geq 95\%$ . Las concentraciones de IL-6 en la línea celular MDA-MB 231 fueron  $117.37 \pm 2.60$  pg/ml (IC 95%) mientras que las obtenidas en la línea WIL-2NS fueron  $1.74 \pm 0.32$  pg/ml (IC 95%) (Tabla N°1). Las concentraciones de IL-6 encontradas fueron marcadamente diferentes en las líneas celulares patológicas vs no patológicas (Gráfica N°1).

Por sus características MDA-MB 231 es una línea de cáncer de mama con clasificación histopatológica de triple negativa. Es una línea de cáncer muy agresiva, de rápida evolución que no posee tratamiento farmacológico exitoso en las mujeres que la padecen (39). Se han realizado diversos trabajos con esta línea celular respecto a su capacidad metastásica e inhibición tumoral (72,73). El estudio de las vías de señalización de esta línea celular reveló que la ruta Jak/Stat3 es responsable de la supervivencia y proliferación en este cáncer, la activación de Jak depende de la acción de la gp130 componente catalítico del receptor de la familia de las citoquinas de clase I, dentro de las cuales se encontró como ligando caracterizado a la IL-6. Berishaj Et al (2007), llegaron a la conclusión que la ruta IL-6/gp130/Jak/Stat3 es el principal mecanismo de activación en el cáncer de mama (72). Las concentraciones de IL-6 halladas en el sobrenadante de cultivo celular fueron  $117.37 \pm 2.60$  pg/ml, concordando con los trabajos experimentales de Berishaj Et al (2007). Las

concentraciones encontradas revelan que en condiciones patológicas las concentraciones de IL-6 se mantienen elevadas. Dado el importante rol documentado se considera, tener en cuenta como blanco de tratamiento el bloqueo de la acción de esta citoquina o disminución de las concentraciones de la misma en el cáncer de mama (74).

WIL-2 NS es una línea celular de linfocitos B indicados para su uso en investigación. La IL-6 fue originalmente identificada como factor diferenciador de células B. Las anomalías en la proliferación o mecanismos de acción de los linfocitos B provocan serios problemas en la respuesta inmunitaria; importante para la supervivencia de la especie humana (75, 76). La investigación de Barr Et al (2012) sobre la BCDT (terapia de reducción de células B productoras de IL-6) demostró mejorar algunas condiciones autoinmunes en modelos animales, como la encefalitis autoinmune y la esclerosis múltiple, donde en ambos casos las células B producen cantidades elevadas de IL-6 en comparación con los controles sanos. Sugiriendo que el uso de fármacos como Rituximab en la BCDT puede mejorar la condición patológica de pacientes con encefalitis autoinmune o esclerosis múltiple (77). La concentración de IL-6 hallada en el sobrenadante de cultivo celular fue  $1.74 \pm 0.32$  pg/ml, no encontrando trabajos experimentales referentes a las concentraciones de esta línea celular. Las concentraciones encontradas revelan que en condiciones de aparente salud los niveles IL-6 se mantienen bajos.

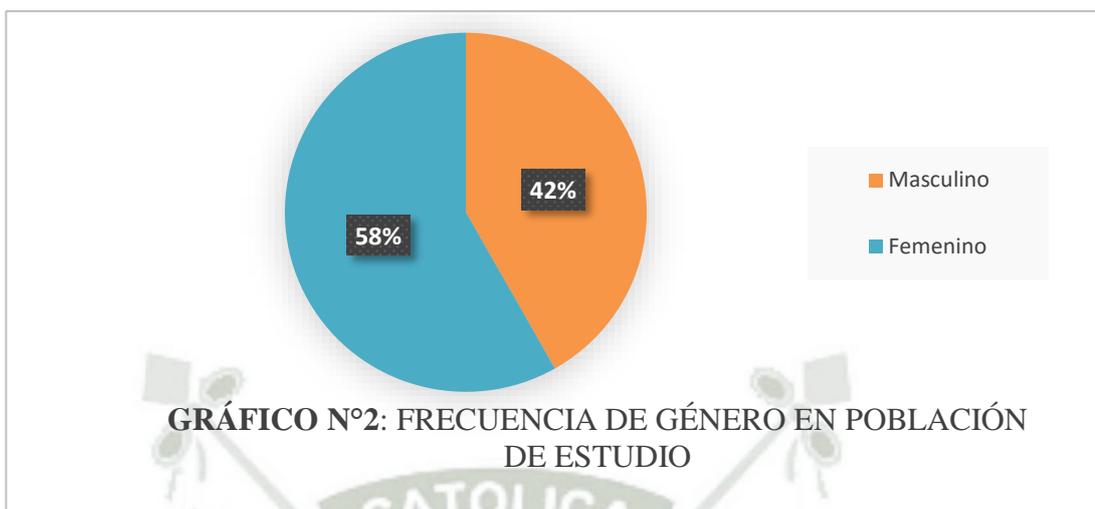
## 2. ESTUDIO IN VIVO

### 2.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

**TABLA N°2: FRECUENCIA DE GÉNERO EN POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Sexo	N°	%
Masculino	33	41.8
Femenino	46	58.2
Total	79	100.0

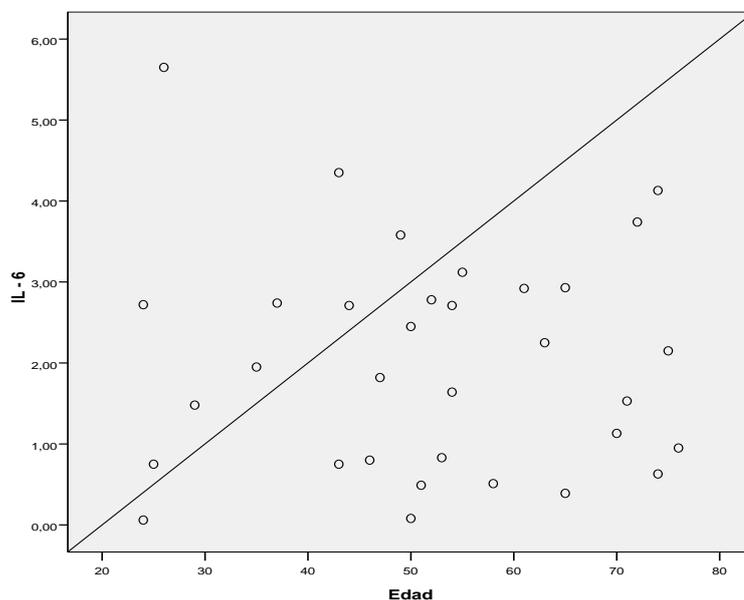
Fuente: Matriz de datos



Según el género obtuvimos que el 58.2% fueron mujeres mientras que el 41.8% fueron varones. (Tabla N°3)(Gráfico N°3).

## 2.2. IL-6 Y EDAD

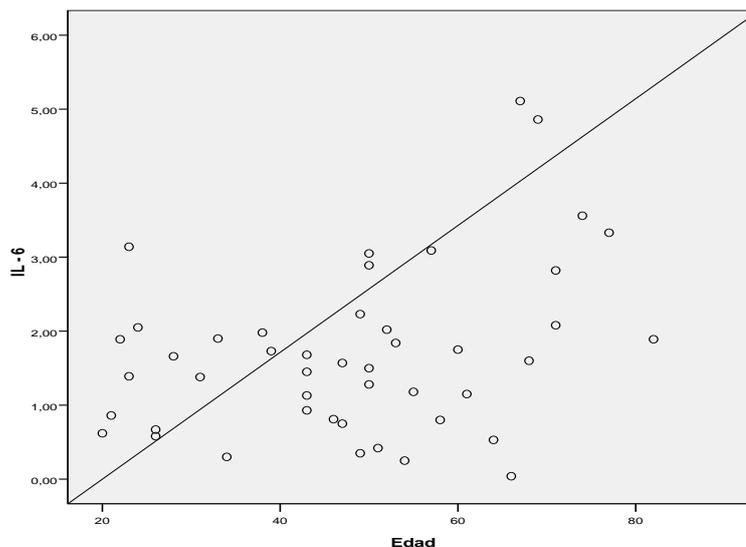
a



**GRÁFICO N°3: RELACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 CON LA EDAD EN VARONES**

Fuente: Matriz de datos

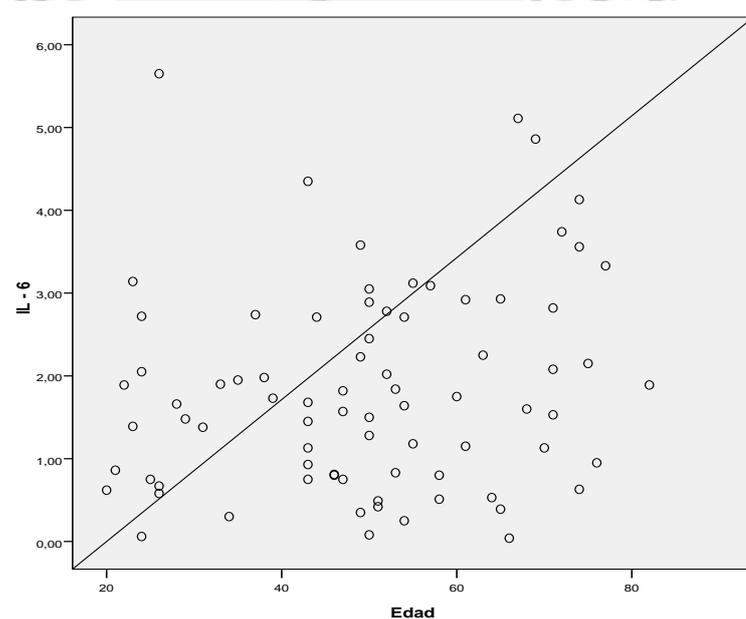
**R = 0.046**



**GRÁFICO N°4: RELACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 CON LA EDAD EN MUJERES.**

Fuente: Matriz de datos

**R = 0.344**



**GRÁFICO N°5: RELACIÓN GLOBAL DE NIVELES DE IL-6 CON LA EDAD**

Fuente: Matriz de datos

**R = 0.181**

El envejecimiento es un proceso fisiológico que comienza en la concepción y ocasiona cambios en las características de las especies durante todo el ciclo de vida.

El avance del envejecimiento se caracteriza por disminución de la regeneración celular, disfuncionalidad orgánica, y degeneración de los tejidos. Todos estos procesos aumentan el riesgo de mortalidad y morbilidad de la población de manera proporcional al tiempo (78). Muchos de los cambios que acompañan al envejecimiento son producto del deterioro de los sistemas de retroalimentación y falta de respuesta al daño sobre todo inflamatorio. El estudio de Jurk Et al (2013) sobre la disfunción de los telómeros inducida por inflamación crónica en modelos animales, llegó a la conclusión que ciertas proteínas pro-inflamatorias especialmente la IL-6 produce daños en telómeros de fibroblastos en los modelos animales, generando un envejecimiento acelerado (79). Gómez Et al (2010) investigaron la producción de IL-6 en macrófagos de ratones jóvenes y adultos, encontrando que los desórdenes inmunitarios acompañados a la vejez se encontraban relacionados a las elevadas concentraciones de IL-6 (80). Algunas investigaciones en poblaciones humanas asocian la elevación de esta citoquina con aumento de mortalidad en la vejez (81). Pese a los trabajos experimentales realizados en cultivos celulares, modelos animales y pacientes; existen controversias respecto a su uso como marcador de envejecimiento. Beharka Et al (2001) investigaron los efectos de la edad sobre la IL-6 en pacientes sanos jóvenes y adultos con estrictos controles de salud entre los grupos de estudio. Se comparó las concentraciones de IL-6 plasmáticas con las de cultivos de células mononucleares extraídas de los pacientes, concluyendo que el aumento de las concentraciones de IL-6 no es consecuencia de envejecimiento, pero si podría reflejar un estado patológico acompañado al mismo (82). La investigación en pacientes sanos de diferentes edades del Hospital Regional PNP Arequipa "Mayor PNP Julio E. Pinto Manrique", Arequipa, Perú reveló que no hay relación entre las concentraciones de IL-6 y la edad en varones ( $R=0.046$ )(Gráfico N°4), se encontró mayor relación en mujeres ( $R= 0.344$ )(Gráfico N°5) suponiendo esto, debido a la disminución marcada de hormonas esteroides, principalmente estrógenos después de los 45 años en promedio y su influencia en la expresión del gen de IL-6 (37). La relación global fue muy baja ( $R= 0.181$ ) por lo cual se concluye que no hay relación entre los niveles de IL-6 y la edad (Gráfico N°6).

## 2.3. IL-6 Y ENFERMEDADES CRÓNICAS

### 2.3.1. ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON DIABETES

**TABLA N°3: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE NIVELES DE IL-6 EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS.**

IL – 6 (pg/ml)	Pacientes sanos	Pacientes con Diabetes Mellitus
Media Aritmética (Promedio)	1.65	1.80
Desviación Estándar	1.14	1.73
Valor Mínimo	0.04	0.53
Valor Máximo	5.65	4.35
<b>P</b>	<b>0.656 (P ≥ 0.05) N.S.</b>	
Total	50	4

Fuente: Matriz de datos

El papel de la IL-6 en la supervivencia de las células beta y la diabetes tipo 1 es probablemente pequeña (86-90). Por el contrario, estudios observacionales muestran que la IL-6 es un factor de riesgo para la diabetes tipo 2 (91-93). Si el aumento de IL-6 es el agente causal o simplemente refleja años de intento del cuerpo para contrarrestar la inflamación de bajo grado, reflejado por la elevación de los demás marcadores inflamatorios, resulta que el rol de la IL-6 en la diabetes sigue siendo una cuestión abierta. Por otro lado, la composición corporal es también otro factor importante, especialmente el porcentaje de grasa visceral. La IL-6 producida por el tejido adiposo va de un 10 a 35% de la producción circ Sanos sal en to DM o (83,84). Debido a esta relación con la adiposidad, ha sido planteado que la IL-6 y otras citoquinas proinflamatorias sean la causa principal de la resistencia a la insulina. Curiosamente, mientras que las pruebas epidemiológicas apoyan esta teoría, estudios experimentales no han podido comprobar la existencia de tal mecanismo (85). En este estudio, el grado de relación entre los niveles de IL-6 de los pacientes sanos con los pacientes que

poseen Diabetes Mellitus mostró una  $P= 0.656$  ( $P \geq 0.05$ ), la cual indica que no hay diferencia significativa (Tabla N°3).

### 2.3.2. ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON HIPERTENSIÓN

**TABLA N°4: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE NIVELES DE IL-6 EN PACIENTES CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL.**

IL – 6 (pg/ml)	Pacientes Sanos	Pacientes con Hipertensión Arterial
Media Aritmética (Promedio)	1.65	3.23
Desviación Estándar	1.14	1.22
Valor Mínimo	0.04	1.53
Valor Máximo	5.65	5.11
<b>P</b>	<b>0.019 (P &lt; 0.05) S.S.</b>	
Total	50	7

Fuente: Matriz de datos

Teniendo en cuenta que la hipertensión arterial está asociada a disfunción endotelial y que ésta se correlaciona con inflamación, se podría pensar que la hipertensión arterial sería, en parte, una enfermedad inflamatoria crónica, como se ha indicado para la aterosclerosis. Sin embargo, en la actualidad la relación entre inflamación e hipertensión no está bien establecida. En un estudio realizado en ratas se ha observado un incremento de los niveles circulantes de marcadores de inflamación como la IL-1 $\beta$  e IL-6 en los animales hipertensos en comparación con los normotensos. De hecho, se demostró una correlación positiva entre los niveles de presión arterial y los niveles circulantes de IL-1 $\beta$  e IL-6. Más aún, este aumento de los niveles circulantes se acompañó de una mayor expresión de dichos marcadores en el vaso. Una situación similar se ha observado en otros modelos de hipertensión (94- 97). Por tanto, estos datos sugieren que la hipertensión se asocia a un proceso inflamatorio local a nivel vascular.

En estudios clínicos, sin embargo, no existe un criterio homogéneo del efecto de la presión arterial sobre los marcadores de inflamación, ya que los resultados son contradictorios (98-100). Para este estudio, la relación de los niveles de IL-6 entre pacientes sanos y los que poseen Hipertensión Arterial se obtuvo una  $P = 0.019$  ( $P < 0.05$ ) que nos indica la existencia de diferencia significativa. (Tabla N°4).

### 2.3.3. ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON DISLIPIDEMIAS

**TABLA N°5: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE NIVELES DE IL-6 EN PACIENTES CON DISLIPIDEMIA.**

IL – 6 (pg/ml)	Pacientes Sanos	Pacientes con Dislipidemia
Media Aritmética (Promedio)	1.65	2.30
Desviación Estándar	1.14	1.04
Valor Mínimo	0.04	0.75
Valor Máximo	5.65	3.56
<b>P</b>	<b>0.084 (<math>P \geq 0.05</math>) N.S.</b>	
Total	50	6

Fuente: Matriz de datos

La hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia son los casos de dislipidemias más comunes a la hora de las consultas médicas, la influencia de la IL-6 en la fisiopatología de estos trastornos está documentada en estudios experimentales y de correlación clínica. Rezaie-Majd Et al (2002) en un estudio sobre la reducción de la expresión de citoquinas IL-6, IL-8 y quimioatrayentes encontró que en todos los pacientes con hipercolesterolemia presentaron niveles elevados de IL-6 entre otras proteínas pro-inflamatorias y que el uso de atorvastatina redujo los niveles de IL-6 séricos, una de las hipótesis de este mecanismo es la interferencia con la formación de componentes prenilo necesarios para el anclaje de las subunidades de proteínas intercambiadoras de guanina (proteínas G) en la ruta de señalización Ras/MAK de la IL-6 (37). Por otro lado los mecanismos de lipólisis de la IL-6 y su posible contribución en la hipertrigliceridemia han sido estudiados en modelos animales, Nonogaki Et al (2010)

en un estudio con ratas a las cuales se les administró IL-6 para inducir lipólisis encontró una relación dosis dependiente en los niveles de triglicéridos y colesterol total, la hipótesis más aceptada es la regulación hormonal mediada por la hormona adrenocorticotropina (ACTH), la estimulación del sistema adrenal y la regulación a través de la leptina sobre la lipólisis (66). En este estudio la relación de los niveles de IL-6 entre pacientes sanos vs los pacientes que poseen Dislipidemias se encontro una  $P=0.084$  ( $P \geq 0.05$ ), lo cual nos indica que no hay diferencia significativa. (Tabla N°5).

#### 2.3.4. ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

**TABLA N°6: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE NIVELES DE IL-6 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA.**

IL – 6 (pg/ml)	Pacientes Sanos	Pacientes con Artritis Reumatoidea
Media Aritmética (Promedio)	1.65	1.26
Desviación Estándar	1.14	1.10
Valor Mínimo	0.04	0.08
Valor Máximo	5.65	2.25
<b>P</b>	<b>0.428 (<math>P \geq 0.05</math>) N.S.</b>	
Total	50	3

Fuente: Matriz de datos

Sakaguchi Et al (2004) En un estudio con ratones SKG que desarrollan espontáneamente Artritis Reumatoidea, observó que los ratones presentaban una protección para el desarrollo de la enfermedad reumatoide cuando el gen productor de IL-6 era bloqueado (Knocked out), sugiriendo que la IL-6 es crítica en la fisiopatología de la Artritis Reumatoidea (101). Acorde con lo anterior, los niveles del receptor para IL-6 e IL-6 propiamente dicha, se encontraron elevados en fluidos sinoviales y suero de pacientes lo cual fue altamente correlacionado con el desarrollo de la enfermedad (102-104). En este estudio se observó que al comparar los niveles de IL-6 de pacientes

sanos con los pacientes con Artritis Reumatoidea presentaron una  $P=0.428$  ( $P>0.05$ ), lo que nos indica que no hubo diferencia significativa. (Tabla N°6). Esto se puede explicar debido a la influencia del uso de antiinflamatorios esteroides y no esteroides sobre la disminución de los niveles séricos de IL-6 en trabajos de investigación relacionados, lo cual podría indicar el uso de alguno de estos fármacos por los pacientes como parte del tratamiento prescrito por el médico o el uso de fármacos sin prescripción médica no documentados en la historia clínica.

### 2.3.5. ANÁLISIS DE IL-6 EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA

**TABLA N°7: PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE NIVELES DE IL-6 EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA.**

IL – 6 (pg/ml)	Pacientes Sanos	Pacientes con Gastritis Crónica
Media Aritmética (Promedio)	1.65	1.29
Desviación Estándar	1.14	1.12
Valor Mínimo	0.04	0.35
Valor Máximo	5.65	3.12
<b>P</b>	<b>0.608 (<math>P \geq 0.05</math>) N.S.</b>	
Total	50	6

Fuente: Matriz de datos

Estudios realizados en poblaciones de linfocitos T de la mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori* han demostrado la existencia de un aumento en la secreción de citocinas que derivan de los linfocitos TCD<sup>14</sup>, subtipo Th1, por lo tanto, se considera que las citocinas sirven como marcadores sistémicos y de tejidos en sujetos afectados. El grupo de las citocinas proinflamatorias, representadas por las IL-1, IL-6, IL-8 y el FNT alfa, tiene una gran importancia, pues en él recae el mayor peso de la respuesta inflamatoria y del daño tisular producido en la gastritis crónica. En el caso de la IL-6, su relación con el proceso inflamatorio crónico del estómago infectado por *Helicobacter pylori* está dado por la diversidad de informes que exponen el

incremento de los niveles de IL-6 de la región antral en la gastritis crónica tipo B, lo que sugiere su posible papel patogénico en este tipo de gastritis (105-109). Las IL-6 e IL-8 se encuentran elevadas, tanto en aquellos pacientes que tienen daños muy severos por *Helicobacter pylori*, como en los que presentan daños ligeros. En este estudio, la relación de los niveles de IL-6 de pacientes sanos con los que poseen Gastritis Crónica no tuvo diferencia significativa ( $P=0.608$ ,  $P>0.05$ ) (Tabla N°7), posiblemente a que se desconoce la causa exacta por la que estos pacientes sufren de esta enfermedad o bien por el tratamiento que reciben.



### 3. CONCLUSIONES

- Las concentraciones de IL-6 en la línea celular WIL-2 NS (células sanas), en condiciones controladas fueron bajas ( $1.74 \pm 0.32$  pg/ml).
- Los valores de IL-6 en la línea celular MDA-MB 231 (células cancerosas), en condiciones controladas fueron elevadas ( $117.37 \pm 2.60$  pg/ml).
- El estudio de las concentraciones plasmáticas de IL-6 con la edad mostró que esta citoquina no tiene relación con el proceso de envejecimiento ( $R=0.181$ ).
- La concentración plasmática promedio de IL-6 en pacientes sanos fue de 1.65 pg/ml.
- Las concentraciones plasmática promedio de IL-6 en pacientes con Diabetes Mellitus fue de 1.80 pg/ml; Hipertensión Arterial, 3.23 pg/ml; Dislipidemia, 2.30 pg/ml; Artritis Reumatoidea, 1.26 pg/ml y Gastritis Crónica, 1.29 pg/ml.
- El estudio de las enfermedades crónicas reveló no presentar diferencia significativa al comparar los niveles plasmáticos de IL-6 de pacientes sanos con los de pacientes que presentan Diabetes Mellitus, Dislipidemia, Artritis Reumatoidea y Gastritis Crónica. No siendo así en el caso de pacientes con Hipertensión Arterial ( $P=0.019$ ,  $P < 0.05$ ).

#### 4. RECOMENDACIONES

La búsqueda de biomarcadores confiables de envejecimiento y enfermedad es una preocupación en diferentes regiones del mundo dado el creciente aumento de la población centenaria, los cambios medioambientales y el aumento de enfermedades metabólicas relacionadas con la nutrición. Actualmente existe una iniciativa internacional para la búsqueda de marcadores de envejecimiento y enfermedad en diferentes instituciones, laboratorios y universidades. Se recomienda consultar las directrices de estas investigaciones respecto a ciertos metabolitos de interés, el estudio de IL-6 para envejecimiento no es aconsejable pese a estar dentro de la directriz de investigación de citoquinas como biomarcadores, dado las múltiples modificaciones que sufre frente a factores fisiopatológicos aparte de la edad.

Respecto a las enfermedades crónicas, se recomienda tomar interés en su valor diagnóstico e investigar el valor pronóstico de las concentraciones de IL-6 en pacientes con hipertensión arterial en diferentes estadios de la enfermedad, con el objetivo de introducirlo en la batería de pruebas de laboratorio de consulta general y seguimiento terapéutico.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Payne BAI, Chinnery PF. Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *BBA - Bioenerg.* 2015.
2. Ng IHW, Yeap YYC, Ong LSR, Jans D a., Bogoyevitch M a. Oxidative stress impairs multiple regulatory events to drive persistent cytokine-stimulated STAT3 phosphorylation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843(3):483-494.
3. Mattson P. C, Matfin G. Pathophysiology concepts of altered health states. 8th ed. China: Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
4. Berishaj M, Gao SP, Ahmed S, et al. Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R32.
5. Eva G, Elisa M, Piera B, Lyrakos DG, Luca R. Quality of Life in the Third Age: A Research on Risk and Protective Factors. *Procedia - Soc Behav Sci.* 2015;187:217-222.
6. Yaffe K, Hoang TD, Byers AL, Barnes DE, Friedl KE. Lifestyle and health-related risk factors and risk of cognitive aging among older veterans. *Alzheimer's Dement.* 2014;10.
7. Cannon WB. Organization for Physiological Homeostasis. *Physiol Rev.* 1929;IX(3):399-431.
8. Karp G. Biología celular y molecular. 6ª ed. México: McGraw-Hill; 2011.
9. Yu CC, Tsai LL, Wang ML, et al. MiR145 targets the SOX9/ADAM17 axis to inhibit tumor-initiating cells and IL-6-mediated paracrine effects in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013;73(11):3425-3440.
10. Taylor P, Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K. The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL - 6 / gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle* ; 2015; 11 (4) : 730 -739.
11. Chen M-F, Chen P-T, Lu MS, Lin PY, Chen W-C, Lee K-D. IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mol Cancer.* 2013; 12:26.

12. Hall J, Guyton A. Tratado de fisiología médica. 12<sup>a</sup> ed. España: Elsevier; 2011.
13. Baynes J., Dominiczak M. Bioquímica médica. 3<sup>a</sup> ed. España: Elsevier; 2011.
14. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez M, Fraile B, Anadon R, et al. 3a Ed. España: McGrawHill; 2007.
15. Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, et al. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(8):2700-2705.
16. Papalia D, Sterns H, Feldman R, Camp C. Desarrollo del adulto y vejez. 3<sup>a</sup> ed. Mexico: MacGraw-Hill; 2009.
17. Daynes R a, Araneo B a, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *J Immunol*. 1993;150(12):5219-5230.
18. Kovacs EJ, Gomez CR, Karavitis J, et al. Interleukin-6 contributes to age-related alteration of cytokine production by macrophages. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
19. Blanca Torquemada, Antonio Astorga, Virginia Ródenas, “Científicamene se puede pensar en la inmortalidad” EN Diario ABC, 33944, (23 de noviembre 2008).
20. Daly RM, O’Connell SL, Mundell NL, Grimes C a., Dunstan DW, Nowson C a. Protein-enriched diet, with the use of lean red meat, combined with progressive resistance training enhances lean tissue mass and muscle strength and reduces circulating IL-6 concentrations in elderly women: A cluster randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(4):899-910.
21. Hassan W, Ding L, Gao R-Y, Liu J, Shang J. Interleukin-6 signal transduction and its role in hepatic lipid metabolic disorders. *Cytokine*. 2014;66(2)
22. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. Inmunología. 7<sup>a</sup> ed. España: Elsevier; 2007.
23. Heinrich PC, Castell J V, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265(3):621-636.
24. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*. 1997;40(11):1286-1292.

25. Owen J, Punt J, Stranford Sh, Jones P. Kuby Immunology. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2013.
26. Abbas A, Lichtman A, Pillai Sh. Inmunología celular y molecular. 7<sup>a</sup> ed. España: Elsevier; 2012.
27. Ferrer Villahoz B. Influencia de la citoquina interleucina 6 (IL-6) adipocitaria y muscular en el control del metabolismo [tesis]. Bellaterra (España): Universidad Autónoma de Barcelona; 2013. 251 p.
28. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(11):1538-1546.
29. Lu ZY, Brailly H, Wijdenes J, Bataille R, Rossi JF, Klein B. Measurement of whole body interleukin-6 (IL-6) production: prediction of the efficacy of anti-IL-6 treatments. *Blood.* 1995;86(8):3123-3131.
30. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 2002;16(11):1335-1347.
31. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008; 88:1379-1406.
32. Kurdi M, Booz GW. JAK redux: a second look at the regulation and role of JAKs in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(5):H1545-H1556.
33. Saavedra Ramírez PG, Vásquez Duque GM, González Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia.* 2011;24(2):157-166.
34. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol.* 2011;90(6-7):484-494.
35. Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature.* 1994;368(6469):339-342.
36. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990;4(11):2860-2867.
37. Omoigui S. The Interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging: role of statins, bisphosphonates and plant polyphenols in aging and age-related diseases. *Immun Ageing.* 2007;4:1.

38. Maggio M, Guralnik J, Longo D, Ferrucci L. Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61(6): 575–584.
39. McPhee S, A. Papadakis M. Diagnóstico clínico y tratamiento. 50a ed. México: McGrawHill; 2012.
40. Yao X, Huang J, Zhong H, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther*. 2014; 141(2):125-129.
41. Mancia G, Grassi G: Systolic and diastolic blood pressure control in antihypertensive drug trials. *J Hypertens* 2002; 20:1461.
42. Collins R, Peto R, MacMahon S. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. *Br Med Bull* 1994; 50: 272-298
43. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, et al. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol*. 2006; 290:935-940.
44. Sturgis LC, Cannon JG, Schreihöfer D a, Brands MW. The role of aldosterone in mediating the dependence of angiotensin hypertension on IL-6. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297:1742-1748.
45. Bautista LE, Vera LM, Arenas I a, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2005; 19:149-154.
46. Lesina M, Wörmann SM, Neuhöfer P, Song L, Algül H. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas. *Semin Immunol*. 2014; 26(1):80-87.
47. Wilson K, Walker J. Principles and Techniques of biochemistry and molecular biology. 7th ed. New York: Cambrigde university press; 2010.
48. Delgado Cirilo A, Minguillon Lombart C, Goblar Tamargo J. Introducción a la química terapéutica. 2ª ed. España: Ediciones Díaz de Santos; 2004.
49. Davis J. Basic cell culture: A Practical Approach. 2th ed. United Kingdom: Oxford University Press; 2002.
50. Tille P. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13th ed. China: Elsevier; 2014.
51. Vinci V, Parekh S. Handbook of Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial, and Plant Cells. New Jersey: Humana Press; 2003.

52. Freshney R. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 4th ed. United States of America: Wiley-Liss; 2000.
53. Trinschek B, Lüssi F, Haas J, et al. Kinetics of IL-6 Production Defines T Effector Cell Responsiveness to Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis. 2013;8(10):1-14.
54. Thirkettle S, Decock J, Arnold H, Pennington CJ, Jaworski DM, Edwards DR. Matrix Metalloproteinase 8 ( Collagenase 2 ) Induces the Expression of Interleukins 6 and 8 in Breast Cancer Cells . 2013;288(23):16282-16294.
55. Sasaki a, Ishiuchi S, Kanda T, Hasegawa M, Nakazato Y. Analysis of interleukin-6 gene expression in primary human gliomas, glioblastoma xenografts, and glioblastoma cell lines. *Brain Tumor Pathol.* 2001;18(1):13-21.
56. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000;101(15):1767-1772.
57. Pradhan AD, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. 2001;286(3):327-334.
58. Recasens M, Ricart W, Fernández-Real J. Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ Navarra.* 2004;48(2):49-54.
59. Okada S, Okusaka T, Ishii H, et al. Elevated serum interleukin-6 levels in patients with pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 1998;28(1):12-15.
60. Oka M, Vaniamolo K, Takahashi M, et al. Relationship between Serum Levels of Interleukin 6 , Various Disease Parameters , and Malnutrition in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. 1996:2776-2781.
61. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M. IL-6 / IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. 2012;159:143-159.
62. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2014;48:102-111.

63. Iglesias M, Plowman GD, Woodworth CD. Interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor regulate proliferation of normal, human papillomavirus-immortalized, and carcinoma-derived cervical cells in vitro. *Am J Pathol.* 1995;146(4):944-952.
64. Knüpfer H, Preiß R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat.* 2007;102(2):129-135.
65. Herbelin A, Urera P, Nguyen ANH THU, Zingraff J, Descamps-latscha B. Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure. 1991;39:954-960.
66. Daly RM, O'Connell SL, Mundell NL, Grimes C a., Dunstan DW, Nowson C a. Protein-enriched diet, with the use of lean red meat, combined with progressive resistance training enhances lean tissue mass and muscle strength and reduces circulating IL-6 concentrations in elderly women: A cluster randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(4):899-910.
67. Eva G, Elisa M, Piera B, Lyrakos DG, Luca R. Quality of Life in the Third Age: A Research on Risk and Protective Factors. *Procedia - Soc Behav Sci.* 2015;187:217-222.
68. Friedman EM, Hayney M, Love GD, Singer BH, Ryff CD. Plasma interleukin-6 and soluble IL-6 receptors are associated with psychological well-being in aging women. *Health Psychol.* 2007;26(3):305-313.
69. Fishman D, Faulds G, Jeffrey R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1369-1376.
70. Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8 , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  . Effect of weight loss in obese men. 2003:535-542.
71. Bachelot T, Rastkha M, Duc A, Blay J. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. 2003:1721-1726.

72. Berishaj M, Gao SP, Ahmed S, et al. Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R32.
73. Thirkettle S, Decock J, Arnold H, Pennington CJ, Jaworski DM, Edwards DR. Matrix Metalloproteinase 8 ( Collagenase 2 ) Induces the Expression of Interleukins 6 and 8 in Breast Cancer Cells \*. 2013;288(23):16282-16294.
74. Dethlefsen C, Højfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(3):657-664.
75. Taeho L. et al. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's Disease. *Blood.* 2015;74(4):1360-1367.
76. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci.* 2012;122(4):143-159.
77. Barr TA, Shen P, Brown S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6 – producing B cells. 2012;209(5): 1001-1010.
78. García A, Salazar Maya ÁM. Análisis del concepto de envejecimiento. *Gerokomos.* 2014; 25(6):57-62.
79. Passos F, Oakley F, Correia-melo C, et al. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. 2014; 5:4172.
80. Gomez CR, Karavitis J, Palmer JL, et al. Interleukin-6 contributes to age-related alteration of cytokine production by macrophages. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:475139.
81. Lee JK, Bettencourt R, Brenner D, Le T, Barrett-connor E, Lomba R. Association between Serum Interleukin-6 Concentrations and Mortality in Older Adults : The Rancho Bernardo Study. 2012;7(4). doi:10.1371/journal.pone.0034218.
82. Beharka AA, Meydani M, Wu D, Leka LS, Meydani A, Meydani SN. Interleukin-6 Production Does Not Increase With Age. 2001; 56(2):81-88.
83. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:4196–4200. [[PubMed](#)]

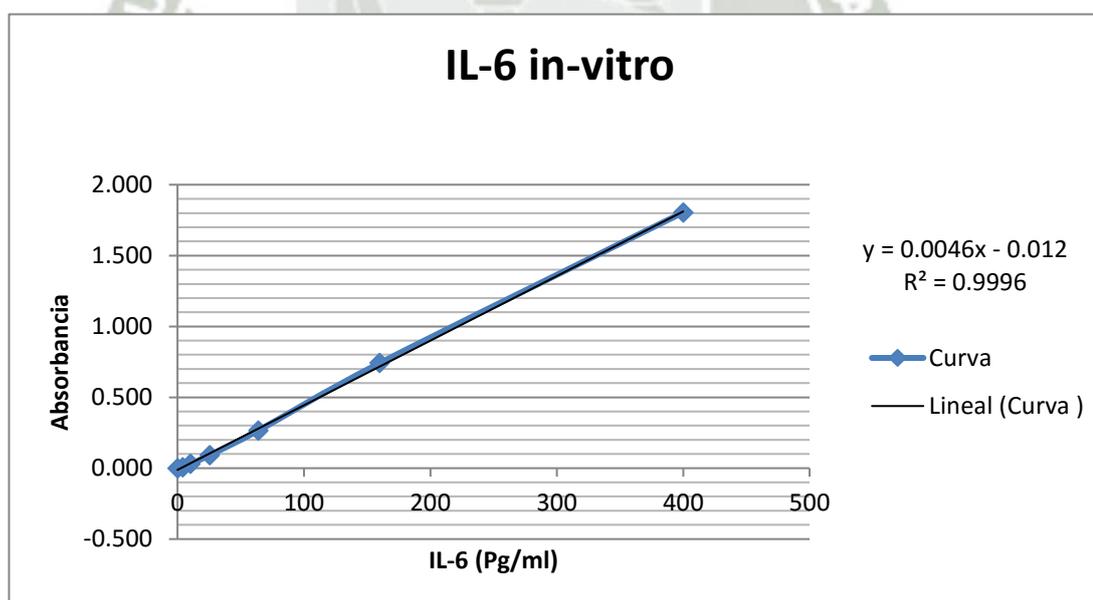
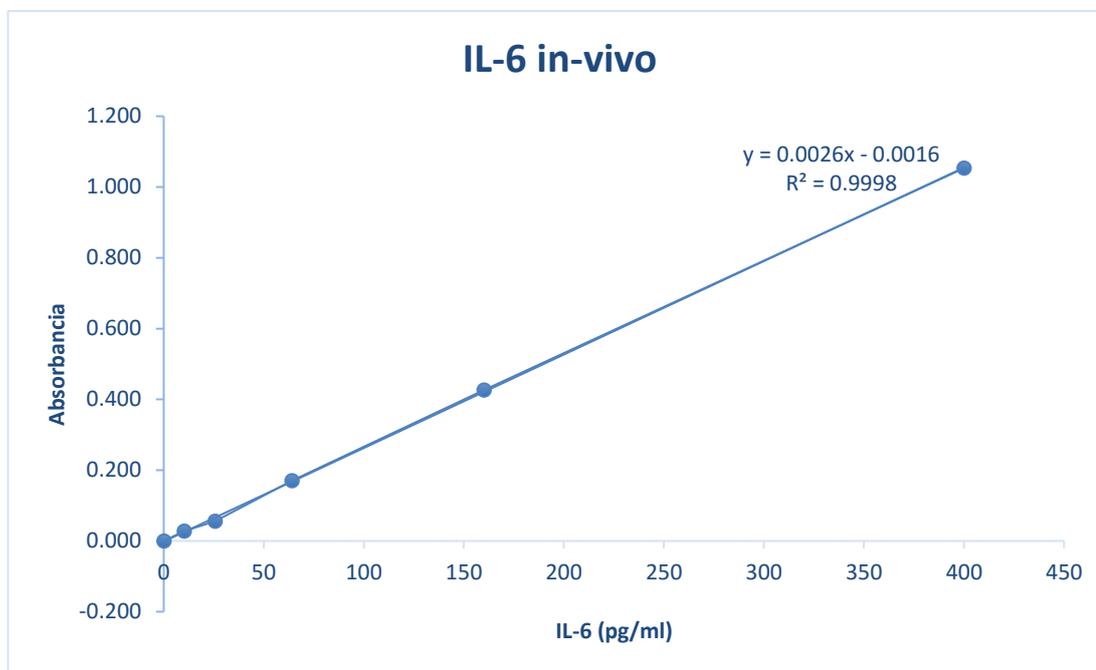
84. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:847–850. [[PubMed](#)]
85. Abbatecola A, Ferrucci L, Grella R, et al. Diverse effect of inflammatory markers on insulin resistance and insulin-resistance syndrome in the elderly. *J Am Geriatr Soc.* 2004;52:399–404. [[PubMed](#)]
86. Wadt KA, Larsen CM, Andersen HU, Nielsen K, Karlsen AE, Mandrup-Poulsen T. Ciliary neurotrophic factor potentiates the beta-cell inhibitory effect of IL-1beta in rat pancreatic islets associated with increased nitric oxide synthesis and increased expression of inducible nitric oxide synthase. *Diabetes.* 1998;47:1602–1608. [[PubMed](#)]
87. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord.* 2003;4:291–299. [[PubMed](#)]
88. Choi SE, Choi KM, Yoon IH, et al. IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immunol.* 2004;13:43–53. [[PubMed](#)]
89. Pilstrom B, Bjork L, Bohme J. Demonstration of a TH1 cytokine profile in the late phase of NOD insulinitis. *Cytokine.* 1995;7:806–814. [[PubMed](#)]
90. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes.* 2005;54(Suppl 2):S114–S124. [[PubMed](#)]
91. Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes.* 2004;53:693–700. [[PubMed](#)]
92. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes.* 2003;52:812–817. [[PubMed](#)]
93. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001;286:327–334. [[PubMed](#)]

94. Luvara G, Pueyo ME, Philippe M, Mandet C, Savoie F, Henrion D, et al. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1408-16.  
Medline
95. González W, Fontaine V, Pueyo ME, Laquay N, Messika-Zeitoun D, Philippe M, et al. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. *Hypertension* 2000;36:103-9.  
Medline
96. Haller H, Park JK, Dragun D, Lippoldt A, Luft FC. Leukocyte infiltration and ICAM-1 expression in two-kidney one-clip hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:899-903.
97. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:1223-9. Medline
98. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994;72:561-6.  
Medline
99. Cottone S, Vadala A, Vella MC, Mule G, Contorno A, Cerasola G. Comparison of tumour necrosis factor and endothelin-1 between essential and renal hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 1998;12:351-4.  
Medline
100. Jilma B, Li-Saw-Hee FL, Wagner OF, Beevers DG, Lip GY. Effects of enalapril and losartan on circulating adhesion molecules and monocyte chemotactic protein-1. *Clin Sci* 2002;103:131-6.  
Medline
101. Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, et al. Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune

- arthritis in mice. *J Clin Invest.* 2004;114:582–588. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
102. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, VanSnick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.* 1988;31:784–788. [[PubMed](#)]
103. Kotake S, Sato K, Kim KJ, et al. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res.* 1996;11:88–95. [[PubMed](#)]
104. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis.* 1993;52:232–234. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
105. Ishihara S, Fukuda R, Fukumoto S. Cytokine gene expression in the gastric mucosa: its role in chronic gastritis. *J Gastroenterol* 1996;31:485-90.
106. Moss SF, Legon S, Davies J, Calam J. Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis. *Gut* 1994;35:1567-70.
107. Deprez P, Calam J. Nouveaux mécanismes d'hypergastrinémie en rapport avec la gastritis atrophique autoimmune et l'infection á *Helicobacter pylori*. *Acta Gastroenterol Belg* 1993;56:245-50.
108. Grionchetti P, Vaira D, Campieri M, Halton J, Menegatti M, Belluzi A, et al. Enhanced mucosal interleukin-6 and 8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients. *Am J Gastroenterol* 1994;89:883-7.
109. Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JL. Mucosal tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991;32:1473-7.
110. Nonogaki K, Fuller G M, Fuentes N L, Moser A H, StapransI, Grunfeld C, Feingold K R.-  
Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endo&Met.* 2010;136(5) :205-213.

## 6. ANEXOS

### 6.1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ELISA



## 6.2. MATRIZ DE DATOS

N° de Pacientes	IL-6 (pg/ml)	Ed ad	Se xo	Enfermedad crónica						
				D M	HT A	Dislipide mia	A R	G C	Cánc er	Hepatopatía crónica
1	0.58	26	F	N	N	N	N	N	N	N
2	1.13	70	M	S	N	N	N	N	N	N
3	0.30	34	F	N	N	N	N	N	N	N
4	0.80	58	F	N	N	N	N	N	N	N
5	0.06	24	M	N	N	N	N	N	N	N
6	0.35	49	F	N	N	N	N	S	N	N
7	0.42	51	F	N	N	N	N	N	N	N
8	1.18	55	F	S	N	N	N	N	N	N
9	1.15	61	F	N	N	N	N	N	N	S
10	0.81	46	F	N	N	N	N	N	N	N
11	0.86	21	F	N	N	N	N	N	N	N
12	5.65	26	M	N	N	N	N	N	N	N
13	0.93	43	F	N	N	N	N	N	N	N
14	1.89	82	F	N	N	N	N	N	N	N
15	0.25	54	F	N	N	N	N	N	N	N
16	1.75	60	F	N	N	N	N	N	N	N
17	0.95	76	M	N	N	N	N	N	N	N
18	0.67	26	F	N	N	N	N	N	N	N
19	1.53	71	M	N	S	N	N	N	N	N
20	0.83	53	M	N	N	N	N	N	N	N
21	0.75	25	M	N	N	N	N	N	N	N
22	3.58	49	M	N	S	N	N	N	N	N
23	0.63	74	M	N	N	N	N	N	N	N
24	1.82	47	M	N	N	N	N	N	N	N
25	0.04	66	F	N	N	N	N	N	N	N
26	0.62	20	F	N	N	N	N	N	N	N
27	0.39	65	M	N	N	N	N	N	N	N

28	0.08	50	M	N	N	N	S	N	N	N
29	1.89	22	F	N	N	N	N	N	N	N
30	1.38	31	F	N	N	N	N	N	N	N
31	2.72	24	M	N	N	N	N	N	N	N
32	1.9	33	F	N	N	N	N	N	N	N
33	1.66	28	F	N	N	N	N	N	N	N
34	1.84	53	F	N	N	N	N	N	N	N
35	0.75	43	M	N	N	N	N	N	N	N
36	4.35	43	M	S	N	N	N	N	N	N
37	1.6	68	F	N	N	N	N	N	N	N
38	1.68	43	F	N	N	N	N	N	N	N
39	3.74	72	M	N	N	N	N	N	S	N
40	1.5	50	F	N	N	N	N	N	N	N
41	2.23	49	F	N	N	S	N	N	N	N
42	3.33	77	F	N	S	N	N	N	N	N
43	2.78	52	M	N	N	N	N	N	N	N
44	2.82	71	F	N	S	N	N	N	N	N
45	2.74	37	M	N	N	S	N	N	N	N
46	4.86	69	F	N	N	N	N	N	N	N
47	0.49	51	M	N	N	N	N	S	N	N
48	2.71	44	M	N	N	N	N	N	N	N
49	1.45	43	F	N	N	N	S	N	N	N
50	2.05	24	F	N	N	N	N	N	N	N
51	3.05	50	F	N	N	S	N	N	N	N
52	2.92	61	M	N	N	N	N	N	N	N
53	1.13	43	F	N	N	N	N	S	N	N
54	3.14	23	F	N	N	N	N	N	N	N
55	2.15	75	M	N	N	N	N	S	N	N
56	2.45	50	M	N	N	N	N	N	N	N
57	3.56	74	F	N	N	S	N	N	N	N

58	4.13	74	M	N	S	N	N	N	N	N
59	1.95	35	M	N	N	N	N	N	N	N
60	1.48	29	M	N	N	S	N	N	N	N
61	1.73	39	F	N	N	N	N	N	N	N
62	1.64	54	M	N	N	N	N	N	N	N
63	2.25	63	M	N	N	N	S	N	N	N
64	2.89	50	F	N	N	N	N	N	N	N
65	2.02	52	F	N	N	N	N	N	N	N
66	0.51	58	M	N	N	N	N	S	N	N
67	0.75	47	F	N	N	S	N	N	N	N
68	2.93	65	M	N	N	N	N	N	N	N
69	1.98	38	F	N	N	N	N	N	N	S
70	1.57	47	F	N	N	N	N	N	N	N
71	2.71	54	M	N	N	N	N	N	N	N
72	1.28	50	F	N	N	N	N	N	N	N
73	1.39	23	F	N	N	N	N	N	N	N
74	0.53	64	F	S	N	N	N	N	N	N
75	3.09	57	F	N	N	N	N	N	N	N
76	0.80	46	M	N	N	N	N	N	N	N
77	5.11	67	F	N	S	N	N	N	N	N
78	2.08	71	F	N	S	N	N	N	N	N
79	3.12	55	M	N	N	N	N	S	N	N

### 6.3. FICHA ENCUESTA PARA PACIENTES VOLUNTARIOS



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA  
MASSACHUSETTS COLLEGE OF PHARMACY AND HEALTH SCIENCES  
UNIVERSITY



FICHA ENCUESTA: HÁBITOS Y ESTILO DE VIDA

Paciente Nro.  Fecha  /  /14 Código   
Sexo M  F  Edad  Ocupación

1. ACTIVIDAD FÍSICA

- a) Sedentaria(Nunca)      b) Ligera (A veces)      c) Moderada(3días/sem)      d) Intensa (Diaria)

2. TIPO DE ALIMENTACIÓN

2.1 Consumo de Carnes Rojas

- a) Nunca      c) Poco frecuente (1-2 veces/sem)      e) Habitual (5-7 veces/sem)  
b) Ocasional (1 vez/sem o menos)      d) Frecuente (3-4 veces/sem)

2.2 Consumo de Vegetales y Frutas

- a) Nunca      c) Poco frecuente (1-2 veces/sem)      e) Habitual (5-7 veces/sem)  
b) Ocasional (1 vez/sem o menos)      d) Frecuente (3-4 veces/sem)

3. SUPLEMENTOS VITAMÍNICOS Y MINERALES

ES POR:

- |  |   |
|--|---|
| <p>a) Prescripción médica</p> <p>b) Automedicación</p> | <p>a) Nunca</p> <p>b) Ocasional (1 vez/sem o menos)</p> <p>c) Poco frecuente (1-2 veces/sem)</p> <p>d) Frecuente (3-4 veces/sem)</p> <p>e) Habitual (5-7 veces/sem)</p> |
|--|---|

4. HÁBITOS DE CONSUMO

4.1 Consumo de café

- |  |  |
|--|--|
| <p>a) Nunca</p> <p>b) Ocasional (1 tza./1-2 veces/sem)</p> <p>c) Poco frecuente (1-2 tza./2-3 veces/sem)</p> | <p>d) Frecuente (1-2 tza.diaria/ 3-4 veces/sem)</p> <p>e) Muy frecuente (1-2 tza.diaria/ más de 4 veces/sem)</p> <p>f) Crónico (3 ó más tza. diaria más de 3 días/sem)</p> |
|--|--|

4.2 Consumo de alcohol

- |  |  |
|--|--|
| <p>a) Nunca</p> <p>b) Ocasional (1 vez/mes/ máx. 1-2 vasos)</p> <p>c) Poco frecuente (1-2 veces/mes/ máx. 1-2 vasos/vez)</p> | <p>d) Frecuente (2-3 veces/mes/ 2-3 vasos/vez)</p> <p>e) Muy frecuente (3-4 veces/mes/3-4 vasos/vez)</p> <p>f) Habitual (2-4 veces/mes/5 vasos a más/vez)</p> <p>g) Crónico (1-2 o más vasos todos los días)</p> |
|--|--|

4.3 Uso de tabaco

- |   |  |
|---|--|
| <p>a) Nunca</p> <p>b) Ocasional (1 cigarrillo/día 1-2 veces/mes)</p> <p>c) Poco frecuente (1-2 cigarrillos/día 1-2 veces/mes)</p> | <p>d) Frecuente (1-2 cigarrillos/día 1-2 veces/sem)</p> <p>e) Muy frecuente (1-2 cigarrillos/día/3-4 veces/sem)</p> <p>f) Crónico (Más de 2 cigarrillos/día más de 3 días/sem)</p> |
|---|--|

5. OBSERVACIONES

.....

## 6.4.MATRIZ PARA RECOLECCIÓN DE DATOS DE HISTORIAS

### CLÍNICAS



FICHA DE RECOLECCION DE DATOS



Apellidos y Nombres:  Nº:  HC:

1. Enfermedad actual:

2. Enfermedad crónica:

3. Antecedentes familiares:

4. Datos de laboratorio:

• Peso:  Talla:  Pulso:  Presión arterial:  IMC:

• Hematología:

○ Grupo sanguíneo:

○ VSG:

○ Hemoglobina:

○ Hematocrito:

○ Hemograma:

▪ Leucocitos totales:

▪ Neutrófilos:

▪ Linfocitos:

▪ Monocitos:

▪ Eosinófilos:

▪ Basófilos:

• Bioquímica:

○ Glucosa:

○ Creatinina:

○ Urea:

○ Ácido úrico:

○ Otros:

• Inmunología:

○ PCR:

○ FR:

○ VDRL:

○ Hep. A,B,C:

○ H. pylori:

○ BetaHCG:

○ PSA:

○ ASO:

○ Insulina y H. tiroideas:

• Microbiología:

• Análisis de orina: