

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE	10
3.2 MONOPOYESIS	13
3.3 MONOCITOS	15
3.3.1 ACTIVACIÓN CLÁSICA vs ACTIVACIÓN ALTERNATIVA	19
3.4 CITOQUINAS.....	21
3.4.1 CITOQUINAS EN LA INMUNIDAD INNATA E INFLAMACIÓN	23
3.5 INMUNOMODULACIÓN	29
3.5.1 EFECTOS DE LOS NUCLEÓSIDOS Y DE LOS DERIVADOS DEL ÁCIDO HIDROXICINÁMICO PRESENTE EN EL SISTEMA INMUNE	31
a) NUCLEÓSIDOS	31
b) COMPUESTOS FENÓLICOS	38
b1) DERIVADOS DEL ÁCIDO HIDROXICINÁMICO	39
3.6 INMUNOESTIMULADOR: LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)	42
3.7 RT-PCR	44
4. HIPÓTESIS	46
5. OBJETIVOS	46
5.1 OBJETIVO GENERAL	46
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
6. MATERIALES Y MÉTODOS	47
6.1 PREPARACIÓN DE COMPUESTOS	47
6.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	47
6.3 SEPARACIÓN DE LOS MONOCITOS	48
6.4 RECUENTO DE GLÓBULOS BLANCOS	51

6.5 VIABILIDAD DE LOS MONOCITOS	51
6.6 ESTANDARIZACIÓN DE CULTIVO CELULAR	52
6.7 ADICIÓN DE COMPUESTOS, INCUBACIÓN Y DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD POR MEDIO DE AZUL TRIPÁN	54
6.8 EXTRACCIÓN DE ARN	55
6.9 CUANTIFICACIÓN DE ARN	57
6.10 SÍNTESIS DE ADNc DE ARN TOTAL	58
6.11 AMPLIFICACIÓN DE ADNc MEDIANTE PCR	59
6.12 ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARTIDORES	60
6.13 ELECTROFORESIS	60
6.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
7. RESULTADOS	62
7.1 ESTANDARIZACIÓN DEL CULTIVO	62
7.1.1 CANTIDAD DE CMSP A CULTIVAR	62
7.1.2 PLACA DE CULTIVO	63
7.1.3 TIEMPO DE INCUBACIÓN	64
7.2 VIABILIDAD CELULAR CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS	65
7.3 ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARTIDORES	67
7.4 TIEMPO DE ESTIMULACIÓN DE CMSP CON LPS	71
7.5 CONCENTRACIÓN DE LPS PARA LA ESTIMULACIÓN DE LAS CMSP	72
7.6 EFECTO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS DE LOS DERIVADOS DEL ÁCIDO HIDROXICINÁMICO EN LAS CMSP ESTIMULADAS CON LPS	77
8. DISCUSIÓN	80
9. CONCLUSIÓN	82
10. BIBLIOGRAFÍA	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo actual de determinación de la jerarquía hematopoyética en el humano adulto	11
Figura 2. Secuencia de maduración del monocito-macrófago	14
Figura 3. Esquema de la estructura subcelular del monocito y visto en el frotis de sangre periférica.....	15
Figura 4. Esquema de la estructura subcelular del macrófago.....	18
Figura 5. Vías de activación de los macrófagos.....	19
Figura 6. Activación de macrófagos por vía clásica (M1) y vía alternativa (M2a) durante infecciones de tipo fúngicas.	20
Figura 7. Mecanismo de actuación de las citocinas como factores de crecimiento locales.....	22
Figura 8. Síntesis de IL-1 α	25
Figura 9. Síntesis de IL-1 β	26
Figura 10. Las manifestaciones sistémicas de IL-1 β	27
Figura 11. Esquema de las distintas formas en que TNF- α interactúa en otras células de la vía aérea.....	28
Figura 12. Terapia de modulación inmune.	30
Figura 13. Adenosina suprime la proliferación de macrófagos a través del receptor A2B.	33
Figura 14. Efecto de los receptores A2A y A2B en los macrófagos.....	34
Figura 15. Algunas de las principales vías del metabolismo de inosina.....	36
Figura 16. Ácido ferúlico.....	40
Figura 17. Ácido cafeico.....	40
Figura 18. Ácido p-cumarínico.....	41
Figura 19. Reconocimiento y vías de transducción del LPS.....	43
Figura 20. Materiales para la obtención de la muestra y punción venosa.....	48
Figura 21. Sangre dispensada en tubos Falcon.....	49

Figura 22. Separación de CMSP con Histopaque 1.077 g/mL después de la centrifugación.	50
Figura 23. Tratamiento de pellet con ACK.....	50
Figura 24. Viabilidad de los CMSP vistos al microscopio óptico con aumento de 40x.	52
Figura 25. Orden de carga de los pocillos.....	54
Figura 26. Muestras tratadas con Trizol.....	55
Figura 27. Muestras con Trizol y Cloroformo antes y después de centrifugar con sus distintas fases.....	56
Figura 28. Etapa de precipitación.....	56
Figura 29. Muestras tratadas con Agua libre de nucleasas.	57
Figura 30. Cantidad de ARN obtenido en cada concentración	63
Figura 31. Se observa la distribución de las células en las distintas placas vistas al microscopio invertido en aumento de 40x.....	64
Figura 32. Muestra la distribución de las células de acuerdo al tiempo de incubación vistas al microscopio invertido en aumento de 40x.....	65
Figura 33. Muestra la viabilidad de las células tratadas con los nucleósidos.	66
Figura 34. Muestra la viabilidad de las células tratadas con los derivados hidroxicinámico	67
Figura 35. Estandarización del partidor IL-1 β	68
Figura 36. Estandarización del partidor TNF- α	69
Figura 37. Estandarización RFLP3A:	70
Figura 38. Expresión de IL-1 β a distintos tiempos de estimulación con LPS.	71
Figura 39. Expresión de IL-1 β a distintas concentraciones de LPS.....	73
Figura 40. Efectos de los nucleósidos sobre la expresión de IL-1 β	75
Figura 41. Efectos de los nucleósidos sobre la expresión de TNF- α	76
Figura 42. Efectos de los derivados del ácido hidroxicinámico sobre la expresión de IL-1 β	78
Figura 43. Efectos de los derivados del ácido hidroxicinámico sobre la expresión de TNF- α	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características principales de la inmunidad innata y adaptativa.....	12
Tabla 2. Muestra los subconjuntos de monocitos humanos, sus receptores de quimioquinas y funciones respectivas.....	16
Tabla 3. Distintas citoquinas que participan en la inmunidad innata y en los proceso de inflamación.....	23
Tabla 4. Protocolo para síntesis de ADNc	58
Tabla 5. Protocolo para amplificación de ADNc mediante PCR.....	59
Tabla 6. Programación de Termociclador para PCR.....	60