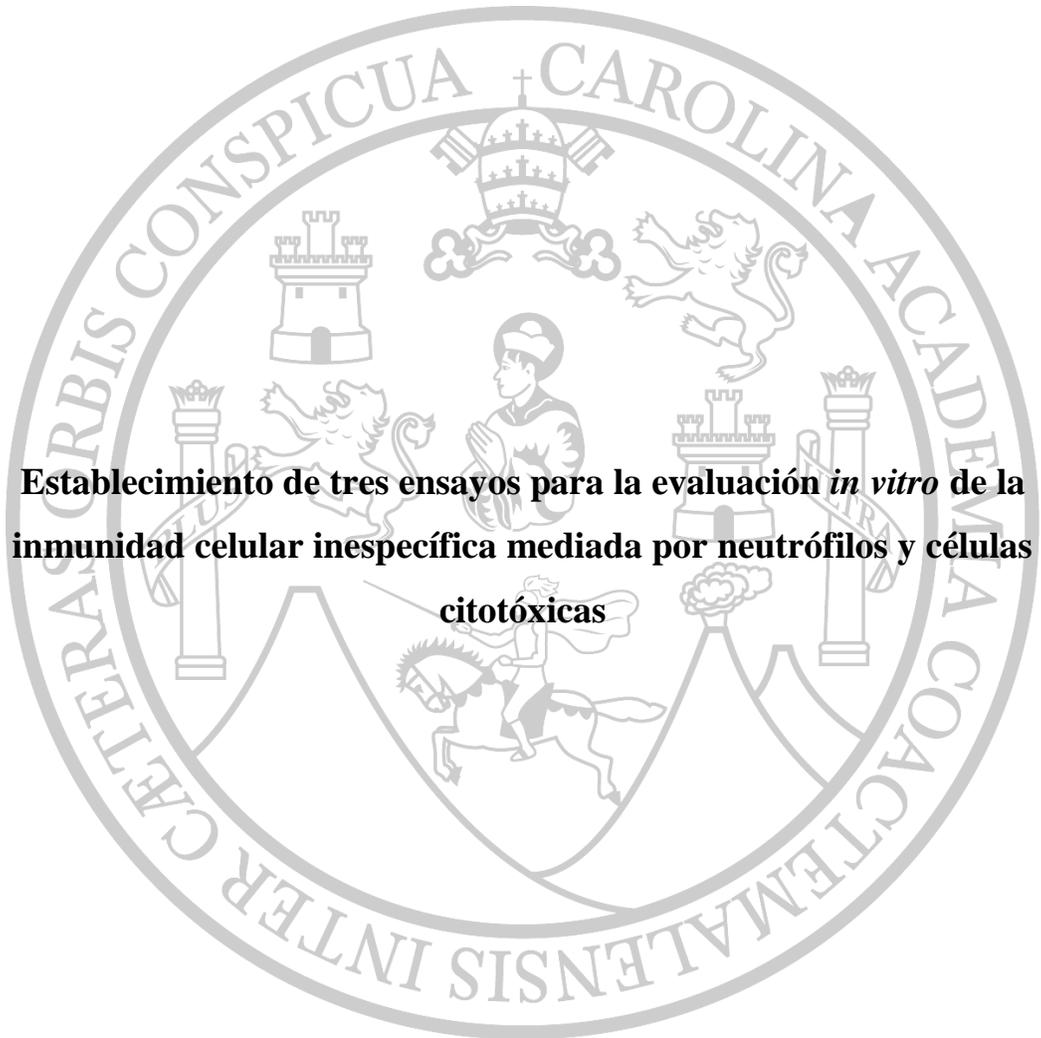


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**Establecimiento de tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la
inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células
citotóxicas**

Andrea Jeanette Osorio Vides

Sasha Janeth Yoc Gatica

Químicas Biólogas

Guatemala, julio 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Establecimiento de tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la
inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células**

citotóxicas

Seminario de Investigación

Presentado por

Andrea Jeanette Osorio Vides

Sasha Janeth Yoc Gatica

Para optar al título de

Químicas Biólogas

Guatemala, Julio 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Y A LA VIRGEN MARÍA

Por brindarnos la guía y fortaleza a lo largo del trayecto para alcanzar este logro.

A NUESTROS PADRES

Por su apoyo incondicional, entrega, trabajo y sacrificio.

A LAS UNIDADES DE INVESTIGACIÓN

Unidad de investigación en Inmunología y Hematología (UDIHEMA) y Unidad de Bioensayos, por avalar la realización del estudio.

A LA TRICENTENARIA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por brindarnos la preparación adecuada para nuestra formación como profesionales.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
III. ANTECEDENTES.....	4
A. Inmunidad.....	4
1. Inmunidad innata o inespecífica.....	4
2. La fagocitosis y la inmunidad adquirida.....	6
a. Células fagocitas.....	7
b. Fagocitosis.....	9
3. Citotoxicidad celular.....	14
a. Linfocitos T citotóxicos.....	14
b. Células Natural killer.....	14
c. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos.....	15
4. Inmunidad adquirida o específica.....	16
B. Evaluación de la inmunidad innata.....	17
1. Técnica <i>in vitro</i>	18
a. Aislamiento y separación de células.....	18
b. Pruebas que miden la funcionalidad de las células inmunes.....	18
2. Neutrófilos y macrófagos.....	20
C. Estudios realizados sobre inmunidad celular inespecífica.....	21
IV. JUSTIFICACIÓN.....	24
V. OBJETIVOS.....	25
VI. HIPÓTESIS.....	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
VIII. RESULTADOS.....	36
IX. DISCUSIÓN.....	47
X. CONCLUSIONES.....	52
XI. RECOMENDACIONES.....	53
XII. REFERENCIAS.....	54
XIII. ANEXOS.....	60

I. RESUMEN

La inmunidad celular inespecífica o inmunidad innata, es independiente de la naturaleza del agente infeccioso y de la existencia o no de contactos previos con él. Aparte de la protección que ejercen las barreras cutaneomucosas y sus secreciones, existen tres formas de protección: citotoxicidad mediada por células, fagocitosis e inflamación (Parham, 2006).

La citotoxicidad mediada por células se da en respuesta antitumoral y antivírica; mientras que, los neutrófilos se ven involucrados en el proceso de fagocitosis en respuesta antibacteriana (Laso, 2015).

En el presente trabajo se llevó a cabo la estandarización de tres ensayos con el fin de evaluar la inmunidad celular inespecífica. Los ensayos estandarizados *in vitro* fueron fagocitosis *in vitro* mediada por neutrófilos, viabilidad de neutrófilos en el proceso de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) y caracterización y linfoproliferación de linfocitos T por medio de la formación de rosetas e incubación con el mitógeno Concanavalina A, respectivamente. La estandarización de cada uno de los ensayos se llevó a cabo en diferentes condiciones; con el objetivo de optimizar los resultados, ajustados a nuestros laboratorios.

Por otro lado, se evaluaron cinco extractos de plantas en búsqueda de actividad inmunomoduladora con los tres ensayos estandarizados.

Por medio de un análisis de datos de manera desagregada; se determinó que el ensayo de fagocitosis *in vitro* fue un método de diagnóstico heterogéneo debido a que el porcentaje de coeficiente de variación fue de 62%; el ensayo de reducción del Nitroazul de Tetrazolio (NBT) mostró capacidad de discernimiento entre una población inmunocompetente y una inmunodeficiente debido a que los valores de los intervalos de confianza no se entrecruzaron; y en el ensayo de linfoproliferación existió una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de preincubación y postincubación con el mitógeno Concanavalina A.

Se recomienda que, para obtener una mayor recuperación de neutrófilos y linfocitos, la fuente de células sea de mayor volumen y recuentos elevados, siempre que se encuentren dentro de los valores de referencia establecidos.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente seminario de investigación se encuentra en la línea de trabajo de la Unidad de investigación en Inmunología y Hematología (UDIHEMA), así como la Unidad de Bioensayos (línea de investigación de inmunomoduladores en productos naturales).

Es importante evaluar si la respuesta inmune se encuentra en las condiciones adecuadas para actuar ante diversos agentes patógenos, así como también ante el estrés, la ansiedad y la depresión.

Se ha investigado el beneficio de los productos naturales sobre la salud de individuos y por lo tanto, es de importancia evaluar si contribuyen a mejorar la capacidad de respuesta inmune ante cualquier agente patógeno o estado emocional que perjudique la salud, mediante ensayos de medición específicamente diseñados.

En este estudio, se establecerán tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica con sangre humana y se llevará a cabo una fase piloto en la búsqueda de actividad inmunomoduladora de cinco extractos vegetales de plantas utilizadas popularmente como estimulantes del sistema inmune.

III. ANTECEDENTES

A. Inmunidad

El sistema inmune permite que, a pesar de vivir en un ambiente densamente poblado de agentes microbianos potencialmente patógenos, sólo en pocas ocasiones padezca de procesos infecciosos evidentes desde el punto de vista clínico. El proceso de una infección ocasiona una cascada de interacciones entre el organismo infeccioso y el hospedero: entrada, invasión y colonización de los tejidos, escape de los mecanismos de defensa del huésped, daño a los tejidos infectados y finalmente, pérdida de las funciones normales del hospedero infectado (Arnaiz-Villena, Regueiro y López-Larrea, 1995). Cuando esto sucede, la infección suele resolverse con rapidez gracias al desarrollo de una respuesta inmune que integra mecanismos propios de inmunidad innata y adaptativa en el hospedero (Geffner y Fainboim, 2008; Tortora, Funke y Case, 2007).

1. Inmunidad innata o inmunidad inespecífica

Está formada por barreras externas constituidas por la piel y las membranas mucosas, además de un conjunto de defensas celulares y químicas internas, que combaten los agentes infecciosos que atraviesan las barreras externas (Campbell y Reece, 2007).

La inmunidad innata no implica el reconocimiento específico de un microorganismo y actúa contra todos los posibles agentes infecciosos de la misma manera. Además, la inmunidad innata después de enfrentarse a una molécula extraña no genera memoria inmunológica. Por lo tanto, la inmunidad innata no requiere de un contacto previo con la molécula extraña para poder actuar sobre ella (Rojas-Espinosa, 2006).

Los determinantes de la inmunidad innata o natural incluyen factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales, además de otros factores como la edad, las barreras de protección mecánicas y el tipo de patógeno humano (Parham, 2006).

Los diferentes tipos de patógenos humanos incluye a: virus, bacterias, hongos y parásitos. Los patógenos difieren en su estructura; en la manera en que atacan al hospedero y en el tipo de daño que causan. El hospedero puede hacer una distinción entre los

patógenos que se reproducen en los espacios existentes entre las células humanas para producir infecciones extracelulares y los patógenos que se reproducen dentro de las células humanas para producir infecciones intracelulares. Tanto el espacio extracelular como el intracelular pueden subdividirse aún más. Estos diferentes sitios de replicación afectan a los tipos de mecanismo inmunitario que pueden usarse para eliminar al patógeno. Las formas extracelulares de los patógenos son accesibles para las moléculas solubles del sistema inmunitario, en tanto que las formas intracelulares no lo son. Los patógenos intracelulares que viven en el núcleo o en el citosol son combatidos mediante la muerte de la célula infectada, lo que interfiere en el ciclo vital del patógeno y expone a los patógenos, que son liberados de las células muertas, a las moléculas solubles del sistema inmunitario. Los patógenos que viven en vesículas intracelulares, en cambio, pueden ser atacados mediante la activación de la célula infectada para que intensifique su actividad antimicrobiana. Sin embargo, casi todos los patógenos sean virus, bacterias, hongos o parásitos, en algún momento están presentes en el espacio extracelular y pueden ser atacados por los anticuerpos (Parham, 2006).

Las respuestas inmunitarias innatas representan el sistema de advertencia temprano de la inmunidad y están destinadas a impedir que los microorganismos logren acceder al cuerpo y a ayudar a eliminar a los que lo logran (Tortora et al., 2007).

Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras epiteliales de la piel, tracto gastrointestinal y respiratorio, que previenen la entrada microbiana (y han de ser violados para que un microorganismo establezca una infección), los leucocitos fagocíticos (neutrófilos y macrófagos) un tipo de célula especializada denominada célula citolítica natural (Natural killer) y varias proteínas plasmáticas circulantes (Kumar, Abbas, Fausto y Mitchell, 2008).

Estas barreras naturales no median solamente una acción pasiva, sino que contribuyen a la inmunidad antimicrobiana mediante la producción de sustancias con actividad microbiostática y microbicida, como también a través de la producción de un conjunto de mediadores capaces de inducir y orientar la respuesta inflamatoria local. Esta respuesta, inducida a consecuencia del establecimiento de un foco infeccioso primario, involucra diferentes componentes, siendo estos el sistema del complemento, proteínas de fase aguda,

interferones, neutrófilos, macrófagos, células NK, células dendríticas mieloides y plasmocitoides, mastocitos y células NKT (Geffner y Fainboim, 2008).

Las células de la inmunidad reconocen un grupo reducido de estructuras presentes en los patógenos denominadas patrones moleculares asociados con los patógenos (-PAMP-, pathogen-associated molecular patterns), que son conservados, compartidos por un gran grupo de agentes infecciosos (lo cual evita la necesidad de demasiados receptores) y se distinguen con claridad de los patrones propios (Delves, Martin, Burton y Roitt, 2006). Este reconocimiento se hace a través de receptores proteicos localizados en las membranas citoplasmáticas de las células definitivas, denominados receptores de reconocimiento de patrones (RRP) o receptores tipo toll (toll-like receptors, TLR). Varios de estos RRP se asemejan a las lectinas y se unen en forma multivalente y con especificidad considerable a los azúcares expuestos en la superficie microbiana, con sus características configuraciones tridimensionales rígidas (PAMP). Los TLR se unen a varios componentes de los microorganismos: en bacterias a lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicano, ácido teicoico, manan, flagelina, pilina y ácido desoxirribonucleico (ADN); en virus a ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena o de cadena sencilla y en hongos a ácido lipoteicoico, zimosán y glicolípidos (Rugeles, Patiño y Montoya, 2009; Geffner y Fainboim, 2008).

Dos de las células defensivas que participan en la inmunidad innata se conocen como macrófagos o células dendríticas. Cuando los TLR de estas células encuentran algún componente de un patógeno, como el LPS de las bacterias Gram negativo, inducen a los macrófagos y células dendríticas a que liberen sustancias químicas denominadas citocinas. Las citocinas son proteínas que regulan la intensidad y la duración de las respuestas inmunitarias. (Tortora, et al., 2007).

2. La fagocitosis y la inmunidad adquirida

La fagocitosis consiste en un conjunto de fenómenos que conduce a la formación de fagosomas, vacuolas de gran tamaño (visibles al microscopio óptico) que contienen partículas sólidas (ej. bacterias) o grandes desechos celulares (Maillet, 2003). La actividad fagocítica de los macrófagos no solo está relacionada con protección, también juega un papel importante en la inducción de la respuesta inmunitaria y no solo concierne a fagocitar bacterias sino también desechos celulares (Maillet, 2003). A través de la fagocitosis, los

macrófagos atrapan e ingieren microorganismos, los inactivan y los rompen en pedazos de tamaño variable. Algunos de estos pedazos se degradan todavía más, produciendo pequeños fragmentos antigénicos o epítomos, que se asocian a moléculas de histocompatibilidad de clase I y de clase II, y así se transportan a la superficie de los macrófagos para ser presentados a las células T CD4+ y T CD8+ del individuo. Según las señales que haya recibido la célula dendrítica en la periferia podrá activar a los linfocitos T en perfiles funcionales diferentes, aptos para combatir patógenos extracelulares o intracelulares o alternativamente mediar una función supresora sobre la inmunidad adaptativa. Los macrófagos funcionan como células atrapadoras, procesadoras y presentadoras de antígeno, pero esta función también la ejercen los linfocitos B, las células de Langerhans y las células dendríticas. Existen algunas evidencias que sugieren que los neutrófilos también podrían funcionar como células procesadoras y presentadoras de antígeno y que quizá esta función no se les ha reconocido plenamente, por tratarse de células de vida media corta (Rojas-Espinosa, 2006; Geffner y Fainboim, 2008).

a. Células fagocíticas

Los fagocitos, los cuales forman parte del mecanismo de defensa de segunda línea, se encargan de ingerir y posteriormente destruir microorganismos que llegan a implantarse en los tejidos (Arnaiz-Villena, et al., 1995).

El grupo de fagocitos incluye básicamente a los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas (Rojas-Espinosa, 2006).

i. Neutrófilos polimorfonucleares

Los neutrófilos polimorfonucleares, son los leucocitos predominantes en el torrente sanguíneo, son más pequeños comparados con los macrófagos y las células dendríticas. Estas células comparten con los demás elementos corpusculares de la sangre un precursor común que es la célula madre hematopoyética. Es una célula de vida corta (Delves, Martin, Burton y Roitt, 2006) aproximadamente 6 horas en la sangre y 2 días en los tejidos y mueren por apoptosis (Rojas-Espinosa, 2006). Estas células no se dividen, tienen un núcleo multilobulado y numerosos gránulos que casi no se tiñen con los colorantes histológicos como hematoxilina-eosina, a diferencia de las estructuras del eosinófilo y el

basófilo, estrechamente relacionado con el neutrófilo. Los gránulos neutrófilos son de dos tipos principales:

Los gránulos primarios azurófilos se forman al inicio del desarrollo, presentan la típica morfología lisosómica y contienen mieloperoxidasa y la mayoría de los efectores antimicrobianos no oxidativos, como defensinas, proteína bactericida estimuladora de la permeabilidad (BPI) y catepsina G.

Los gránulos secundarios específicos, peroxidasa negativos que contienen lactoferrina, gran parte de la lisozima, fosfatasa alcalina y citocromo b558 unido a membrana. Los abundantes depósitos de glucógeno que se encuentran en el citoplasma se utilizan en la glucólisis, lo cual les permite a las células actuar en condiciones de anaerobiosis (Delves, et al., 2006).

ii. Macrófago

Esta célula se deriva del promonocito de la médula ósea que, tras su diferenciación en monocito sanguíneo, finalmente se instala en el tejido como macrófago maduro donde constituye el sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos se encuentran en el tejido conectivo y alrededor de la membrana basal de los vasos sanguíneos de pequeño calibre, aparecen en mayor concentración en los pulmones, el hígado (células de Kupffer), el revestimiento de sinusoides esplénicos y en los senos medulares de los ganglios linfáticos, donde ocupan localizaciones estratégicas para filtrar y eliminar el material extraño. Otros ejemplos son las células mesangiales del glomérulo renal, la microglia del encéfalo y los osteoclastos de los huesos. A diferencia de los polimorfonucleares, son células de vida prolongada, con cantidades significativas de retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias. Mientras los polimorfonucleares constituyen la principal defensa contra las bacterias piógenas (formadoras de pus), en general se puede decir que los macrófagos están más preparados para combatir las bacterias, los virus y los protozoos capaces de vivir dentro de las células del huésped (Delves, et al., 2006).

iii. Células dendríticas

Son células de vida media prolongada, se encuentran en los epitelios como células inmaduras y luego de capturar microorganismos se mueven a través de la linfa a los nódulos linfáticos regionales donde maduran y ejercen sus funciones como células presentadoras de antígeno (Rojas-Espinosa, 2006).

b. Fagocitosis

i. Infección

Todos los microorganismos que penetran al cuerpo lo hacen a través de lesiones (que pueden ser imperceptibles) producidas en las membranas mucosas o en la piel. Una vez establecidos en los tejidos del cuerpo, los microorganismos proliferan liberando en los tejidos pequeños péptidos con actividad quimiotáctica. Éstos y otros factores quimiotácticos, derivados tanto de los tejidos lesionados como del complemento activado, se difunden en el tejido circundante hasta hacer contacto, a concentraciones de femtogramos (1×10^{-15} g), con los vasos sanguíneos (Rojas-Espinosa, 2006).

ii. Activación

Los leucocitos deben ser activados por los mediadores de la inflamación para que se transformen en fagocitos activos. La activación estimula la producción de receptores glicoproteicos sobre la membrana citoplasmática del leucocito, lo que aumenta la capacidad celular de adherirse a superficies y de reconocer objetos extraños como las bacterias. La activación también origina un estallido respiratorio cuando los gránulos del fagocito producen oxidantes letales al modificar su metabolismo de glucólisis anaerobia a una respiración aerobia. Entre los mediadores de la inflamación que activan los leucocitos se encuentran los subproductos bacterianos, los fragmentos del complemento, los leucotrienos y las prostaglandinas (Ingraham y Ingraham, 1998).

iii. Diapédesis y quimiotaxis

En respuesta al contacto con los factores quimiotácticos, las células endoteliales y las células fagocíticas incrementan la síntesis de sus proteínas de adhesión y se vuelven más “pegajosas” entre sí. Esto propicia que los fagocitos se adhieran a las superficies de los endotelios y rueden sobre ellos hasta procurarse una salida entre las uniones de las células endoteliales, a través de un proceso conocido como diapédesis. Es conveniente señalar que todas las funciones móviles de una célula dependen del buen funcionamiento del citoesqueleto, una compleja red de fibrillas elásticas constituida por microtúbulos (tubulina), microfilamentos (actina), miosina, gelsolina, talina, calmodina y otras proteínas. Ya fuera de los vasos sanguíneos, los fagocitos se desplazan hasta los focos de infección donde hacen contacto con los microorganismos, amplificando la reacción inflamatoria. El contacto de las células con los microorganismos es más firme cuando éstos se encuentran recubiertos con opsoninas del suero; las opsoninas más importantes son las colectinas, los anticuerpos IgG y el componente C3b del complemento (Ingraham y Ingraham, 1998).

iv. Reconocimiento y adherencia

La ingestión de microorganismos por la células fagocíticas ocurre a través de dos tipos de receptores: los receptores de reconocimiento de patrón (PRR, pattern recognition receptors) dentro de los cuales están los receptores SR (scavenger receptors) y los receptores para manosa, dectina-1, CD14 y C1q, que reconocen componentes estructurales conservados de los microorganismos (-PAMP-, pathogen associated molecular patterns); los receptores para las opsoninas IgG (FcR), C3b/C3bi (CR1/CR3), y colectinas (complejo calreticulina-CD91) (Rojas-Espinosa, 2006).

En el caso de los receptores para las opsoninas, cumplen su función cuando no se produce la unión entre el receptor del fagocito y la superficie de la célula bacteriana si esta está protegida por una cápsula o por proteínas superficiales. Por ejemplo, la cápsula polisacárida protectora de *Streptococcus pneumoniae* aumenta en gran medida la capacidad que poseen estos microorganismos de establecer una infección, Durante la opsonización una parte de la molécula de opsonina se une a la pared de la bacteria y luego la otra parte se une a un receptor del fagocito. Así, una opsonina forma un puente entre la

bacteria y el fagocito para facilitar el proceso de fagocitosis. Las dos opsoninas más importantes son el complemento y los anticuerpos (Ingraham y Ingraham, 1998).

v. Ingestión o endocitosis

Las células responden al contacto con los microorganismos, extendiendo su membrana y emitiendo prolongaciones a manera de pseudópodos que terminan por rodear y englobar a los microorganismos. En este momento los microorganismos ya se encuentran en el interior de las células, contenidos en estructuras conocidas como vacuolas fagocíticas o fagosomas (Rojas-Espinosa, 2006).

vi. Cambios bioquímicos

La interacción de los microorganismos con receptores presentes en la membrana de los fagocitos genera en estas células una serie de cambios bioquímicos que son finalmente responsables de su actividad microbicida. De manera resumida, la unión microorganismo-receptor induce cambios conformacionales en el receptor, que se transmiten a moléculas adyacentes (proteínas G reguladoras y segundo mensajeros), activándolas. Cuando el segundo mensajero que se activa es una fosfolipasa-C, esta enzima hidroliza los fosfolípidos con inositol de la membrana, produciendo inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 participa en la movilización de calcio (muchos eventos intracelulares requieren de calcio), en tanto que el DAG activa a protein cinasas C (PKC). Una de las PKC activadas se transloca a la cara interna de la membrana celular donde interacciona con las proteínas del sistema de la NADPH oxidasa y la fosforila. La fosforilación activa al sistema, uno de cuyos componentes es el citocromo B558, y esto promueve la captación de oxígeno molecular y su reducción a anión superóxido (O_2^-), el primer metabolito o radical libre del oxígeno (ROI), que se acumula dentro y fuera de las células. El anión superóxido no es estable y rápidamente se convierte en peróxido de hidrógeno, el segundo ROI. A través de diversas interacciones, estos metabolitos dan origen a los iones hidroxilo (OH) y al singlete de oxígeno, los otros ROIs. Una vez producidos, los ROIs interaccionan con proteínas, polisacáridos, lípidos, ADN y ARN de los microorganismos, y los rompen o modifican anulando su función. Es así, a través de los ROIs, que las células fagocíticas matan a los microorganismos (Ingraham y Ingraham, 1998).

vii. Respuesta inflamatoria

La internalización de los microorganismos por las células fagocíticas usualmente se acompaña de la generación de señales proinflamatorias, y señales activadoras de los mecanismos microbicidas. Algunos receptores fagocíticos, tales como los receptores Fc, disparan respuestas inflamatorias directamente, en tanto que otros, como los receptores del complemento no lo hacen. En muchos casos, la activación de la respuesta inflamatoria durante la fagocitosis es regulada por receptores adicionales, como los receptores TLR (toll-like receptors). La interacción de los componentes microbianos con los TLRs genera señales químicas que se transducen al interior de las células y terminan activando la expresión de genes cuyos productos (citocinas inflamatorias y moléculas de coestimulación) controlan las respuestas de la inmunidad innata y estimulan la inmunidad adquirida. Los TLR son proteínas transmembranales cuya región intracitoplásmica contiene un dominio TIR (Toll/IL-1 resistance domain) a través del cual interacciona con las proteínas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM, que también tienen dominios TIR, y que funcionan como proteínas transductoras de señales. La conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida se establece cuando los TLRs de las células presentadoras de antígeno (APC, antigen presenting cells) interaccionan con los PAMPs. Se sabe, por ejemplo, que la interacción de las células dendríticas (DC, dendritic cells) con los PAMPs, a través de sus TLRs, induce la maduración de las células y las capacita para interaccionar con las células T, iniciado así la inmunidad adaptativa. La importancia de los TLRs en la inmunidad natural y adquirida se deduce de la gravedad de las enfermedades en los pacientes que tienen deficiencias en TLRs (Rojas-Espinosa, 2006).

viii. Fusión fagosoma-lisosoma (fusión fagolisosomal)

Simultáneamente a los cambios antes señalados, ocurre la fusión de la vacuola fagocítica con diversas vesículas o endosomas y con los lisosomas citoplásmicos para formar el fagolisosoma. Los lisosomas, llamados también gránulos primarios o azurófilos y secundarios o específicos, contienen una colección de enzimas hidrolíticas que están como zimógenos o enzimas no activas en las células que se encuentran en reposo. Dentro de los fagolisosomas, los microorganismos quedan expuestos al efecto lesionante tanto de los metabolitos del oxígeno como de las enzimas hidrolíticas (Ingraham y Ingraham, 1998).

ix. El sistema de la mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima lisosomal que hidroliza al peróxido de hidrógeno producido por las células fagocíticas, generando intermediarios inestables que interaccionan con haluros (Cl⁻ y I⁻) para formar radicales halogenantes (ácido hipocloroso, hipoclorito e hipoyodito) altamente tóxicos para los microorganismos ingeridos (Rojas-Espinosa, 2006).

x. Los metabolitos del nitrógeno

Además de los metabolitos del oxígeno, las células fagocíticas, pero principalmente los macrófagos, responden a los estímulos infecciosos con la producción de óxido nítrico. Este es un biproducto del metabolismo de la arginina, y su síntesis se incrementa cuando los macrófagos son activados por interferón gamma.

Como los metabolitos del oxígeno, el óxido nítrico es un compuesto altamente tóxico. Juntos constituyen los elementos microbicidas, muy eficientes por cierto, de las células fagocíticas (Ingraham y Ingraham, 1998).

xi. Digestión y exocitosis

Los microorganismos ingeridos se mueren por el efecto tóxico de los metabolitos, oxígeno y nitrógeno, pero su digestión es el resultado de la actividad de las enzimas hidrolíticas lisosomales. Las hidrolasas degradan a los componentes microbianos hasta fragmentos de tamaño variable (lípidos, polipéptidos, oligosacáridos, oligonucleótidos y sus unidades monoméricas) que luego son reutilizados por la célula en beneficio de su propio metabolismo anabólico, mientras que otros son desechados por exocitosis, un proceso esencialmente inverso a la endocitosis (Parham, 2006).

3. Citotoxicidad de células

La citotoxicidad celular se encuentra dentro de las funciones más importantes de la rama celular de reacciones de defensa. Desde el momento en que los primeros ensayos fueron desarrollados, ha habido una continua controversia relacionada con los mecanismos actuales de la citotoxicidad mediada por células. Esta controversia persiste hasta el día de hoy, a pesar de décadas de trabajo y un real progreso. Existen diferentes tipos de citotoxicidad celular, los cuales difieren fundamentalmente uno de otro (Fernandez-Botran & Větvicka, 2000).

a. Linfocitos T citotóxicos

A diferencia de las inmunoglobulinas que reconocen antígenos solubles, el receptor de células T reconoce sólo antígenos presentados en el contexto de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Los linfocitos T CD8⁺ tienen la capacidad de reconocer antígenos presentados por las moléculas del CMH de clase I en la superficie de las células (González, Bonelo, Arévalo y Herrera, 1999).

Una vez el antígeno es reconocido por los linfocitos, se inicia una serie de vías de activación en el linfocito, que llevan finalmente a la eliminación de la célula blanco mediante mecanismos como citotoxicidad directa o la inducción de muerte celular programada (González, et al., 1999).

b. Células Natural killer

i. Desarrollo de las células NKT

El desarrollo de las células NKT es pobremente entendido (Fournier, 2008). Algunos estudios sugieren que se desarrollaron muy temprano en la ontogenia, independiente del timo y antes de la aparición de las células T convencionales. Sin embargo, ahora existe evidencia que las células NKT son una población dependiente del timo (Brahmi, Thomas, Park, Park & Dowdeswell, 1985).

Tradicionalmente los linfocitos NK se han descrito como células grandes, no adherentes, que poseen un citoplasma muy rico en gránulos azurófilos; CD16 y CD56 positivas, y negativas para CD3 y las cadenas del TCR. Es posible encontrar linfocitos NK de menor tamaño al esperado y CD16 o CD56 negativos. Lo que sí es un rasgo auténticamente distintivo de estas células es la ausencia de expresión del complejo TCR/CD3, característica que permite separarlas perfectamente de la subpoblación de linfocitos T (Arnaiz-Villena, et al., 1995).

ii. Principales funciones de las células NK

El principal papel de los linfocitos NK es la destrucción rápida de células tumorales por un mecanismo de citotoxicidad independiente de la expresión de MHC clase I o MHC clase II por parte de la célula blanco. La eficacia y el espectro de lisis pueden ser ampliados por la acción de varias citocinas, fundamentalmente IL-2. Sin embargo, conviene aclarar que esta actividad citotóxica no dependiente de MHC no es exclusiva de las células NK: existen células T (CD3/TCR positivas, (tanto α como β) que adquieren esta función tras su activación, principalmente por IL-2 (Arnaiz-Villena, et al., 1995).

c. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC)

Ha sido la más estudiada y es dependiente del receptor Fc de baja afinidad de inmunoglobulinas G, que poseen receptores RFc o CD16. Funciona reconociendo la fracción Fc de los anticuerpos que recubren a la célula blanco, lo que les permite activarse y lisar a la célula blanco (Lanier, 1998). Los mecanismos utilizados para lisar a las células blanco se pueden resumir en dos tipos: mecanismo membranolítico y mecanismo de muerte celular programada o apoptosis; generalmente en la lisis de cualquier determinada célula blanco ocurre una mezcla de los dos (Sepúlveda y Puente, 2000).

El actual concepto de citotoxicidad de células T sugiere que un contacto celular inicial de blanco-asesino es seguido por un golpe letal dependiente de calcio y una lisis subsecuente, sin ningún otro involucramiento de la célula asesina. Estudios con microscopía electrónica de citotoxicidad de células T y células NK han mostrado que la membrana de células asesinas se polariza y gránulos preexistentes son secretados en el espacio estrecho entre las células asesinas y su presa (Henkart & Henkart, 1982). Estudios

posteriores han medido la liberación de componentes granulados solubles después de la entrega de un estímulo desencadenante (Pasternack, et al., 1986). Este debe ser polivalente, como una unión de ligando inmovilizada, y ser dependiente de calcio. Una variedad de esterasas se han identificado como esenciales para la actividad lítica (Simon, Prester, Kramer & Fruth, 1989).

La muerte de células blanco es acompañada por varios eventos característicos, incluyendo apoptosis, fragmentación de ADN y producción de ácidos grasos (Russell, 1983).

4. Inmunidad adquirida o específica

Se refiere a las defensas que implican el reconocimiento específico de un microorganismo una vez que este ha abierto una brecha en las defensas de la inmunidad innata. La inmunidad adquirida se basa en una respuesta específica contra un microorganismo específico; se adapta o se ajusta para ocuparse de un microorganismo en particular. Al contrario de lo que sucede con la inmunidad innata, la inmunidad adquirida es más lenta para responder, pero tiene un componente de memoria. La inmunidad adquirida involucra a los linfocitos (un tipo de leucocito) denominados linfocitos T (Células T) y linfocitos B (Células B) (Tortora, et al., 2007).

La inmunidad adquirida puede obtenerse en forma activa por infección natural y en forma pasiva por tratamiento con antisueros o sueros inmunes. También puede adquirirse pasivamente y de manera natural, como en el caso de la inmunidad materno-fetal, donde los anticuerpos producidos por la madre atraviesan la barrera placentaria y se vierten a la circulación fetal o puede ser inducida de manera artificial por vacunación (Rojas-Espinosa, 2006).

La inmunidad adquirida depende de la existencia y función de un sistema celular altamente especializado y que los efectores de esta forma de inmunidad incluyen tanto elementos celulares como solubles, de aquí los términos de inmunidad celular e inmunidad humoral (Rojas-Espinosa, 2006).

B. Evaluación de la respuesta inmunológica innata

La respuesta inmunológica innata se puede determinar con dos técnicas:

1. *In vivo*

Estudian la función de los linfocitos T, responsables de la hipersensibilidad retardada o de tipo IV. Incluyen pruebas como la reacción de la tuberculina (Universidad Complutense, 2009).

2. *In vitro*

Se realiza en una placa portaobjetos, tiñendo el extendido de una gota de sangre venosa con el colorante de Wright. Permite establecer el porcentaje y número absoluto (cuando se complementa con el recuento de leucocitos totales) de las subpoblaciones más importantes de leucocitos en sangre periférica (Rugeles, et al., 2009).

1. Técnica *in vitro*

Dada la complejidad de las interacciones entre las células del sistema inmunitario, es casi imposible establecer la funcionalidad de cada célula por separado mientras actúan en conjunto. Por lo tanto, para evaluar la funcionalidad de las células de forma individual primero se debe recurrir a su aislamiento e identificación. Sin embargo, es importante recalcar que existe el inconveniente de que las células se comportan de manera distinta *in vitro* e *in vivo* (Delves, et al., 2006).

Para llevar a cabo dichos procedimientos generalmente se utiliza sangre periférica completa, sin importar el anticoagulante que se utilice. También se pueden utilizar órganos y tejidos linfoides (*post mortem*) (Rubio, García y Romeros, 2016).

a. Aislamiento y separación de células

Las células inmunes se pueden separar por varios métodos:

i. Métodos Físicos

- **Aislamiento por centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque):** Con esta técnica se puede obtener de forma separada las células mononucleares (linfocitos y monocitos) de los granulocitos (Universidad Complutense, 2009).
- **Separación por adhesión selectiva:** Esta técnica se fundamenta en la capacidad que tienen los monocitos de adherirse a superficies de vidrio o plástico, que permite separarlos de los linfocitos. Empleando columnas o jeringas de lana de nailon o de algodón a las que se fijan los linfocitos B, se consigue separar los linfocitos B de los linfocitos T (Rubio, et al., 2016).

ii. Estudio de marcadores y antígenos de membrana

Las técnicas más empleadas son:

- Citometría de flujo con FACS (separador celular activado por fluorescencia).
- Separación por sus antígenos de membrana:
 - Separación magnética
 - Separación por afinidad en columnas
- Formación de rosetas por linfocitos B y T (Universidad Complutense, 2009).
- Inmunohistoquímica (Rugeles, et al., 2009).

b. Pruebas que miden la funcionalidad de las células inmunes

i. Pruebas de proliferación celular

Se basan en que los linfocitos que reconocen un antígeno determinado se estimulan y proliferan (Universidad Complutense, 2009).

Hay dos ensayos fundamentales:

- Ensayo de linfoproliferación: Método normalmente utilizado para diferenciar o cuantificar poblaciones de linfocitos. Se basa en que los linfocitos proliferan tras su estimulación con un mitógeno (inespecífico) o con un marcador específico (Rubio, et al., 2016).
- Reacción linfocitaria mixta: Medida de histocompatibilidad. Los linfocitos de la sangre periférica de dos individuos se mezclan en un cultivo de tejidos por varios días. Los linfocitos de individuos incompatibles se estimularán mutuamente y proliferarán significativamente (medido por la captación de timidina tritiada), en tanto aquellos que pertenecen a individuos compatibles, no lo harán (Detrick, et al., 2002).

ii. Determinación de la producción de citoquinas (IFN- γ)

Sirve para la valoración de la funcionalidad de linfocitos T CD4+. La producción de citoquinas evidencia la funcionalidad de los linfocitos Th, e incluso puede identificar la subpoblación (Th1 o Th2) (Universidad Complutense, 2009).

- Prueba del Interferón- γ : Este método es el más comúnmente utilizado, en cuanto a medición del nivel proteico. La medición se hace con la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Esta técnica de inmunoensayo permite fijar a un soporte sólido un anticuerpo monoclonal frente a la citoquina en estudio, luego se añade un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente que cataliza esta reacción y genera un producto cuya intensidad de color es fácilmente medible por espectrofotometría (Nieves, 2012).
- ELISPOT: Es una versión modificada de ELISA (Yang & Lim, 2010). Esta técnica permite conocer la frecuencia de células sintetizadoras de una determinada citoquina (Nieves, 2012).
- Detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo (Delgado, Pérez y Castellanos, 2014).

iii. Ensayos de citotoxicidad

Sirve para la valoración de la funcionalidad de los linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos y de las células NK. Determinan la capacidad del linfocito Tc para lisar células diana que presenten el complejo péptido-CMH I específico que reconocen. Estas células diana al haber sido cultivadas previamente con cromo radiactivo (Cr51), cuando se lisan liberan radiactividad que se mide. Se realiza con linfocitos aislados de sangre periférica (Universidad Complutense, 2009).

Un ensayo similar se emplea para valorar la actividad citotóxica de las células NK de sangre periférica, generalmente empleando líneas celulares tumorales sensibles (ya que las células NK no están restringidas por el CMH I) (Universidad Complutense, 2009).

2. Neutrófilos y macrófagos

La evaluación funcional de estas células incluye pruebas que se enfocan en distintos aspectos de su actividad: la capacidad fagocítica, la capacidad microbicida, la respuesta quimiotáctica, y la activación del metabolismo celular (Lomonte, 2009).

Existen diversas técnicas para la evaluación de la actividad fagocítica. Su principio general consiste en incubar una fracción rica en leucocitos (obtenida de sangre periférica) con una suspensión de partículas inertes (ej. Microesferas de látex) o de microorganismos (ej. Bacterias como *Staphylococcus* o levaduras como *Candida* o *Saccharomyces*), para permitir la fagocitosis, y luego cuantificarla mediante la observación microscópica de las células teñidas en portaobjetos. Sin embargo, un problema general de estos métodos es la imposibilidad de diferenciar entre las partículas fagocitadas y aquellas que solo se ha adherido superficialmente a las células, dado que la lectura microscópica simple es inherentemente bidimensional (Lomonte, 2009).

Por otro lado, las técnicas que evalúan la actividad microbicida de los fagocitos proveen resultados más significativos, pues van más allá de la simple ingestión de los microorganismos y determinan si los fagocitos son capaces de aniquilarlos. Estos métodos son más laboriosos que los anteriormente descritos. En estos se incuban los fagocitos con una cantidad determinada de un microorganismo (bacterias, levadura), y después de un

tiempo de incubación, se realiza un recuento de la viabilidad residual del agente microbiano. La disminución del número original de unidades formadoras de colonias (UFC) nos indica la destrucción del agente por parte de los fagocitos (Lomonte, 2009).

Un método simple y útil para evaluar la activación del metabolismo celular (también denominado "estallido respiratorio" post-activación) de los fagocitos sanguíneos, es la prueba de reducción del Nitroazul de tetrazolio. Con ella se puede evaluar pacientes en estudio por inmunodeficiencia, principalmente niños, como un primer análisis de su sistema fagocítico. El NBT (nitrobluetetrazolium) es un compuesto soluble amarillo que, al ser endocitado y reducido por la acción de enzimas intracelulares del fagocito, precipita en forma de cristales color púrpura oscuro (cristales de formazán). En ciertas deficiencias innatas de los fagocitos como la enfermedad granulomatosa crónica, existen defectos genéticos que afectan al sistema de oxidasas del NADPH generadoras de anión superóxido (ej. citocromos), lo cual disminuye su capacidad microbicida y expone a los pacientes a serias infecciones bacterianas y fúngicas. Estos defectos se pueden detectar en el laboratorio como una incapacidad de los fagocitos para reducir el NBT. En individuos normales, cuando se estimula a los fagocitos con lipopolisacáridos (LPS) bacterianos u otros agentes (ej. ésteres de forbol como el PMA), se observa que la gran mayoría de las células (>90%) reducen el NBT, generando formazán (Lomonte, 2009).

La ausencia de reducción del NBT (<10% de células positivas) en leucocitos que han sido estimulados por LPS indica que existe un defecto metabólico importante, usualmente asociado con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) u otros trastornos de los fagocitos. Otra condición que puede inducir valores bajos en la reducción del NBT es la deficiencia de deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (G6PD). Se ha descrito que, ocasionalmente, algunos pacientes que cursan con infecciones pueden dar porcentajes altos en la prueba sin estímulo con LPS, probablemente por la activación de los fagocitos *in vivo* (Lomonte, 2009).

C. Estudios realizados sobre inmunidad celular inespecífica

Sierra y colaboradores, junto con la División de Alergia, Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad Médica de New Jersey, en el año 1998, evaluaron la respuesta inmune celular en pacientes con diagnóstico de neuropatía epidémica por medio

de un ensayo de linfoproliferación. Este ensayo reportó una sensibilidad del 96% y especificidad del 100%.

Para ello se aislaron las células mononucleares a partir de sangre venosa periférica de pacientes y controles sanos; y se estimularon con varias concentraciones de mitógenos de fitohemaglutinina (PHA) y fitolaca (PWM); y varios antígenos (*Candida albicans*, toxoide tetánico, toxoide diftérico, estreptoquinasa y antígenos virales de las cepas 44-93 IPK ECP-L y 47-93 CA9). En el sobrenadante de cultivo de las células estimuladas con PHA se cuantificaron varias citoquinas (IL-2, IL-10, TNF alfa e IFN gamma) y marcadores solubles (CD4, CD8, CD23 y beta 2 microglobulina).

Al estudiar la respuesta inmune de los pacientes frente a los agentes virales aislados, se constató un menor nivel de respuesta celular en pacientes con neuropatía periférica con respecto a controles sanos. Este menor grado de reconocimiento inmune del virus en los pacientes fue selectivo para esos antígenos, al haberse comprobado una respuesta proliferativa de células T normal frente a mitógenos y antígenos convencionales. De los marcadores solubles estudiados, se observó diferencia en los niveles de IL-2, los cuales fueron 4 veces más altos en sobrenadantes de cultivo de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA en pacientes con respecto a controles sanos.

Muñoz y colaboradores en el año 2000, estandarizaron un método simple para evaluar desórdenes de la fagocitosis y del sistema bactericida dependiente del oxígeno, en pacientes sospechosos de Enfermedad granulomatosa crónica (EGC) que acudieron al Hospital Nacional de Niños en Costa Rica.

Este método determina la formación de formazán como producto de la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), el cual es solubilizado con ayuda de hidróxido de potasio (KOH) y dimetilsulfóxido (DMSO) debido a que aumenta la sensibilidad y exactitud del ensayo. Se mide la absorbancia del formazán resultante por medio de espectrofotometría en un lector de placas para microELISA.

En los pocillos donde las células son incubadas junto a un estimulante, se desarrolla un precipitado color azul oscuro donde la intensidad es directamente proporcional a la cantidad del precipitado observado.

El precipitado observado fue más evidente para las bacterias vivas, leve para las muertas y casi indetectable para el lipopolisacárido y las células sin estimulante.

Torres y colaboradores en el año 2004, estudiaron la función fagocítica de los neutrófilos obtenidos de la sangre periférica de 30 donantes procedentes del Departamento de Medicina Transfusional del Instituto de Hematología e Inmunología en Cuba. Se determinó la viabilidad celular con la técnica de exclusión del azul tripán que fue superior al 95 % y la fagocitosis por medio del enfrentamiento de los neutrófilos aislados con *Candida albicans*, previamente opsonizada, en los tiempos 0', 15' y 60'. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular ni entre la función fagocítica, al aplicar una t de Student para muestras pareadas, entre los neutrófilos el día de su aislamiento y 24 horas después.

Se concluyó que se puede realizar la función fagocítica incluso 24 horas después de aislados los neutrófilos y guardados en condiciones especiales (RPMI 1640 al 10 % de suero fetal bovino y D-glucosa 2mg/mL), lo cual permite estudiar el efecto *in vitro* de diferentes sustancias como extractos de plantas, de animales, e incluso de productos sintéticos sobre los neutrófilos. La prueba de función fagocítica reportó una sensibilidad del 87%.

Alkouwatli y colaboradores en el año 2005, evaluaron la efectividad de la medición de la capacidad de depuración de partículas de la sangre en ratones BALB/c inoculados con distintos microorganismos. Esta depuración es una medida de la capacidad funcional del sistema fagocítico mononuclear responsable de la eliminación sistémica de microorganismos patógenos, inmunocomplejos y células apoptóticas. Puede ser alterada por agentes modificadores de la respuesta biológica, entre los que figuran numerosos agentes antimicrobianos.

Se obtuvo, que el tratamiento con azitromicina durante 10 y 20 días disminuyó la capacidad de depuración del sistema fagocítico-mononuclear. Además, el efecto antiinflamatorio de la azitromicina en tratamientos de larga duración, disminuyó efectividad de la medición de la capacidad de depuración de partículas de la sangre por medio de la inhibición de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los neutrófilos y células citotóxicas son células del sistema inmune que llevan a cabo el proceso de fagocitosis, el cual es de vital importancia en la defensa del organismo contra las infecciones.

En este proceso, los neutrófilos y células citotóxicas captan microorganismos y cualquier partícula nociva para el organismo, los cuales ingieren con el fin de eliminarlos. Para que este proceso se lleve a cabo efectivamente, es necesario que el sistema inmune de un individuo se encuentre trabajando en perfectas condiciones para poder combatir los procesos infecciosos a los cuales puede verse enfrentado.

La presente investigación se llevó a cabo con el fin de establecer tres ensayos para evaluar la capacidad fagocítica, tanto cualitativamente como cuantitativamente. Estos ensayos fueron utilizados para evaluar si ciertos extractos de plantas estimulan o inhiben dicha capacidad en neutrófilos y células citotóxicas. De esta manera, se logró determinar si la capacidad inmunomoduladora de productos naturales puede ser una fuente de asistencia a estas células al momento de responder ante un proceso infeccioso, en caso de que se encuentre inmunosupreso por afecciones que pueda estar cursando un individuo.

La Unidad de investigación en Inmunología y Hematología, así como la Unidad de Bioensayos, harán un avance significativo al adoptar metodologías para la evaluación del efecto sobre la capacidad fagocítica y establecer la actividad biológica de inmunomodulación que poseen plantas de la región. El estudio de sus propiedades será de beneficio para la recomendación de su uso, como coadyuvantes naturales.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Establecer tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas.

B. Objetivos Específicos

1. Estandarizar los tres ensayos de la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas utilizando sangre humana.
2. Determinar la capacidad inmunomoduladora de cinco extractos de plantas sobre el proceso de fagocitosis llevado a cabo por neutrófilos y células citotóxicas.

VI. HIPÓTESIS

Por ser un estudio exploratorio no se plantea hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas.

B. Muestra

Sangre completa con EDTA

C. Recursos

1. Humanos

a. Asesor

MA. Ana Margarita Paz Morales de Ramírez

Co-Asesor

MSc. Pedro Pablo Martínez Rojas

b. Estudiantes

Sasha Janeth Yoc Gatica

Andrea Jeanette Osorio Vides

2. Materiales

- Tubos al vacío con EDTA de 4.5 mL
- Tubos al vacío con heparina de 4.5 mL
- Tubos Ficoll
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo siliconizados
- Suspensión de *Staphylococcus coagulasa* negativo (1.5×10^8 UFC/mL)
- Lipopolisacárido purificado de *Escherichia coli* O55:B5 SIGMA® (25 µg/mL)
- Rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*
- Rizoma y hoja de *Phlebodium decumanum*

- Rizoma de *Smilax domingensis*
- Hoja de *Petiveria alliacea*
- Sangre de carnero
- Jeringas de 10 mL
- Torundas de algodón
- Ligadura
- Curitas redondas
- Guantes de látex
- Pipetas Pasteur plásticas de 3 mL
- Gradilla
- Marcador permanente
- Portaobjetos
- Cronómetro
- Papel limpiantes
- Tips azules
- Toallas de papel
- Gasas

3. Equipo

- Microscopio
- Centrífuga
- Incubadora
- Pipeta calibrada de 500 a 1000 uL
- Mechero
- Pinza
- Cámara de Neubauer

4. Reactivos

- CPDA (Solución anticoagulante citrato, fosfatos, dextrosa y adenina)
- Manitol/Dextrosa
- Histopaque 1077
- Solución salina 0.85%
- Buffer de fosfatos (PBS), pH 7,2

- Buffer de barbital sódico, pH 7,2
- Alcohol etílico al 70%
- Aceite de inmersión
- Nitroazul de tetrazolio (NBT) al 0.15%
- Reactivos para la tinción de Wright

5. Institucionales

Laboratorio del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

D. Diseño experimental

1. Tipo de estudio

El estudio es de tipo prospectivo, longitudinal y exploratorio.

2. Unidad de análisis

Se basó en neutrófilos y células citotóxicas obtenidas del plasma de los participantes.

E. Procedimiento

Los tres métodos se estandarizaron utilizando una muestra de sangre venosa humana y como anticoagulante EDTA.

Los participantes del estudio se seleccionaron después de verificar que no presenten ningún síntoma o signo sugestivo de estar cursando una infección. Se realizó un examen de hematología completa a cada uno para corroborar que los glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB) y plaquetas se encuentren dentro de los valores de referencia establecidos:

GR: 4.00-5.40 M/uL

GB: 4.50-11.50 K/uL

Plaquetas: 150-500 K/uL

1. Estandarización de los métodos

a. Obtención de muestra de sangre

- Se entabló comunicación con el participante.
- Se colocaron los guantes de látex.
- Se preparó material para venopunción.
- Se inspeccionó e identificó visualmente la vena.
- Se colocó la liga.
- Se palpó la vena.
- Se limpió el área con una torunda de alcohol impregnada con alcohol al 70% (No se debe volver a tocar el área una vez desinfectada).
- Se colocó la aguja alineada con la vena, en un ángulo de 15 grados y con el bisel hacia arriba.
- Se puncionó la vena con un solo movimiento directo y único piel y vena.
- Se observó que comenzara a fluir la sangre dentro del tubo de hematología, utilizando como anticoagulante EDTA.
- Una vez se llenó el tubo, se retiró la liga y la aguja, respectivamente.
- Se colocó una torunda de algodón firmemente en el sitio de la venopunción.
- Se descartó la aguja en descarte de punzocortantes y demás materiales en bolsa roja.

b. Fagocitosis *in vitro*

Se realizó de acuerdo con Escobar, (2012):

- Se obtuvo de un individuo 10 mL de sangre venosa distribuida en dos tubos con EDTA. Uno de los tubos se rotuló como muestra y el otro como control.
- Ambos tubos se colocaron en una superficie plana de forma vertical por 30 minutos a 37C.
- Se preparó una suspensión de *Staphylococcus* coagulasa negativo (1.5×10^8 UFC/mL), utilizando un estándar de McFarland 0.5 para ajustar turbidez.

- Se rotularon dos tubos de ensayo siliconizados como muestra y control. Se separó el plasma rico en leucocitos con mucho cuidado en los tubos de ensayo siliconizado, respectivamente, sin traer consigo el paquete de glóbulos rojos.
- Se centrifugaron los plasmas ricos en leucocitos a 500 rpm durante 3 minutos y luego se descartó el sobrenadante.
- Se resuspendió el sedimento celular en 5 mL de solución salina.
- Nuevamente se rotularon dos tubos de ensayo como muestra y control y se colocó en ellos 2 mL de plasma, respectivamente. Además, al tubo muestra se agregó 2 mL de la suspensión de *Staphylococcus* coagulasa negativo. Se incubó durante 30 minutos a 37°C ambos tubos.
- Se depositó una gota del tubo muestra en uno de los extremos de un portaobjetos y en el otro extremo una gota del tubo control. Se prepararon los frotis y se tiñeron con colorante de Wrigth. Se examinaron con aceite de inmersión diez campos y se observaron las bacterias ingeridas por los polimorfonucleares.
- El resultado se representó como un promedio de polimorfonucleares positivos (con bacterias ingeridas) por campo.

c. Ensayo de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT)

Se realizó de acuerdo con Wilkinson, (1985):

- Se obtuvo de un individuo 1 mL de sangre venosa en un tubo con EDTA.
- Se mezcló 100 μ L y 10 μ L de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O55:B5 (25 μ g/mL en PBS).
Se corrió una muestra estimulada con LPS y otra sin estimular. Se incluyó un control normal en la prueba. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 100 μ L de solución de NBT 0.15% e incubo por 15 minutos a 37°C, en la oscuridad.
- Se preparó un frote de cada tubo y se tiño con colorante de Wright (1 minuto en colorante y 3 minutos cubierto con agua).
- Bajo el objetivo de 100x en inmersión, se observó 100 neutrófilos y determinó el porcentaje que poseían gránulos de formazán (aparece como un precipitado oscuro púrpura, de aspecto fino a intermedio, en el citoplasma).

- Los valores de referencia para este método fueron:
 Leucocitos no-estimulados (sin LPS): $\leq 10\%$ de positividad
 Leucocitos estimulados con LPS: $\geq 80\%$ de positividad

d. Caracterización de linfocitos T

Se realizó de acuerdo con García-Tamayo, (1997):

- Se obtuvo de un individuo 10 mL de sangre venosa distribuidos en dos tubos con EDTA. Las muestras se procesaron dentro de las dos siguientes horas.
- Se separaron las células mononucleares por el método de Ficoll (González, Sáenz, Rodríguez y Porras, s.f.).
- Se mezcló la suspensión de mononucleares con la suspensión de eritrocitos de carnero y se incubó durante 5 minutos a 37°C.
- Se observó al microscopio en cámara de Neubauer las rosetas que forman los linfocitos T con los eritrocitos de carnero (aparece una célula mononuclear rodeada de eritrocitos, que dan impresión de una flor).
- Se contó un mínimo 200 linfocitos y de ellos, se determinó el porcentaje que formaban rosetas, por tener mínimo 3 eritrocitos de carnero unidos a su superficie para considerarse positivo.
- Los valores de referencia para este método fueron: 60% a 70% de positividad.

e. Linfoproliferación

Se realizó de acuerdo con Rodríguez, Ramírez, González, Oliva y Sánchez, (2009):

- Se agregó sobre 5 mL de Histopaque-1077, un volumen de 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA, con una pipeta estéril.
- Se centrifugó en frío a 2400 rpm por 20 minutos.
- Se aspiró con cuidado la capa de linfocitos.
- Se transfirió la capa de linfocitos a un tubo centrífuga, se agregó 10 mL de PBS y mezcla cuidadosamente.
- Se centrifugó a 1400 rpm por 5 minutos.
- Se aspiró el sobrenadante y luego se descartó.
- Se resuspendieron las células en 2 mL de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI), y se aforó hasta 15 mL.
- Se centrifugó la suspensión a 1400 rpm por 5 minutos.
- Se aspiró el sobrenadante y luego se descartó.

- Se resuspendieron las células en 2 mL de RPMI-FBS (suero fetal bovino), y se aforo a 10 mL.
- Se realizó un conteo manual de linfocitos en cámara de Neubauer y, posteriormente, se agregó 50 µL de mitógeno Concanavalina A.
- Se incubó por 5 días a 37°C con 5% de CO₂.
- Al finalizar los días establecidos de incubación, se realizó un conteo manual nuevamente, para comparar la cantidad de linfocitos antes y después de la incubación con el mitógeno.

2. Determinación de la capacidad inmunomoduladora de las cuatro especies vegetales

Las plantas utilizadas fueron:

- a. *Phlebodium pseudoaureum* (rizoma)
- b. *Phlebodium decumanum* (rizoma y hoja)
- c. *Smilax domingensis* (rizoma)
- d. *Petiveria alliaceae* (hoja)

Los extractos de dichas plantas fueron obtenidos en su forma cruda durante diferentes trabajos de investigación que se han llevado a cabo en la línea de trabajo de la Unidad de Bioensayos. Pertenecen a la colección de extractos de dicha unidad y se encuentran refrigerados a 4°C.

Para llevar a cabo la determinación de la capacidad inmunomoduladora, se prepararon a una concentración de 1 mg/mL y se evaluaron con cada uno de los métodos. Para ello en el procedimiento anteriormente descrito, se agregó el mismo volumen del extracto. El procedimiento estandarizado no fue modificado.

Si existió un aumento en la capacidad fagocítica de las células al adicionar los extractos en cada ensayo, el extracto fue diluido en serie de factor dos y se repitió el mismo procedimiento hasta N número de veces hasta que la actividad inmunomoduladora fuera negativa.

3. Análisis de datos

El tamaño de muestra se obtuvo utilizando EPI DAT 3.1, en el módulo de muestreo, cálculo de tamaño de muestra para pruebas diagnósticas.

Los datos se trabajaron de manera desagregada, lo cual permitió visualizar y analizar la total dispersión de los mismos y obtener resultados más significativos.

En fagocitosis *in vitro* se evaluó el coeficiente de variación, para determinar la reproducibilidad de un método analítico, homogeneidad o heterogeneidad de un método de diagnóstico y si el comportamiento de las variables en estudio siguen una distribución normal (Montero, 2007).

Se realizó el cálculo de intervalos de confianza para establecer el rango en el cual, los neutrófilos eran funcionales.

Se realizó el cálculo de las diferencias entre los valores de las medias del porcentaje de rosetas antes y después de incubación; así como las diferencias entre los valores de las medias del recuento de linfocitos antes y después de incubación. Además, contrastó si la media fue diferente a 0. Se incluye el valor p que se utiliza para determinar si los resultados son estadísticamente significativos (Rial y Varela, 2008).

Para este estudio, el tamaño de muestra corresponde al número de repeticiones que se realizó por método para evaluar la reproducibilidad de los mismos. Para evaluar dicha reproducibilidad, se obtuvo la media de cada una de las repeticiones y la desviación estándar para obtener el coeficiente de variación:

$$CV = (\sigma/\mu)*100$$

Donde:

CV = coeficiente de variación.

σ = desviación estándar de la población.

μ = media aritmética de la población.

Tamaños de muestra y precisión para pruebas diagnósticas:

Sensibilidad de los métodos: 87.000%

Prevalencia de la enfermedad en la población (en este caso corresponde a la capacidad fagocítica, que puede ocurrir o no): 50.0%

Nivel de confianza: 95.0%

Precisión (%)	Tamaño de muestra
-----	-----
10.000	89
20.000	23

Para obtener el número de repeticiones de cada método, se procedió a dividir el tamaño de muestra dentro de 3, el cual corresponde al número de métodos investigados en este estudio.

$$\text{Número de repeticiones} = 89/3 = 29.67$$

$$\text{Número de repeticiones} = 23/3 = 7.67 = 8 \text{ repeticiones por método.}$$

Al evaluar con una precisión del 10%, el número de repeticiones sería muy elevado, mientras que con una precisión del 20% se obtiene un número de repeticiones considerable y significativo para el estudio debido a que con dicha precisión, se establece que el estudio es válido.

4. Aspectos éticos de la investigación

Para la realización del presente trabajo de investigación se hizo una carta de consentimiento informado para que los participantes firmaran de enterados del propósito del estudio y el fin con el que se utilizó su sangre (Anexo 1).

VIII. RESULTADOS

A. Estandarización de ensayos

1. Fagocitosis *in vitro*

En la Tabla 1, se resumen las condiciones finales; con las cuales se estandarizó el ensayo de fagocitosis *in vitro*; siendo estas: Sangre completa humana con anticoagulante EDTA/K2, separación de polimorfonucleares con la técnica de Ficoll Hypaque con el reactivo Histopaque-1119 (Anexo 2), lavado de la suspensión de polimorfonucleares obtenidos con solución salina estéril (SS), *Staphylococcus epidermidis* como elemento a fagocitar y tinción de Wright para evaluar neutrófilos positivos (Anexo 3).

Tabla 1. Resumen de las condiciones finales de estandarización del ensayo de fagocitosis *in vitro*.

Muestra	8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2.
Aislamiento de neutrófilos	Separación por gradientes de densidad con Histopaque®-1119. - 6 mL de sangre completa con EDTA/K2 - 3 mL de Histopaque®-1119.
Centrifugación	50 minutos a 700 rpm
Solución de lavado	Solución salina estéril
Suspensión de neutrófilos	2 mL
Suspensión de microorganismos	2 mL de suspensión de <i>Staphylococcus epidermidis</i> equivalente al 0.5 de la escala de McFarland.
Incubación	45 minutos a 37°C
Tinción	Wright
Control	2 neutrófilos positivos/campo

mL= mililitro, EDTA = ácido etilendiaminotetraacético, rpm = revoluciones por minuto, °C = grados Celsius.

En la Tabla 2, se muestra el número de neutrófilos positivos por campo observados en cada una de las repeticiones realizadas por participante; siendo el participante 1 y, los participantes 4 y 6, los que presentaron el mayor y menor número de neutrófilos positivos por campo, respectivamente.

Tabla 2. Neutrófilos positivos observados por campo.

Participante	Neutrófilos positivos
1	3
	3
	2
2	1
	2
	0
3	2
	1
	1
4	1
	1
	0
5	3
	2
	2
6	1
	1
	0
7	1
	1
	1
8	2
	1
	2

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

Se realizó la estimación del porcentaje del coeficiente de variación por medio del cálculo de la media, desviación estándar y el coeficiente de variación del promedio obtenido de las tres repeticiones que se realizaron por participante, para determinar si el ensayo de fagocitosis *in vitro* fue homogéneo o heterogéneo. El valor de referencia para determinarlo es 50%. El porcentaje del coeficiente de variación fue 62% (Tabla 3).

Tabla 3. Estimación del coeficiente de variación.

μ	Σ	CV	%CV
1.42	0.88	0.62	62

μ = media, σ = desviación estándar, CV = coeficiente de variación, %CV = porcentaje del coeficiente de variación

2. Reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT)

En la Tabla 4, se resumen las condiciones finales con las cuales se estandarizó el ensayo de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT), siendo estas: sangre completa humana con anticoagulante EDTA/K2, separación de polimorfonucleares con la técnica de Ficoll Hypaque con el reactivo Histopaque-1119 (Anexo 2), lavado de la suspensión de polimorfonucleares obtenidos con solución salina estéril (SS), *Escherichia coli* ATCC 25922 como elemento a fagocitar, Nitroazul de tetrazolio como reactivo y tinción de Wright para evaluar porcentaje de neutrófilos con gránulos (Anexo 4).

Tabla 4. Resumen de las condiciones finales de estandarización del ensayo de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT).

Muestra	8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2.
Aislamiento de neutrófilos	Separación por gradientes de densidad con Histopaque®-1119. - 6 mL de sangre completa con EDTA/K2 - 3 mL de Histopaque®-1119.
Centrifugación	50 min a 700 rpm
Solución de lavado	Solución salina estéril
Suspensión de neutrófilos	100 µL
Suspensión de microorganismos	10 µL de suspensión de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 equivalente al 0.5 de la escala de McFarland.
Incubación	- 20 minutos a temperatura ambiente - 15 minutos a 37°C (con NBT)
Reactivo	100 µl de Nitroazul de tetrazolio al 0.15%
Tinción	Wright
Control	74% de neutrófilos con gránulos

mL= mililitro, EDTA = ácido etilendiaminetetraacético, rpm = revoluciones por minuto, µL = microlitros, ATCC = American Type Culture Collection, °C = grados Celsius, % = porcentaje.

En la Tabla 5, se muestra el porcentaje de neutrófilos con gránulos y sin gránulos observados en cada una de las repeticiones realizadas por participante; siendo el participante 5 y 8, los que presentaron el mayor y menor porcentaje de neutrófilos con gránulos, respectivamente.

Tabla 5. Porcentaje de neutrófilos con gránulos y sin gránulos.

Participante	% Neutrófilos con gránulos	% Neutrófilos sin gránulos
1	72	28
	72	28
	70	30
2	54	46
	54	46
	53	47
3	67	33
	64	36
	66	34
4	61	39
	61	39
	61	39
5	76	24
	73	27
	74	26
6	74	26
	74	26
	71	29
7	42	58
	39	61
	41	59
8	37	63
	36	64
	37	63

%=porcentaje

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

Se realizó el cálculo de intervalos de confianza en el ensayo de reducción del NBT, para establecer el rango en el cual los neutrófilos son funcionales (con gránulos) y el rango en el que no son funcionales (sin gránulos); en este caso funcionales para matar a la bacteria *Escherichia coli* por medio del estallido respiratorio y realizar una comparación con los que no resultaron ser funcionales. Para ello, se llevó a cabo el cálculo de la media de los neutrófilos con gránulos y sin gránulos, con un nivel de confianza del 95%. El intervalo de confianza del 95% de la población de neutrófilos con gránulos se encontró entre el límite inferior de 54% y el superior de 65%. Por otro lado, el intervalo de confianza del

95% de la población de neutrófilos sin gránulos se encontró entre el límite inferior de 34% y el superior de 46% (Tabla 6).

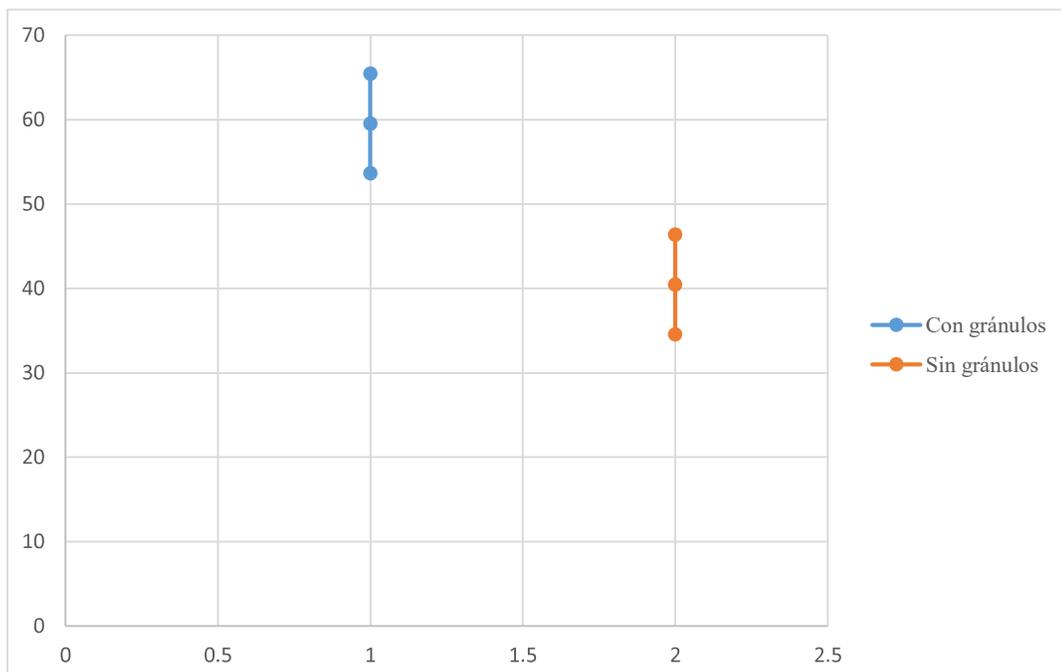
Tabla 6. Intervalos de confianza para la media de la población de neutrófilos con gránulos y sin gránulos.

Neutrófilos	μ	NC95%	Límite inferior	Límite superior
Con gránulos	59.54	5.91	53.63	65.45
Sin gránulos	40.46	5.91	34.55	46.37

μ = media, NC95% = nivel de confianza de 95 por ciento

El intervalo de confianza para la media de la población de neutrófilos con gránulos y sin gránulos está representado en azul y anaranjado, respectivamente. Se observa que el límite inferior del intervalo de confianza de los neutrófilos con gránulos no se entrecruza con el límite superior del intervalo de confianza de los neutrófilos sin gránulos de formazán. Esto indica que, el ensayo aplicado a una población, tiene la capacidad de discernimiento si es inmunocompetente o no para matar a microorganismos por medio de la acción bactericida de neutrófilos (Grafica 1).

Gráfica 1. Intervalos de confianza para la media de la población de neutrófilos con gránulos y sin gránulos de formazán.



Fuente: Datos experimentales.

3. Caracterización de linfocitos T y linfoproliferación

En la Tabla 7, se resumen las condiciones finales con las cuales se estandarizó el ensayo de caracterización de linfocitos T y linfoproliferación, siendo estas: Sangre completa humana con anticoagulante EDTA/K2, separación de polimorfonucleares con la técnica de Ficoll Hypaque con el reactivo Histopaque-1077 (Anexo 5), lavado de la suspensión de linfocitos obtenidos con buffer de fosfatos, RPMI y RPMI-FBS como medio de cultivo, recuento de linfocitos y de rosetas en cámara de Neubauer con reactivo de Turk (Anexo 6) y Lectina Conavalina A como mitógeno (Anexo 7).

Tabla 7. Resumen de las condiciones finales de estandarización del ensayo de caracterización de linfocitos T y linfoproliferación.

Muestra	8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2.
Aislamiento de linfocitos	Separación por gradientes de densidad con Histopaque®-1077. - 7 mL de sangre completa con EDTA/K2 - 7 mL de Histopaque ®-1077.
Centrifugación	- 20 minutos a 2400 rpm a 4°C - 5 minutos a 1400 rpm
Solución de lavado	Buffer de fosfatos
Medios	2 mL de medio RPMI 2 mL de medio RPMI-FBS
Recuento de linfocitos	Conteo manual en cámara de Neubauer con reactivo de Turk. Dilución 1/10. Factor 25.
Caracterización de linfocitos T	Conteo de rosetas, en cámara de Neubauer. - 10 µL de solución de eritrocitos de carnero. - 1240 µL de suspensión de linfocitos.
Mitógeno	50 µL de Lectina Conavalina A
Incubación	5 días a 37°C con 5% CO ₂
Control	3058 linfocitos/mm ³

mL= mililitro, EDTA = ácido etilendiaminotetraacético, rpm = revoluciones por minuto, °C = grados Celsius, RPMI = Roswell Park Memorial Institute, RPMI-FBS = Roswell Park Memorial Institute con suero fetal bovino, µl = microlitros, % = porcentaje, CO₂= dióxido de carbono, mm³ = milímetros cúbicos

En la Tabla 8, se muestra el porcentaje de rosetas observadas antes y después de la incubación con Conavalina A; siendo el participante 5 y 3, los que presentaron el mayor y menor porcentaje de rosetas después de la incubación con el mitógeno, respectivamente.

Tabla 8. Porcentaje de rosetas observadas antes y después de la incubación con Concavalina A.

Participante	PREINCUBACIÓN	POSTINCUBACIÓN
	%Rosetas	%Rosetas
1	8	14
	6	12
	7	10
2	10	17
	10	16
	10	16
3	4	9
	4	8
	3	6
4	5	11
	3	9
	4	8
5	11	19
	9	17
	11	19
6	6	12
	5	10
	4	10
7	4	11
	4	9
	4	8
8	9	15
	6	12
	8	13

%=porcentaje

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

En la Tabla 9, se muestra el recuento de linfocitos antes y después de la incubación con Concavalina A; siendo el participante 5 y 4, los que presentaron el mayor y menor recuento de linfocitos después de la incubación con el mitógeno, respectivamente.

Tabla 9. Recuento de linfocitos antes y después de la incubación con Concavalina A.

Participante	PREINCUBACIÓN	POSTINCUBACIÓN
	Linfocitos por mm ³	Linfocitos por mm ³
1	625	1175
	550	1100
	575	1100
2	700	2050
	650	1975
	625	2000
3	475	1225
	375	1225
	400	1150
4	425	700
	375	700
	425	700
5	1050	3100
	950	3000
	1000	3075
6	525	900
	500	825
	500	800
7	900	1075
	900	1025
	875	1000
8	625	1925
	500	1850
	525	1800

mm³=milímetro cúbico

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

Se realizó el procedimiento de prueba T para muestras relacionadas con los datos obtenidos en el ensayo de caracterización de linfocitos T y linfoproliferación. El análisis en el programa de Excel realizó el cálculo de las diferencias entre los valores de las medias del porcentaje de rosetas antes y después de incubación y las diferencias entre los valores de las medias del recuento de linfocitos antes y después de incubación, donde generó los datos observados en las Tablas 10 y 11, respectivamente. Además, contrastó si la media fue diferente a 0. Se incluye el valor p que se utiliza para determinar si los resultados son estadísticamente significativos (Rial y Varela, 2008).

En el análisis de la caracterización de linfocitos T y linfoproliferación, se determinó que las medias de preincubación y postincubación con el mitógeno Concaivalina A fueron diferentes a 0 y aumentó su valor. El valor p obtenido para cada uno de los ensayos mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa al compararlos con el nivel de significancia alfa (α), que suele ser un valor de 0.05.

Tabla 10. Prueba T para medias de porcentaje de rosetas antes y después de incubación.

	Preincubación	Postincubación
Media	6.45833333	12.125
Varianza	7.30253623	13.8532609
Observaciones	24	24
Coefficiente de correlación de Pearson	0.95370491	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	23	
Estadístico t	-19.7737199	
P(T<=t) una cola	3.0981E-16	
Valor crítico de t (una cola)	1.71387153	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

Tabla 11. Prueba T para medias de recuento de linfocitos antes y después de incubación.

	Preincubación	Postincubación
Media	627.0833333	1478.125
Varianza	43473.73188	566593.0707
Observaciones	24	24
Coefficiente de correlación de Pearson	0.65287619	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	23	
Estadístico t	-6.550232314	
P(T<=t) una cola	5.51957E-07	
Valor crítico de t (una cola)	1.713871528	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

B. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de extractos de plantas sobre los leucocitos

Los extractos de las plantas se prepararon a una concentración de 50 mg/mL (Anexo 8). Cada uno de los extractos se evaluó en los ensayos fagocitosis *in vitro*, reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) y caracterización de linfocitos T y linfoproliferación, por triplicado, utilizando una sola muestra.

En el ensayo de fagocitosis *in vitro* (Tabla 12), se observó una disminución en el número de neutrófilos positivos al evaluarse cada uno de los extractos por triplicado, comparados con el control de 2 neutrófilos positivos/campo.

Tabla 12. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de extractos de plantas en la fagocitosis *in vitro*.

Extracto [50 mg/mL]	Neutrófilos positivos/campo
Control	2
<i>Phlebodium decumanum</i> (Hoja)	0
<i>Phlebodium decumanum</i> (Rizoma)	1
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Rizoma)	1
<i>Petiveria alliacea</i> (Hoja)	1
<i>Smilax domingensis</i> (Rizoma)	0

mg/ml = miligramo por mililitro

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

En el ensayo de reducción del NBT (Tabla 13), al evaluarse cada uno de los extractos por triplicado, se observó una disminución del porcentaje de neutrófilos con gránulos comparados con el control de 74% de neutrófilos con gránulos.

Tabla 13. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de extractos en la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT).

Extracto [50 mg/mL]	% Neutrófilos con gránulos	% Neutrófilos sin gránulos
Control	74	26
<i>Phlebodium decumanum</i> (Hoja)	2	98
<i>Phlebodium decumanum</i> (Rizoma)	9	91
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Rizoma)	3	97
<i>Petiveria alliacea</i> (Hoja)	12	88
<i>Smilax domingensis</i> (Rizoma)	11	89

mg/ml = miligramo por mililitro, % = porcentaje

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

En el ensayo de linfoproliferación (Tabla 14), se observó una disminución del recuento de linfocitos por milímetro cúbico (mm^3) al evaluar por triplicado, el extracto del rizoma de *Phlebodium decumanum* y *Phlebodium pseudoaureum*; y el extracto de la hoja de *Petiveria alliacea* comparados con el control de 3058 linfocitos/ mm^3 . Por el contrario, se observó un aumento del recuento de linfocitos con el extracto de la hoja y rizoma de *Phlebodium decumanum* y *Smilax domingensis*, respectivamente; comparados con el control.

Tabla 14. Evaluación de la capacidad mitogénica de extractos en la linfoproliferación.

Extracto [50 mg/mL]	Linfocitos/ mm^3
Control	3058
<i>Phlebodium decumanum</i> (Hoja)	5575
<i>Phlebodium decumanum</i> (Rizoma)	1225
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Rizoma)	2225
<i>Petiveria alliacea</i> (Hoja)	2175
<i>Smilax domingensis</i> (Rizoma)	4050

mg/ml = miligramo por mililitro, mm^3 =milímetro cúbico

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio del Departamento de Citohistología.

IX. DISCUSIÓN

El presente seminario de investigación estableció tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas. Para ello se llevó a cabo en dos partes: la estandarización de dos ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica y la evaluación de la actividad inmunomoduladora de cinco extractos de plantas.

A. Estandarización de ensayos.

Aunque la literatura recomienda citrato de sodio como anticoagulante para el ensayo de fagocitosis *in vitro* (Escobar, 2012), se evaluó el uso del anticoagulante EDTA/K2 ya que es más fácil de obtener, es de menor costo y respeta la morfología eritrocitaria y leucocitaria asegurando su conservación durante 24 horas si se mantiene a 4°C (Vives y Aguilar, 2006).

El tiempo de incubación de la suspensión de polimorfonucleares con la suspensión de *Staphylococcus epidermidis* se aumentó de 30 a 45 minutos porque al realizar la prueba incubando durante 30 minutos, se observó que la fagocitosis fue mínima y al aumentar el tiempo de incubación a 45 minutos, el número de neutrófilos positivos fue mayor por el incremento en el tiempo que obtuvo el neutrófilo para realizar su acción fagocítica.

En la estandarización del ensayo de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) (Anexo 4), el tiempo de centrifugación de la sangre completa con el Histopaque-1119 fue prolongado de 30 a 50 minutos porque al realizar el procedimiento la primera vez durante 30 minutos, la capa de polimorfonucleares obtenida fue pobre y las capas de los otros componentes sanguíneos no estaban definidas. Al aumentar el tiempo de centrifugación a 50 minutos, la capa de polimorfonucleares fue mayor y las otras capas mencionadas, estaban definidas.

En la estandarización del ensayo de caracterización de linfocitos T y linfoproliferación (Anexo 7), el volumen de muestra e Histopaque-1077, se aumentó de 5 a 7 mililitros (mL) porque al realizar el procedimiento la primera vez con 5 ml, la recuperación de linfocitos fue deficiente debido a que corresponde a un porcentaje menor del recuento de glóbulos

blancos en sangre, comparado con el porcentaje de neutrófilos, el cual es mayor. Al utilizar 7 ml, la recuperación de linfocitos fue mayor.

El tiempo de incubación para la formación de rosetas aumentó de 5 a 75 minutos a 37°C porque al realizar el procedimiento la primera vez, la unión fue débil y se disgregaban con facilidad antes de poder visualizarlos. Al aumentar el tiempo y adicionar 5 minutos a 4°C, se observó una unión más estable y un mayor número de rosetas. De acuerdo con Quezada, Ramírez y Lomonte, (1985), el número de rosetas aumenta hasta los 60 minutos, punto en el cual se alcanza un máximo estable.

Algunos de los beneficios de haber estandarizado cada uno de los tres ensayos con las condiciones finales establecidas fueron: lograr recuperar las células de interés y observar la actividad *in vitro* que se pretendía, con la metodología establecida, para poder cumplir con el objetivo principal del estudio.

La estandarización de cada uno de los ensayos se logró ajustar a las condiciones del laboratorio de bioensayos. Se lograron disminuir costos y tiempo para ejecutar cada ensayo, al adquirir materiales y reactivos que no interfirieron con la metodología de cada uno y permitieron cumplir con el objetivo de cada uno.

Con los datos obtenidos de las pruebas estadísticas aplicadas a cada ensayo, se logró darle un tratamiento estadístico y obtener conclusiones sobre la viabilidad y sensibilidad de cada uno para que, al momento de aplicarlo como un método de diagnóstico, se tenga la certeza que los resultados obtenidos serán confiables y significativos.

B. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de extractos de plantas.

Las plantas utilizadas para la obtención de los extractos en este estudio fueron: *Phlebodium decumanum* (Hoja), *Phlebodium decumanum* (Rizoma), *Phlebodium pseudoaureum* (Rizoma), *Petiveria alliacea* (Hoja) y *Smilax domingensis* (Rizoma).

La selección de plantas se basó en el efecto de sus extractos sobre los dos tipos de células evaluadas en este estudio (neutrófilos y linfocitos), como se explica a continuación:

Los extractos de *Phlebodium decumanum* (rizoma y hoja) y *Phlebodium pseudoaureum* (rizoma) son utilizados por sus propiedades antiinflamatorias (Gattuso, Cortadi y Gattuso, 2008), mostrando un potencial efecto inhibitorio directo sobre las enzimas o la inhibición de la desgranulación de los neutrófilos (Cárdenas, Aragón, Ospina, Isaza y Pérez, 2012).

Los extractos de *Petiveria alliacea* (hoja) y *Smilax domingensis* (rizoma) también son considerados agentes antiinflamatorios. Además *Petiveria alliacea* es analgésico-antipirético, anestésico, antiespasmódico, antidispéptico, hipoglucemiante, inmunoestimulante y antimicrobiano (Antoun, Gerena & Milhous, 1993). Y *Smilax domingensis* es antifúngico, antiprurítico, antirreumático, antiséptico, cicatrizante, estimulante, diurético, diaforético, depurativo, sudorífico y tónico (Cáceres, 1996). La eficacia de los extractos de ambas plantas está dada por su capacidad de inhibir a las células polimorfonucleares durante la formación del tejido granular (Zaa, Valdivia y Marcelo, 2012).

En cuanto a la capacidad inmunomoduladora de *Petiveria alliacea* y *Smilax domingensis*, Pichardo y Teo (2010) encontraron que los extractos de hoja de *Petiveria alliacea* y rizoma de *Smilax domingensis* presentaron efecto inhibitorio sobre la actividad linfocítica o linfoproliferación.

En cuanto a la capacidad inmunomoduladora de *Phlebodium decumanum* y *Phlebodium pseudoaureum*, Álvarez (2006) encontró que el extracto de rizoma y hoja de *Phlebodium decumanum*; y el extracto de rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* presentaron efecto inhibitorio sobre la actividad linfocítica o linfoproliferación.

En el ensayo de fagocitosis *in vitro* y reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), los neutrófilos fueron inhibidos por dichos extractos, debido a que al ser comparados con los ensayos estandarizados, disminuyó la cantidad de neutrófilos observados con *Staphylococcus epidermidis* (Tabla 4) y con gránulos de formazán (Tabla 13), respectivamente.

En el ensayo de linfoproliferación, se pudo evidenciar que el extracto de *Phlebodium decumanum* (hoja) y *Smilax domingensis* (rizoma) actuaron como mitógenos, ya que al ser comparados con los ensayos estandarizados, aumentaron la cantidad de linfocitos T (Tabla

14). Se desconoce si en estudios previos se ha determinado la capacidad mitogénica de estos dos extractos, debido a que no se encontró en la literatura consultada.

Al realizar el análisis, los datos se trabajaron de manera desagregada, lo cual permitió visualizar y analizar la total dispersión de los mismos y obtener resultados más significativos.

Para el análisis del ensayo de fagocitosis *in vitro*, se realizó la estimación del coeficiente de variación, el cual determina: la reproducibilidad de un método analítico, homogeneidad o heterogeneidad de un método de diagnóstico y si el comportamiento de las variables en estudio siguen una distribución normal (Montero, 2007).

Para este caso, por ser un método de diagnóstico, se determinó que el ensayo de fagocitosis *in vitro* es heterogéneo debido a que el porcentaje del coeficiente de variación mostró un valor de 62 %, el cual se encuentra arriba del 50%, valor que es considerado de referencia para establecer si un método de diagnóstico es homogéneo u heterogéneo.

Esto indica que las muestras de la población que se estudiaron no fueron homogéneas; por lo que es preciso utilizar más criterios en la selección de la población a estudiar; aparte del criterio de selección que establece que los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas deben estar dentro de los valores de referencia previamente establecidos; como lo son sexo, edad y recuentos elevados de células; siempre y cuando se encuentren dentro de los valores de referencia previamente establecidos.

La mayor limitación de este ensayo por ser heterogéneo es que no permite combinar los resultados individuales para obtener una medida de resumen. A menos que los resultados sean estratificados y evaluados conjunto a otros parámetros.

Para el análisis del ensayo de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), se realizó el cálculo de intervalos de confianza para establecer el rango en el cual, los neutrófilos son funcionales para matar a la bacteria *Escherichia coli* por medio del estallido respiratorio y realizar una comparación con los que no resultaron ser funcionales.

Al observar la gráfica 1, se evidencia que el límite inferior del intervalo de confianza de los neutrófilos con gránulos no se entrecruza con el límite superior del intervalo de confianza de los neutrófilos sin gránulos de formazán. Esto indica que, el ensayo aplicado a una población, tiene la capacidad de discernimiento si es inmunocompetente o no para matar a microorganismos por medio de la acción bactericida de neutrófilos.

En el análisis de la caracterización de linfocitos T y linfoproliferación, se determinó que las medias de preincubación y postincubación con el mitógeno Concanavalina A fueron diferentes a 0 y aumentó su valor (Tablas 10 y 11). El valor p obtenido para cada uno de los ensayos mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa al compararlos con el nivel de significancia alfa (α), que suele ser un valor de 0.05.

El nivel de significancia también determina la probabilidad de error que es inherente a la prueba. Mientras más pequeño sea el nivel de significancia, menos probable es que se cometa un error. Por lo anterior, se determinó que existe una menor probabilidad de error al realizar la caracterización de linfocitos T por medio de rosetas que un recuento de linfocitos en cámara de Neubauer, debido a que, factores como precisión en el llenado de la cámara, puede conducir a más probabilidad de error al realizar el conteo.

X. CONCLUSIONES

1. Se establecieron y estandarizaron, utilizando sangre humana, tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica en condiciones de laboratorio de bioensayos.
2. El ensayo de fagocitosis *in vitro* fue considerado un método de diagnóstico heterogéneo; por lo que es preciso utilizar criterios de selección de la población a estudiar como lo son, sexo, edad y recuentos elevados de células sanguíneas.
3. El ensayo de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) mostró capacidad de discernimiento entre una población inmunocompetente y una población inmunodeficiente.
4. Los extractos evaluados en este estudio, mostraron un efecto inhibitorio sobre los neutrófilos, sin embargo debido a la limitación del ensayo, no pudo establecerse si fue debido a propiedades antiinflamatorias propias de los extractos.
5. Los extractos *Phlebodium decumanum* (hoja) y *Smilax domingensis* (rizoma) mostraron actividad mitogénica sobre linfocitos T, específicamente.

XI. RECOMENDACIONES

1. Para obtener una mayor recuperación de neutrófilos y linfocitos, se recomienda una fuente de células de mayor volumen y recuentos elevados de células, siempre y cuando se encuentren dentro de los valores de referencia previamente establecidos.
2. Fomentar estudios para determinar si el efecto inhibitorio de los extractos sobre los neutrófilos es directamente en el proceso de desgranulación o en la actividad enzimática.
3. Buscar alternativas metodológicas que no dependan de los recuentos celulares para obtener una mayor recuperación de neutrófilos y linfocitos para realizar ensayos *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica.

XII. REFERENCIAS

- Alkouwatli, K., Leiva, M., Ruiz-Bravo, A. y Jiménez-Valera, M. (2005). Técnicas de estudio de fagocitosis *in vivo* y su aplicación en la investigación de la actividad inmunomoduladora de antibióticos. *Ars Pharmaceutica*, 46(1), 43-55.
- Álvarez, E. (2006). *Actividad inmunomoduladora de rizomas y frondas de Phlebodium pseudoaureum y Phlebodium decumanum* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Antoun, M., Gerena, L. & Milhous, WK. (1993). *Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives*. Puerto Rico: Int J Pharm.
- Arnaiz-Villena, A., Regueiro, J. y López-Larrea, C. (1995). *Inmunología*. Madrid, España: Complutense.
- Brahmi, Z., Thomas, J., Park, M., Park, M., & Dowdeswell, I. (1985). The effect of acute exercise on natural killer-cell activity of trained and sedentary human subjects. *Journal of Clinical Immunology*, 5(2), 321-328.
- Cáceres A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Campbell, N. y Reece, J. (2007). *Biología*. (7ª. Ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Cárdenas, P., Aragón, D., Ospina, L., Isaza, G. y Pérez, J. (2012). Efecto de algunas especies vegetales antiinflamatorias sobre la actividad enzimática de elastasa y mieloperoxidasa. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 41(2), 67-72.
- Delgado, F., Pérez, A. y Castellanos, J. (2014). Descripción de un modelo de infección *in vitro* con virus dengue empleando células mononucleares humanas de sangre periférica. *IATREIA*, 27(3), 267-277.

- Delves, P., Martin, S., Burton, D. y Roitt, I. (2006). *Roitt Inmunología: Fundamentos*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Detrick, B., Hamilton, R. & Rose, N. (2002). Manual of Clinical Laboratory Immunology. *American Society for Microbiology*, 6(1), 54-57.
- Escobar, H. (2012). *Inmunología básica. Manual de prácticas de laboratorio*. Recuperado de:
https://issuu.com/jbescobar/docs/qu_mico_h_ctor_practicas_de_inmunolog_a_i.
- Fernández-Bostrán, R. & Větvička, V. (2000). *Advanced Methods in Cellular Immunology*. Florida, Estados Unidos: CRC Press.
- Fournier, N. (2008). *Natural killer T-cells: roles, interactions and interventions*. Nueva York, Estados Unidos: Nova Science Publishers, Inc.
- García-Tamayo, F. (1997). *Fundamentos de Inmunología*. Distrito Federal, México: Universidad Autónoma de México.
- Gattuso, M., Cortadi, A. y Gattuso, S. (2008). Caracteres morfoanatómicos de especies de *Phlebodium*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7, 10-17.
- Geffner, J. y Fainboim, L. (2008). *Introducción a la Inmunología humana*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- González, J., Bonelo, A., Arévalo, M. y Herrera, S. (1999). Los linfocitos T CD8+ en la respuesta inmune celular. *Inmunoalergia*, 8(3), 7.
- Henkart, M. & Henkart, P. (1982). Lymphocyte mediated cytolysis as a secretory phenomenon. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 146(2), 227.
- Ingraham, J. y Ingraham, C. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Barcelona, España: Reverté.

- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P. y Woods, G. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. y Mitchell, R. (2008). *Robbins patología humana*. Barcelona, España: Elsevier.
- Lanier, L. (1998). Natural killer cell receptors. *Annual Review of Immunology*, 16(3), 359-364.
- Laso, J. (2015). *Introducción a la medicina clínica. Fisiopatología y semiología*. (3ª. Ed.). Barcelona, España: Elsevier Masson.
- Lomonte, B. (2009). *Técnicas de laboratorio en Inmunología Clínica*. Recuperado de: http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/iahula/curso_2010/suplementario-tema16.pdf.
- Maillet, M. (2003). *Biología celular*. Barcelona, España: Masson.
- Montero, J. M. (2007). *Estadística descriptiva*. Madrid, España: Ediciones Paraninfo.
- Muñoz, R. y Alfaro, W. (2000). Estandarización de la técnica de reducción del NBT mediante lectura en placas de microELISA. *Revista médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 35(1), 152-158.
- Nieves, Y. (2012). *Medición de citoquinas en cultivos in vitro de células mononucleares de sangre periférica humana expuestos a Nux vómica homeopatizada*. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7236/1/5598638.2012.pdf>.
- Parham, P. (2006). *Inmunología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Pasternack, M., Verret, C., Liu, M. & Eisen, H. (1986). Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature*, 322(2), 740.

- Pichardo, N. y Teo, A. (2010). *Actividad Inmunomoduladora de Especies Cultivadas Nativas de Mesoamérica (P. alliacea L y S. domingensis Willd)*. (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Quezada, S., Ramírez, M. y Lomonte, B. (1985). Porcentaje y cifra absoluta de linfocitos T en sangre periférica por el método de rosetas E: estudio de cuarenta adultos sanos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 6(2), 7-16.
- Rial, A. y Varela, J. (2008). *Estadística Práctica para la Investigación en Ciencias de la Salud*. La Coruña, España: Netbiblo.
- Rodríguez, C., Ramírez, K., González, N., Oliva, S. y Sánchez, S. (2009). *Determinación de la actividad inmunomoduladora de los basidiomicetos comestibles: Cantherellus lateritius Singer (Berk) Singer, Armillariella polymyces (Pers.: Latell.) Sing & Clem, Laccaria amethystina Cooke, Lactarius deliciosus (L. ex Fr) S. F. Gray y Pleurotus ostreatus (Jacquim ex Fries) Kummer* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Rojas-Espinosa, O. (2006). *Inmunología*. Distrito Federal, México: Médica Panamericana.
- Rubio, F., García, B. y Romeros, S. (2016). *Técnicas de Inmunodiagnóstico*. Madrid, España: Copyright.
- Rugeles, M., Patiño, P. y Montoya, C. (2009). *Inmunología, una ciencia activa*. (2ª. Ed.). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía.
- Russell, J. (1983). Internal desintegration model of cytotoxic lymphocyte-induced target damage. *Immunological Reviews*, 72(5), 97.
- Sepúlveda, C. y Puente, J. (2000). Células Natural killer y el Sistema Inmune Innato en la Patología Infecciosa. *Revista médica de Chile*, 128(12), 1361-1370.

- Sierra, B., Más, P., Pérez, A., Sarmiento, L., Bello, M., Ávalos, I., Resik, S., Denny, T., García, G. y Guzmán, M. (1998). Nuevas evidencias de la relación antigénica entre los virus de la neuropatía epidémica y el sistema nervioso humano. Estudio de la respuesta inmune celular en pacientes con neuropatía epidémica y controles. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 50, 249-253.
- Silva, M. y García, M. (2004). *Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínico*. Madrid, España: MAD.
- Simon, M., Prester, M., Kramer, M. & Fruth, D. (1989). An Inhibitor Specific for the Mouse T cell-associated Serine Proteinase 1 (TSP-1) Inhibits the Cytolytic Potential of Cytoplasmic Granules but not in Intact Cytolytic T cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 40(2), 4.
- Torres, I., del Valle, L., Marsán, V., Socarrás, B. y Macías, C. (2004). Evaluación evolutiva de la función fagocítica de los polimorfonucleares. *Revista Cubana de Hematología*, 20(2), 61-72.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Universidad Complutense. (2009). *Valoración de la respuesta inmune de base celular. Inmunología*. Recuperado de: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/documentostemas/Tema%2017.pdf>.
- Vives, J. y Aguilar, J. (2006). *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. (3ª. Ed.). Barcelona, España: MASSON, S.A.
- Wilkinson, P. (1977). Neutrophil Leucocyte Function Tests. *Techniques in Clinical Immunology*, 3(2), 201.
- Yang, I. & Lim, M. (2010). *Immunotherapy*. San Francisco, Estados Unidos: Elsevier.

Zaa, C., Valdivia, M. y Marcelo, A. (2012). Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*. *Revista Peruana de Biología*, 19(3), 329-334.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA Fecha: _____
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Departamento de Citohistología

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR

“Establecimiento de tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas”.

Este estudio consistirá en la extracción de 25 mililitros de sangre completa, distribuidos en cinco tubos para hematología de 4.5 – 5 mililitros de volumen. El análisis no tendrá ningún costo.

El estudio se realizará con la finalidad de evaluar la capacidad fagocítica de los neutrófilos y las células citotóxicas por medio del establecimiento de tres ensayos. También se determinará, en dichos ensayos, extractos de determinadas plantas estimulan o inhiben la capacidad fagocítica de los neutrófilos y células citotóxicas. Así mismo, si presentara alguna anomalía de la inmunidad celular inespecífica, se le hará saber y se referirá a un médico especializado. Los resultados de dicho estudio son confidenciales y por ninguna circunstancia se revelarán, así mismo está en toda la libertad de no participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin ningún problema.

Por lo que, en el pleno uso de mis facultades, libre y voluntariamente manifiesto que he sido debidamente informado y comprendido sobre el estudio que se está realizando, y en consecuencia autorizo a que se realicen las pruebas para evaluar la capacidad fagocítica de los neutrófilos y las células citotóxicas y ser participe de este estudio; cuyo objetivo es establecer tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas.

Muestra No. _____

Nombre del participante

Dirección

/

Número de teléfono

Firma

Firma del responsable

Establecimiento de tres ensayos para la evaluación *in vitro* de la inmunidad celular inespecífica mediada por neutrófilos y células citotóxicas – **Universidad de San Carlos de Guatemala**

Para mayor información puede comunicarse a los teléfonos:

Sasha Yoc Cel: 4182-9227

Andrea Osorio Cel: 5411-6163

Anexo 2. POE de la técnica de Ficoll Hypaque-1119

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	Título	POE 4/6
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Departamento de Citohistología	Técnica de Ficoll Histopaque®-1119	Pág. 1/2
Objetivo	Establecer un procedimiento estandarizado para la separación de granulocitos, de sangre completa, por medio de un gradiente de densidad.	
Alcance	Este procedimiento es de aplicación a todos los laboratorios clínicos dedicados a la evaluación de células sanguíneas por separado.	
Procedimiento	<p>Materiales, reactivos y equipo</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 mL de Histopaque-1119 • 1 Tubo cónico de centrifugación de 15 mL • 6 mL de sangre completa humana con EDTA/K2 • Centrifuga • Pipeta calibrada de 1000 uL • 100 mL solución salina • Pipeta pasteur 3 mL • Probeta <ol style="list-style-type: none"> 1. Añadir 3 mL de Histopaque-1119 a un tubo cónico de centrifugación de 15 mL. 2. Agregar cuidadosamente 6 mL de sangre completa en el tubo cónico de centrifugación de 15 ml, para formar una capa sobre el histopaque-1119 previamente añadido. 3. Centrifugar a 700 rpm durante 50 minutos a temperatura ambiente. 4. Retirar el tubo de la centrífuga cuidadosamente. 	

<p>5. Separar la capa de granulocitos y transferirla a un tubo sin anticoagulante. Los granulocitos se encuentra en la capa opaca que se encuentra justamente antes del paquete globular.</p> <p>6. Lavado de células:</p> <p>a) Adicionar 4 mL de solución salina.</p> <p>b) Centrifugar 10 min a 200 rpm.</p> <p>c) Aspirar el sobrenadante y descartar.</p> <p>d) Resuspender las células suavemente con una pipeta pasteur de 3 mL.</p> <p>e) Repetir este procedimiento dos veces más.</p> <p>7. Resuspender las células en 4 mL de solución salina.</p>		
<p>Redactado por: Andrea Osorio Sasha Yoc</p>	<p>Revisado por: Licda. Margarita Paz</p>	<p>Aprobado por: Licda. Margarita Paz</p>
<p>Fecha de redacción: 08/08/2017</p>	<p>Fecha de revisión: 09/08/2017</p>	<p>Fecha de aprobación: 09/08/2017</p>

Anexo 3. POE del Ensayo de Fagocitosis *in vitro*

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	Título	POE 1/6
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Departamento de Citohistología	Ensayo de fagocitosis <i>in vitro</i>	Pág. 1/3
Objetivo	Establecer un procedimiento estandarizado para evaluar la fagocitosis <i>in vitro</i> en seres humanos.	
Alcance	Este procedimiento es de aplicación a todos los laboratorios clínicos dedicados a la evaluación de la inmunidad innata de individuos; para el diagnóstico de enfermedades.	
Procedimiento	<p>Fundamento</p> <p>La fagocitosis consiste en un conjunto de fenómenos que conduce a la formación de fagosomas, vacuolas de gran tamaño (visibles al MO) que contienen partículas sólidas (ej. bacterias) o grandes desechos celulares (Maillet, 2003). La actividad fagocítica de los macrófagos no solo está relacionada con protección, también juega un papel importante en la inducción de la respuesta inmunitaria adquirida (Geffner & Fainboim, 2008) y no solo concierne a fagocitar bacterias sino también desechos celulares (Maillet, 2003). A través de la fagocitosis, los macrófagos atrapan e ingieren microorganismos, los inactivan y los rompen en pedazos de tamaño variable. Algunos de estos pedazos se degradan todavía más, produciendo pequeños fragmentos antigénicos o epítomos, que se asocian a moléculas de histocompatibilidad de clase I y de clase II, y así se transportan a la superficie de los macrófagos para ser presentados a las células T CD4+ y T CD8+ del individuo. Según las señales que haya recibido la célula dendrítica en la periferia podrá activar a los linfocitos T en perfiles funcionales diferentes, aptos para combatir patógenos extracelulares o intracelulares o</p>	

alternativamente mediar una función supresora sobre la inmunidad adaptativa (Geffner & Fainboim, 2008). Los macrófagos funcionan como células atrapadoras, procesadoras y presentadoras de antígeno, pero esta función también la ejercen los linfocitos B, las células de Langerhans y las células dendríticas. Existen algunas evidencias que sugieren que los neutrófilos también podrían funcionar como células procesadoras y presentadoras de antígeno y que quizá esta función no se les ha reconocido plenamente, por tratarse de células de vida media corta (Rojas-Espinosa, 2006).

Materiales, reactivos y equipo

- 8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2.
- 2 mL suspensión de neutrófilos
- 2 mL de suspensión de *Staphylococcus epidermidis* equivalente al 0.5 de la escala de McFarland.
- Incubadora
- Laminas porta objetos
- Pipeta pasteur de 3 mL
- Tinción wrihgt
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Pipeta calibrada de 500 a 1000 uL

1. Obtención de 8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2.
2. Aislamiento de neutrófilos por gradientes de densidad con Histopaque®-1119.
3. Preparación de suspensión de *Staphylococcus epidermidis* equivalente al 0.5 de la escala de McFarland.
4. Mezclar 2 mL de suspensión de *Staphylococcus epidermidis* y 2 mL de suspensión de neutrófilos.
5. Incubar 45 min a 37°C.

	<p>6. Realizar frote de suspensión por triplicado y un control negativo.</p> <p>7. Teñir con coloración wrihgt</p> <p>8. Observar y contar al microscopio en 100x neutrófilos con cocos en su interior/campo.</p>	
<p>Referencias Bibliográficas</p>	<p>Maillet, M. (2003). <i>Biología celular</i>. Barcelona, España: Masson</p> <p>Geffner, J. & Fainboim, L. (2008). <i>Introducción a la Inmunología humana</i>. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.</p> <p>Rojas-Espinosa, O. (2006). <i>Inmunología</i>. Distrito Federal, México: Médica Panamericana.</p>	
<p>Redactado por: Andrea Osorio Sasha Yoc</p>	<p>Revisado por: Licda. Margarita Paz</p>	<p>Aprobado por: Licda. Margarita Paz</p>
<p>Fecha de redacción: 08/08/2017</p>	<p>Fecha de revisión: 09/08/2017</p>	<p>Fecha de aprobación: 09/08/2017</p>

Anexo 4. POE del Ensayo de Reducción del Nitroazul de Tetrazolio (NBT)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	Título	POE 2/6
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Departamento de Citohistología	Ensayo de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT)	Pág. 1/3
Objetivo	Establecer un procedimiento estandarizado para evaluar la reducción de nitroazul de tetrazolio, como consecuencia de la activación del metabolismo celular de los fagocitos.	
Alcance	Este procedimiento es de aplicación a todos los laboratorios clínicos dedicados a la evaluación de la inmunidad innata de individuos; para el diagnóstico de enfermedades.	
Procedimiento	<p>Fundamento</p> <p>La interacción de los microorganismos con receptores presentes en la membrana de los fagocitos genera en estas células una serie de cambios bioquímicos que son finalmente responsables de su actividad microbicida. De manera resumida, la unión microorganismo-receptor induce cambios conformacionales en el receptor, que se transmiten a moléculas adyacentes, activándolas (Ingraham & Ingraham, 1998).</p> <p>Por otro lado, las técnicas que evalúan la actividad microbicida de los fagocitos proveen resultados más significativos, pues van más allá de la simple ingestión de los microorganismos y determinan si los fagocitos son capaces de aniquilarlos (Lomonte, 2009).</p> <p>Un método simple y útil para evaluar la activación del metabolismo celular (también denominado "estallido respiratorio" post-activación) de los fagocitos sanguíneos, es la prueba de reducción del Nitroazul de tetrazolio. Con ella se puede evaluar pacientes en estudio por inmunodeficiencia, principalmente niños, como un primer análisis de su sistema</p>	

fagocítico. El NBT (nitrobluetetrazolium) es un compuesto soluble amarillo que, al ser endocitado y reducido por la acción de enzimas intracelulares del fagocito, precipita en forma de cristales color púrpura oscuro (cristales de formazán) (Lomonte, 2009).

Materiales, reactivos y equipo

- 8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2.
- 100 uL suspensión de neutrófilos
- 10 uL de suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 equivalente al 0.5 de la escala de McFarland.
- 100 uL de nitroazul de tetrazolio al 0.15%
- Incubadora
- Laminas porta objetos
- Pipeta pasteur de 3 mL
- Tinción wrihgt
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Pipeta calibrada de 500 a 1000 uL
- Pipeta calibrada de 5 a 100 uL

1. Obtención de 8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2.
2. Aislamiento de neutrófilos por gradientes de densidad con Histopaque®-1119.
3. Preparación de suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 equivalente al 0.5 de la escala de McFarland.
4. Mezclar 10 uL de suspensión de *Staphylococcus epidermidis* y 100 uL de suspensión de neutrófilos.
5. Incubar 20 min a temperatura ambiente.
6. Adicionar 100 uL de nitroazul de tetrazolio al 0.15%.
7. Incubar 15 min a 37°C.

	<p>8. Realizar frote de suspensión por triplicado y un control negativo.</p> <p>9. Teñir con coloración wrihgt</p> <p>10. Observar y contar al microscopio en 100x, % de neutrófilos con gránulos.</p>	
<p>Referencias Bibliográficas</p>	<p>Ingraham, J. & Ingraham, C. (1998). <i>Introducción a la Microbiología</i>. Barcelona, España: Reverté.</p> <p>Lomonte, B. (2009). <i>Técnicas de laboratorio en Inmunología Clínica</i>. Recuperado de: http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/iahula/curso_2010/suplementario-tema16.pdf.</p>	
<p>Redactado por: Andrea Osorio Sasha Yoc</p>	<p>Revisado por: Licda. Margarita Paz</p>	<p>Aprobado por: Licda. Margarita Paz</p>
<p>Fecha de redacción: 08/08/2017</p>	<p>Fecha de revisión: 09/08/2017</p>	<p>Fecha de aprobación: 09/08/2017</p>

Anexo 5. POE de la técnica de Ficoll Hypaque-1077

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	Título	POE 5/6
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Departamento de Citohistología	Técnica de Ficoll Histopaque®-1077	Pág. 1/2
Objetivo	Establecer un procedimiento estandarizado para la separación de mononucleares, de sangre completa, por medio de un gradiente de densidad.	
Alcance	Este procedimiento es de aplicación a todos los laboratorios clínicos dedicados a la evaluación de células sanguíneas por separado.	
Procedimiento	<p>Materiales, reactivos y equipo</p> <ul style="list-style-type: none"> • 7 mL de Histopaque-1077 • 2 Tubo cónico de centrifugación de 15 mL • 7 mL de sangre completa humana con EDTA/K2 • Centrifuga • Pipeta calibrada de 1000 uL • 100 mL buffer fosfatos • Pipeta pasteur 3 mL • Probeta <ol style="list-style-type: none"> 1. Añadir 7 mL de Histopaque-1077 a un tubo cónico de centrifugación de 15 mL. 2. Agregar cuidadosamente 7 mL de sangre completa en el tubo cónico de centrifugación de 15 ml, para formar una capa sobre el histopaque-1077 previamente añadido. 3. Centrifugar a 2400 rpm durante 20 minutos a 4°C. 4. Retirar el tubo de la centrífuga cuidadosamente. 5. Separar la capa de mononucleares y transferirla a un tubo cónico de centrifugación de 15 mL. Los mononucleares se 	

	<p>encuentran en la capa opaca que se encuentra justamente debajo del plasma.</p> <p>6. Lavado de células:</p> <p>a) Adicionar 10 mL de PBS (Buffer de fosfatos).</p> <p>b) Centrifugar 5 min a 1400 rpm.</p> <p>c) Aspirar el sobrenadante y descartar.</p> <p>d) Resuspender las células en 2 mL de RPMI, y aforar hasta 15 mL.</p> <p>e) Centrifugar 5 min a 1400 rpm.</p> <p>f) Aspirar el sobrenadante y descartar.</p> <p>g) Resuspender las células en 2 mL de RPMI-FBS, y aforar hasta 10 mL.</p>	
<p>Redactado por: Andrea Osorio Sasha Yoc</p>	<p>Revisado por: Licda. Margarita Paz</p>	<p>Aprobado por: Licda. Margarita Paz</p>
<p>Fecha de redacción: 08/08/2017</p>	<p>Fecha de revisión: 09/08/2017</p>	<p>Fecha de aprobación: 09/08/2017</p>

Anexo 6. Conteo manual de leucocitos en cámara de Neubauer

1. Mezclar en un eppendorf 10 uL de sangre completa (con anticoagulante EDTA) y 90 uL del diluyente para blancos; para obtener una dilución 1:10.
2. Llenar la cámara de Neubauer con la solución preparada.
3. Dejar sedimentar por 3 minutos.
4. Contar en 10x los glóbulos blancos que se encuentran dentro de los cuadros específicos para conteo de blancos.
5. Multiplicar el número de glóbulos blancos contados por el factor 25.

(Silva, 2004).

Anexo 7. POE del Ensayo de Caracterización de linfocitos T y linfoproliferación

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	Título Ensayo de caracterización de linfocitos T y linfoproliferación	POE 3/6
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Departamento de Citohistología		Pág. 1/3
Objetivo	Establecer un procedimiento estandarizado para evaluar la funcionalidad mediante la caracterización de linfocitos T y la linfoproliferación.	
Alcance	Este procedimiento es de aplicación a todos los laboratorios clínicos dedicados a la evaluación de la inmunidad innata de individuos; para el diagnóstico de enfermedades.	
Procedimiento	<p>Fundamento</p> <p>Existen antígenos y marcadores de membrada que son utilizados para poder diferenciar entre una y otra célula. Uno de los métodos para conocidos para diferenciar linfocitos B y T es la formación de rosetas (Universidad Complutense, 2009).</p> <p>El ensayo de linfoproliferación e un método normalmente utilizado para diferenciar o cuantificar poblaciones de linfocitos. Se basa en que los linfocitos proliferan tras su estimulación con un mitógeno (inespecífico) o con un marcador específico (Rubio, García y Romeros, 2016).</p> <p>Materiales, reactivos y equipo</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2. • 10 mL suspensión de linfocitos en RPMI-FBS • Cámara de Neubauer • Reactivo de Turk • Incubadora • Microscopio 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Pipeta calibrada de 5 a 100 uL • Contador • Congelador • Jarra con candela • Eritrocitos de carnero <ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención de 8 mL de sangre completa humana con EDTA/K2. 2. Aislamiento de linfocitos por gradientes de densidad con Histopaque®-1077. 3. Conteo manual de linfocitos recuperados con cámara de Neubauer con reactivo de Turk. Dilución 1/10. Factor 25. 4. Conteo de rosetas en cámara de Neubauer. Dilución 1/125. 5. Agregar 50 uL de lectina concavalina A. 6. Incubar 5 días a 37°C con 5% de CO₂. 7. Realizar nuevamente conteo manual de linfocitos con cámara de Neubauer con reactivo de Turk. Dilución 1/10. Factor 25. 8. Realizar nuevamente conteo de rosetas en cámara de Neubauer. Dilución 1/125. 	
Referencias Bibliográficas	<p>Universidad Complutense. (2009). <i>Valoración de la respuesta inmune de base celular. Inmunología</i>. Recuperado de: http://pendientedemigracion.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/documentostemas/Tema%2017.pdf.</p> <p>Rubio, F., García, B. y Romeros, S. (2016). <i>Técnicas de Inmunodiagnóstico</i>. Madrid, España: Copyright.</p>	
Redactado por: Andrea Osorio Sasha Yoc	Revisado por: Licda. Margarita Paz	Aprobado por: Licda. Margarita Paz
Fecha de redacción: 08/08/2017	Fecha de revisión: 09/08/2017	Fecha de aprobación: 09/08/2017

Anexo 8. Preparación de solución madre de extractos de plantas con concentración de 50mg/mL

1. Pesar en una balanza analítica 50 mg del extracto de planta puro, utilizando papel mantequilla.
2. Medir 1 mL de DMSO (Dimetil sulfóxido) con pipeta automática o volumétrica.
3. En un vial de 1.5 mL disolver los 50 mg de extracto de planta puro en el mililitro de DMSO.
4. Para una mejor homogenización mezclar con ayuda de un vortex.

Anexo 9. Tinción de Wright

1. Colocar el frotis secado al aire sobre una rejilla o cubeta de tinción con la muestra hacia arriba.
2. Cubrir completamente el portaobjetos con el colorante de Wright gota a gota. El colorante deberá cubrir completamente el portaobjetos, pero no debe derramarse por los bordes. Deberá agregarse una cantidad adicional si este se comienza a evaporar.
3. Dejar actuar durante 3 minutos.
4. Lavar con agua del chorro cuidadosamente hasta que la extensión presente un aspecto rosado al examinar a simple vista.
5. Limpiar el dorso del portaobjetos con una gasa o algodón humedecido en alcohol para eliminar cualquier resto de colorante.
6. Secar al aire y observar al microscopio.

Anexo 10. POE de la preparación de suspensión de eritrocitos de carnero

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	Título	POE 6/6
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Departamento de Citohistología	Preparación de suspensión de eritrocitos de carnero	Pág. 1/2
Objetivo	Establecer un procedimiento estandarizado para la preparación de suspensión de eritrocitos de carnero, para evaluar la formación de rosetas con linfocitos.	
Alcance	Este procedimiento es de aplicación a todos los laboratorios clínicos dedicados a la evaluación de células sanguíneas por separado.	
Procedimiento	<p>Materiales, reactivos y equipo</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 mL de sangre de carnero • 2 mL de CPDA-1 • 8 mL de solución salina • Centrífuga • Pipeta pasteur de 3 mL • Pipeta calibrada de 10 a 100 ul • Pipeta calibrada de 1000 ul <ol style="list-style-type: none"> 1. Mezclar 2 mL de sangre de carnero con 2 mL de CPDA-1 (Solución anticoagulante citrato, fosfatos, dextrosa y adenina). 2. Separar 2 mL de la solución preparada en el paso No. 1 y agregar 8 mL de solución salina estéril. 3. Centrifugar 5 min a 2500 rpm. 4. Aspirar el sobrenadante y descartar. 5. Repetir dos veces más la adición de 8 mL de solución salina estéril y el paso No. 3 y 4. 	

	6. Realizar una dilución 1/125 (10 ul de suspensión de eritrocitos de carnero + 1250 ul de suspensión de linfocitos) para evaluar la formación de rosetas.	
Redactado por: Andrea Osorio Sasha Yoc	Revisado por: Licda. Margarita Paz	Aprobado por: Licda. Margarita Paz
Fecha de redacción: 08/08/2017	Fecha de revisión: 09/08/2017	Fecha de aprobación: 09/08/2017

Anexo 11. Preparación de buffer de fosfatos (PBS)
pH 7.4

1. Disolver 6.9 gramos de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada.
2. Agregar 40 mL de 1 N NaOH y diluir en 500 mL de agua destilada.
3. Medir pH.
4. Si fuera necesario ajustar el pH con 1 N NaOH o $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, según el caso.

Andrea Jeanette Osorio Vides
Autora

Sasha Janeth Yoc Gatica
Autora

MA. Ana Margarita Paz Morales
Asesora

Lic. Pedro Pablo Martínez Rojas
Co-asesor

MA. Isabel Cristina Gaitán Fernández
Revisora

MSc. Alba Marina Valdés de García
Directora
Escuela Química Biológica

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia