

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
3.1. Generalidades del sistema inmune	3
3.2. Monocitos.....	6
3.2.1 Activación clásica vs. Activación alternativa.....	10
3.2.2. Monopoyesis.....	12
3.3 Citoquinas.....	13
3.3.1. Citoquinas mediadoras de la inmunidad innata y la inflamación.....	13
3.4. Inmunomodulación.....	17
3.4.1. Lipopolisacárido (inmunoestimulante).....	18
3.5. Efectos de frutas y verduras en el sistema inmune.....	20
3.5.1. <i>Berries</i> chilenos	26
3.5.2. Compuestos presentes en frutas y verduras.....	28
3.6. qPCR	29
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo general	31
4.2. Objetivos específicos.....	31

5. MATERIALES Y METODOS	32
5.1. Preparación de extractos.....	32
5.2. Obtención de la muestra.....	32
5.3. Aislamiento de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs).....	33
5.4. Recuento de CMSP y evaluación de viabilidad	34
5.5. Cultivo celular	35
5.6. Extracción de RNA	36
5.7. Síntesis de cDNA	38
5.8. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y análisis de productos de amplificación	39
5.9. Análisis estadístico.....	41
6. RESULTADOS	42
6.1. Cultivo de mononucleares	42
6.1.1. Separación de mononucleares con Histopaque 1,077 g/mL.....	42
6.1.2. Diferencia entre un pellet obtenido del CMSP tratado con buffer de lisis (ACK) y sin ACK	44
6.1.3. Recuento de CMSP.....	45
6.1.4. Viabilidad celular	46
6.1.5. Estandarización de placa de cultivo	47
6.1.6. Tiempo de incubación del cultivo celular	48
6.1.7. Cantidad de CMSP a cultivar	49

6.2. Expresión de citoquinas tras la estimulación de las células mononucleares con LPS	51
6.3. Efecto en expresión de citoquinas proinflamatorias de berries chilenos sobre células mononucleares estimuladas con LPS	54
6.4. Efecto en expresión de citoquinas proinflamatorias de guanosina y ácido ferúlico sobre células mononucleares estimuladas con LPS	57
7. DISCUSION	60
8. CONCLUSION.....	62
9. BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inmunidad innata y adaptativa: Componentes del sistema inmunológico

Figura 2. Morfología de monocito

Figura 3. Tipos de activación de macrófagos

Figura 4. Secuencia de maduración de la serie monocítica

Figura 5. Fruto Calafate

Figura 6. Fruto Maqui

Figura 7. Toma de muestra sanguínea

Figura 8. Separación de mononucleares de sangre periférica

Figura 9. Eliminación de glóbulos rojos en pellet de leucocitos

Figura 10. Orden de carga de los pocillos

Figura 11. Lisis celular para extracción de RNA

Figura 12. Separación de fases

Figura 13. Separación de mononucleares con Histopaque 1077

Figura 14. Separación de mononucleares con Histopaque 1077

Figura 15. Muestra pellet obtenido de la centrifugación del CMSP

Figura 16. Recuento de células mononucleares de sangre sin diluir y sangre diluida

Figura 17. Ensayo de viabilidad celular mediante método de exclusión con Azul Tripán

Figura 18. Distribución de células mononucleares en multipocillos

Figura 19. Cuantificación de RNA en diferentes tiempos de incubación

Figura 20. Densidad celular del cultivo, con distintas cantidades de CMSP

Figura 21. Cuantificación de RNA con 2×10^6 , 3×10^6 y 6×10^6 células/mL

Figura 22. Expresión de IL-1 β en distintos tiempos de estimulación con LPS

Figura 23. Expresión de TNF – α en distintos tiempos de estimulación con LPS

Figura 24. Efecto de *berries* chilenos sobre la expresión de IL-1 β

Figura 25. Efecto de *berries* chilenos sobre la expresión de TNF- α

Figura 26. Efecto de Guanosina y Ferúlico sobre la expresión de IL-1 β

Figura 27. Efecto de Guanosina y Ferúlico sobre la expresión de TNF- α

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata

Tabla 2. Protocolo para síntesis de cDNA

Tabla 3. Primers empleados para la detección de citoquinas y gen de expresión constante (RPL37A) utilizados en el estudio, indicando la cantidad utilizada y la longitud del producto

Tabla 4. Reactivos y cantidad de estos utilizados por muestra para reacción qPCR

Tabla 5. Protocolo de temperatura, tiempo y ciclos utilizados para reacción qPCR

Tabla 6. Recuento eritrocitario de pellet obtenido de CMSP sin tratarlo con ACK y al tratarlo con ACK