UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
Facultad de Medicina

"EFECTO MODULADOR DE LA DIETILCARBAMAZINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR DEL RATON BALB/c".

Por

Q. F. B. GRACIELA GUERRERO RAMIREZ

Como requisito parcial para obtener el Título de Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología.

Abril 2003

Q. F. B. GRACIELA GUERRERO RAMIREZ

TM
QR186
.G8
2003
c.1

1080117728

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Medicina

"EFECTO MODULADOR DE LA DIETILCARBAMAZINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR DEL RATÓN BALB/c".

Por

Q. F. B. GRACIELA GUERRERO RAMÍREZ

Como requisito parcial para obtener el Título de Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología.

Abril 2003

TM
QR186
.G8
2003

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

"EFECTO MODULADOR DE LA DIETILCARBAMAZINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR DEL RATON BALB/c".

POR:

Q. F. B. Graciela Guerrero Ramírez

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", U. A. N. L., bajo la dirección del Dr. Carlos E. Medina De la Garza.

Proyecto apoyado por PAICYT SA-611-01 (2001-2002)

"EFECTO MODULADOR DE LA DIETILCARBAMAZINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR DEL RATÓN BALB/c".

APROBACIÓN DE TESIS

DR. MED. CARLOS E. MEDINA DE LA GARZA
Director de Tesis

DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Comisión de Tesis

DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Investigación y
Estudios de Postgrado

DEDICATORIA

A DIOS

Y

A MI FAMILIA:

Ma. Socorro
Ramírez Ruiz

Claudia, Roberto y Corina
Guerrero Ramírez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ayudarme a concluir satisfactoriamente esta meta y por permanecer siempre conmigo dándome fortaleza.

A mi Mamá, por ser mi mejor amiga, por impulsar todas mis metas y acompañarme hasta el final de cada una de ellas, gracias por creer en mi y darme tu apoyo incondicional.

A Claudia, por tu apoyo y por compartir conmigo una meta mas, por el ejemplo de superación que siempre he visto en ti.

A Beto, por toda la ayuda que me das, por ser mi mejor amigo y una de las personas mas importante en mi vida.

A Corina, por siempre ser mi amiga, por apoyarme en todo, espero sigamos creciendo juntas en lo que resta de nuestras vidas.

Al Dr. Carlos E. Medina De la Garza, por dirigir esta investigación y darme la oportunidad de colaborar con él, por sus enseñanzas, su trato, su amistad, su confianza y los miles de buenos detalles que ha tenido conmigo.

Al Dr. Mario César Salinas por toda su ayuda, por todas las enseñanzas que me dio durante mi formación como Maestra en inmunología, y por permitirme utilizar uno de los instrumentos fundamentales para el desarrollo de este trabajo: el Citómetro de Flujo.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, por todas las enseñanzas brindadas para mi formación como Maestra en Ciencias.

Al Dr. Ernesto Torres López, por tu amistad, por asesorar parte de este trabajo y por todas y cada una de tus enseñanzas tan valiosas para esta investigación.

A mis compañeros y amigos de trabajo, Alejandro, Alejandra, Paty, Dra. Velia, Brenda, Araceli, Lizzy, Carmen, Lupita, Dr. Solís, Dra. Jaqui, Santana, Francisco, Carlitos, por su siempre grata convivencia, y a Don Reynaldo por su amabilidad y el cuidado de los ratoncitos.

A Isabel, por tu apoyo, tus consejos y por brindarme una de las mejores amistades.

A mis mejores amigos, Adrián, por tu ayuda incondicional y desinteresada. Lissette, por compartir conmigo parte de tu tiempo y las tantas locuras que hicimos juntas. Juan Manuel, Lorena, Edith, y Elizabeth, por formar parte de este grupo de amigos y entre todos ayudarme a valorar el significado de la amistad.

A mis compañeros de generación de postgrado, Ariana, Marcela, Angélica, Teresa, Blanca, Luis, Lorena y Adrián, por los momentos compartidos durante esta etapa.

A mis amigos de siempre, Aída, Diana, Carlos, Lilith, Carmen y Raúl, por seguir acompañándome hasta el día de hoy.

A aquellos amigos que han estado en cierto momento conmigo y que aun ya sin el contacto todavía siguen formando parte importante de mi vida.

Y en si a todos los que me han dado lo mas valioso que existe, su amistad, esta meta sin todos ustedes no la hubiera podido cumplir.

A CONACYT, por haberme otorgado el apoyo económico durante el postgrado.

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS iv
LISTA DE GRÁFICAS v
LISTA DE TABLAS vi
ABREVIATURAS viii

I. RESUMEN 1

II. INTRODUCCIÓN 3

III. JUSTIFICACIÓN 16

IV. OBJETIVOS 17

V. MATERIAL Y MÉTODOS 18

Estrategia General 18
5.1 Animales 19
5.2 Antígenos 19
5.2.1 Lipopolisacárido 19
5.2.2 Toxoide Tetánico 19
5.3 Fármacos 19
5.3.1 Dietilcarbamazina 19
5.3.2 Azatioprina 20
5.4 Modelo Murino 20
5.5 Respuesta inmune humoral: Determinación de anticuerpos por ensayo inmunoenzimático (ELISA) anti-TT y anti-LPS 21
5.5.1 Determinación de anticuerpos anti-Lipopolisacárido 22
5.5.1.1 Obtención de sueros controles de ratón anti-LPS 22

5.5.1.2 Inmunoensayo 22
5.5.1.2.1 Fijación del Antígeno 22
5.5.1.2.2 Sueros 22
5.5.1.2.3 Anticuerpos Conjugados Anti-ratón 23
5.5.1.2.4 Sustrato 23
5.5.2 Determinación de anticuerpos anti-Toxoide tetánico 23
5.5.2.1 Obtención de sueros controles de ratón anti-T 23
5.5.2.2 Inmunoensayo 24
5.5.2.2.1 Fijación del Antígeno 24
5.5.2.2.2 Suero 24
5.5.2.2.3 Anticuerpos conjugados anti-ratón 24
5.5.2.2.4 Sustrato 25
5.6 Determinación de la producción de citocinas
in vivo por ensayo inmunoenzimático (ELISA) 25
5.7 Determinación del estallido respiratorio de fagocitos
de sangre periférica 25
5.7.1 Modelo Murino 25
5.7.2 Tratamiento con Dietilcarbamazina 26
5.7.3 Determinación del anión superóxido por la técnica
123-dihidro-rodamina mediante citometría de flujo 26
5.7.4 Estimulación con PMA o con Zimosan 27
5.7.5 Tinción con 1, 2, 3 - Dihidro-rodamina 28
5.7.6 Adquisición y Análisis de Muestras 28
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 28

VI. RESULTADOS 29
6.1 Determinación de anticuerpos ANTI-LPS y ANTI-TT por
inmunoensayo enzimático (ELISA) 29
6.1.1 Anticuerpos totales anti-TT 29
6.1.2 Anticuerpos IgG anti-TT 29
6.1.3 Anticuerpos totales anti-LPS 32

6.1.4 Anticuerpos IgG anti-LPS 32
6.2 Determinación de la concentración de citocinas 35
6.2.1 Determinación de citocinas en ratones inmunizados con TT
6.2.1.1 Producción de IL-2 35
6.2.1.2 Producción de IFN-γ 35
6.2.1.3 Producción de IL-12 35
6.2.1.4 Producción de IL-10 36
6.2.2 Determinación de citocinas en ratones inmunizados con LPS
6.2.2.1 Producción de IL-2 40
6.2.2.2 Producción de IFN-γ 40
6.2.2.3 Producción de IL-12 40
6.2.2.4 Producción de IL-10 40
6.3 Evaluación del estallido respiratorio de granulocitos y monocitos por citometría de flujo 45
6.3.1 Histogramas: Estallido respiratorio de granulositos 45
6.3.2 Histogramas: Estallido respiratorio de monocitos 46
6.3.3 Estallido respiratorio de granulositos-neutrófilos 47
6.3.4 Estallido respiratorio de monocitos 47

VII. DISCUSIÓN 50

VIII. CONCLUSIONES 57

IX. APÉNDICE 58

X. BIBLIOGRAFÍA 63

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Estructura molecular de la dietilcarbamazina	8
2	Descripción esquemática del efecto de la DEC sobre las vías metabólicas del ácido araquidónico	12
3	Estrategia general	18
4	Histogramas obtenidos del análisis del estallido respiratorio de los granulocitos	45
5	Histogramas obtenidos del análisis del estallido respiratorio de los granulocitos	46
6	Distribución del LPS en las microplacas a diferentes concentraciones y diferentes pH para la estandarización del ELISA	58
7	Distribución de los sueros control anti-LPS en microplacas para ELISA	59
8	Distribución del TT en las microplacas a diferentes concentraciones y diferentes pH para la estandarización del ELISA	60
9	Distribución de los sueros control anti-TT en microplacas para ELISA	61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Producción de anticuerpos totales específicos anti-TT, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA)	30
2	Producción de anticuerpos IgG específicos anti-TT, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA)	31
3	Producción de anticuerpos totales específicos anti-LPS, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA)	33
4	Producción de anticuerpos IgG específicos anti-LPS, determinada inmunoensayo enzimático (ELISA)	34
5	Producción de IL-2 en ratones inmunizados con toxoide tetánico	36
6	Producción de IFN-γ en ratones inmunizados con toxoide tetánico	37
7	Producción de IL-10 en ratones inmunizados con toxoide tetánico	38
8	Producción de IL-12 en ratones inmunizados con toxoide tetánico	39
9	Producción de IL-2 en ratones inmunizados con LPS	41
10	Producción de IFN-γ en ratones inmunizados con LPS	42
11	Producción de IL-10 en ratones inmunizados con LPS	43
12	Producción de IL-12 en ratones inmunizados con LPS	44
13	Estallido respiratorio de granulocitos	48
14	Estallido respiratorio de monocitos	49

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Modelo Murino para la determinación de anticuerpos y citocinas	21
2	Modelo murino para la evaluación del estallido respiratorio	26
3	Protocolo de evaluación para el estallido respiratorio	27
4	Valores numéricos de la producción de anticuerpos totales anti-TT	30
5	Valores numéricos de la producción de anticuerpos IgG anti-TT	31
6	Valores numéricos de la producción de anticuerpos totales anti-LPS	33
7	Valores numéricos de la producción de anticuerpos IgG anti-LPS	34
8	Valores numéricos de la producción de IL-2 en ratones inmunizados con toxoide tetánico	36
9	Valores numéricos de la producción de IFN-γ en ratones inmunizados con toxoide tetánico	37
10	Valores numéricos de la producción de IL-10 en ratones inmunizados con toxoide tetánico	38
11	Valores numéricos de la producción de IL-12 en ratones inmunizados con toxoide tetánico	39
12	Valores numéricos de la producción de IL-2 en ratones inmunizados con LPS	41
13	Valores numéricos de la producción de IFN-γ en ratones inmunizados con LPS	42
14	Valores numéricos de la producción de IL-10 en ratones inmunizados con LPS	43
15	Valores numéricos de la producción de IL-2 en	

ratones inmunizados con LPS 44
16 Valores de IMF obtenidos de la evaluación del estallido respiratorio de granulocitos 48
17 Valores de IMF obtenidos de la evaluación del estallido respiratorio de monocitos 49

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo (s)
Ag	Antígeno (s)
ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
AZA	Azatioprina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CAS-BR-M	Virus de la leucemia murina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
Cat.	Catálogo
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CoVF	Factor del veneno de cobra
CS	Cloruro de Sodio
CSF	Factor estimulante de colonias
DEC	Dietilcarbamazina
DHR	1,2,3-Dihidro-rodamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FeLV	Virus de la leucemia felina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
h	Hora (s)
HETE	Ácido hidroxieicosatetranoico
HPETE	Ácido hidroxiperoxieicosatetranoico
HTLV-II	Virus linfotrópico humano tipo II
IFN-α	Interferón alfa
IFN-γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
IL	Interleucina

IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
Kg	Kilogramo
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
MBP	Proteína básica mayor
µg	Microgramo (s)
µl	Microlitro (s)
mg	Miligramo (s)
mm	Milímetro (s)
ml	Mililitro (s)
min	Minuto (s)
nm	Nanómetro (s)
PBS	Buffer de fosfatos
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina I2
PMA	Ester forbólico del ácido mirístico
RANTES	Quimiocina regulada bajo activación, normalmente expresada y secretada por células T
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TGF-β	Factor beta transformante de granulocitos
TT	Toxoide Tetánico
UI	Unidad Internacional
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ZIM	Zimosan