

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Revisión Bibliográfica	3
3.1. Sistema Inmunológico	3
3.2. Respuesta Inmune	4
3.2.1. Respuesta Inmune Innata	5
3.2.1.1. Componentes del Sistema Inmune Innato	6
3.2.1.1.1. Monocitos y Macrófagos	6
3.2.1.1.2. Eosinófilos, Basófilos y Mastocitos	7
3.2.1.1.3. Neutrófilos	7
3.2.1.2. Fagocitosis	8
3.2.1.2.1. Mecanismos efectores intracelulares de Células Fagocíticas	9
3.2.1.3. Estrategias de Reconocimiento Inmune Innato	10
3.2.2. Respuesta Inmune Adaptativa	11
3.2.2.1. Reconocimiento del Antígeno por el Anticuerpo	12
3.3. Regulación Inmune	13
3.4. Alimentos Funcionales	13
3.4.1. Alimentos y Sistema Inmune	14
3.4.2. Fitoquímicos	15
3.4.2.1. Ácido Hidroxicinámico	15
3.5. Estudios en frutas y hortalizas en Chile	16
3.6. Inmunomodulación	17
3.6.1. Clasificación Inmunomoduladores	18
3.6.2. Mecanismos de la Inmunomodulación	19
3.6.3. Ensayos de Inmunomodulación	20
3.6.3.1. Cultivo Celular	20
3.6.3.2. Ensayos de Proliferación	22

3.4.3.2.1. Ensayos de Reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio (MTT)	22
3.6.3.3. Efecto en formación de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)..	23
3.4.3.3.1. Efecto en formación de ROS por reducción del Nitroazul de Tetrazolio (NBT)	23
3.6.3.4. Ensayo del Óxido Nítrico basado en la reacción de Griess	24
4. Objetivos	26
4.1. Objetivo General	26
4.2. Objetivos Específicos	26
5. Materiales y Métodos	27
5.1. Obtención de compuestos	27
5.2. Obtención de la muestra	27
5.3. Ensayo de Fagocitosis <i>in vitro</i>	28
5.3.1. Preparación de suspensión de Levaduras	28
5.3.2. Preparación de la muestra	28
5.3.3. Lectura de la Fagocitosis	29
5.4. Cultivo celular para ensayos de proliferación celular y formación de ROS.....	30
5.4.1. Obtención de células Mononucleares	30
5.4.2. Viabilidad celular	31
5.4.3. Cultivo de Mononucleares	32
5.4.4. Ensayo de proliferación <i>in vitro</i>	34
5.4.5. Ensayo de formación de ROS	35
5.5. Determinación de concentración de óxido nítrico mediante reacción de Griess..	36
5.6. Análisis estadístico	37
6. Resultados	38
6.1. Estudio de Fagocitosis <i>in vitro</i>	38
6.2. Cultivo de Mononucleares	42
6.2.1. Viabilidad Celular	42
6.2.4. Visualización de población celular de cultivo	43
6.3. Ensayo de proliferación celular (MTT)	44
6.4. Efecto en la formación de ROS mediante la reducción del NBT	47
6.5. Ensayo del óxido nítrico	49

6.5.1. Curva de calibración de Nitrato de Sodio	49
6.5.2. Determinación de NO por reacción de Griess	50
7. Discusión	52
7.1. Estudios de Fagocitosis <i>in vitro</i>	54
7.2. Cultivo de Mononucleares	55
7.3. Ensayo de proliferación basados en la reducción del MTT	56
7.4. Efecto en formación de ROS mediante la reducción del NBT	57
7.5. Ensayo del óxido nítrico por reacción de Griess	58
8. Conclusión	60
9. Bibliografía	61
10. Anexos	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química del ácido hidroxicinámico	16
Figura 2.	Estructura química de MTT y su producto formazán reducido	22
Figura 3.	Reacción de NBT con iones superóxido	24
Figura 4.	Reacción de Griess para determinación de Nitratos	25
Figura 5.	Fagocitosis <i>in vitro</i>	29
Figura 6.	Separación de Mononucleares.....	30
Figura 7.	Separación de la nube de Mononucleares	31
Figura 8.	Viabilidad Celular	32
Figura 9.	Microplaca de 96 pocillos cargada para cultivar	33
Figura 10.	Fagocitosis <i>in vitro</i>	38
Figura 11.	Neutrófilo fagocitando a levaduras	39
Figura 12	Gráfico de fagocitosis porcentual de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico	39
Figura 13.	Gráfico de fagocitosis porcentual en base a curva de concentración de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico	40
Figura 14.	Gráfico de índice fagocítico de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico	41
Figura 15.	Gráfico de índice fagocítico en base a curva de concentración de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico	42
Figura 16.	Observación de viabilidad celular en cámara de Neubauer con aumento 40x	43
Figura 17.	Observación de cultivo celular con Ác. Cafeico mediante microscopio invertido	43
Figura 18.	Observación de cultivo celular con higromicina mediante microscopio invertido	44
Figura 19.	Cristales de formazán depositados en los pocillos	44
Figura 20.	Gráfico de porcentaje de proliferación celular según compuestos derivados del ácido hidroxicinámico	45

Figura 21. Gráfico de porcentaje de proliferación celular en base a curva de concentración de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico.....	46
Figura 22. Partículas de formazan en ensayo de reducción NBT	47
Figura 23. Gráfico de porcentaje de reducción de NBT según compuestos derivados del ácido hidroxicinámico	48
Figura 24. Gráfico de porcentaje de reducción de NBT en base a curva de concentración de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico.....	49
Figura 25. Curva de calibración de nitrato de sodio	50
Figura 26. Reacción de Griess en microplaca para su lectura	50
Figura 27. Gráfico de concentración de Óxido Nítrico según compuestos derivados del ácido hidroxicinámico	51
Figura 28. Gráfico de concentración de nitrito celular en base a curva de concentración de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tipos de medios para cultivo celular, ejemplos y sus respectivos usos.....	21
-----------------	----------------------------------------------------------------------------	----