



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE ESTRÓGENOS EN LA
ACTIVIDAD DE CÉLULAS CITOTÓXICAS DE RATÓN**

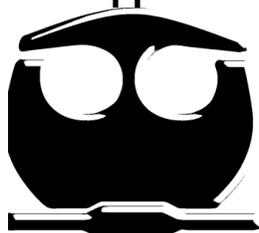
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

LUIS FERNANDO BRAVO ORTIZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: García Tamayo Fernando

VOCAL: Profesor: Gómez Martínez Atonatiu Edmundo

SECRETARIO: Profesor: Molina Guarneros Juan Arcadio

1er. SUPLENTE: Profesor: Berrón Ruiz Patricia Elvira

2do. SUPLENTE: Profesor: González Trujano María Eva

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunofarmacología del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Becario del proyecto CONACYT 98729

Asesor: DR. C.B. Juan Arcadio Molina Guarneros

Supervisor técnico: Q.F.B. Patricia Cuautle Rodríguez

Sustentante: Luis Fernando Bravo Ortiz

Dedico esta tesis a:

Mi madre, María Magdalena Ortiz Herrera, y mi abuela, María Filadelfo Herrera Salinas, con mucho amor, como una forma de agradecerles su cariño, apoyo, aliento, regaños, preocupación, desvelos y cuidados, por darme siempre todo lo que ha estado a su alcance y mucho más, porque sin todo eso simplemente sería imposible haber llegado hasta este punto de mi vida y tener la posibilidad de concluir mis estudios de licenciatura; por enseñarme a ser responsable, recto, tenaz y perseverante, a trabajar duro para lograr las metas que me propongo, por confiar en mí, tenerme fe y mucha paciencia; y para demostrar mi admiración hacia ellas porque nunca han dejado de luchar con todas sus fuerzas para salir adelante, como en estos tiempos tan difíciles que nos toca vivir.

Mis hermanos, porque ambos han entendido y aguantado mi ausencia, mis malos ratos y mis preocupaciones, y son uno de mis motivos para seguir adelante. Arturo, por todo lo que hemos vivido y compartido desde que éramos pequeños, por estar conmigo siempre que lo he necesitado, dándome su apoyo incondicional y sincero en todo momento, por ser como un padre para mí, porque con ello ha contribuido en gran medida a que sea posible la realización de este trabajo, y para reconocer su fortaleza, temple y decisión para aferrarse a la vida y seguir luchando; e Itzel, porque desde que nació ha llenado mi vida de alegría, por hacerme tan feliz día a día con el cariño tan sincero y desinteresado que me demuestra siempre con cualquier pequeño detalle como un beso, un abrazo, una sonrisa y muchas cosas más que no podría terminar de mencionar.

Mis compañeros y amigos, que me han dado la oportunidad de conocerlos y entrar en sus vidas, por todas las alegrías y vivencias compartidas, por enriquecer mi vida con valiosos consejos y enseñanzas, ayudándome a ser una mejor persona, por brindarme desinteresada y sinceramente su amistad y afecto, y por darme su apoyo incondicional en los momentos más cruciales y difíciles de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial a mi supervisora técnica, Q.F.B. Patricia Cuautle Rodríguez, para agradecerle todas sus enseñanzas, indicaciones, comentarios, críticas, sugerencias y consejos, porque me motivaron para trabajar, pensar, estudiar, investigar, recapacitar, y cambiar de actitud, mejorando día a día, y por su tiempo, dedicación, apoyo, y paciencia, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Mi asesor, doctor Juan Arcadio Molina Guarneros, para demostrarle mi gratitud por abrirme las puertas y darme la oportunidad de dar este paso en mi vida académica, guiarme acertadamente en mi proceso de titulación apoyándome en todo lo posible, y darme consejos, instrucciones y enseñanzas han sido y seguirán siendo de gran utilidad.

Mi compañera Q.F.B. Xanic Alejandra Barrera Hernández, por su colaboración en la obtención de extractos proteínicos de células de la línea P-815 y la cuantificación de proteína total, así como por el tiempo que compartimos durante nuestra estancia en el laboratorio.

Al doctor José Sullivan López González del Laboratorio de Cáncer Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Ismael Cosío Villegas”, que nos proporcionó las células de la línea P-815.

Al laboratorio de Farmacología Celular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, por facilitarnos la utilización de sus instalaciones y equipos, al doctor Juan José Mandoki Weitzner por proporcionarnos los estrógenos que se estudiaron y el kit usado en la estimación de actividad de Deshidrogenasa Láctica, y a la Q.F.B. María Juana García Mondragón por sus consejos y recomendaciones para la preparación y administración de los estrógenos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para el proyecto 98729.

Al bioterio de la Facultad de Medicina, que proporcionó los animales que se utilizaron para desarrollar la parte experimental de este trabajo.

A los animales que se emplearon en el estudio, porque fueron esenciales en la realización de esta investigación, disculpándome por las molestias y dolor que les haya ocasionado durante su manipulación.

CITAS

"Cada cosa tiene su belleza, pero no todos pueden verla"

Confucio

"Quien se enfada por las críticas, reconoce que las tenía merecidas."

Cayo Cornelio Tacito

"No pretendas que las cosas ocurran como tú quieres. Desea, más bien, que se produzcan tal como se producen, y serás feliz."

"Acusar a los demás de los infortunios propios es un signo de falta de educación. Acusarse a uno mismo, demuestra que la educación ha comenzado."

"Un barco no debería navegar con una sola ancla, ni la vida con una sola esperanza."

Epicteto de Frigia

"Para investigar la verdad es preciso dudar, en cuanto sea posible, de todas las cosas."

René Descartes

"Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos. Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos"

Niels Steensen

"No estudio por saber más, sino por ignorar menos."

Sor Juana Inés de la Cruz

"La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad."

Jules Verne

"Cuántos hombres se precipitan hacia la luz, no para ver mejor sino para brillar."

"Quien tiene algo por qué vivir, es capaz de soportar cualquier cómo."

Friedrich Nietzsche

"La mayoría de las personas gastan más tiempo y energías en hablar de los problemas que en afrontarlos"

Henry Ford

"Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas."

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber."

"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo."

Albert Einstein

"La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero... ¡Que importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste."

Marya Sklodowska

"El sentido de las cosas no está en las cosas mismas, sino en nuestra actitud hacia ellas"

Antoine de Saint-Exupéry

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO	PÁGINAS
I. ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
II. ABREVIATURAS	IX
III. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	XI
IV. RESUMEN	1
V. INTRODUCCIÓN	3
A.- Marco teórico	3
1) Citotoxicidad	3
2) Respuesta inmune. Células del sistema inmune con actividad citotóxica	4
3) Estrógenos naturales y sintéticos. Efectos de los estrógenos sobre células citotóxicas del sistema inmune	15
4) Métodos para la estimación de citotoxicidad	18
5) Métodos para la estimación de niveles séricos de anticuerpos	21
B.- Justificación	24
C.- Hipótesis de trabajo	24
D.- Objetivo general	25

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

E.- Objetivos particulares	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	26
1) Diseños experimentales	26
2) Manejo de animales (ratones BALB/c machos de 12 semanas, 20-30 g de peso) y obtención de muestras biológicas de animales tratados	29
3) Cultivos celulares: Línea celular P-815 (ATCC TIB 64, mastocitoma, ratón cepa DBA/2) y esplenocitos obtenidos de los ratones BALB/c machos	30
4) Obtención y cuantificación del extracto proteínico de células de la línea P-815	31
5) Inmunización de los ratones BALB/c machos con el extracto proteínico obtenido de las células de la línea P-815	35
6) Tratamiento de los ratones BALB/c machos con dos estrógenos naturales (17β -estradiol ó estriol) y uno sintético (dietilestilbestrol)	35
7) Obtención de esplenocitos y células de la línea P-815 para realizar ensayos de citotoxicidad	36
8) Ensayos de citotoxicidad	39
9) ELISA indirecto para estimar niveles séricos de IgG en ratones BALB/c machos contra el extracto proteínico de células de la línea P-815	44
10) Cálculos y gráficos de los resultados	47
11) Análisis estadístico de los resultados	47
VII. RESULTADOS	48

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1) Inmunización de los ratones BALB/c machos con el extracto proteínico obtenido de las células de la línea P-815	48
A.- Actividad citotóxica de esplenocitos	48
B.- Niveles séricos de IgG contra el extracto proteínico de células de la línea P-815	54
2) Tratamiento de los ratones BALB/c machos con dos estrógenos naturales (17 β -estradiol ó estriol) y uno sintético (dietilestilbestrol)	60
A.- Actividad citotóxica de esplenocitos	60
B.- Niveles séricos de IgG contra el extracto proteínico de células de la línea P-815	66
VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	71
IX. REFERENCIAS	75
X. APÉNDICES	78
1) Materiales, equipos y reactivos	78
2) Preparación de reactivos	81
3) Código numérico para marcaje de animales	84
4) Recuento de células en la cámara de Neubauer	85
XI. GLOSARIO	86

II. ABREVIATURAS

A: Absorbancia

Ab: Anticuerpo

Ag: Antígeno

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin, por sus siglas en inglés)

cm: centímetro

CO₂: Dióxido de Carbono

DEB: Dietilestilbestrol

DHL: Deshidrogenasa Láctica

DMEM: Medio de Dulbecco modificado por Eagle (Dulbecco's Modified Eagle Medium, por sus siglas en inglés)

DMSO: Dimetil sulfóxido

e.e.m.: error estándar de la media

E2: 17 β -estradiol

E3: Estriol

EDTA: Ácido dietilenamino tetraacético

EGTA: Ácido dietilenglicol tetraacético

ELISA: Inmunoensayo Enzimático en Fase Sólida

ELISPOT: Inmunoensayo Enzimático de Punto

ft³: pie cúbico

h: hora

HCl: Ácido clorhídrico

IgD: Inmunoglobulina D

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

INT: Cloruro de yodotetrazolio

LTC: Linfocitos T citotóxicos (CTL, Cytotoxic T Lymphocyte, por sus siglas en inglés)

M ϕ : Macrófagos

mg: miligramo

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

μg: microgramo

μL: microlitro

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MTT: Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado

NADH⁺: Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido

NaCl: Cloruro de sodio

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

NaH₂PO₄•H₂O: Fosfato de sodio monobásico, monohidrato

Na₂HPO₄: Fosfato de sodio dibásico

NaN₃: Azida de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

NH₄Cl: Cloruro de amonio

ng: nanogramo

nm: nanómetro

NK: Células asesinas naturales (Natural Killer, por sus siglas en inglés)

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

rpm: revoluciones por minuto

RPMI-1640: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute-1640 (por sus siglas en inglés)

Sap: Saponina

SBF: Suero Bovino Fetal

T-20: Tween 20

TX-100: Triton X-100

V: Vehículo

III. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CONTENIDO	PAGINA
Figura 1. Representación de células del sistema inmune con actividad Citotóxica	3
Figura 2. Representación de la respuesta inmune celular y humoral	4
Figura 3. Función efectora y reguladora de las células NK	5
Figura 4. Etapas del proceso de citotoxicidad mediada por células	6
Figura 5. Mecanismos de citotoxicidad mediada por células	8
Figura 6. Señales celulares para la inducción de muerte celular	9
Figura 7. Cambios morfológicos durante la muerte celular por necrosis o apoptosis	10
Figura 8. Fases del desarrollo de células B	11
Figura 9. Reconocimiento de antígenos dependientes e independientes de células T	12
Figura 10. Fases primaria y secundaria de la respuesta inmune humoral	13
Figura 11. Células plasmáticas productoras de anticuerpos durante las fases primaria y secundaria de la respuesta humoral	14
Figura 12. Síntesis de hormonas esteroidales a partir del colesterol	15
Figura 13. Estructura y peso molecular del 17β - estradiol estriol y dietilestilbestrol	16
Figura 14. Fundamento bioquímico del método para la estimación de actividad Deshidrogenasa Láctica liberada	20
Figura 15. Espectros de absorción de la sal de formazán y el cloruro de yodotetrazolio	21
Figura 16. Representación esquemática de un ELISA tipo sándwich o de captura	23

Figura 17. Representación de la metodología seguida en el experimento 1	27
Figura 18. Representación de la metodología seguida en el experimento 2	28
Figura 19. Obtención y cuantificación del extracto proteínico de células de la línea P-815	34
Figura 20. Preparación de suspensiones celulares para realizar los ensayos de citotoxicidad	38
Figura 21. Diseño del ensayo de citotoxicidad del experimento 1	40
Figura 22. Diseño del ensayo de citotoxicidad del experimento 2 (esplenocitos de ratón, y co-cultivos mastocitoma P-815/esplenocitos de ratón)	41
Figura 23. Diseño del ensayo de citotoxicidad del experimento 2 (mastocitoma P-815)	41
Figura 24. Procedimiento para la estimación de actividad de Dehidrogenasa Láctica liberada	43
Figura 25. Procedimiento para la evaluación de viabilidad celular por reducción de MTT	44
Figura 26. Secuencia del método de ELISA indirecto para la estimación de niveles séricos de anticuerpos específicos contra el extracto proteínico de células de la línea P-815	46
Figura 27. Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la actividad citotóxica de esplenocitos de ratón al día 15 posterior a la primera inmunización	50
Figura 28. Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la actividad citotóxica de esplenocitos de ratón al día 15 posterior a la segunda inmunización	53
Figura 29. Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la producción de anticuerpos séricos específicos (IgG). Sueros de prueba diluidos 1:100 y 1:1000 en PBS 1X	55

Figura 30. Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la producción de anticuerpos séricos específicos (IgG). Sueros de prueba diluidos 1:1000 en PBS 1X	59
Figura 31. Efecto del tratamiento con estrógenos en la actividad citotóxica de esplenocitos de ratón	61
Figura 32. Efecto del tratamiento con estrógenos en la viabilidad celular	63
Figura 33. Cinéticas de actividad de Deshidrogenasa Láctica liberada. Día 15 posterior a la segunda inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815	65
Figura 34. Efecto del tratamiento con estrógenos en la producción de anticuerpos séricos específicos (IgG)	70
Figura 35. Código numérico para realizar el marcaje de los ratones	84
Figura 36. Representación esquemática de la cámara de Neubauer	84
Tabla I. Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la respuesta humoral (producción de IgG específica). Comparaciones contra la respuesta preinmune	57
Tabla II. Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la respuesta humoral (producción de IgG específica). Comparaciones contra el grupo control	58
Tabla III. Efecto del tratamiento con estrógenos en la respuesta humoral (producción de IgG específica). Comparaciones contra la respuesta preinmune	67
Tabla IV. Efecto del tratamiento con estrógenos en la respuesta humoral (producción de IgG específica). Comparaciones contra el grupo control	69

IV. RESUMEN

La citotoxicidad es la propiedad que tienen algunos agentes físicos, químicos o biológicos de ser tóxicos para las células, consiste en la alteración de funciones celulares básicas que llevan a las células a sufrir daño, resultando incluso en la muerte celular. El daño y la muerte celular pueden ser detectados mediante métodos con diversos fundamentos biológicos y bioquímicos.

Para proteger al organismo, el sistema inmune puede responder mediante la generación de células citotóxicas o mediante la producción de anticuerpos contra células tumorales o infectadas con virus, así como contra microorganismos patógenos.

La respuesta inmune puede ser modificada por diversas sustancias químicas, entre las que se encuentran las hormonas. Los estrógenos son hormonas esteroidales que llevan a cabo su efecto al interactuar con receptores que se encuentran en el interior de sus células diana. Los efectos de los estrógenos en la respuesta inmune han sido ampliamente estudiados y son muy diversos, dependiendo del modelo que se utilice para su estudio, así como de las dosis administradas y de si el tratamiento se realiza *in vivo* o *in vitro*.

El estudio de los efectos de los estrógenos sobre la respuesta inmune es relevante, ya que los estrógenos tienen influencia en el desarrollo o supresión de algunos tipos de cáncer, así como en la respuesta inmune contra dichas patologías, y en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple, entre otras. Otra función de los estrógenos que se ha estudiado recientemente (en ratones y humanos) es la que tienen en el embarazo.

Los resultados de estos estudios podrían tener aplicación en el desarrollo de terapias basadas en la modulación de la respuesta inmune, para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, problemas de fertilidad y embarazos con complicaciones.

En este trabajo evaluamos el efecto del tratamiento *in vivo* en ratones machos de la cepa BALB/c de 12 semanas con los estrógenos naturales 17 β -estradiol o estriol, o con el estrógeno sintético dietilestilbestrol, sobre la respuesta inmune citotóxica y humoral

de los esplenocitos, con la finalidad de establecer si la administración de dichas hormonas modifica la respuesta citotóxica, y de ser así, si puede ocurrir por un mecanismo dependiente de anticuerpos.

Para ello administramos los estrógenos por vía subcutánea a los ratones durante los tres días posteriores a la inmunización con antígenos alogénicos (extracto proteínico obtenido de células de la línea P-815, mastocitoma de ratón de la cepa DBA/2). Después del tratamiento con los estrógenos los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el bazo, posteriormente se obtuvieron los esplenocitos y éstos se emplearon como células efectoras contra las células P-815 (empleadas como células blanco en ensayos de citotoxicidad).

También se extrajo sangre venosa a los animales, y en los sueros obtenidos se estimaron los niveles de anticuerpos específicos producidos contra los extractos empleados para inmunizar a los ratones.

Evaluamos la citotoxicidad y la viabilidad celular mediante la estimación de actividad de Deshidrogenasa Láctica (DHL) liberada y la reducción de MTT respectivamente. Por otra parte la producción de Inmunoglobulina G (IgG) específica contra antígenos alogénicos fue estimada por el método de ELISA indirecto.

Nuestros resultados mostraron que el 17β -estradiol no modificó la actividad citotóxica de los esplenocitos de ratón, no afectó su viabilidad celular y no tuvo efecto sobre la producción de anticuerpos; el estriol no afectó la actividad citotóxica, aumentó la viabilidad o actividad metabólica de los esplenocitos, y no modificó la producción de anticuerpos; y el dietilestilbestrol aumentó la actividad citotóxica, no modificó la producción de anticuerpos y disminuyó drásticamente la viabilidad de los esplenocitos.

V. INTRODUCCIÓN

A.- Marco teórico

1) Citotoxicidad

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que da lugar a que se produzca un daño que pueda ser detectado (Rodeiro, 2002). Dicho daño celular puede ser producido por agentes de tipo físico, químico o biológico.

Dentro de los agentes biológicos que producen un efecto citotóxico se encuentran algunas poblaciones celulares del sistema inmune. Los macrófagos, los linfocitos T citotóxicos (LTC) y las células asesinas naturales (NK) pueden destruir células infectadas con virus, así como bacterias, hongos, parásitos y células tumorales mediante diversos mecanismos (Lieberman, 2003; Moretta, 2008; Chávez, 2009; Arens, 2010; Oykman, 2010).

En la figura 1 se representan las células del sistema inmune con capacidad citotóxica o citolítica que se mencionaron anteriormente.

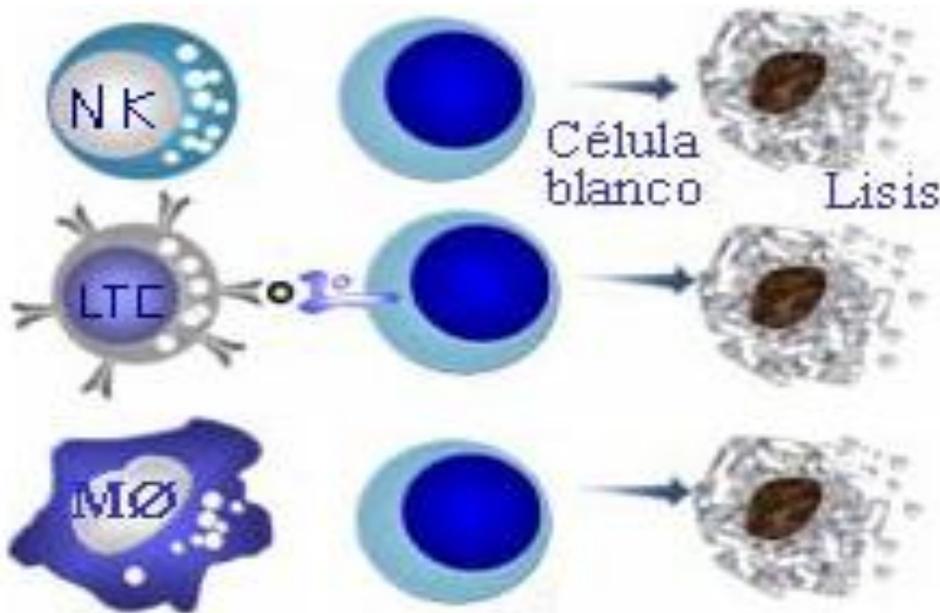


Figura 1. Representación de células del sistema inmune con actividad citotóxica. Se muestran las células Natural Killer (NK), linfocitos T citotóxicos (LTC) y macrófagos (Mφ).

Imagen de E. Muñoz y J. Peña, Universidad de Córdoba, España. Tomada de la red en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema10/figura01.htm>.

Las células del sistema inmune llevan a cabo su acción citotóxica como respuesta a diversos estímulos, entre los que se encuentran los antígenos (Ag) y otras moléculas expresadas en la superficie de las células blanco.

2) Respuesta inmune. Células del sistema inmune con actividad citotóxica

La respuesta inmune es aquella específica hacia un antígeno (Ag), la cual incluye respuestas celulares (generación de células cooperadoras y células citotóxicas) y la inmunidad humoral (figura 2). Ambos tipos de respuesta inmune no son mutuamente excluyentes, ya que algunas células cooperadoras de la respuesta celular participan en la generación de células de la respuesta humoral. Los productos de la respuesta humoral pueden participar a su vez en la generación de una respuesta celular (figura 5). Por ejemplo, los macrófagos participan en la respuesta celular en la generación de células cooperadoras (figura 2, figura 3) o como células efectoras (figura 1), pero también son células presentadoras de antígeno; mientras que las células NK desempeñan funciones efectoras (actividad citotóxica, figura 1) o de células cooperadoras/reguladoras (Moretta, 2008) (figura 3).

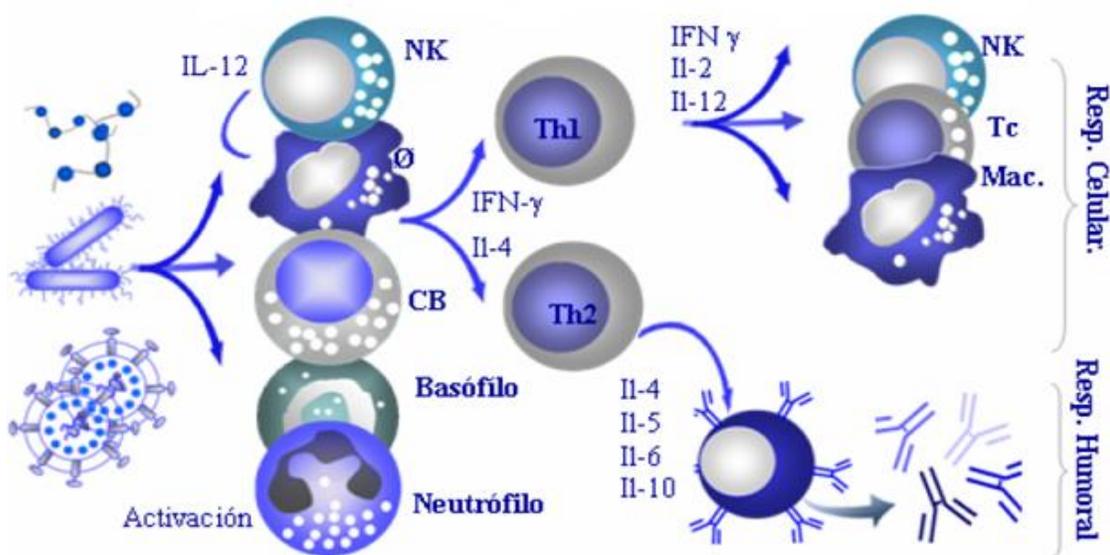


Figura 2. Representación de la respuesta inmune celular y humoral. Se muestran de manera general los tipos celulares involucrados en ambas respuestas, y cómo éstas se encuentran relacionadas entre ellas. Imagen de J.M. Lozano, R. Tarazona y J. Peña, Universidad de Córdoba, España. Tomada de la red en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema14/figura14.htm>.

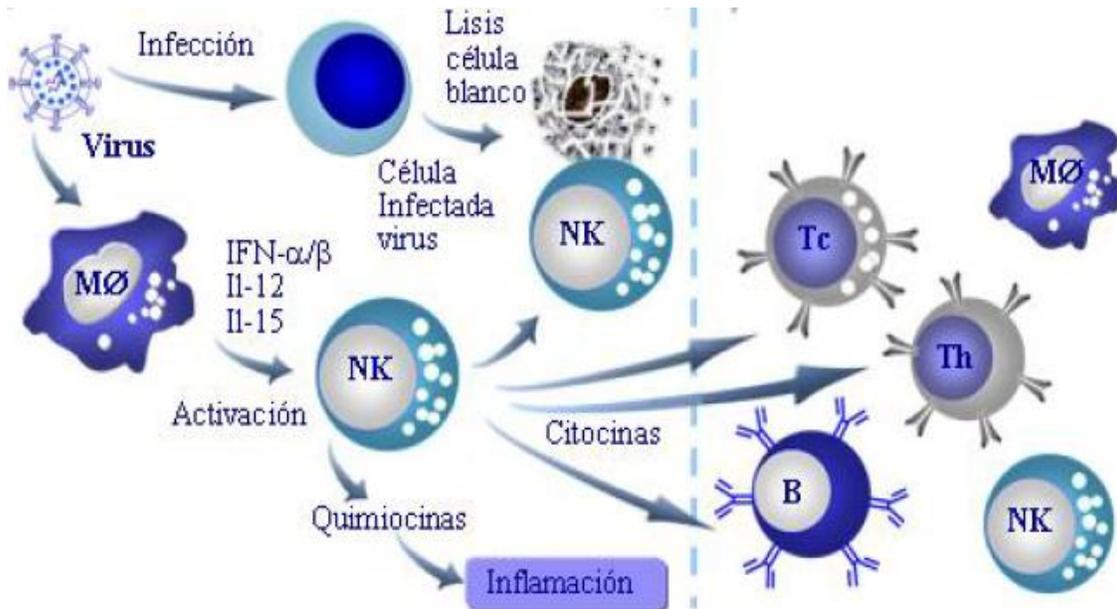


Figura 3. Funciones de las células NK. Se muestra que las células NK tienen la capacidad de lisar células blancas, pero también de secretar sustancias que tienen efecto en otras células del sistema inmune. Se muestra también que los macrófagos pueden actuar como células cooperadoras (en la generación de células NK que pueden tener un papel cooperador/regulador) o como células efectoras. Imagen de M. López-Botet y J. Peña, Universidad de Córdoba, España. Tomada de la red en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema12/figura17.htm>.

La respuesta inmune primaria es aquella que se presenta en el organismo de un animal hacia un antígeno en la primera ocasión en la que se encuentra en contacto con él. La respuesta secundaria se presenta en enfrentamientos subsecuentes del organismo con el antígeno (Herbert, 1995).

En la inmunidad mediada por células los linfocitos T (células T, derivadas del timo) tienen un papel principal como células reactivas, reconociendo antígenos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en contacto con las células que los poseen.

Lo anterior resulta en una proliferación y maduración de células T antígeno-específicas que da origen a células T efectoras capaces de llevar a cabo diversas funciones, por ejemplo, las células T CD4⁺ producen citocinas y expresan moléculas de superficie pertenecientes a la familia de necrosis tumoral

Las mismas células T CD4⁺, al ser activadas con antígeno, proliferan y se diferencian hacia células T efectoras inmaduras (T_{H0}) y después hacia células cooperadoras de tipo T_{H1} proinflamatorias que activan a las células T citotóxicas precursoras, o hacia células T_{H2} contribuyentes a la activación de células B.

Asimismo, las células T activadas liberan citocinas que tienen efectos en otros tipos celulares, de tal manera que la célula efectora puede ser de un tipo diferente al linfocito T. Un ejemplo de lo anterior son las células T, que cooperan con linfocitos B en la producción de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes, pero también pueden activar a células citotóxicas.

Por otra parte, los linfocitos T citotóxicos CD8+ activados destruyen a sus células blanco principalmente liberando perforina y granzimas, lo cual es una manera sinérgica de inducir la muerte de la célula blanco (Gachlin, 2001; Madrenas, 2001; Moretta, 2008).

Entre las células del sistema inmune con actividad citotóxica o citolítica se encuentran los linfocitos T citotóxicos (LTC), las células asesinas naturales (Natural Killer, NK), las células asesinas activadas por linfocinas (LAK) y los monocitos.

La función citotóxica constituye una parte importante de la respuesta inmune mediada por células. La citotoxicidad es un proceso multifactorial altamente organizado llevado a cabo por diferentes células del sistema inmune, consiste en la inducción de la muerte de la célula blanco a través de células efectoras citotóxicas, e incluye mecanismos de adhesión, formación de sinapsis, polarización de gránulos y exocitosis de los mismos (figura 4).

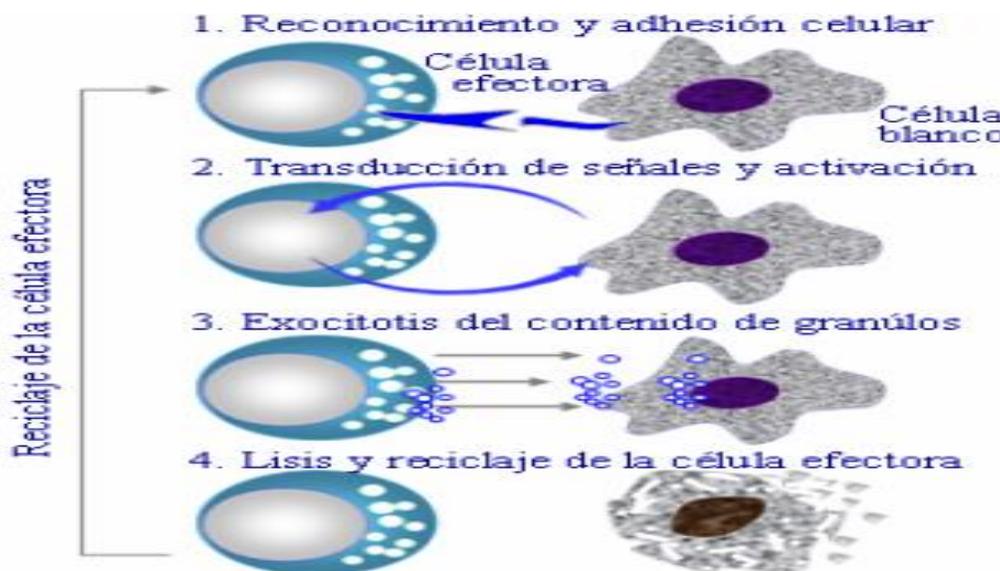


Figura 4. Etapas del proceso de citotoxicidad mediada por células como macrófagos, linfocitos T citotóxicos y células NK.

Imagen de J.M. Lozano, R. Tarazona y J. Peña, Universidad de Córdoba, España. Tomada de la red en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema14/figura01.htm>.

Las células NK y células T CD8+ son dos de las principales poblaciones consideradas como células citotóxicas, debido a que su actividad más importante es eliminar células anormales o infectadas para prevenir el desarrollo de malignidades, así como la eliminación de patógenos intracelulares (Trambas, 2003; Ignatowska-Jankowska, 2009).

Las células NK son linfocitos grandes y granulares, mediadores de funciones cruciales de la inmunidad innata, principalmente contra infecciones virales. Destruyen a las células blanco que no expresan o que expresan deficientemente MHC clásico y no clásico. La actividad de las células NK se presenta en una manera no antígeno-específica (sin previa sensibilización al antígeno) mediada por un amplio espectro de receptores de superficie inhibitorios, por ejemplo KIR2DL, KIR3DL, LIR-1, LIR-2; y activadores, como CD16, CD43, CD29, los receptores de citotoxicidad natural NKp46, NKp44, y NKp30, y otros como KIR2DS, KIR3DS, CD94/NKG2C, CD94/NKG2E y NKG2D (Hao, 2007; Voskens, 2010).

En el proceso de citotoxicidad mediado por células, dependiente de anticuerpos, una célula cubierta con anticuerpos puede ser lisada por las células citotóxicas (Golub, 1987). Algunas poblaciones de células NK y linfocitos T citotóxicos expresan en su membrana receptores específicos conocidos como CD16, para la fracción cristalizable de la IgG de tipo III (FcγR-III). Estos receptores presentan baja afinidad por la IgG monomérica, pero interaccionan eficazmente con inmunocomplejos. Si la IgG se halla unida específicamente al antígeno sobre la superficie de otra célula, el CD16 en la célula efectora activa el proceso citolítico con la misma eficacia que el CD3/TCR de los linfocitos T citotóxicos, desencadenando el proceso de citotoxicidad mediado por células, dependiente de anticuerpos (Russell, 2002).

En la figura 5 se muestran algunos mecanismos por los que los linfocitos T citotóxicos y las células NK llevan a cabo su acción citotóxica.

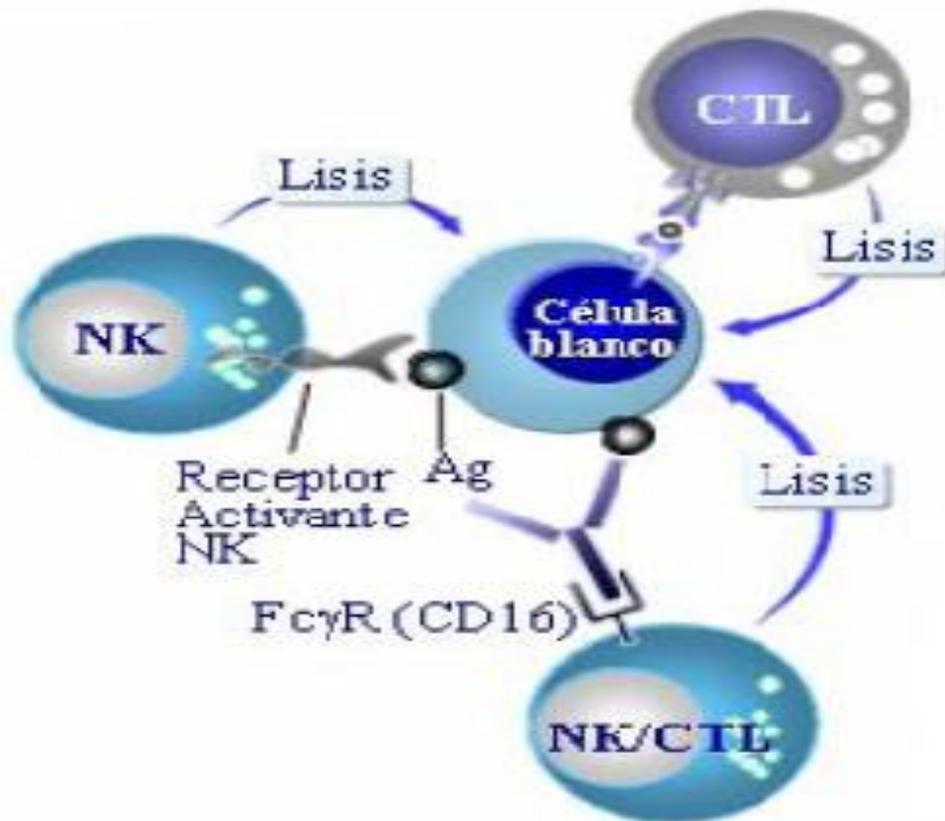


Figura 5. Mecanismos de citotoxicidad mediada por células. Se muestra el reconocimiento de células blanco por linfocitos T citotóxicos mediante el receptor de Linfocito T, por células NK mediante los receptores de citotoxicidad natural, y el mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos, en el que ambos tipos celulares pueden ejercer su acción citotóxica al reconocer la fracción cristalizante de una inmunoglobulina G unida a antígenos presentes en la superficie de una célula blanco.

Imagen de J.M. Lozano, R. Tarazona y J. Peña, Universidad de Córdoba, España. Tomada de la red en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema14/figura03.htm>.

En los años recientes ha emergido un concepto novedoso indicando que el verdadero papel de las células NK no está confinado únicamente a la destrucción de células infectadas por virus, o a la de tumores. De hecho, diferentes subgrupos de células NK muestran grandes diferencias en su actividad citolítica, producción de citocinas y capacidad para reconocer y atacar células blanco. Debido a lo anterior las células NK pueden ser vistas también como células reguladoras que, dependiendo de las interacciones celulares y del tipo de citocinas liberadas después de una invasión de patógenos juegan un papel clave en la estimulación de células T (Moretta, 2008).

La muerte celular inducida por las células citotóxicas puede producirse por necrosis o apoptosis. Algunas de las señales de reconocimiento y activación celular para que una

célula efectora induzca la muerte de una célula blanco por necrosis o apoptosis se muestran en la figura 6.

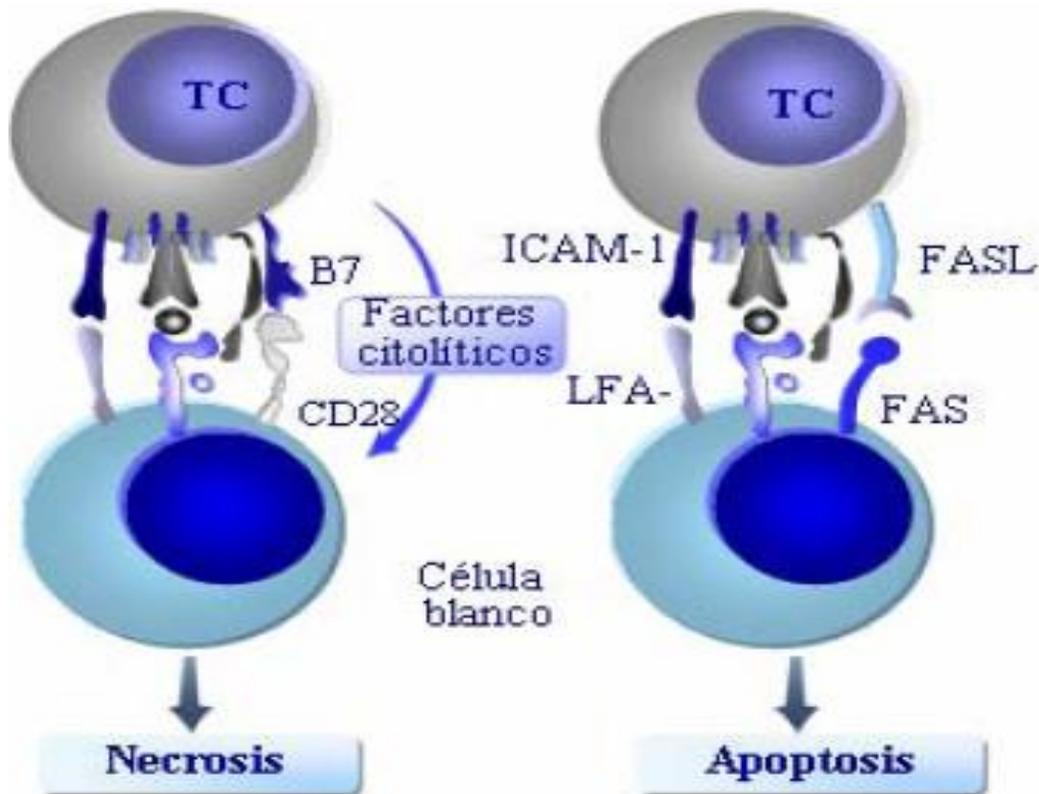


Figura 6. Señales de reconocimiento y activación celular que permiten que una célula efectora (como los linfocitos T citotóxicos que se muestran en la imagen) induzca la muerte de una célula blanco, la cual puede producirse por necrosis o apoptosis. El reconocimiento de diferentes moléculas expresadas en la superficie de las células blanco por sus receptores correspondientes presentes en las células efectoras da como resultado la producción de factores citolíticos que llevan a la muerte de la célula blanco por diferentes mecanismos.

Imagen de J.M. Lozano, R. Tarazona y J. Peña, Universidad de Córdoba, España. Tomada de la red en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema14/figura04.htm>.

La necrosis es un proceso en el cual las células sufren cambios irreversibles que se llevan a cabo en una manera rápida y no ordenada. Un gran número de componentes intracelulares son liberados al espacio intercelular debido al estallido celular. La necrosis causa daño al tejido circundante porque promueve un proceso inflamatorio.

Por otra parte, en la apoptosis las células sufren cambios morfológicos, pero éstos tienen lugar en una forma controlada y programada. Inicialmente, hay una alteración química limitada en la membrana de la célula apoptótica, seguida por condensación de la cromatina nuclear, encogimiento citoplasmático, dilatación del retículo endoplásmico

y finalmente un empaquetamiento de los contenidos celulares en vesículas denominadas “cuerpos apoptóticos” (figura 7). Dichos cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos circundantes, lo que evita la liberación del contenido citoplásmico al exterior, sin que desarrolle una respuesta inflamatoria y se dañen las células vecinas. La apoptosis puede ser inducida por tres vías: 1) vía de exocitosis dependiente de gránulos (perforina, granzimas y granulicina); 2) vía mediada por anclaje intercelular de Fas-FasL (entre las células blanco y las células efectoras citotóxicas); y 3) enlace cruzado de TNF y TNFR tipo I (Chávez, 2009).

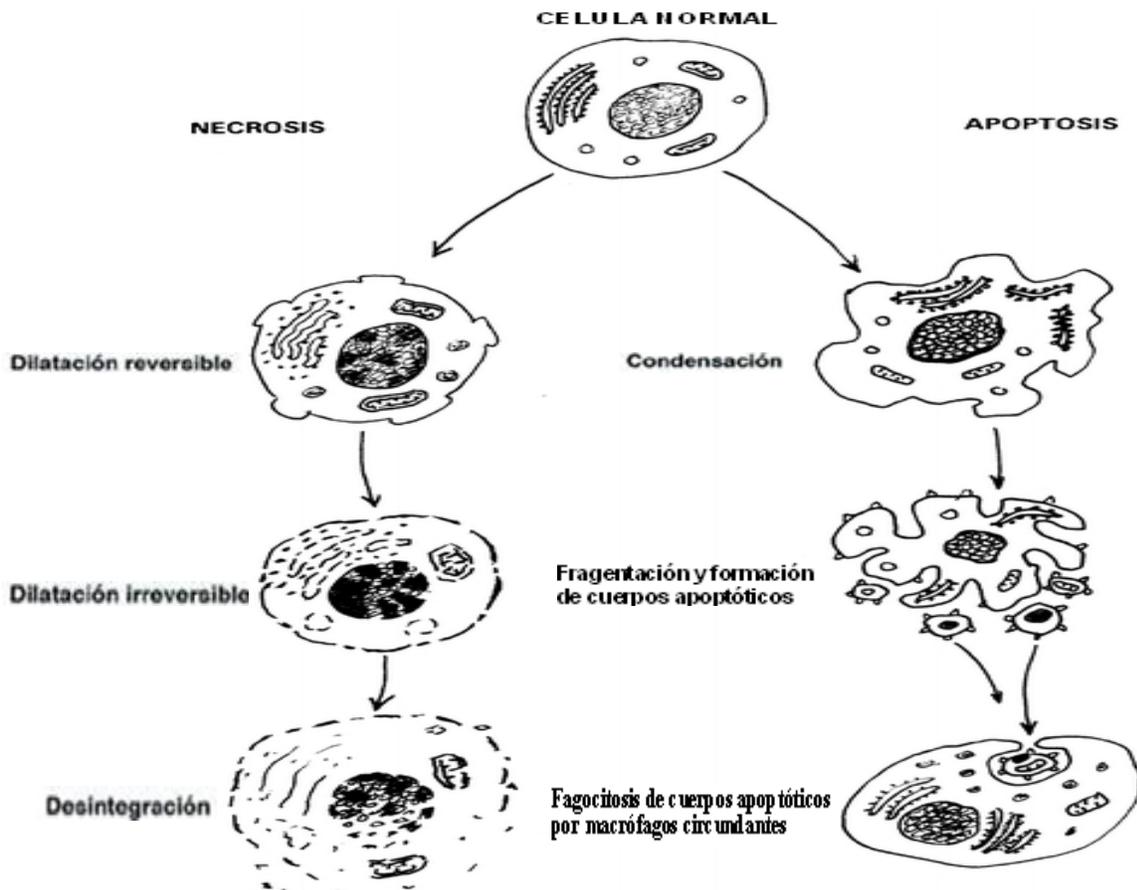


Figura 7. Cambios morfológicos durante la muerte celular por mecanismos de necrosis o apoptosis. Se muestra que en la muerte por necrosis se da un “estallido” celular, con la consiguiente liberación del contenido celular al espacio intercelular; mientras que en la apoptosis se da una muerte celular “limpia”, en la que los componentes celulares son contenidos en los cuerpos apoptóticos para su posterior reutilización.

Imagen de Freek J. van der Meer, Dirk J. Faber, Maurice C. G Aalders, et al. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. *Lasers Med Sci.* 2010 March; 25(2): 259–267.

La inmunidad humoral es mediada por linfocitos B (también llamados células B), células derivadas de un precursor en la médula ósea, ambiente donde tienen su primera etapa de desarrollo (fase antígeno independiente) (figura 8), que incluye el rearreglo de genes de las cadenas pesadas y luego de las ligeras de las inmunoglobulinas de superficie (Ig). Las células B inmaduras migran hacia el bazo y órganos linfoides, donde entran en contacto con antígenos extraños (fase antígeno dependiente) (figura 8).

El posterior desarrollo de las células B (con excepción del reconocimiento de antígenos independientes de células T), que incluye expresión de IgD en la superficie, producción de inmunoglobulinas solubles, cambio de isotipo, y maduración de afinidad por hipermutación somática, requiere de ayuda de las células T cooperadoras (T_H). Las etapas finales de diferenciación de las células B dan como resultado células plasmáticas, las cuales producen una gran cantidad de anticuerpos y tienen un tiempo de vida limitado; o células de memoria, que son células pequeñas con un tiempo de vida largo, que al ser estimuladas con antígeno pueden proliferar rápidamente y diferenciarse hacia células B activas (Gachlin, 2001; Odendahl, 2005) (figuras 8 y 9).

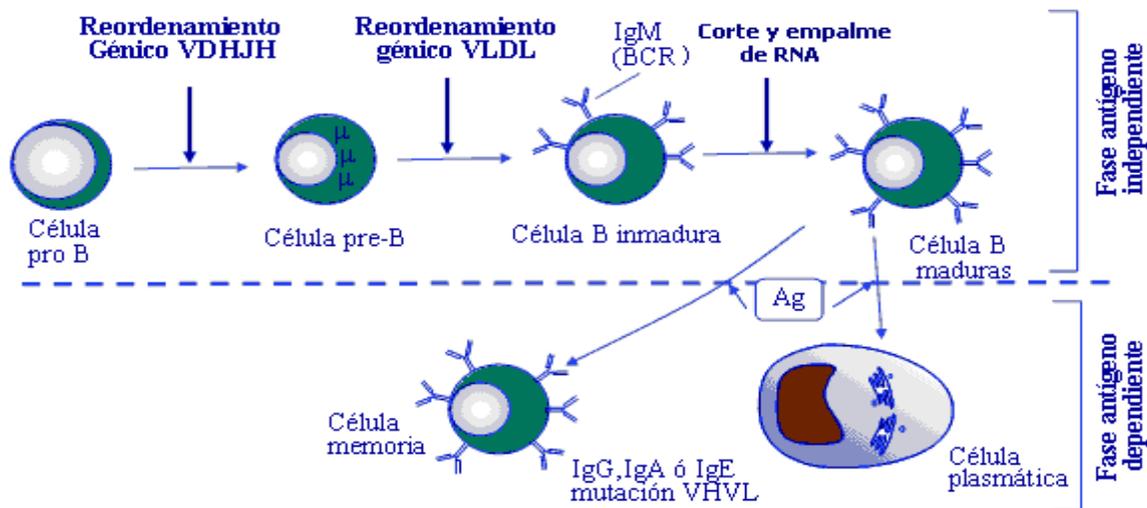


Figura 8. Fases del desarrollo de las células B a partir de precursores en la médula ósea. El reordenamiento génico VDHJH es el rearreglo de las cadenas pesadas de Inmunoglobulina, el reordenamiento génico VLDL es el rearreglo de las cadenas ligeras de Inmunoglobulina. Después de dichos rearreglos de genes se tiene una célula B inmadura, que expresa IgM en su superficie, la cual actúa como receptor de célula B (BCR). Cuando las células B maduras entran en contacto con antígenos en el bazo y órganos linfoides pueden diferenciarse hacia células de memoria o hacia células plasmáticas. La mutación VHVL consiste en el cambio de isotipo y la maduración de afinidad por hipermutación somática. Imagen de P. Aparicio y T. Gallart. Tomada de <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema11/figura01.htm>.

En la figura 9 se presenta de manera más detallada el reconocimiento de antígenos dependientes e independientes de células T, que da como resultado la diferenciación de las células B maduras hacia células de memoria o hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos.

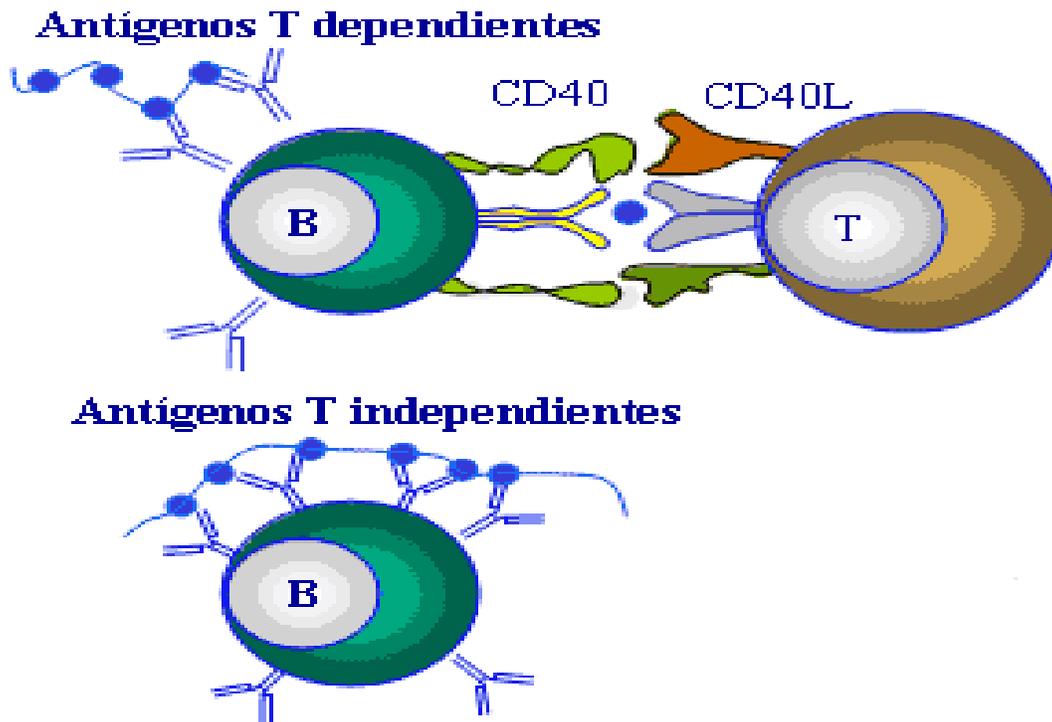


Figura 9. Reconocimiento de antígenos dependientes e independientes de células T. Se muestra que para el reconocimiento de antígenos dependientes de células T es necesaria una interacción entre las células T cooperadoras y las células B.
Imagen de P. Aparicio y T. Gallart. Tomada de <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema11/figura01.htm>.

En el enfrentamiento primario con un antígeno T-dependiente, hay una fase inicial en la cual no pueden detectarse anticuerpos específicos, mientras que toma de 1 a 2 semanas observar un aumento logarítmico de los títulos de anticuerpos, los cuales alcanzan una meseta antes de disminuir nuevamente.

En la respuesta primaria, la aparición de IgG es precedida por la de IgM. En comparación, los títulos de anticuerpo posteriores a un enfrentamiento antigénico secundario aparecen más rápidamente, alcanzan un nivel mayor y pueden persistir por períodos de tiempo muy largos, además de que la respuesta humoral secundaria está

caracterizada por la predominancia de anticuerpos de la subclase IgG con una mayor afinidad por el antígeno inmunizante, como se muestra en la figura 10.

Esta respuesta secundaria rápida y específica es dependiente del reclutamiento y activación de células B de memoria generadas durante la respuesta primaria, ya que estas células exhiben una ventaja sobre células B “novatas” tanto en el tiempo para iniciar una respuesta como en la tasa de desarrollo celular basado en división.

En ausencia de re-inmunización, los niveles de anticuerpo en el suero pueden ser mantenidos por varios años e incluso décadas. Se cree que dichos niveles de anticuerpos son mantenidos por la presencia de células plasmáticas de tiempo de vida prolongado en la médula ósea, las cuales secretan anticuerpos durante largos períodos de tiempo; y/o la diferenciación continua de células B de memoria hacia células plasmáticas en una manera antígeno-independiente (Lefevre, 2009) (figura 11).

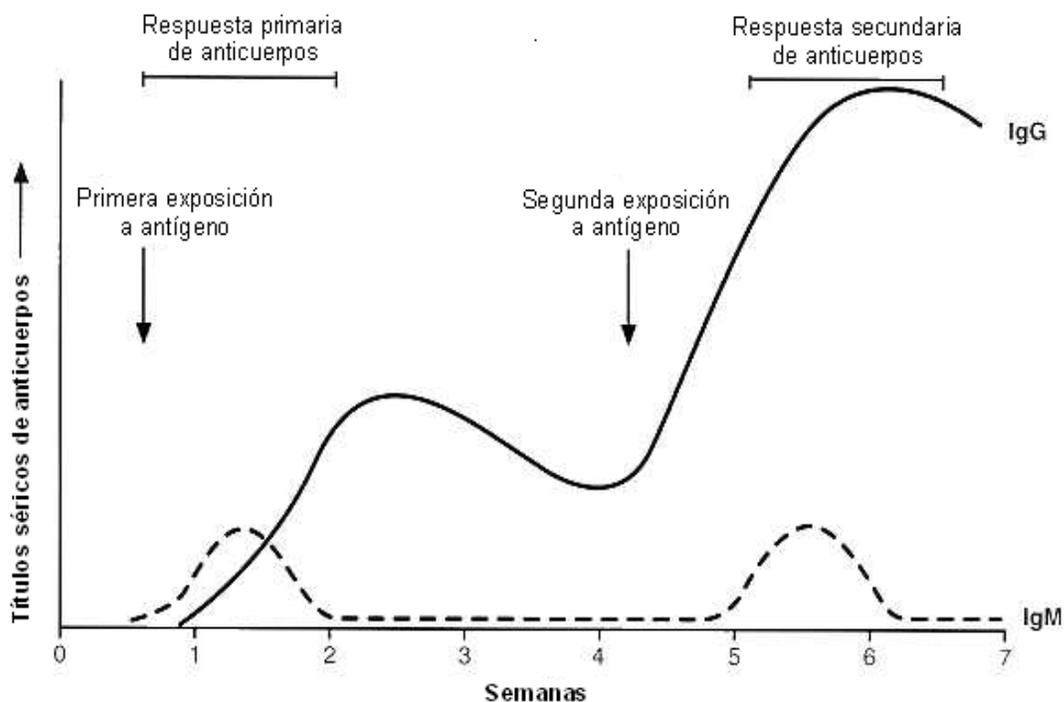


Figura 10. Fases primaria y secundaria de la respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos).

Se muestran los niveles séricos de anticuerpos inespecíficos (IgM) y específicos (IgG) producidos en respuesta a la inmunización con un antígeno. Se observa que durante la fase de respuesta primaria predominan los anticuerpos inespecíficos (IgM) y durante la fase de respuesta secundaria predominan los anticuerpos específicos (IgG). En la fase de respuesta secundaria se da un incremento logarítmico en los niveles séricos de anticuerpos específicos, los cuales alcanzan una meseta antes de disminuir nuevamente.

Imagen de Samuel Baron, The University of Texas Medical Branch of Galveston, 1996. Tomada de la red en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A201>.

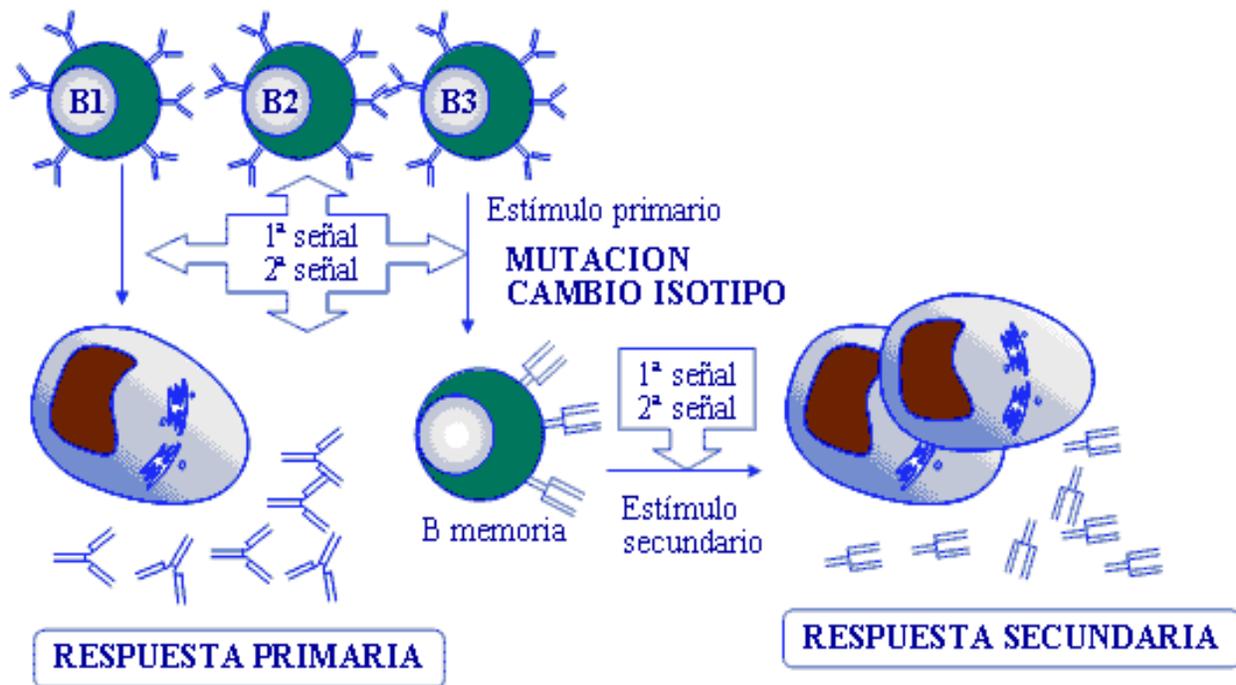


Figura 11. Células plasmáticas productoras de anticuerpos durante las fases primaria y secundaria de la respuesta humoral.

Se muestra que las células plasmáticas productoras de anticuerpos producen anticuerpos específicos con mayor facilidad que las células “novatas”, debido a la gran capacidad de proliferación adquirida por la activación al estar en contacto con antígenos.

Durante la fase de respuesta primaria la proliferación de células plasmáticas productoras de anticuerpos es menor que durante la fase de respuesta secundaria, en la que ya se han generado células B de memoria debido al estímulo primario, las cuales en presencia de un estímulo secundario se diferencian rápidamente hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estos fenómenos se relacionan con los niveles de anticuerpos séricos inespecíficos y específicos que se muestran en la figura 10.

Imagen de P. Aparicio y T. Gallart. Tomada de la red en <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema11/figura01.htm>.

La generación de células citotóxicas y la respuesta humoral pueden verse modificadas por las hormonas (sustancias producidas por células de un tejido u órgano, las cuales pueden tener efectos sobre las mismas células que las produjeron, sobre células vecinas, o sobre células que formen parte de un tejido u órgano diferente).

Las hormonas pueden clasificarse de acuerdo a su naturaleza química, pudiendo ser derivadas de aminoácidos, peptídicas (formadas por oligopéptidos o polipéptidos, que son cadenas de aminoácidos), o lipídicas (que pueden ser esteroidales o eicosanoides).

Los estrógenos pertenecen a un amplio grupo de hormonas esteroidales que presentan diversos efectos fisiológicos, que dependen de la célula sobre la que actúen. Dada su naturaleza lipofílica pueden atravesar la bicapa lipídica de las membranas celulares, interactuando con sus receptores específicos en el interior de la célula diana.

3) Estrógenos naturales y sintéticos. Efectos de los estrógenos sobre células citotóxicas del sistema inmune

Los estrógenos son hormonas femeninas endógenas, derivadas del colesterol, que tienen como principal característica la presencia del ciclopentanoperhidrofenantreno en su estructura (figura 12).

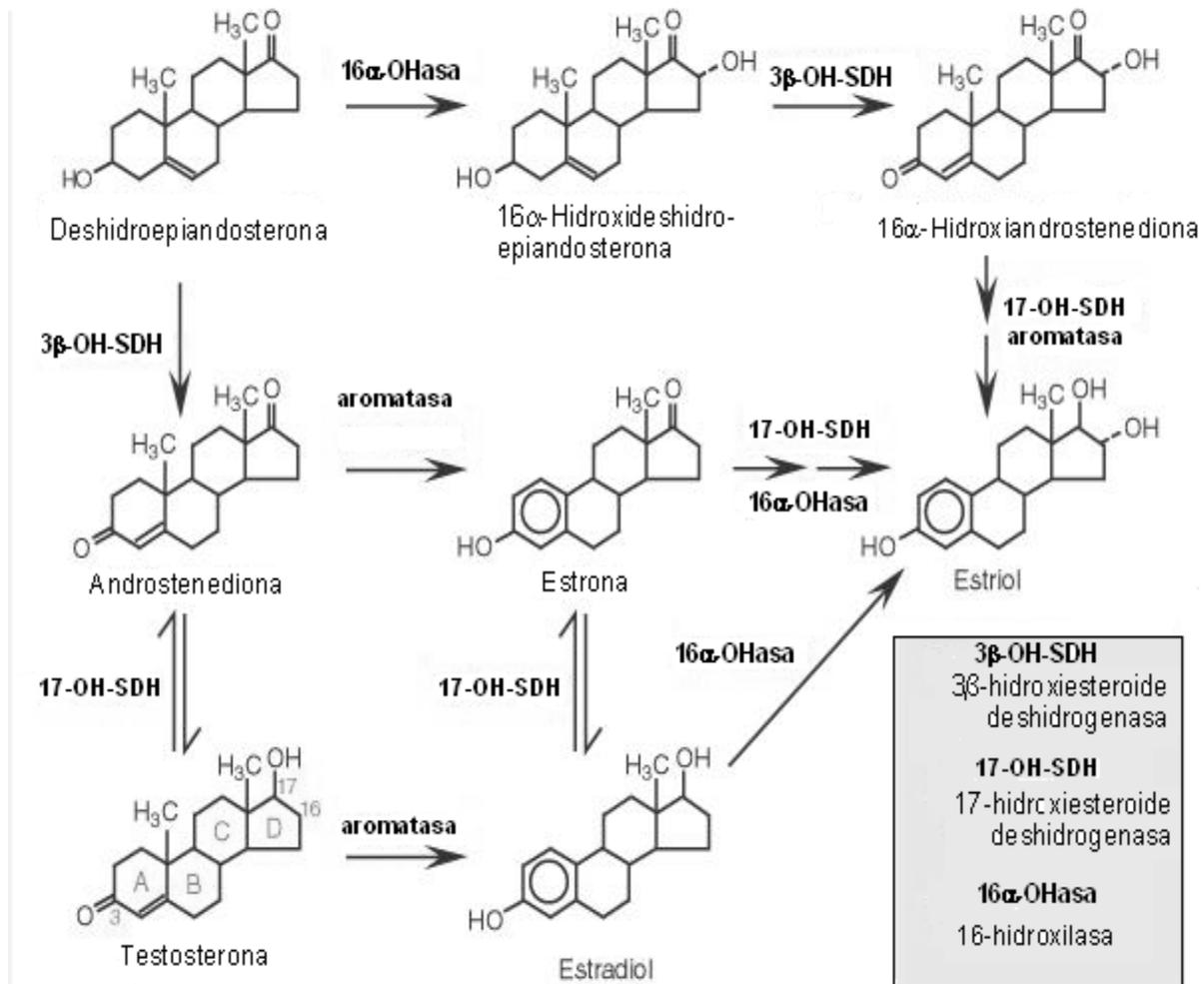


Figura 12. Biosíntesis de hormonas esteroidales. Se muestran los cuatro anillos del ciclopentanoperhidrofenantreno (A, B, C y D) presentes en la estructura de todas ellas, así como los átomos de carbono que sufren modificaciones por las enzimas de la ruta sintética.

Imagen de Laurence L. Brunton, John S. Lazo y Keith L. Parker. Goodman & Gillman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS. McGraw Hill. 11th Ed. p. 1543.

Los estrógenos representados anteriormente en la figura 12 son hormonas endógenas que tienen diversos efectos fisiológicos. Existen estrógenos sintéticos (análogos

estructurales de los estrógenos naturales, que son producidos en laboratorio mediante síntesis) que al igual que los estrógenos endógenos pueden presentar efectos diversos sobre el organismo, debido a las similitudes estructurales que presentan.

En la figura 13 se muestran las estructuras y pesos moleculares de dos estrógenos naturales (17β -estradiol y estriol) y uno sintético (dietilestilbestrol).

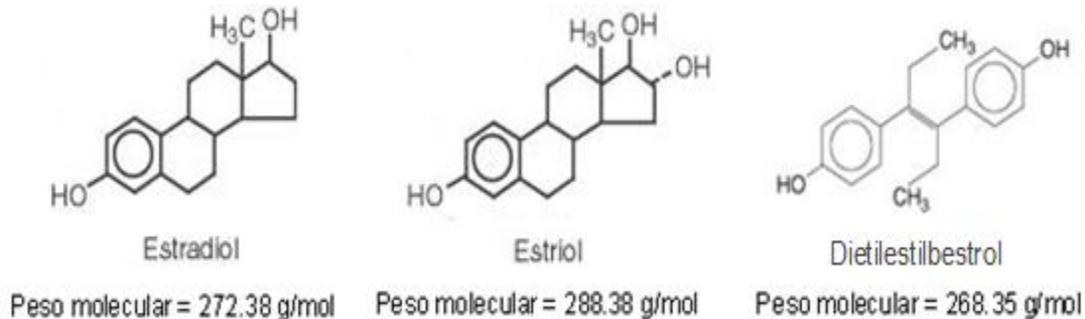


Figura 13. Estructura y peso molecular de dos estrógenos naturales (17β - estradiol y estriol, y un estrógeno sintético (dietilestilbestrol).

Imágenes de Lurence L. Brunton, John S. Lazo y Keith L. Parker. Goodman & Gillman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS. McGraw Hill. 11th Ed. p. 1542-43.

Los estrógenos producen una gran variedad de efectos fisiológicos, como son aquellos sobre el desarrollo, mantenimiento y funciones de los órganos reproductores femeninos, entre ellos se encuentran acciones promotoras del crecimiento sobre las células del útero (efecto uterotrófico), la cornificación vaginal (Molina, 1995), la glándula mamaria y sobre los folículos de Graaf del ovario, los ciclos de actividad sexual y las características sexuales secundarias femeninas

Además, tienen efectos metabólicos generales en todo el organismo, algunos son el aumento de la lipogénesis en el tejido adiposo, efectos bifásicos en la colesterolemia, el incremento en la síntesis de proteínas a través del hígado, entre las que se encuentran la transferrina, la ceruloplasmina, la transcortina o globulina enlazante de corticoesteroides y la globulina fijadora de testosterona y estrógeno. Asimismo, actúan sobre el sistema cardiovascular y el mecanismo de coagulación de la sangre, favoreciendo una disminución en el tiempo de coagulación y un aumento en el número de plaquetas.

Los efectos de los estrógenos en el sistema inmune son muy diversos. El 17β -estradiol puede actuar como inmunomodulador positivo incrementando la autoinmunidad, o

negativo al afectar negativamente la proliferación de células T y las respuestas dependientes de antígeno (McMurray, 2001); incrementa la viabilidad de células dendríticas plasmacitoides y su capacidad estimuladora sobre las células B (Li, 2009), aumentando la susceptibilidad de estas últimas a producir autoanticuerpos, lo cual puede participar en la patogénesis y prevalencia de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico en mujeres.

Otro estrógeno, el 17α -estradiol, esteroisómero del 17β -estradiol, induce la apoptosis de las células T de la línea Jurkat (Jun, 2008); y el estriol reduce la infiltración de células T y monocitos en el sistema nervioso central, atenuando las lesiones en esclerosis múltiple y encefalitis autoinmune experimental (Gold, 2009).

Tanto la progesterona como el estradiol suprimen la citotoxicidad de células mononucleares de sangre periférica en una manera dosis-dependiente. La estrona, el estriol, la pregnenolona y el colesterol no tienen efecto sobre la citotoxicidad. Una supresión sinérgica de la citotoxicidad se observa cuando la estrona, el estradiol, el estriol y la progesterona son combinados (Feinberg, 1992).

Por otra parte, el tratamiento con 17β -estradiol produce un aumento en el número de células NK, pero una reducción de su citotoxicidad, y se piensa que la presencia de receptores estrogénicos en células B, células T y células NK permite que los estrógenos estén involucrados en la regulación de inmunocompetencia del sistema inmune en el embarazo y algunas enfermedades predominantes en mujeres (Hao, 2007).

Algunos autores han propuesto que los estrógenos pueden tener un efecto regulador en la respuesta inmune durante el embarazo. Es posible que la progesterona y el estradiol secretados por el trofoblasto actúen en la interface coriodecidual, donde están presentes en altas concentraciones, para que se dé un efecto inmunosupresor local parácrino sobre la citotoxicidad (Feinberg, 1992).

Los leucocitos comprenden aproximadamente 30-40% de las células estromales deciduales en el embarazo humano temprano (Williams, 2009), de ellos, las células NK uterinas son el componente mayoritario (Acar, 2009), de las cuales se han identificado distintos subgrupos. Algunas de esas células pueden jugar un papel importante en la vasoregulación y angiogénesis, teniendo efecto en la presión sanguínea y en el proceso de modificación de la arteria espiral durante el embarazo (Burke, 2010). Las células NK

uterinas parecen desempeñar papeles en la inmunotolerancia y la regulación de la invasión del trofoblasto hacia la decidua uterina y el miometrio interior, procesos clave en el establecimiento de un embarazo humano exitoso (Lash, 2009).

Como antecedente, en el Laboratorio de Farmacología Celular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM, se encontró que el tratamiento in vivo con dietilestilbestrol, estimuló la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes, mientras que el tratamiento in vitro tuvo un efecto depresor; por otra parte, el tratamiento in vivo con 17β -estradiol o dietilestilbestrol previo o posterior a la inmunización no modificó la producción de anticuerpos durante la fase de respuesta primaria, ni el número de células secretoras de IgG (Molina 1995; 1999).

En el presente trabajo, estudiamos in vivo en el ratón el efecto de dos estrógenos fisiológicos (17β -estradiol o estriol) y un estrógeno sintético (dietilestilbestrol) sobre la actividad citotóxica de los esplenocitos, así como sobre las fases primaria y secundaria de la respuesta humoral (producción de IgG específica), con la finalidad de determinar si las modificaciones en la actividad citotóxica podrían deberse a un efecto sobre la citotoxicidad natural o sobre la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

Por ello fue necesario implementar métodos que resultaran adecuados para estimar la citotoxicidad mediada por células, así como para evaluar los niveles séricos de anticuerpos. En los dos apartados siguientes se describen los fundamentos de algunos de esos métodos.

4) Métodos para la estimación de citotoxicidad

Diferentes autores han desarrollado baterías de prueba in vitro para predecir el efecto de compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios, órganos aislados y líneas celulares establecidas (Rodeiro, 2002).

La muerte celular es evaluada típicamente mediante la cuantificación del daño de la membrana plasmática. Los métodos empleados para ello siguen diferentes principios. Algunos de ellos se basan en la captación o exclusión de colorantes vitales (Jones, 1985; Cook, 1989; González, 2004), en ellos las células muertas y viables son

discriminadas por tinción diferencial y contadas usando un microscopio de luz o de fluorescencia. Estos métodos tienen como desventaja que no permiten procesar un número grande de muestras (algunos se han adaptado para dicho propósito) y no toman en cuenta células que pudieran lisarse. Como ejemplos están el ensayo de captación del rojo neutro, que es un colorante catiónico débil que penetra a las membranas por difusión pasiva y es almacenado en los lisosomas. Si la división celular es interferida, se reduce el número de células del cultivo, disminuyendo por tanto la cantidad del colorante retenido por las células vivas; el ensayo de enlace al azul de kenacid, colorante que tiene la capacidad de enlazarse a las proteínas celulares, en el que la cantidad de colorante retenido en las células vivas es un indicador de proliferación celular; y el ensayo de reducción de MTT a formazán por la succinato deshidrogenasa, lo que conduce a que se produzca un cambio de coloración en el medio, que puede ser cuantificado y tomado como índice de la integridad de las mitocondrias, del estado energético y la actividad funcional de las células (Rodeiro, 2002; Da Violante, 2002). La determinación de la viabilidad celular en este tipo de ensayos se realiza de manera espectrofotométrica.

Otro grupo de ensayos está basado en la liberación de isótopos radiactivos (como [^{14}C], [^{51}Cr] o [^3H]-timidina) o colorantes fluorescentes de células blanco previamente marcadas (Zänker, 1984; Kolber, 1988; Danks, 1992). Las desventajas de estos métodos son el uso de isótopos radiactivos, la necesidad de marcar previamente las células blanco y la alta liberación espontánea de la mayoría de los marcadores de las células premarcadas. En un tercer tipo de ensayos se realiza la medición de la actividad de enzimas liberadas de células dañadas, en ellos la cantidad de actividad enzimática detectada en el sobrenadante de cultivo es directamente proporcional a la fracción de células lisadas, un ejemplo es la medición de la actividad de la enzima Deshidrogenasa Láctica (DHL) como indicador de daño celular por disfunción de la membrana (Da Violante, 2002), que puede llevarse a cabo mediante ensayos colorimétricos acoplados al ensayo enzimático, empleando un catalizador que transfiere los electrones del NADH formado por reducción del NAD^+ durante la oxidación del lactato a piruvato por acción enzimática, a una sal de tetrazolio que se reduce pasando a formar una sal de formazán (figura 14).

Otros métodos para la medición de la proliferación ó la muerte celular son aquellos que se basan en la captura de productos como bromodesoxiuridina, que puede ser detectada mediante la técnica de ELISA (Fu, 2010); en la medición del contenido de proteína celular por tinción con sulforodamina B (Papazisis, 1997); en la expresión de genes que codifican para proteínas que tienen efecto en la proliferación ó viabilidad celular detectada y cuantificada mediante microarreglos ó inmunoblot (Western blot) (Hao, 2007; Fu, 2010); en la actividad de caspasas cuantificada por inmunofluorescencia (Antczak, 2009), y en la fragmentación de DNA internucleosomal detectada mediante tinción con el método de marcaje pseudofinal de desoxiuridina-5-fosfato mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Loo, 2002; Fu, 2010) para detectar células apoptóticas.

En las figuras 14 y 15 se representa el fundamento bioquímico y analítico del método estándar empleado para la estimación de actividad de Deshidrogenasa Láctica (DHL) liberada, mediante un ensayo enzimático colorimétrico.

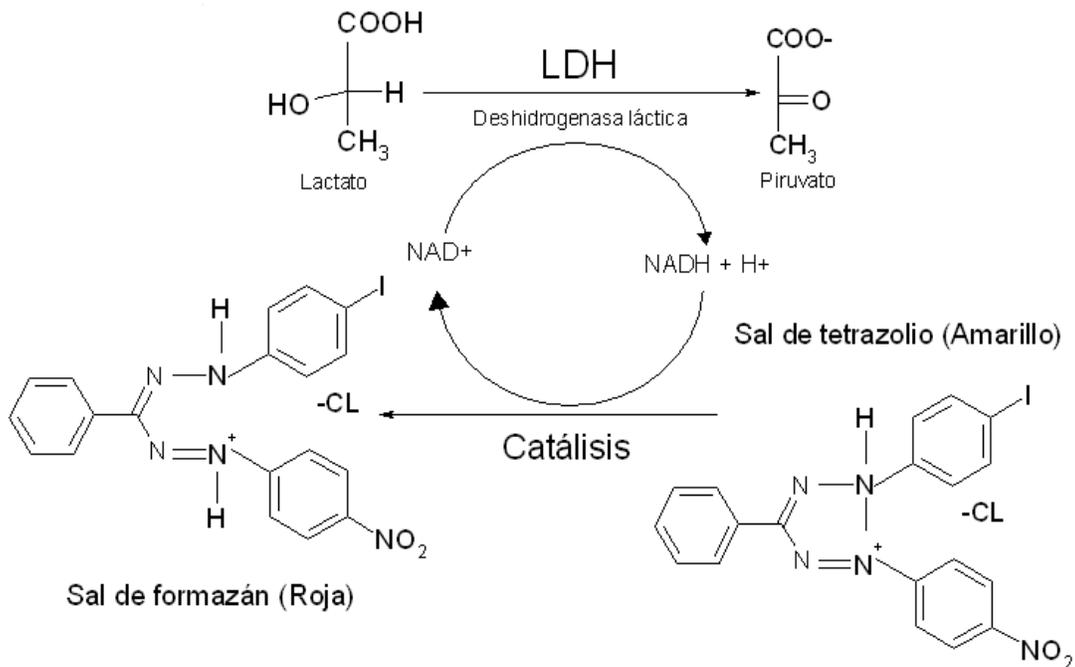


Figura 14. Fundamento bioquímico del método para la estimación de actividad de Deshidrogenasa láctica (DHL) liberada, mediante un ensayo enzimático colorimétrico. En un primer paso el NAD⁺ pasa a NADH + H⁺ al capturar los electrones liberados por la oxidación del lactato hacia piruvato catalizada por la DHL. En el segundo paso el NADH + H⁺ cede los electrones al cloruro de yodotetrazolio (sal amarilla), que se reduce para formar una sal de formazán (roja). La cantidad del producto colorido es proporcional a la actividad de la DHL liberada de células que han sufrido daño en la membrana.

Imagen tomada de Roche Applied Science. Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Version July 2005. p. 16.

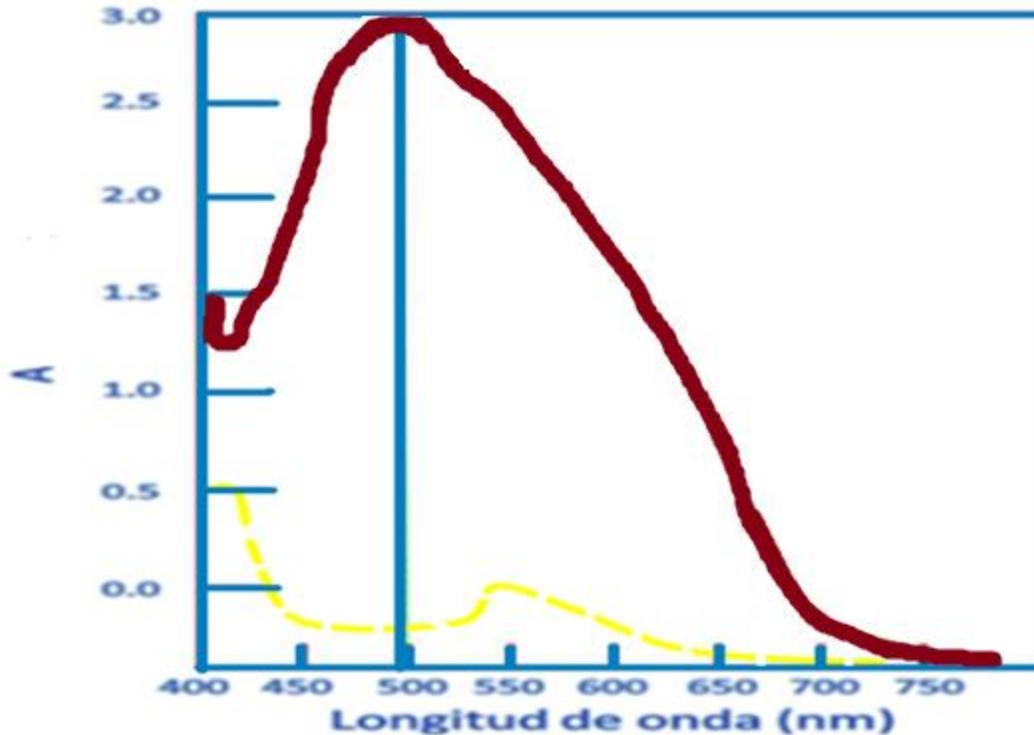


Figura 15. Espectros de absorción de la sal de formazán y del cloruro de yodotetrazolio. La sal de formazán (línea roja continua) presenta un máximo de absorción a 492 nm, mientras que la sal de tetrazolio (línea amarilla punteada) no presenta una absorción considerable a dicha longitud de onda. Imagen tomada de Roche Applied Science. Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Version July 2005. p. 16.

5) Métodos para la estimación de niveles séricos de anticuerpos

Los inmunoensayos son las técnicas analíticas más ampliamente utilizadas para medir la respuesta inmune humoral y han sido aplicados exitosamente para un vasto espectro de sustancias, células, componentes celulares, virus, etc. Dependen del uso de anticuerpos específicos seleccionados como reactivos. Debido a que los anticuerpos pueden tener una alta especificidad y reaccionar con gran afinidad, los inmunoensayos son capaces de medir sustancias en matrices complejas sin pre-tratamiento, extracción, purificación ó concentración. Hay una enorme variedad de marcadores para la detección de fracciones unidas (complejos antígeno-anticuerpos) y fracciones libres (antígeno o anticuerpo), generalmente se emplean radioisótopos, enzimas, y sustratos fluorescentes, fosforescentes o quimioluminiscentes. Otros marcadores que se usan en

ocasiones son los bacteriófagos, metales, partículas y metalocarbonilos (Edwards, 1996).

Uno de los inmunoensayos más ampliamente utilizados es el ELISA (Inmunoensayo Enzimático en Fase Sólida), el cual es altamente versátil y sensible para la determinación cualitativa o cuantitativa de anticuerpos o cualquier molécula antigénicamente activa, puede ser aplicado para el análisis de muestras simples así como en monitoreo de alto rendimiento.

El formato del ensayo puede variar, pero siempre implica la interacción específica entre el anticuerpo y el antígeno, con uno de ellos inmovilizado en un soporte sólido. La inmovilización del antígeno hace posible medir la unión de anticuerpos específicos y, viceversa, el pegado de los anticuerpos a la fase sólida permite la detección y cuantificación del antígeno.

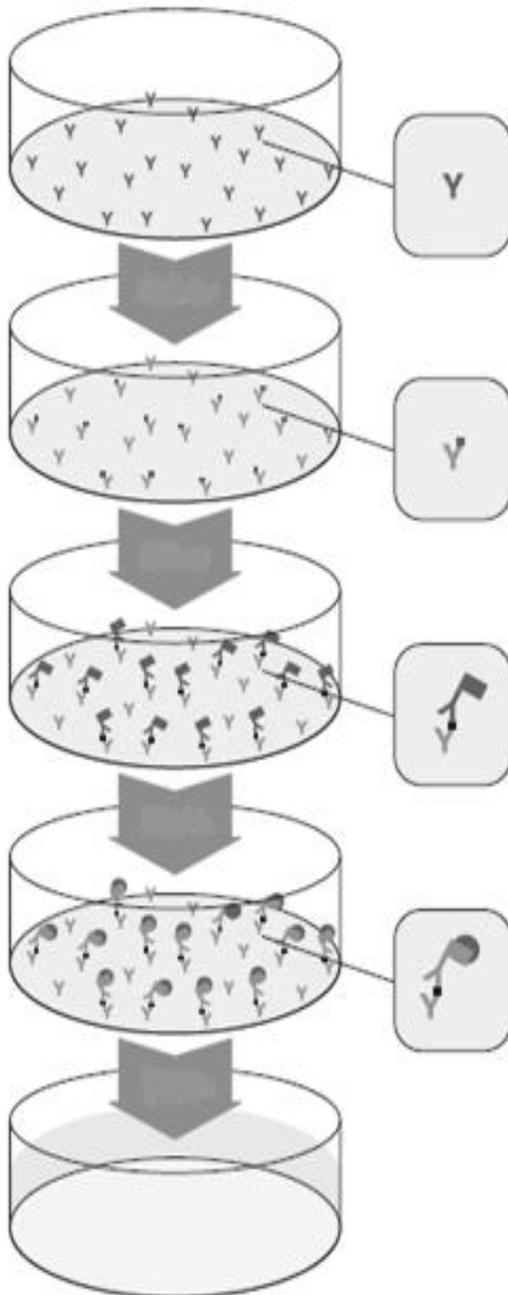
Las interacciones antígeno-anticuerpo son amplificadas y visualizadas usando reactivos conjugados a enzimas, los cuales, dependiendo del tipo de ensayo utilizado, pueden ser un anticuerpo anti-inmunoglobulina acoplado a una enzima, o un anticuerpo secundario para el antígeno específicamente unido. Finalmente, se usa un sustrato cromogénico que da lugar a un cambio de color proporcional a la intensidad de la reacción inmune estudiada.

La cuantificación es realizada usualmente por comparación contra muestras estándar con una concentración conocida del analito. El límite de detección del ensayo es usualmente muy bajo (1 ng/mL). El cambio de color resultante puede ser registrado visualmente ó espectrofotométricamente y la señal es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos (figura 16).

De las múltiples enzimas diferentes adecuadas para el ensayo de ELISA, la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano y la β -galactosidasa son las más comúnmente usadas. Existen diversos formatos o tipos de ELISA, según lo que se quiera determinar, teniéndose así el ELISA indirecto para determinar anticuerpos específicos, el directo competitivo o el tipo "sándwich" de anticuerpos para determinar antígeno soluble, y el ELISPOT (Inmunoensayo Enzimático de Punto) para contar células que secretan anticuerpos u otros factores solubles, por ejemplo células T secretando citocinas en

respuesta a un reto antigénico ó células B produciendo anticuerpos (Edwards, 1995; Paulie, 2006).

En la figura 16 se muestra una representación general de un ELISA tipo sándwich o de captura.



El ensayo es comúnmente llevado a cabo en placas de microtitulación de 96 pozos. En el primer paso los pozos son cubiertos con un anticuerpo monoclonal (Y) específico para el antígeno a ser determinado.

Las muestras conteniendo cantidades desconocidas del antígeno (■) son adicionadas a los pozos. A otros pozos se les adiciona un estándar de concentración conocida. Durante la incubación, el antígeno es capturado por el anticuerpo unidos a los pozos.

La muestra/estándar son retirados mediante lavado y un anticuerpo Marcado (Y) es adicionado.

Se adiciona el anticuerpo conjugado a la enzima (A)

Finalmente, un sustrato cromogénico (■) para la enzima es adicionado y las placas son incubadas hasta que aparece el color. Dentro del intervalo de detección del ensayo, la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de antígeno añadida a cada pozo. La concentración es determinada por comparación contra el estándar.

Figura 16. Representación esquemática de un ELISA tipo “sándwich” o de captura. Imagen de Staffan Paulie, Hedvig Perlmann y Peter Perlmann. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Encyclopedia of Life Sciences. 2005, John Wiley & Sons.

B.- Justificación

El estudio de los diversos efectos que presentan algunos estrógenos sobre el sistema inmune es relevante, ya que éstos podrían ser empleados en la modulación farmacológica de la respuesta inmune con fines terapéuticos. Un efecto inmunoestimulante de los estrógenos podría emplearse en el tratamiento del cáncer, al causar detención del crecimiento de tumores, o de infecciones; y por otra parte un efecto inmunosupresor podría tener aplicación en la disminución del rechazo de trasplantes, en enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico; así como en el tratamiento de problemas de fertilidad y complicaciones del embarazo.

C.- Hipótesis de trabajo

El tratamiento in vivo en el ratón con los estrógenos naturales 17β -estradiol o estriol tendrá un efecto inmunomodulador sobre la actividad citotóxica de los esplenocitos, y la producción de anticuerpos; mientras que el tratamiento in vivo con el estrógeno sintético dietilestilbestrol tendrá un efecto inmunomodulador mayor sobre la actividad citotóxica de los esplenocitos y sobre la producción de anticuerpos.

Para las pruebas de hipótesis (análisis estadístico) se planteó una hipótesis nula y una alternativa.

H_0 : El tratamiento in vivo en el ratón con estrógenos naturales (17β -estradiol o estriol) o sintéticos (dietilestilbestrol) no modifica la respuesta citotóxica de los esplenocitos de ratón.

H_1 : El tratamiento in vivo en el ratón con estrógenos naturales (17β -estradiol o estriol) o sintéticos (dietilestilbestrol) modifica la respuesta citotóxica de los esplenocitos de ratón, y dichas modificaciones podrían no estar relacionadas con mecanismos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

D.- Objetivo general

Determinar si la administración in vivo de estrógenos naturales ó sintéticos modifica la respuesta citotóxica de los esplenocitos de ratón.

E.- Objetivos particulares

1. Estudiar in vivo en el ratón la respuesta de células citotóxicas en animales tratados con 17β -estradiol, estriol o dietilestilbestrol.

a) Implementar un ensayo enzimático colorimétrico para evaluar citotoxicidad mediante la estimación de actividad de DHL liberada.

b) Determinar la relación óptima de células blanco (línea celular P-815 ATCC TIB 64, mastocitoma, ratón cepa DBA/2): células efectoras (esplenocitos de ratones BALB/c machos tratados), para llevar a cabo ensayos de citotoxicidad.

c) Determinar si se genera una respuesta inmune celular citotóxica empleando antígenos alogénicos, y si ésta se ve modificada por el tratamiento con 17β -estradiol, estriol o dietilestilbestrol.

2. Estudiar in vivo en el ratón la respuesta inmune humoral (producción de IgG) en animales tratados con 17β -estradiol, estriol ó dietilestilbestrol, para investigar si existe una modulación de la actividad de las células citotóxicas y descartar que este efecto se deba a la citotoxocidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

a) Implementar un ensayo adecuado para la estimación de niveles séricos de anticuerpos en el ratón contra antígenos alogénicos.

b) Determinar si se genera una respuesta inmune humoral empleando antígenos alogénicos y si ésta se ve modificada por el tratamiento con 17β -estradiol, estriol o dietilestilbestrol.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1) Diseños experimentales

Antes de llevar a cabo el experimento para determinar el efecto del tratamiento *in vivo* con los estrógenos sobre la actividad citotóxica y la respuesta humoral de los esplenocitos de ratón, fue necesario realizar un primer experimento (Experimento 1), el cual tuvo como finalidad establecer la cantidad adecuada del extracto proteínico obtenido a partir de células de la línea P-815 (apartados 3, 4 y 5) para inmunizar a los ratones previo al tratamiento con los estrógenos, así como la relación óptima de células blanco: células efectoras con la que se realizaron los ensayos de citotoxicidad posteriores al tratamiento con los estrógenos. Se formaron tres grupos de ratones, cada uno con un tamaño (n) de 5 individuos. Uno de los grupos (I-1), fue empleado como control (administración de 1 μg de saponina sin extracto proteínico/200 μL), a otro grupo (I-2) se le administró 1 μg de saponina + 10 μg de extracto proteínico/200 μL , y al tercer grupo (I-3) se le administró 1 μg de saponina + 100 μg de extracto proteínico/200 μL . La inmunización se realizó por vía intraperitoneal como se describe en el apartado 5.

En el experimento realizado para estudiar el efecto de los estrógenos sobre la actividad citotóxica y la respuesta humoral (Experimento 2) se formaron otros cuatro grupos de animales (n=5). Todos los grupos fueron inmunizados (apartado 5) empleando la cantidad de extracto proteínico determinada en el primer experimento (justificación en el sección de resultados). Los estrógenos se administraron por vía subcutánea (apartado 6). El grupo control (T-1) fue administrado solamente con el vehículo (aceite de maíz), mientras que cada uno de los demás grupos fue tratado con uno de los estrógenos a estudiar: vehículo + 17 β -estradiol (T-2), vehículo + estriol (T-3) o vehículo + dietilestilbestrol (T-4).

En las figuras 17 y 18 se resumen los procedimientos que se llevaron a cabo respectivamente en los experimentos 1 y 2.

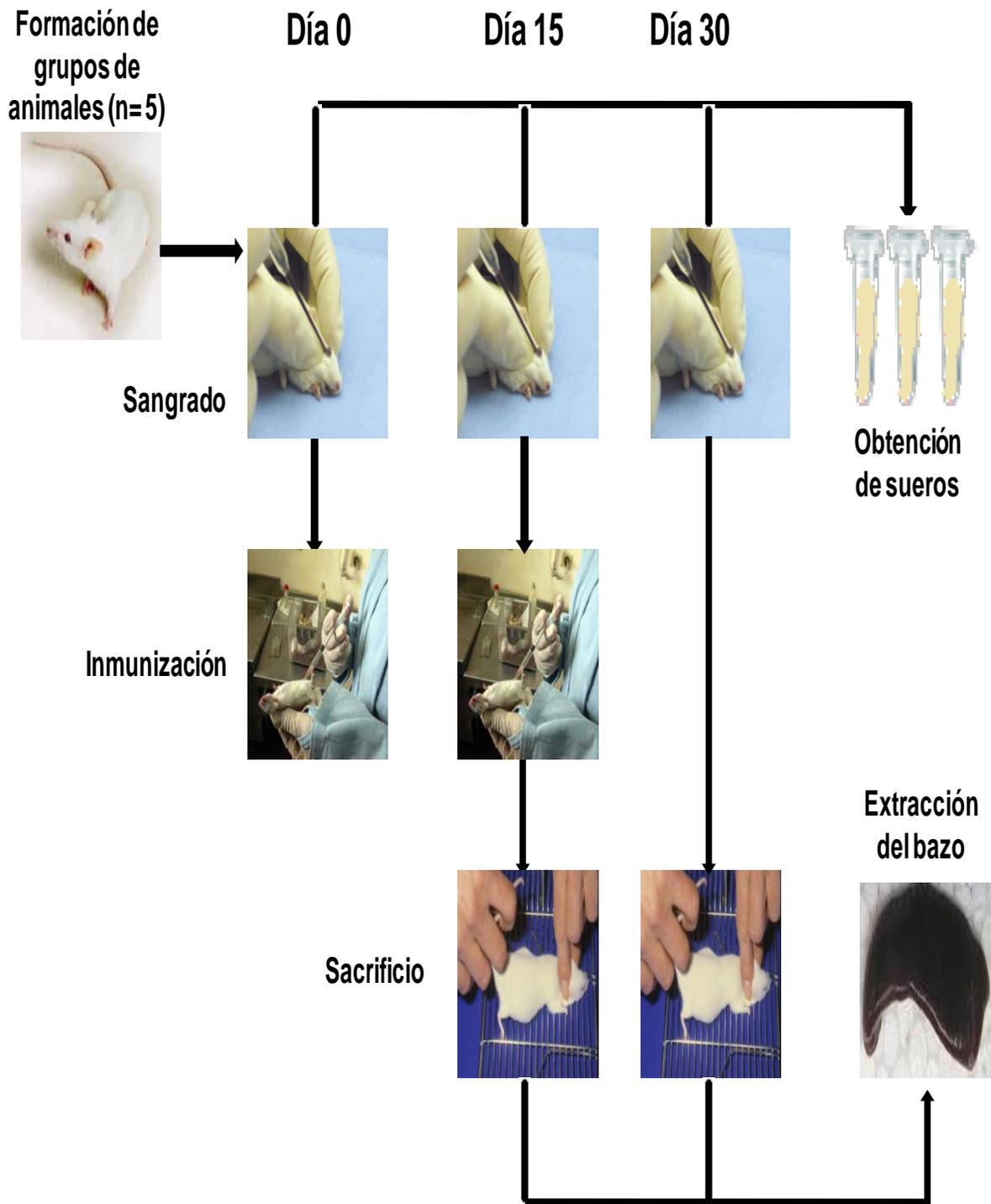


Figura 17. Secuencia seguida durante el experimento 1. Al día 0 se realizó el sangrado preinmune de los ratones, y se inmunizaron por vía intraperitoneal con extracto proteínico de las células P-815. El día 15 se obtuvo el sangrado correspondiente a la fase primaria de la respuesta humoral, y los animales fueron reinmunizados; se sacrificó a la mitad de los animales para obtener los bazo y posteriormente realizar los ensayos de citotoxicidad. El día 30 se obtuvo el sangrado correspondiente a la fase secundaria de la

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

respuesta humoral y se sacrificó a la mitad restante de los animales, los bazo fueron extraídos y se realizaron los ensayos de citotoxicidad.

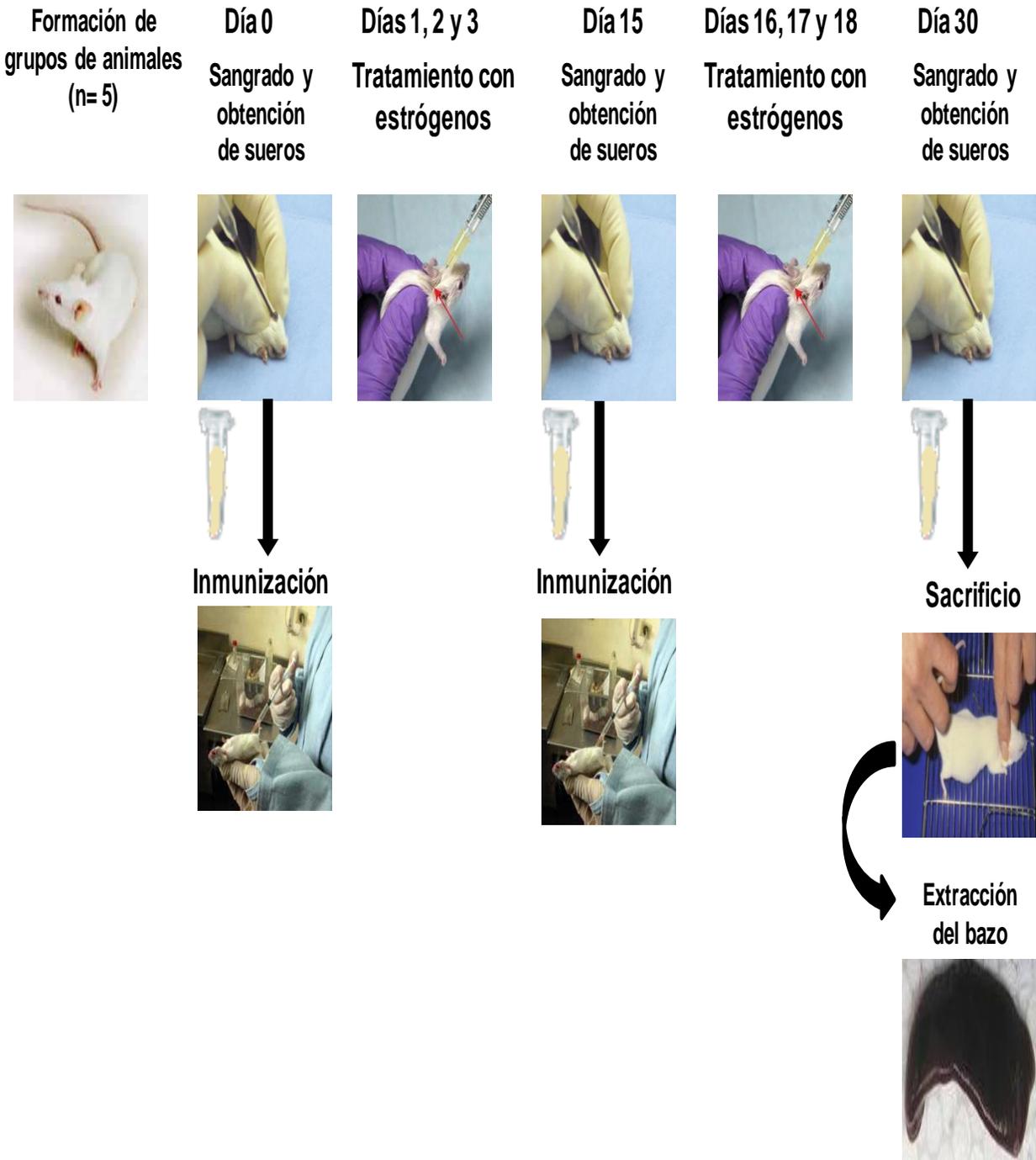


Figura 18. Secuencia seguida durante el experimento 2. El día 0 se realizó el sangrado preinmune de los ratones, y se inmunizaron por vía intraperitoneal con extracto proteínico de células P-815. Los días 1, 2 y 3 se administró el tratamiento con estrógenos por vía subcutánea. El día 15 se obtuvo el sangrado correspondiente a la fase primaria de la respuesta humoral, y los animales fueron reinmunizados. Los días 16, 17 y 18 se administró un segundo tratamiento con estrógenos por vía subcutánea. El día 30 se obtuvo el sangrado correspondiente a la fase secundaria de la respuesta humoral, y los animales fueron sacrificados para obtener los bazo y realizar los ensayos de citotoxicidad.

En el siguiente apartado se describe el manejo de los ratones BALB/c, el cual incluyó formación de grupos, obtención de sangre venosa, eutanasia y obtención de bazos.

2) Manejo de animales (ratones BALB/c machos de 12 semanas, 20-30 g de peso) y obtención de muestras biológicas de los animales tratados

Se emplearon ratones machos con la finalidad de evitar la interferencia de los niveles endógenos de los estrógenos a estudiar, de la cepa BALB/c, de 12 semanas de edad, con un peso de 20-30 g, los cuales fueron manejados conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los animales fueron mantenidos en cajas de policarbonato transparentes, con el fondo cubierto con aserrín no estéril. Desde su recepción, hasta el final de los experimentos los ratones tuvieron acceso libre a alimento y agua.

Posteriormente fueron pesados y marcados por perforación de las orejas de acuerdo a un código numérico previamente determinado en nuestro laboratorio.

Para la realización de los experimentos se formaron grupos de ratones por el método de estratos balanceados de peso, con la finalidad de obtener homogeneidad entre los pesos promedio de los grupos. Cada grupo fue colocado en una caja de policarbonato distinta.

A.- Obtención de sangre venosa y separación de sueros

Se extrajo sangre venosa a los ratones BALB/c machos mediante punción del plexo retro-orbicular del ojo empleando capilares de vidrio, a los días 0 (sangrado preinmune), 15 (fase primaria de la respuesta humoral) y 30 (fase secundaria de respuesta humoral) para posteriormente obtener el suero y estimar por medio de ELISA indirecto los niveles de anticuerpos específicos (IgG) contra el extracto proteínico empleado para llevar a cabo la inmunización. Inmediatamente después de obtener la muestra de sangre, ésta fue depositada en tubos eppendorf de 1.5 mL limpios, soplando suavemente el extremo de un capilar, para evitar la hemólisis de las células rojas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Los tubos eppendorf conteniendo la sangre fueron centrifugados a 2375 x g (6000 rpm) durante 5 minutos en una microfuga. Después de la centrifugación se separó el suero del paquete celular con micropipetas y se transfirió a tubos eppendorf limpios, con los cuales se repitió el procedimiento anterior, centrifugando a 3232 x g (7000 rpm) durante 3 minutos, para obtener sueros libres de hemólisis. Los sueros limpios obtenidos fueron almacenados en congelación de -17 a -19° C.

B.- Obtención de bazos

En el experimento 1 se sacrificó por dislocación cervical a la mitad de los ratones el día 15 posterior a la primera inmunización y a la mitad restante el día 15 posterior a la segunda inmunización (día 30). En el experimento 2 todos los animales fueron sacrificados el día 30, para obtener los bazos y realizar los ensayos de citotoxicidad.

Antes de realizar la disección los cadáveres de los animales fueron bañados con etanol al 70% para evitar la liberación de pelos que pudieran contaminar la cavidad abdominal. Los bazos fueron extraídos en área aséptica (empleando mechero Bunsen) con equipo quirúrgico esterilizado en autoclave, y transferidos inmediatamente a cajas Petri de vidrio estériles de 10 cm de diámetro.

3) Cultivos celulares: Línea celular P-815 (ATCC TIB 64, mastocitoma, ratón cepa DBA/2) y esplenocitos obtenidos de ratones BALB/c machos

Las células P-815 (ATCC TIB 64, mastocitoma cultivado a partir de un tumor obtenido de un ratón de la cepa DBA/2), donadas por el doctor José Sullivan López González del Laboratorio de Cáncer Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Ismael Cosío Villegas”, de las cuales se obtuvieron los extractos proteínicos para inmunizar a los animales (apartados 4 y 5) y que fueron empleadas como células blanco en los ensayos de citotoxicidad (apartados 7 y 8) fueron crecidas y propagadas en un volumen de cultivo de 10 mL en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de Suero Bobino Fetal (SBF) y antibióticos (100 UI de penicilina y 100 µg de

estreptomina por mL) en botellas *NUNC* para cultivo celular de 260 mL de cuello recto.

En cuanto a los esplenocitos obtenidos de los ratones BALB/c machos se realizaron cultivos primarios en medio RPMI-1640 sin SBF y antibióticos (100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomina por mL) en tubos eppendorf, como se describe más adelante en el apartado 7).

4) Obtención y cuantificación del extracto proteínico de células de la línea P-815

A.- Mantenimiento de cultivo celular

Las células P-815 fueron cultivadas como se mencionó en el apartado 2. Para obtener el extracto proteínico, se procedió a centrifugarlas a 420 x g (1616 rpm) durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de medio DMEM sin SBF, dicha suspensión celular fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

B.- Recuento de células y evaluación de viabilidad celular

La suspensión celular obtenida anteriormente se diluyó 10 veces tomando una alícuota de 10 µL y transfiriéndola a un tubo eppendorf de 600 µL con 90 µL de medio DMEM sin SBF. La suspensión celular diluida 1:10 fue diluida 10 veces, tomando 10 µL que fueron transferidos a un tubo eppendorf de 600 µL con 80 µL de medio DMEM sin SFB y 10 µL de azul de Tripán al 0.2% para evaluar la viabilidad celular. Después de homogeneizar la suspensión (dilución 1:100) mediante pipeteo se tomó una alícuota de 10 µL, la cual fue inyectada en un compartimento de la cámara de Neubauer mejorada para realizar el recuento de células viables.

C.- Lisis de células

La suspensión celular obtenida en el inciso A fue transferida nuevamente al tubo cónico de 15 mL para centrifuga, se le agregaron 10 mL de PBS 1X estéril frío para lavar las células y se centrifugó a 420 x g durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 5 mL de PBS 1X frío, y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones (el resto del procedimiento se realizó manteniendo las muestras en un baño de hielo para evitar la degradación de proteína).

Se desechó el sobrenadante y se adicionó a la pastilla 1 mL de solución de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, NaOH 1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, TX-100 1%) por cada 5×10^6 células para romperlas y favorecer la liberación de proteína al medio, y 10 μ L de mezcla inhibidora de proteasas para extractos de células y tejidos de mamíferos (SIGMA-ALDRICH) por cada mililitro de solución de lisis, teniendo como objetivo minimizar la degradación de proteínas.

Los lisados celulares se dividieron en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales fueron envueltos en la zona de la tapa con película PARAFILM e introducidos en un recipiente con hielo. Se colocó el recipiente con las muestras inmersas en hielo sobre un vortex para llevar a cabo agitación constante durante 30 minutos.

Al terminar el tiempo de agitación se retiró la envoltura de los tubos eppendorf y éstos fueron centrifugados en una microfuga a 8500 x g (10000 rpm) durante 12 minutos. Se extrajeron los sobrenadantes para separar los lisados proteínicos de los residuos contenidos en las pastillas y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL limpios.

Las muestras se almacenaron en congelación, mantenidas a una temperatura entre -17 y -19° C.

D.- Cuantificación de proteína total

La concentración de proteína total en los lisados obtenidos de células P-815 fue determinada empleando el método del ácido bicinconínico (micro BCA), en el que las proteínas presentes en una muestra reducen iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cúpricos reaccionan con el BCA, que es verde, para

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

formar un complejo de color morado soluble en agua (Smith, 1985). La intensidad de color del complejo formado es proporcional al contenido proteínico de la muestra. Se empleó un kit comercial micro BCA Reagent, el cual consiste de tres reactivos: A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 y tartrato de sodio en NaOH 0.2 N), B (Ácido bicinconínico al 4.0% en agua) y C ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 4.0% en agua). El kit incluye adicionalmente ampollas con un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 2 mg/mL en solución salina al 0.9% y NaN_3 al 0.05%, dicho estándar se empleó para realizar una curva patrón para la determinación de proteína.

La curva patrón de BSA se preparó como se describe a continuación: se hizo una dilución 1:10 del estándar de BSA mezclando 0.5 mL del mismo con 4.5 mL de agua bidestilada para obtener una concentración final de 200 $\mu\text{g/mL}$ de BSA (dilución "A"). Se tomaron 2 mL de la dilución A y se mezclaron con 8 mL de agua bidestilada (dilución B, concentración final 40 $\mu\text{g/mL}$). Para la dilución C se tomaron 4 mL de la solución B y se mezclaron con 4 mL de agua bidestilada (concentración final 20 $\mu\text{g/mL}$). La dilución D (10 $\mu\text{g/mL}$) se preparó mezclando 4 mL de la dilución C y 4 mL de agua bidestilada, y finalmente la dilución E (5 $\mu\text{g/mL}$) se obtuvo al mezclar 4 mL de la dilución D con 4 mL de agua bidestilada. Como blanco se empleó la solución de lisis que se utilizó para la extracción de proteína de las muestras problema (concentración de BSA = 0 $\mu\text{g/mL}$).

El reactivo de BCA (mezcla de reacción) para la determinación de proteína se preparó mezclando 25 partes del reactivo A con 24 partes del reactivo B y 1 parte del reactivo C como lo indica el fabricante, verificando visualmente que se obtuviera una solución verde-azulada de BCA.

Cada muestra problema (extracto proteínico) se diluyó 10 veces tomando una alícuota de 15 μL , la cual se mezcló con 135 μL de agua bidestilada.

Todas las muestras, incluyendo a los estándares de la curva patrón y al blanco fueron determinadas por duplicado, mezclando 150 μL de cada muestra con 150 μL de la mezcla de reacción en tubos eppendorf de 600 μL , para homogeneizarlas por medio de agitación en un vortex. Una vez que las muestras se homogeneizaron, fueron transferidas a inmuno módulos de 16 pozos, los cuales se incubaron a 37° C durante 2 horas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Después de transcurrir el tiempo de incubación se realizó la lectura espectrofotométrica de los módulos a una longitud de onda de 570 nm. Posteriormente se obtuvo la regresión lineal de la curva patrón y con la ecuación de la recta se calculó la concentración de proteína de cada muestra por interpolación de su valor de absorbancia en la curva patrón.

La figura 19 ilustra el procedimiento descrito anteriormente.

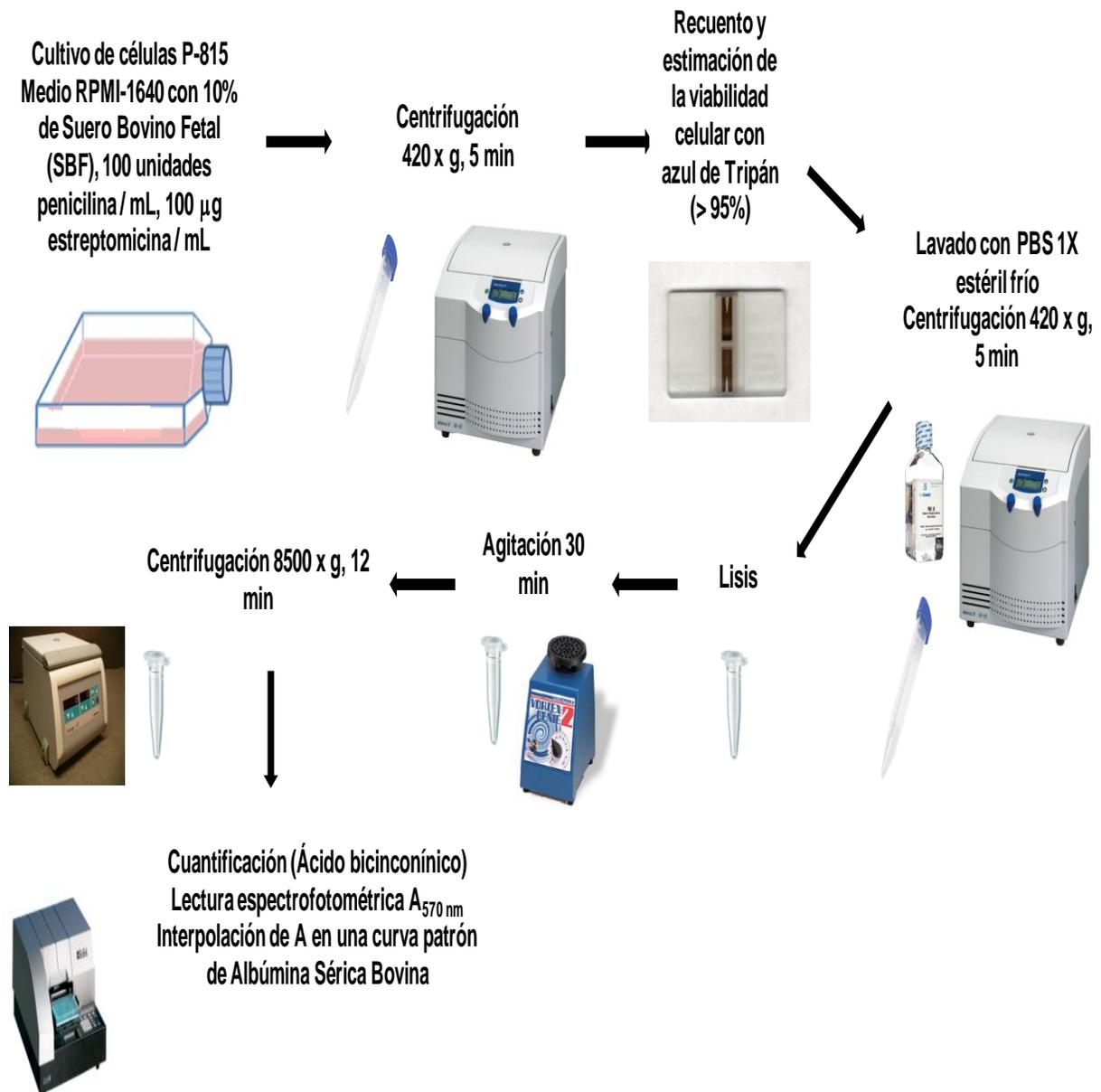


Figura 19. Representación del procedimiento empleado para la obtención del extracto proteínico de células de la línea P-815.

5) Inmunización de los ratones BALB/c machos con el extracto proteínico obtenido de las células de la línea P-815

En el experimento 1, realizado para determinar la dosis de antígeno apropiada para inmunizar a los ratones previo a los tratamientos con estrógenos, se inmunizó a los ratones (días cero y quince) por vía intraperitoneal con 200 μ L de soluciones de los extractos proteínicos obtenidos de las células P-815 preparadas en PBS 1X estéril frío, para administrar las dosis previamente descritas (grupo I-1: 1 μ g de saponina sin extracto proteínico/200 μ L; grupo I-2: 1 μ g de saponina + 10 μ g de extracto proteínico/200 μ L; grupo I-3: 1 μ g de saponina + 100 μ g de extracto proteínico/200 μ L), empleando jeringas de plástico para insulina de 1 mL con aguja desmontable. Las soluciones de los extractos fueron mantenidas en hielo desde que fueron retiradas del congelador hasta el momento de la administración con la finalidad de evitar la degradación de proteínas.

Para estudiar el efecto de los estrógenos en la respuesta citotóxica y humoral (experimento 2) se inmunizó previo a los tratamientos con estrógenos (días 0 y 15) a los animales de todos los grupos formados con 200 μ L de soluciones del extracto proteínico obtenido de células de la línea P-815 (1 μ g de saponina + 100 μ g de extracto proteínico/200 μ L en PBS 1X estéril frío, la justificación de la cantidad de extracto para inmunizar se encuentra en la parte de resultados) por vía intraperitoneal como se describió anteriormente.

6) Tratamiento de los ratones BALB/c machos con dos estrógenos naturales (17 β -estradiol ó estriol) ó uno sintético (dietilestilbestrol)

Los estrógenos (E2, E3 ó DEB) se prepararon en aceite de maíz, en concentraciones equimoleculares, tomando como base una dosis de 6 mg/Kg de peso corporal para el E2, el cual fue preparado pesando 6 mg que fueron llevados a un volumen final de 5 mL con el aceite de maíz ($10^{-2.3}$ M), y fueron administrados (150 μ L en un ratón de 30 g de peso) los tres días posteriores a la primera inmunización con extracto proteínico

obtenido de las células P-815 (días 1, 2, y 3 del experimento) y la segunda inmunización (días 16, 17 y 18 del experimento) de las 8:00 a las 10:00 a.m. por inyección subcutánea en la región que se encuentra inmediatamente bajo la piel de la nuca, empleando agujas calibre 20, de 38 mm de longitud adaptadas a jeringas de plástico para insulina de 1 mL, con la finalidad de formar depósitos pequeños del vehículo en el tejido subcutáneo de los animales. La dosis elegida fue la misma que se utilizó en el estudio de los procesos inmunes descritos anteriormente en la parte introductoria (Molina, 1995, 1999).

7) Obtención de esplenocitos y células de la línea P-815 para realizar ensayos de citotoxicidad

A.- Obtención de células de la línea P-815

Las células de la línea P-815, cultivadas como se mencionó en el apartado 2, se procesaron como se describe a continuación. 24 horas antes de realizar los ensayos de citotoxicidad fueron centrifugadas a 420 x g durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 mL de medio RPMI con SBF al 1%. Inmediatamente antes de realizar los ensayos de citotoxicidad las células fueron se centrifugaron nuevamente a 420 x g durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de medio RPMI sin SBF.

Se tomó una alícuota para realizar el recuento de células y evaluar la viabilidad celular como se ha descrito anteriormente.

B.- Obtención de esplenocitos totales

Cada uno de los bazo obtenidos de ratones del mismo grupo fue transferido al mismo tamiz colector para cultivo celular colocado sobre el fondo de una caja Petri, y perfundido con 2 mL de DMEM sin SBF empleando jeringas para insulina de 1 mL, para ser disgregado posteriormente por fricción contra la malla del tamiz hasta la obtención de fragmentos pequeños de tejido. Una vez que se tuvieron juntos los fragmentos de

tejido de todos los bazos de ratones del mismo grupo en el tamiz, éstos fueron lavados con 8 mL de medio DMEM sin SBF para obtener una mezcla de células. La suspensión celular obtenida en el fondo de la placa Petri fue transferida a un tubo cónico de 15 mL para centrifuga. El fondo de la caja Petri fue enjuagado con medio DMEM sin SBF y el líquido con células obtenido se transfirió al tubo para centrifuga, hasta completar un volumen de 15 mL de suspensión celular.

C.- Lisis de eritrocitos

La suspensión celular obtenida anteriormente se centrifugó a 420 x g durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el líquido remanente mediante agitación manual.

A la pastilla resuspendida se le agregaron 7 mL de cloruro de amonio 144 mM preparado en Tris 17 mM estéril para lisar los eritrocitos. La suspensión celular se dejó reposar durante siete minutos dentro de la campana de flujo laminar, se le agregaron 5 mL de DMEM sin SBF para diluir el NH_4Cl y se centrifugó nuevamente a 420 x g durante 5 minutos.

El procedimiento anterior se repitió hasta la obtención de una pastilla blanca-amarillenta, libre de eritrocitos, la cual fue resuspendida en medio RPMI-1640 sin SBF hasta obtener un volumen total de 1 mL de suspensión celular.

D.- Recuento de células

De cada una de las suspensiones de células blancas obtenidas anteriormente se tomó una alícuota de 10 μL , la cual se diluyó 100 veces con medio DMEM sin SBF y azul de Tripán al 0.2% para realizar el recuento de células y evaluar su viabilidad.

Por otra parte, el volumen total de cultivo de células P-815 en medio RPMI-1640 con SBF al 1% se transfirió a un tubo cónico de 15 mL para centrifuga. La suspensión celular se centrifugó a 420 x g durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla obtenida en el líquido remanente y se adicionó medio RPMI-1640 sin SBF hasta completar 1 mL de suspensión celular, de la cual se tomó una

8) Ensayos de citotoxicidad

A.- Inoculación de suspensiones celulares

Las suspensiones de esplenocitos y células P-815 fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos, considerando en el diseño experimental controles de células blanco (pozos donde solamente se sembraron células P-815), controles de células efectoras (pozos donde solamente se sembraron esplenocitos), y enfrentamientos o co-cultivos células blanco: células efectoras (pozos donde se sembraron ambos tipos celulares). Se sembró una cantidad “base” de 2,500 células de la línea P-815 en cada pozo.

En el experimento 1 los enfrentamientos entre ambos tipos celulares se llevaron a cabo (por triplicado al día 15 posterior a la primera inmunización y por duplicado al día 30 posterior a la primera inmunización) en relaciones células blanco: células efectoras 1:1, 1:10 ó 1:100 respectivamente, y en el experimento 2 en una relación células blanco: células efectoras 1:10 (la justificación se explica en la parte de resultados) sembrando 12 pozos por cada variable a probar, de tal forma que se obtuvieron dos sextuplicados, uno para la estimación de actividad de DHL liberada y otro para realizar un ensayo de reducción de MTT.

Los pozos en los que se cargó medio de cultivo sin células fueron utilizados para determinar el fondo del ensayo, cuyo valor fue sustraído de todas las demás muestras. Al terminar de inocular las placas de cultivo de 96 pozos con las suspensiones celulares correspondientes, éstas se incubaron durante 24 h a 37° C con 5% de CO₂.

En las figuras 21, 22 y 23 se ilustran los diseños experimentales empleados.

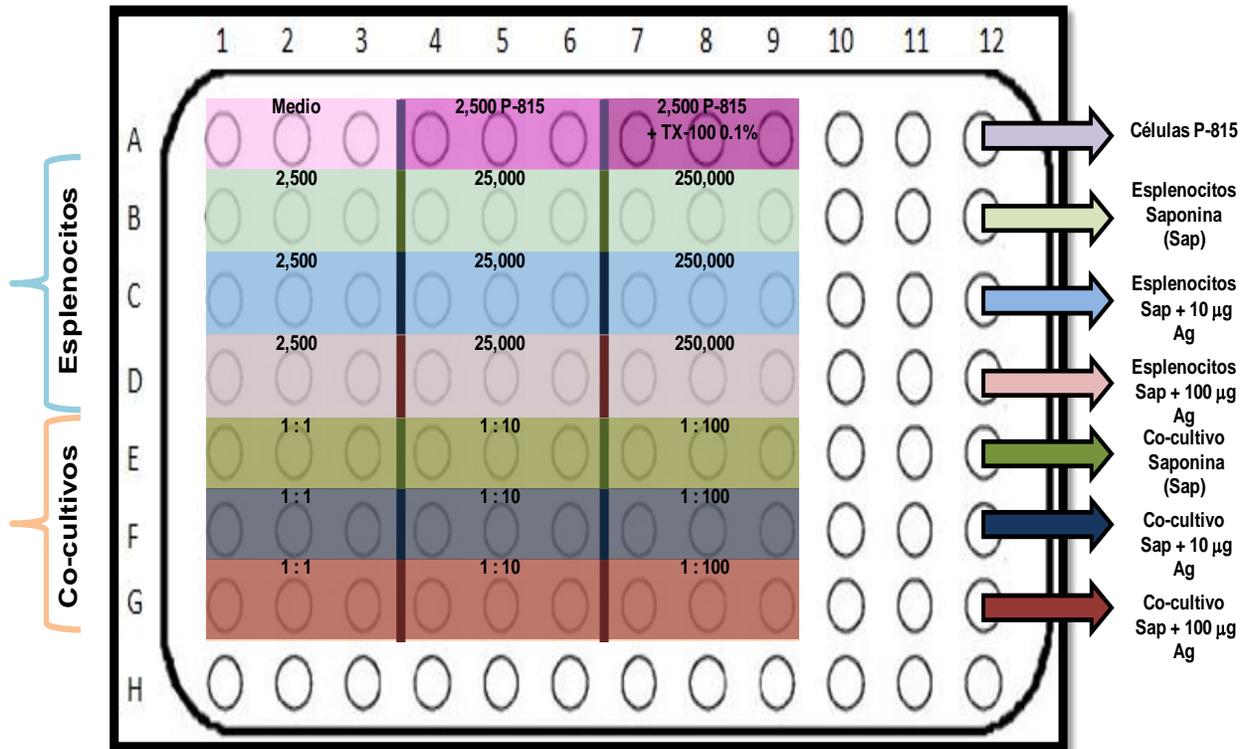


Figura 21. Diseño del ensayo de citotoxicidad del experimento 1. En los pozos de las columnas A1-A9 se cargaron los siguientes controles: Medio de cultivo (Fondo del ensayo, A1-A3); 2,500 células P-815 en medio de cultivo (control bajo de células blanco, A4-A6); 2,500 células P-815 en medio de cultivo con Triton X-100 al 0.1% (control alto de células blanco, A7-A9). En los pozos de las filas B-D se sembraron los controles de células efectoras (2,500 células: B1-B3, C1-C3, D1-D3; 25,000 células: B4-B6, C4-C6, D4-D6; 250,000 células: B7-B9, C7-C9, D7-D9). En los pozos de las filas E-G se sembraron co-cultivos mastocitoma P-815 (2,500 células): esplenocitos (relación 1:1: E1-E3, F1-F3 G1-G3; relación 1:10: E4-E6, F4-F6, G4-G6; relación 1:100: E7-E9, F7-F9, G7-G9). En los pozos de las filas B y E se sembraron esplenocitos obtenidos de animales inmunizados con 1 µg de saponina sin extracto proteínico (grupo I-1); en los de C y F esplenocitos obtenidos de animales inmunizados con 1 µg de saponina + 10 µg de extracto proteínico de células de la línea P-815 (grupo I-2); y en los de D y G esplenocitos de animales inmunizados con 1 µg de saponina + 100 µg de extracto proteínico de células de la línea P-815 (grupo I-3).

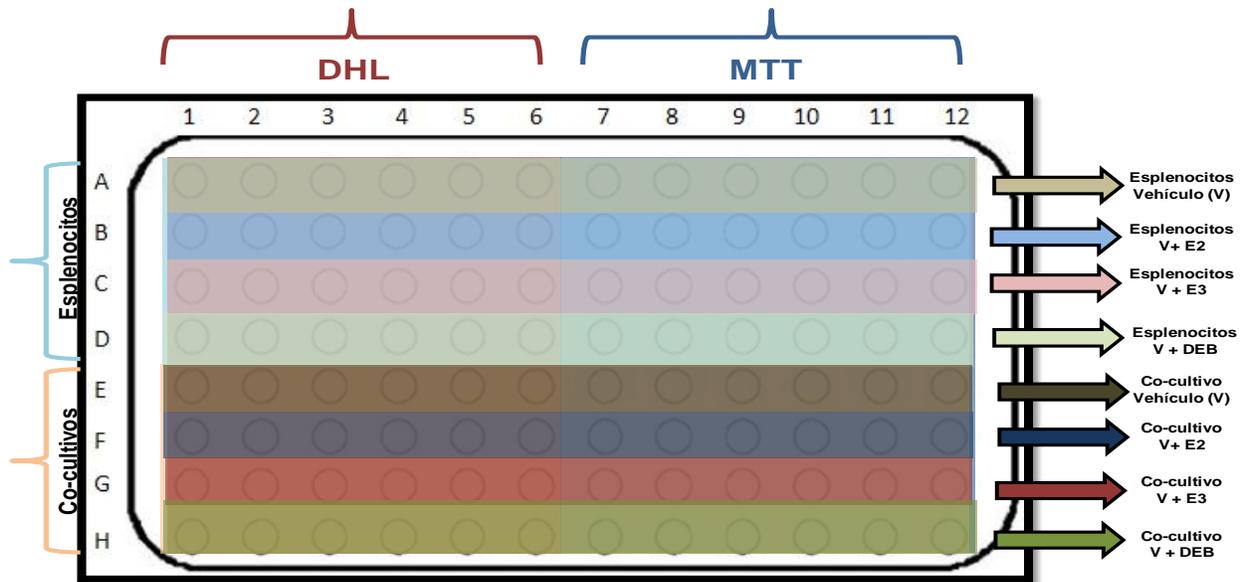


Figura 22. Diseño del ensayo de citotoxicidad del experimento 2. Los pozos de las columnas 1-6 fueron empleados para la estimación de la actividad de DHL liberada; y los pozos de las columnas 7-12 para los ensayos de reducción de MTT. En los pozos de las filas A-D se sembraron los controles correspondientes a las células efectoras; en las filas E-H se sembraron co-cultivos mastocitoma P-815 (2,500 células): esplenocitos (25,000) de ratones inmunizados con 1 μg de saponina + 100 μg de extracto proteínico de células de la línea P-815 (días 0 y 15) y tratados con estrógenos durante los tres días posteriores a la inmunización (1, 2 y 3; 16, 17 y 18). En los pozos de las filas A y E se sembraron esplenocitos obtenidos de animales tratados con el vehículo (aceite de maíz); en los de B y F esplenocitos obtenidos de animales tratados con vehículo + 17β -estradiol; en C y G esplenocitos de animales tratados con vehículo + estriol; y finalmente en D y H esplenocitos de animales tratados con vehículo + dietilestilbestrol.

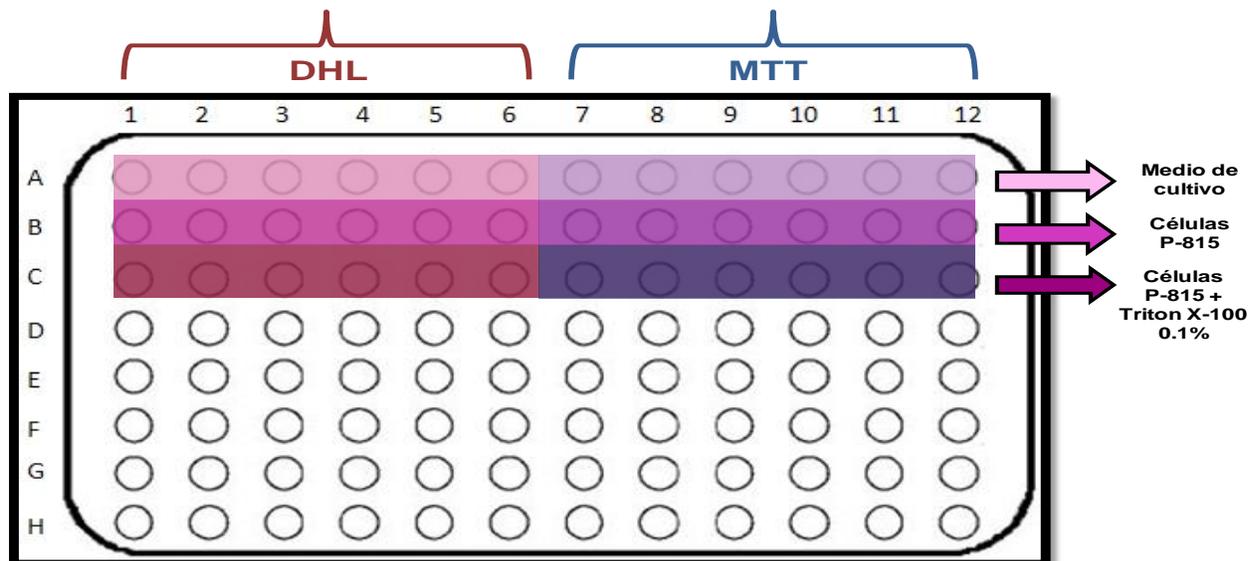


Figura 23. Diseño del ensayo de citotoxicidad del experimento 2. Los pozos de las columnas 1-6 fueron empleados para la estimación de la actividad de DHL liberada; y los pozos de las columnas 7-12 para los ensayos de reducción de MTT. En la fila A se cargaron los controles para determinar el fondo del ensayo (medio de cultivo); en la fila B controles bajos de células efectoras (2,500 células de la línea P-815 en el medio de cultivo); en la fila C controles altos de células efectoras (2,500 células de la línea P-815 con Triton X-100 al 0.1% en el medio de cultivo).

B.- Lectura de la actividad de la DHL liberada en los sobrenadantes

Tanto en el experimento 1 como en el experimento 2, al transcurrir las 24 h de incubación, las placas de cultivo de 96 pozos fueron centrifugadas a $250 \times g$ (1371 rpm) durante 10 minutos para favorecer que las células se depositaran en el fondo de los pozos. Se extrajeron 100 μL de sobrenadante de cada uno de los pozos evitando resuspender nuevamente las células, y se transfirieron a placas para lector de ELISA *NUNC MaxiSorp Surface* nuevas.

En cada uno de los pozos se agregaron 100 μL de la mezcla de reacción para la detección de DHL, preparada instantáneamente antes de usarse, siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicha mezcla consiste de dos reactivos: 1 (diaforasa como catalizador para la transferencia de electrones del $\text{NADH} + \text{H}^+$ a la sal amarilla de tetrazolio, y NAD^+ para llevar a cabo la oxidación del lactato hacia piruvato, liofilizado reconstituido en 1 mL de agua bidestilada, del cual se toman 250 μL por cada 100 reacciones); y 2 (cloruro de yodotetrazolio (INT, amarilla,) que se reduce capturando los electrones donados por $\text{NADH} + \text{H}^+$ pasando a formar una sal de formazán roja, y lactato de sodio como sustrato para la DHL liberada de las células, 11.25 mL por cada 100 reacciones). Una vez añadida la mezcla de reacción las placas se cubrieron con aluminio para alimentos con el fin de mantenerlas protegidas de la luz. Se realizaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm a diferentes intervalos de tiempo posteriores a la adición de la mezcla de reacción (comprendidos entre 0 y 30 minutos), en cada tiempo se descubrieron las placas, se introdujeron al lector para ELISA, se realizó la lectura y éstas se volvieron a cubrir con el aluminio para alimentos. Cuando fue necesario se detuvo la reacción adicionando 50 μL /pozo de HCl 1N (concentración final 0.2 N)

C.- Ensayo de reducción de MTT

En el experimento 2, una vez que se extrajeron los sobrenadantes para la estimación de la actividad de la DHL liberada, los sobrenadantes para llevar a cabo el ensayo de

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

reducción de bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) fueron resuspendidos en los respectivos pozos mediante pipeteo. A continuación se añadieron 40 μL de MTT (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en cada uno de los pozos y se homogenizó mediante pipeteo. Las placas de cultivo fueron incubadas durante 3 h a 37° C y 5% de CO_2 . Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiró el volumen total de sobrenadante (aproximadamente 240 $\mu\text{L}/\text{pozo}$) y se desechó. Se adicionaron 100 μL de DMSO estéril a cada uno de los pozos para disolver los cristales de formazán formados por la reducción mitocondrial del MTT en células viables y se homogenizó mediante pipeteo. Se leyó la absorbancia del producto colorido (morado) a una longitud de onda de 570 nm.

En las figuras 24 y 25 se ilustran los procedimientos para la lectura de actividad de DHL y reducción de MTT.

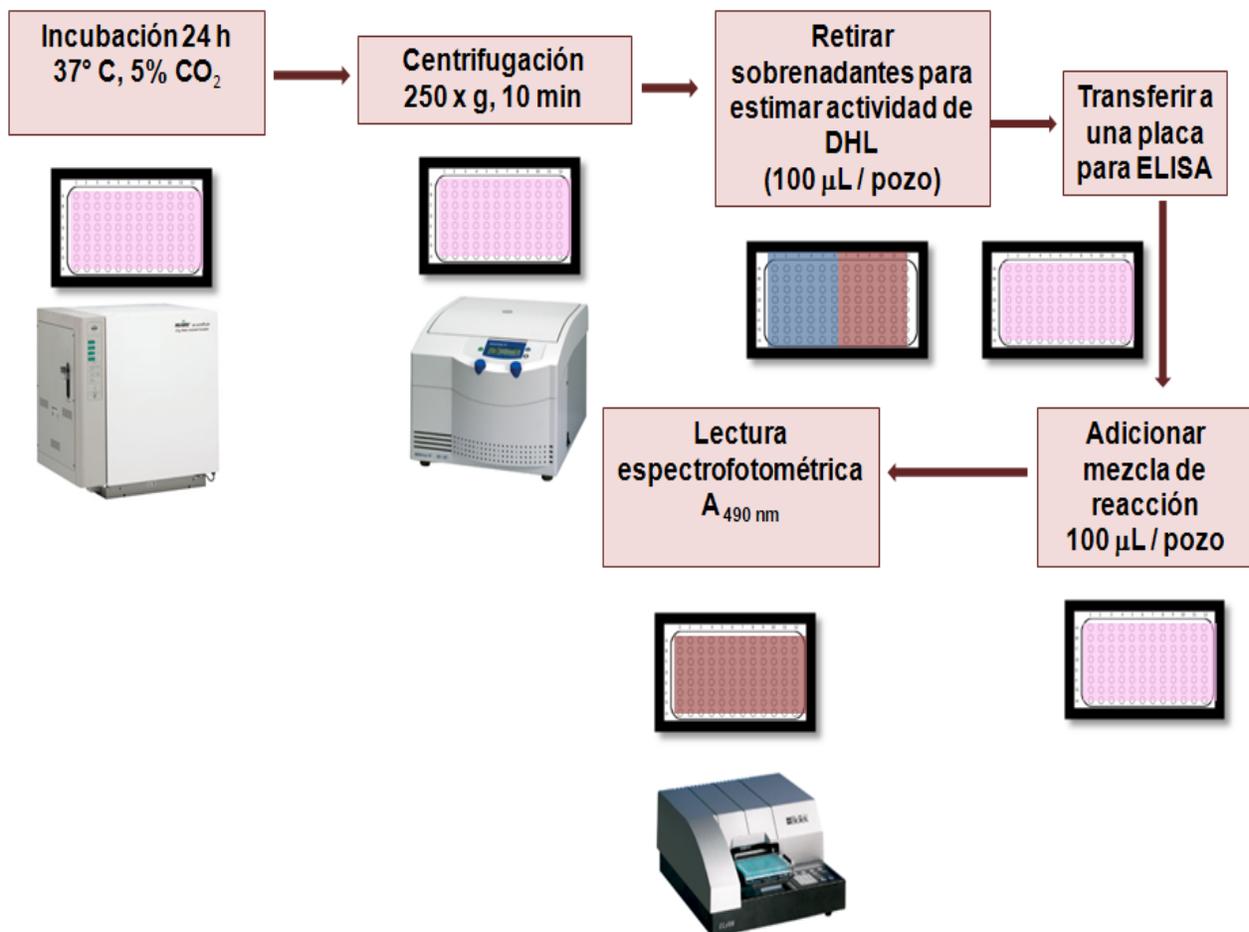


Figura 24. Diagrama de flujo del procedimiento para estimar la actividad de Deshidrogenasa Láctica (DHL) liberada.

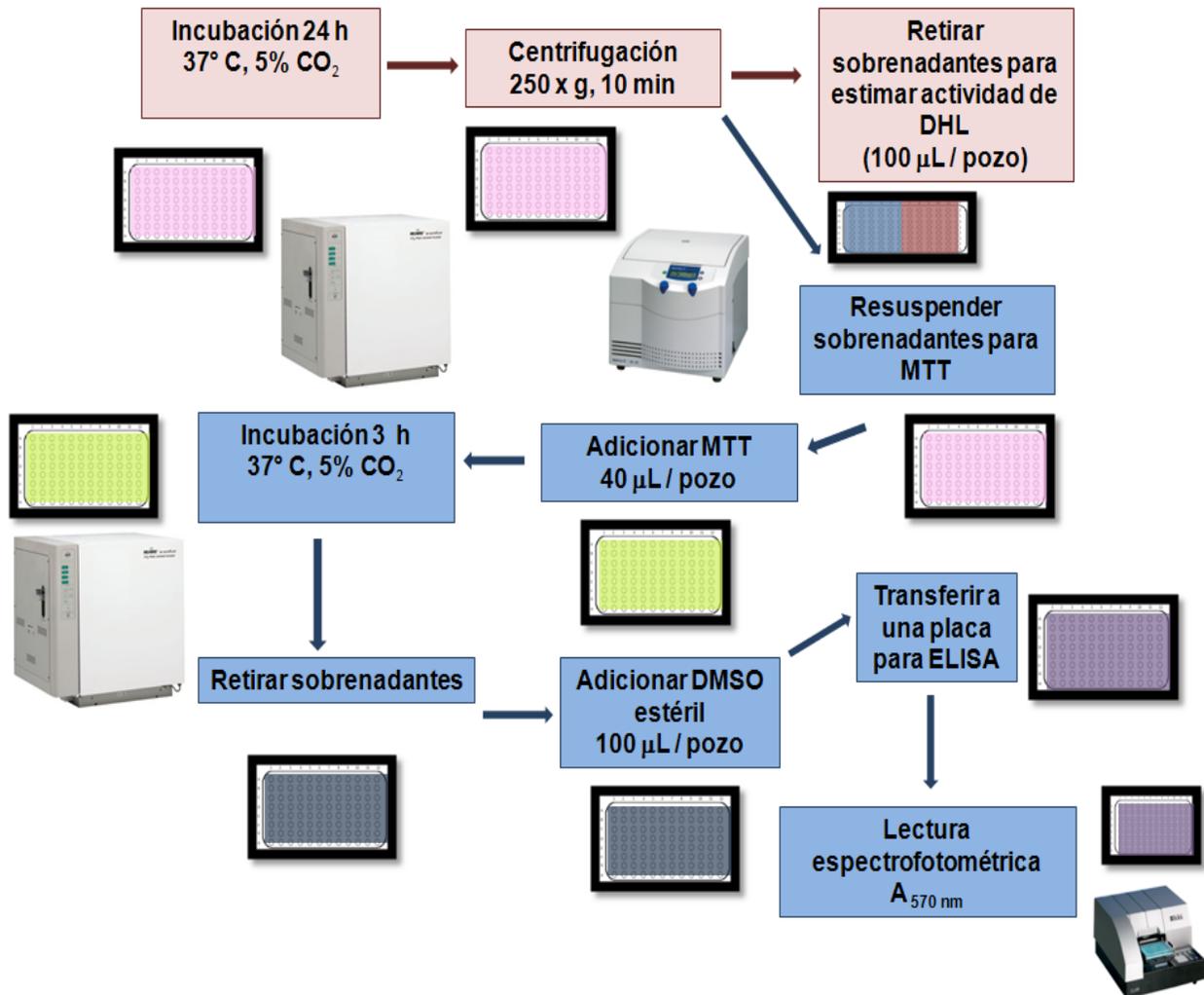


Figura 25. Diagrama de flujo del procedimiento para el ensayo de reducción de MTT.

9) ELISA indirecto para estimar niveles séricos de IgG en ratones BALB/c machos contra el extracto proteínico de células de la línea P-815

Para determinar si la respuesta humoral fue afectada por la inmunización con extractos proteínicos de células de la línea P-815 y/o por el tratamiento con los estrógenos, así como para determinar que una posible respuesta de generación de células citotóxicas estuviera relacionada con un mecanismo dependiente de anticuerpos, se hicieron las estimaciones de niveles séricos de anticuerpos (IgG específica) producidos contra antígenos de células de la línea P-815, lo cual se realizó mediante ensayos de ELISA indirecto como se describe a continuación. Primeramente se cubrió el fondo de inmuno

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

placas y/o inmuno módulos (*NUNC* MaxiSorp Surface) con el mismo extracto proteínico que se utilizó para inmunizar a los animales (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{pozo}$) preparado en amortiguador carbonatos pH 9.6, dejando las placas ó modulos durante 3 horas a Temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente las placas y módulos fueron lavados cinco veces con Tween 20 (T-20) al 0.01% en PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de antígeno y cinco veces con PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de detergente. Se procedió a “bloquear” los sitios no ocupados por el extracto proteínico añadiendo leche descremada al 1% (1 mg/100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$), dejando incubar durante toda la noche en frío (4° C), protegiendo de la luz con aluminio para alimentos. Se lavaron las placas y módulos cinco veces con T-20 al 0.01% en PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de leche descremada y cinco veces con PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de detergente. Se adicionaron los sueros de prueba diluidos en PBS 1X pH 7.4 (1:100 ó 1:1000) por triplicado en los pozos correspondientes, dejándolos incubar durante 2 h a Temperatura ambiente, protegidos de la luz. Las placas y módulos se lavaron cinco veces con T-20 al 0.01% en PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de proteínas presentes en el suero y cinco veces con PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de detergente. Posteriormente se adicionaron 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de una dilución 1:5000 en amortiguador Tris pH 7.4 de una IgG de cabra anti-IgG de ratón (AP200A, cadena ligera, conjugado a fosfatasa alcalina) empleada como anticuerpo secundario, dejando incubar 1 h a Temperatura ambiente, protegiendo de la luz. Se realizaron cinco lavados con T-20 al 0.1% en amortiguador Tris pH 7.4 para eliminar el exceso del anticuerpo secundario añadido y cinco veces con amortiguador Tris pH 7.4 para eliminar el exceso de detergente, y se procedió a añadir 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ del sustrato para fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato 20 mM, dietanolamina 2 M, MgCl_2 464 mM), dejando incubar durante 90 minutos a 37° C, protegiendo de la luz. Al terminar el tiempo de incubación se realizó la lectura de las absorbancias de las placas y módulos a una longitud de onda de 405 nm.

En la figura 26 se presenta un esquema del procedimiento descrito anteriormente.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

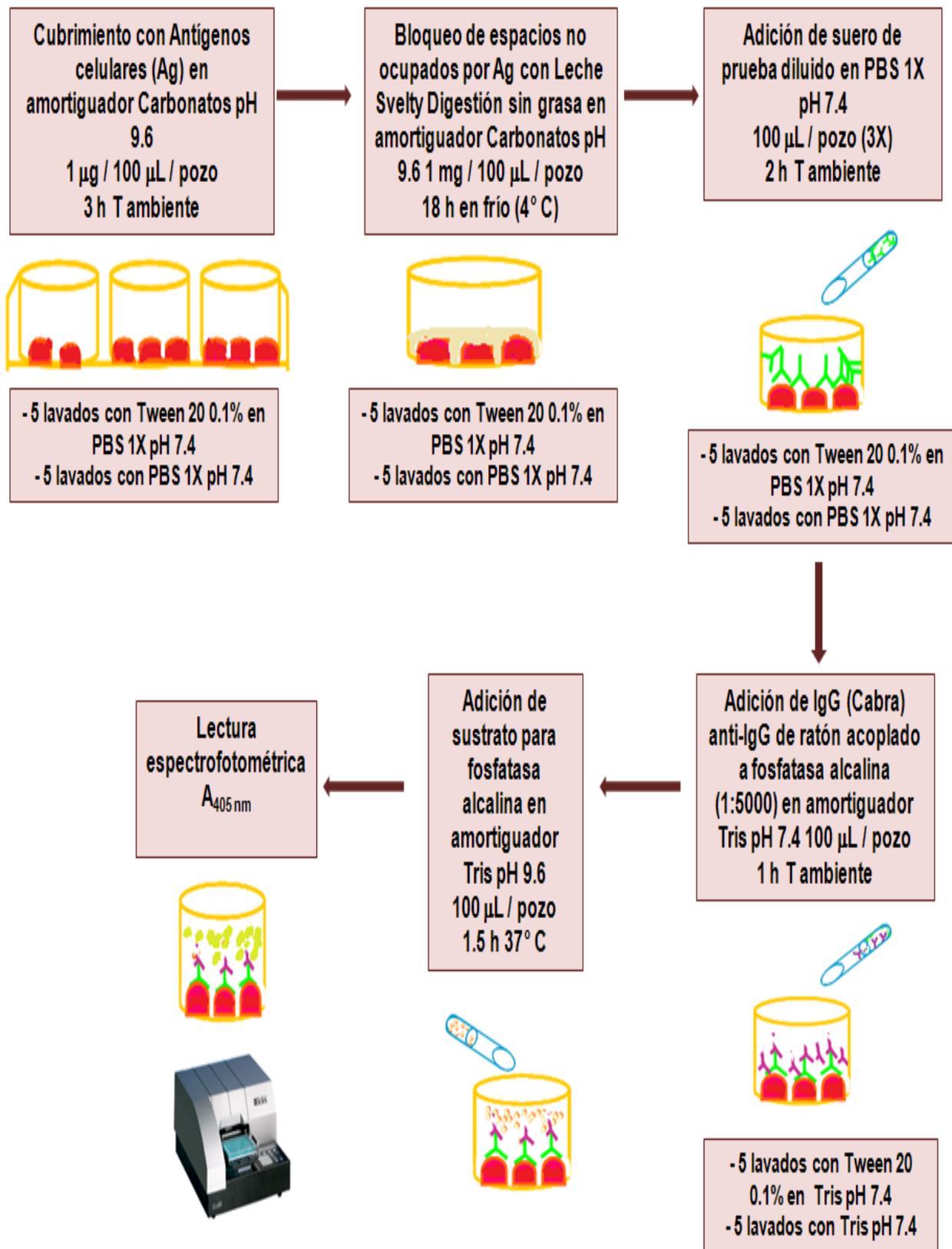


Figura 26. Diagrama de flujo del método de ELISA indirecto empleado para la estimación de niveles séricos de anticuerpos específicos (IgG). Se muestra la representación esquemática de los pozos de una placa para lector de ELISA, indicando lo que ocurre en ellos durante cada etapa del procedimiento.

10) Cálculos y gráficos de los resultados obtenidos

A Cálculos

En el caso de los ensayos de citotoxicidad estimada por actividad de la DHL liberada y reducción de MTT, los valores de absorbancia obtenidos en los pozos con medio de cultivo fueron sustraídos de las demás muestras (diferencia de absorbancia). Por otra parte, los índices señal/ruido fueron obtenidos para cada muestra dividiendo sus respectivos valores de absorbancia entre aquellos obtenidos para los pozos con medio de cultivo. Ambas operaciones se realizaron usando el software Microsoft Office Excel 2007.

B Gráficos

Los gráficos de absorbancia, diferencia de absorbancia e índice señal/ruido (ELISA indirecto y ensayos de reducción de MTT), se realizaron empleando el software SigmaPlot 11.0 para Windows (Systat Software Inc.). Los datos de origen fueron obtenidos a partir de las hojas de cálculo de Excel descritas previamente.

11) Análisis estadístico de los resultados

Se obtuvieron los estadísticos descriptivos de cada uno de los experimentos con el software SigmaPlot 11.0 para Windows (Systat Software Inc.) cuando se elaboraron los gráficos. Las pruebas t de student para comparar dos grupos; ANOVA y prueba t de Bonferroni; ANOVA en rangos y prueba de Tukey, Holm-Sidak, Dunn ó Dunnett para comparaciones entre varios grupos fueron realizadas con el software SigmaStat 3.5 para Windows (Systat Software Inc.). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0.05$, con un poder de 0.8.

VII. RESULTADOS

1) Inmunización de ratones BALB/c machos con extracto proteínico obtenido de células de la línea P-815

A.- Actividad citotóxica de esplenocitos

Al medir la actividad de DHL liberada al día 15 posterior a la primera inmunización con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815, el uso de las dosis de 10 y 100 μg de extracto proteínico para inmunizar a los ratones no modificó el daño celular producido en las células efectoras (esplenocitos) con respecto al grupo control (I-1) al que se administró únicamente saponina, cuando se sembraron 2,500 células/pozo, como se observa en la figura 11. Cuando se sembraron 25,000 células/pozo la inmunización con 10 μg de extracto proteínico no modificó el daño celular de los esplenocitos, pero con 100 μg del extracto la señal de daño celular resultó 8 veces mayor con respecto al grupo control con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En el caso del tratamiento con 100 μg de extracto proteínico, no se obtuvieron suficientes células viables como para sembrar 250,000 células/pozo, por lo que la actividad de DHL liberada de dichas muestras no aparece representada en la gráfica; para dicho número de células la inmunización con 10 μg de extracto proteínico no modificó el daño celular de los esplenocitos con respecto al grupo control (saponina sin extracto proteínico).

En el caso de los co-cultivos de los esplenocitos con células de la línea P-815 (figura 27), se observa que la inmunización con 10 ó 100 μg de extracto proteínico disminuyó ligeramente el daño celular con respecto al grupo control en la relación células blanco/células efectoras 1:1, mientras que en la relación 1:10, con 10 μg de extracto proteínico no se modificó el daño celular y con 100 μg el daño celular resultó aproximadamente 3 veces mayor con respecto al grupo control, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En el caso de la relación 1:100 tampoco se obtuvieron suficientes esplenocitos viables como para sembrar los pozos correspondientes al co-cultivo del grupo inmunizado con 100 μg de extracto proteínico;

y empleando 10 μg de extracto proteínico se observó una ligera reducción del daño celular con respecto al grupo control, sin diferencia estadísticamente significativa.

Las modificaciones en el daño celular al aumentar el número de células fueron estadísticamente significativas para los grupos control y 10 μg de extracto proteínico al comparar 2,500 células/pozo a 250,000/pozo, no así al pasar de 2,500 a 25,000, ni de 25,000 a 250,000 células/pozo, en el caso del grupo inmunizado con 100 μg de extracto proteínico sí se observó diferencia estadísticamente significativa en el daño celular al emplear 2,500 ó 25,000 células/pozo ($p < 0.05$)

En los co-cultivos del grupo control las diferencias en el daño celular fueron estadísticamente significativas al comparar las relaciones 1:1 contra 1:10, 1:1 contra 1:100 y 1:10 contra 1:100; en el grupo inmunizado con 10 μg de extracto proteínico hubo diferencia estadísticamente significativa en las comparaciones entre la relación 1:1 contra la relación 1:100, y la relación 1:10 contra la relación 1:100; y en el de 100 μg de extracto proteínico la diferencia en el daño celular entre la relación 1:1 y la relación 1:10 fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la respuesta citotóxica de esplenocitos de ratón

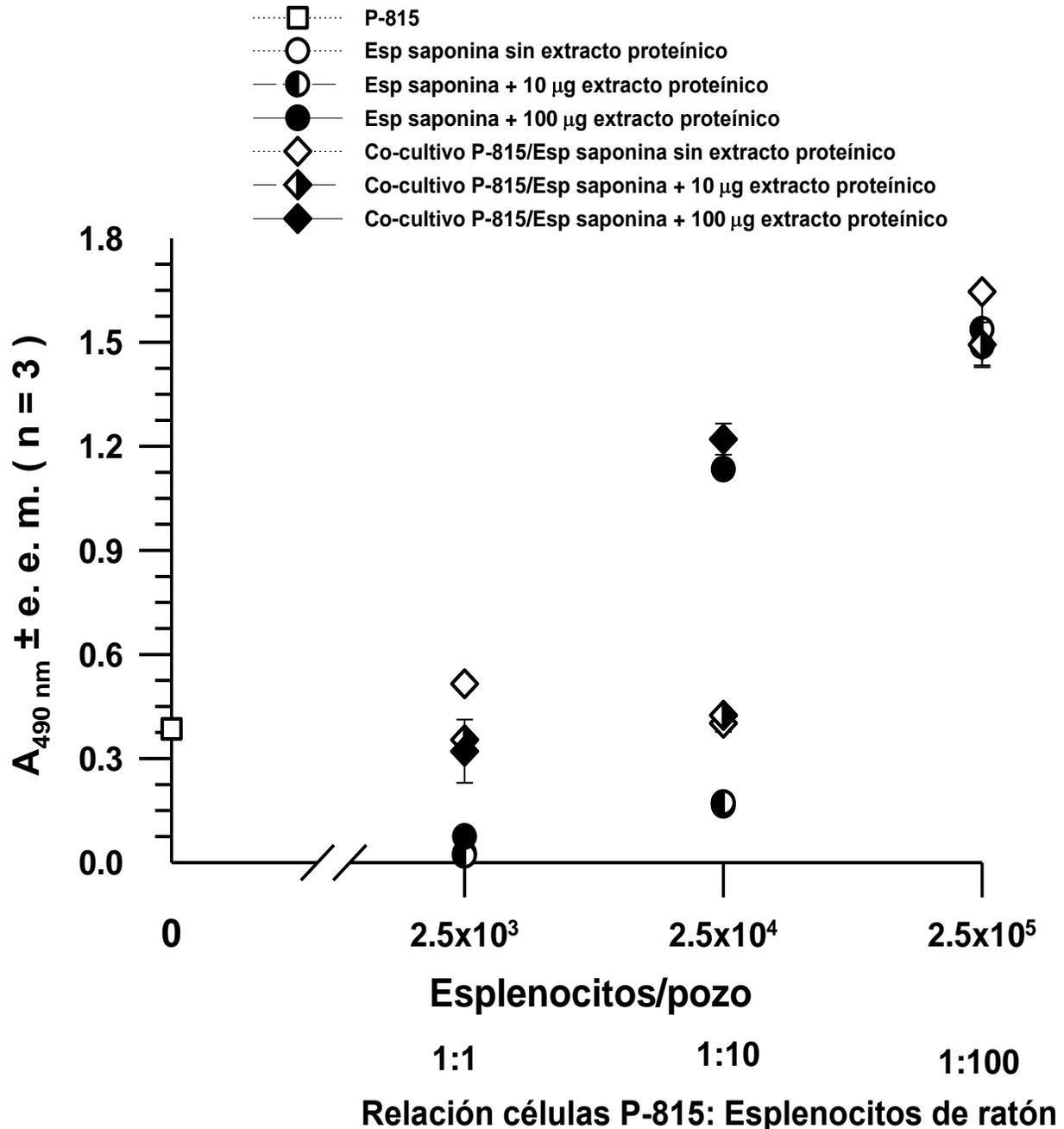


Figura 27. Citotoxicidad mediada por células evaluada por estimación de actividad de DHL al día 15 (día 15 posterior a la primera inmunización por vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815). Se muestran las señales obtenidas de las células blanco (línea P-815), las células efectoras (esplenocitos de ratones BALB/c machos) y ambos tipos celulares juntos en tres relaciones células blanco/células efectoras.

Por otra parte, al día 15 posterior a la segunda inmunización (figura 28) se presentó en general un menor daño celular con respecto a lo observado al día 15 posterior a la primera inmunización, obteniéndose incluso suficientes esplenocitos viables para sembrar los controles de 250,000 células efectoras/pozo y los co-cultivos en relación 1:100 con las células blanco en el caso del grupo inmunizado con 100 μ g de extracto proteínico.

La inmunización con 10 ó 100 μ g de extracto proteínico prácticamente no modificó el daño celular para 2,500 esplenocitos/pozo con respecto al grupo control; en el caso de 25,000 esplenocitos/pozo 10 μ g de extracto proteínico produjeron una señal de daño celular 12 veces mayor, y 100 μ g una señal 88% menor con respecto al grupo control; y para 250,000 esplenocitos/pozo 10 μ g de extracto proteínico produjeron una señal de daño celular 2 veces mayor; y 100 μ g una señal 4 veces mayor con respecto al grupo control.

En los co-cultivos, para la relación 1:1 10 μ g de extracto proteínico no modificaron la señal de daño celular, y 100 μ g produjeron una señal de daño celular 3 veces mayor con respecto al grupo control; en el caso de la relación 1:10 10 μ g produjeron una señal 66% menor, y 100 μ g una señal 4 veces mayor con respecto al grupo control; y para la relación 1:100 la inmunización con 10 μ g de extracto proteínico produjo una señal de daño celular 91% menor, y con 100 μ g un señal 3 veces mayor con respecto al grupo control.

Al aumentar el número de células, se presentaron las siguientes modificaciones en la señal de daño celular: en el grupo control de 2,500 células/pozo a 25,000 células/pozo se obtuvo una señal 32 veces mayor, de 2,500 células/pozo a 250,000 células/pozo una señal 1,214 veces mayor, de 25,000 células/pozo a 250,000 células/pozo una señal 38 veces mayor; en el caso del grupo inmunizado con 10 μ g de extracto proteínico al pasar de 2,500 a 25,000 células/pozo se obtuvo una señal 32 veces mayor, al pasar de 2,500 a 250,000 células/pozo una señal 220 veces mayor, y al pasar de 25,000 a 250,000 células/pozo una señal 7 veces mayor; finalmente en el grupo inmunizado con 100 μ g de extracto proteínico al pasar de 2,500 a 25,000 células/pozo se obtuvo una señal 2

VII. RESULTADOS

veces mayor, al pasar de 2,500 a 250,000 células/pozo una señal 1,746 veces mayor y de 25,000 a 250,000 células/pozo una señal 1,309 veces mayor.

En los co-cultivos las modificaciones en la señal de daño celular fueron las siguientes: en el grupo control de la relación 1:1 a la relación 1:10 una señal 4 veces mayor, de 1:1 a 1:100 20 veces mayor, y de 1:10 a 1:100 7 veces mayor; en el grupo inmunizado con 10 μg de extracto proteínico de la relación 1:1 a la relación 1:10 una señal 3% menor, de 1:1 a 1:100 2 veces mayor, y de 1:10 a 1:100 2 veces mayor; y en el grupo inmunizado con 100 μg de extracto proteínico de 1:1 a 1:10 señal 3 veces mayor, de 1:1 a 1:100 17 veces mayor, y de 1:10 a 1:100 6 veces mayor. Ninguna de las comparaciones descritas anteriormente mostró diferencia estadísticamente significativa.

Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la respuesta citotóxica de esplenocitos de ratón

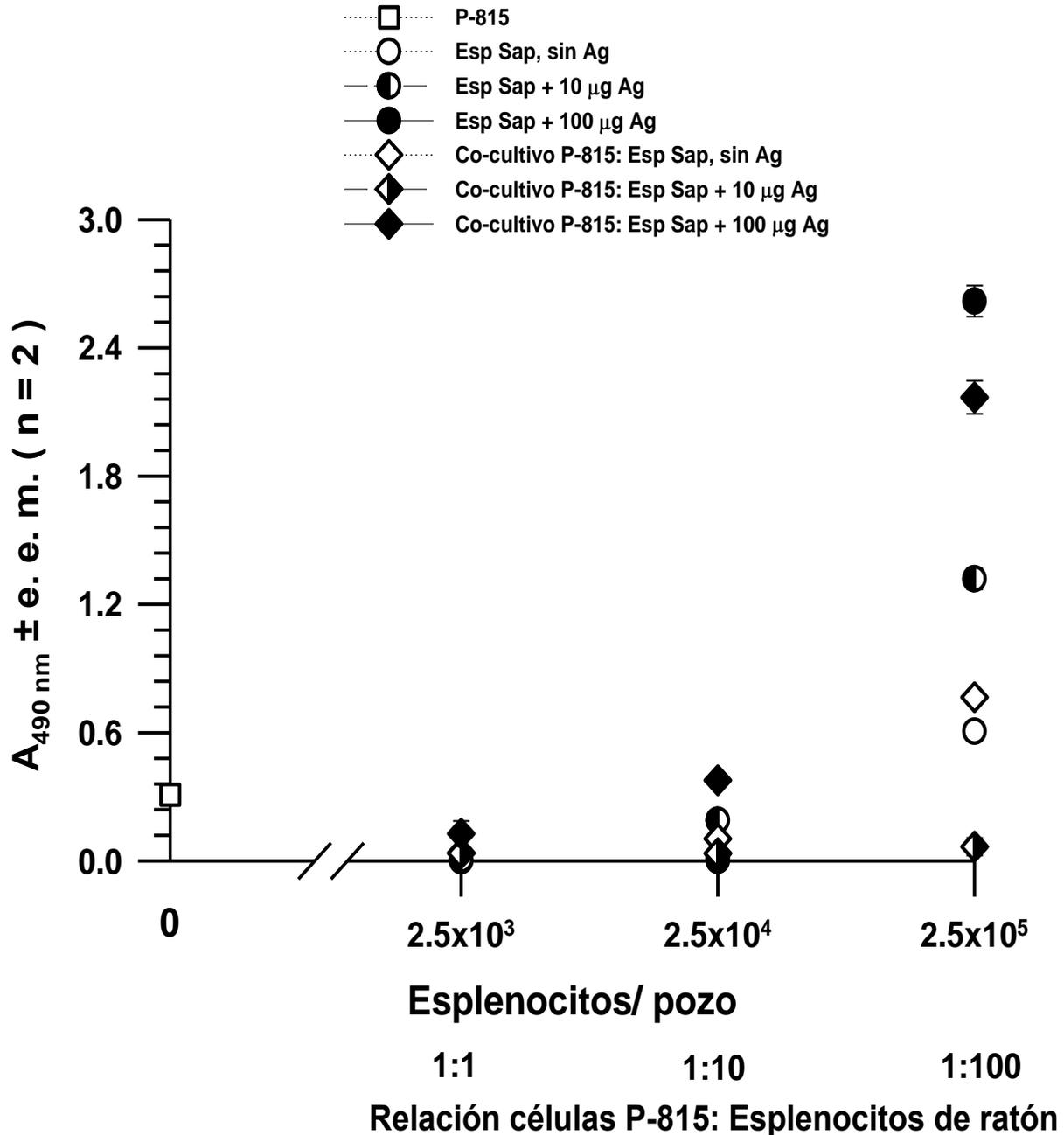


Figura 28. Citotoxicidad mediada por células evaluada por estimación de actividad de DHL al día 30 (día 15 posterior a la segunda inmunización por vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815). Se muestran las señales obtenidas de las células blanco (línea P-815), las células efectoras (esplenocitos de ratones BALB/c machos) y ambos tipos celulares juntos en tres relaciones células blanco/células efectoras.

B.- Niveles séricos de IgG contra extracto proteínico de células de la línea P-815

El efecto de la inmunización con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815 sobre la producción de IgG específica se observa en la figura 29. Al comparar entre sí las diluciones 1:100 y 1:1000 de los sueros de prueba, se nota que los valores de las lecturas de absorbancia tienden a disminuir al diluir los sueros, excepto en el caso de la respuesta preinmune del grupo control (saponina sin extracto proteínico).

En las diluciones 1:100 se observa una tendencia de disminución de los niveles séricos de IgG durante la fase de respuesta primaria, y un posterior incremento de los mismos durante la respuesta secundaria, con excepción del grupo control.

En las diluciones 1:1000 se aprecia que los niveles de IgG sérica tienden a disminuir con el transcurso del tiempo (excepto en el caso de la respuesta secundaria del grupo inmunizado con 10 μ g de extracto proteínico).

Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) únicamente en los niveles séricos de IgG correspondientes a la dilución 1:1000 de los sueros de ratones inmunizados con 100 μ g del extracto proteínico.

Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la producción de anticuerpos (IgG específica)

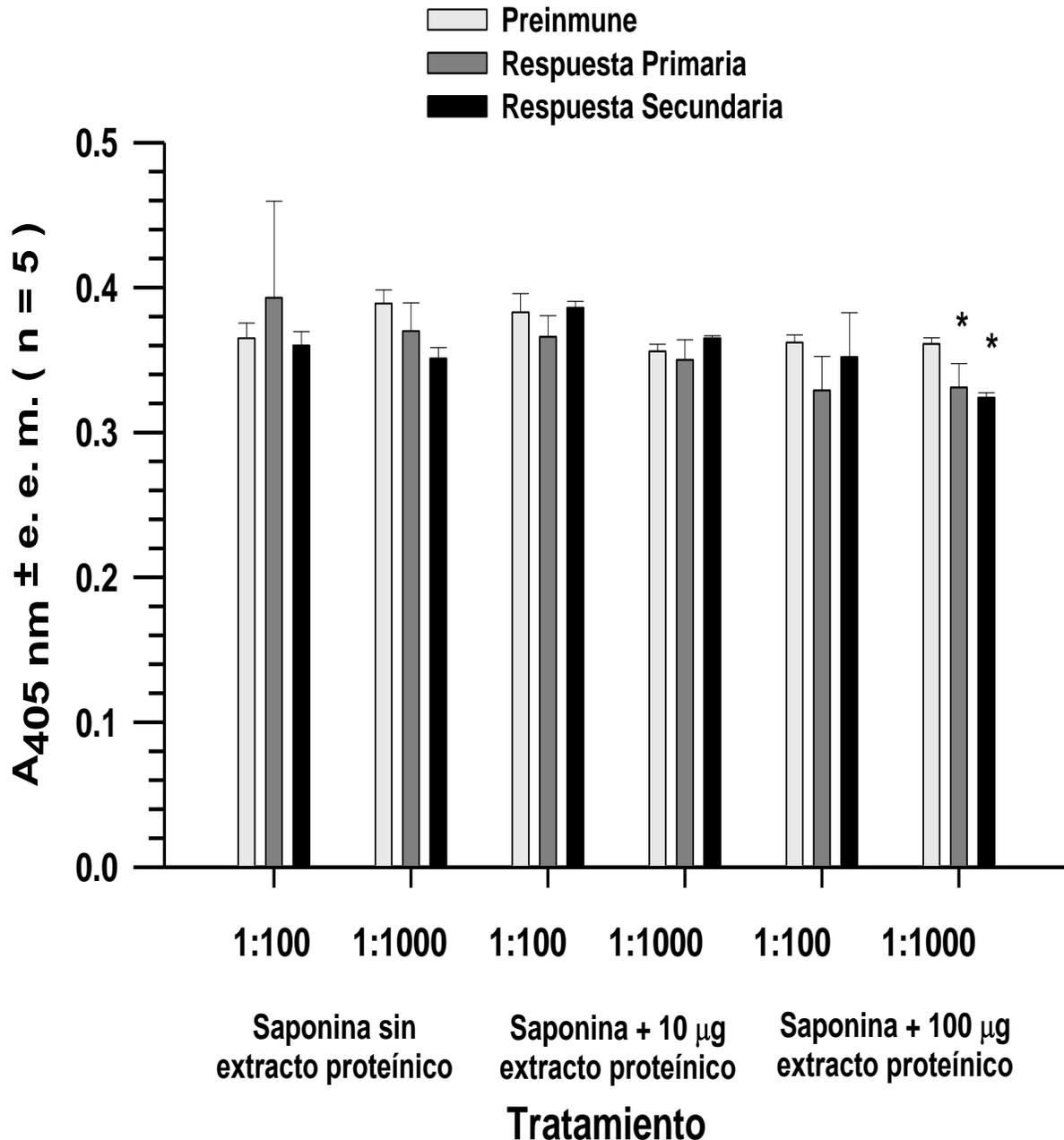


Figura 29. Modificación de la respuesta humoral (producción de IgG específica) en ratones BALB/c machos de 12 semanas por inmunización vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815. Sueros diluidos 1:100 y 1:1000 en PBS 1X.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la comparación de la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización) contra la respuesta preimmune de cada grupo.

En la tabla I se observa que en el grupo control (I-1) los niveles séricos de IgG disminuyeron en la fase de respuesta primaria con respecto a la respuesta preinmune, y volvieron a disminuir durante la fase de respuesta secundaria, sin presentar ninguno de ellos diferencia estadísticamente significativa con respecto a la respuesta preinmune. En el caso del grupo inmunizado con 10 μg de extracto proteínico, en la fase de respuesta primaria se presentó una disminución de los niveles séricos de IgG con respecto a la respuesta preinmune, y un posterior aumento durante la fase de respuesta secundaria, ambos sin diferencia estadísticamente significativa con respecto a la respuesta preinmune. Para el grupo inmunizado con 100 μg de extracto proteínico se observó una disminución en los niveles séricos de IgG durante la fase de respuesta primaria, y una disminución más ligera durante la fase de respuesta secundaria, ambas modificaciones presentaron diferencia estadísticamente significativa con respecto a la respuesta preinmune.

En la tabla II se observa que había diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de anticuerpos de los grupos inmunizados con extractos proteínicos con respecto al grupo control desde la respuesta preinmune, misma que ya no resultó significativa para el grupo inmunizado con 10 μg de extracto proteínico durante las fases de respuesta primaria ni secundaria. Para el grupo inmunizado con 100 μg de extracto proteínico la disminución de los niveles séricos de IgG se incrementó ligeramente con respecto al grupo control durante la fase de respuesta primaria, y disminuyó durante la fase de respuesta secundaria, en ambos casos con diferencia estadísticamente significativa.

Tabla I. Modificación de la respuesta humoral (producción de IgG específica) en ratones BALB/c machos de 12 semanas por inmunización vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815.

Fase de la respuesta inmune	Grupo de ratones inmunizados $A_{405\text{ nm}} \pm$ error estándar de la media (e.e.m.)		
	I-1 Saponina sin extracto proteínico	I-2 Saponina + 10 μg de extracto proteínico	I-3 Saponina + 100 μg de extracto proteínico
Preinmune	0.389 \pm 0.00945	0.356 \pm 0.00486	0.361 \pm 0.00440
Primaria	0.370 \pm 0.0196 ↓ 4.8% n.s.	0.350 \pm 0.0140 ↓ 1.7% n.s.	0.331 \pm 0.0166 ↓ 8.3% * $p < 0.05$
Secundaria	0.351 \pm 0.00762 ↓ 9.8% n.s.	0.365 \pm 0.00186 ↑ 2.5% n.s.	0.324 \pm 0.00353 ↓ 11.7% * $p < 0.05$

Se muestran las modificaciones en los niveles séricos de IgG en la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización). Los sueros de prueba fueron diluidos 1:1000 en PBS 1X.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la comparación de la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización) contra la respuesta preinmune de cada grupo, en caso contrario se indica n.s.

Tabla II. Modificación de la respuesta humoral (producción de IgG específica) en ratones BALB/c machos de 12 semanas por inmunización vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815.

Fase de la respuesta inmune	Grupo de ratones inmunizados $A_{405\text{ nm}} \pm$ error estándar de la media (e.e.m.)		
	I-1 Saponina sin extracto proteínico	I-2 Saponina + 10 μg de extracto proteínico	I-3 Saponina + 100 μg de extracto proteínico
Preinmune	0.389 ± 0.00945	0.356 ± 0.00486 ↓ 8.5% * $p < 0.05$	0.361 ± 0.00440 ↓ 7.2% * $p < 0.05$
Primaria	0.370 ± 0.0196	0.350 ± 0.0140 ↓ 5.4% n.s.	0.331 ± 0.0166 ↓ 10.5% * $p < 0.05$
Secundaria	0.351 ± 0.00762	0.365 ± 0.00186 ↓ 4.0% n.s.	0.324 ± 0.00353 ↓ 7.7% * $p < 0.05$

Se muestran las modificaciones en los niveles séricos de IgG en la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización). Los sueros de prueba fueron diluidos 1:1000 en PBS 1X.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la comparación de la respuesta preinmune, la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización) de los grupos inmunizados con 10 ó 100 μg de extracto proteínico con respecto a las del grupo control (sin extracto proteínico), en caso contrario se indica n.s.

Los resultados mostrados en la figura 29, así como en las tablas I y II, se resumen en la figura 30, mostrando únicamente los datos correspondientes a las diluciones 1:1000 de los sueros de prueba, y las diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones intragrupalas (fases de respuesta primaria y secundaria con respecto a respuesta preinmune para cada grupo).

Efecto de la inmunización con extracto proteínico de células de la línea P-815 en la producción de anticuerpos (IgG específica)

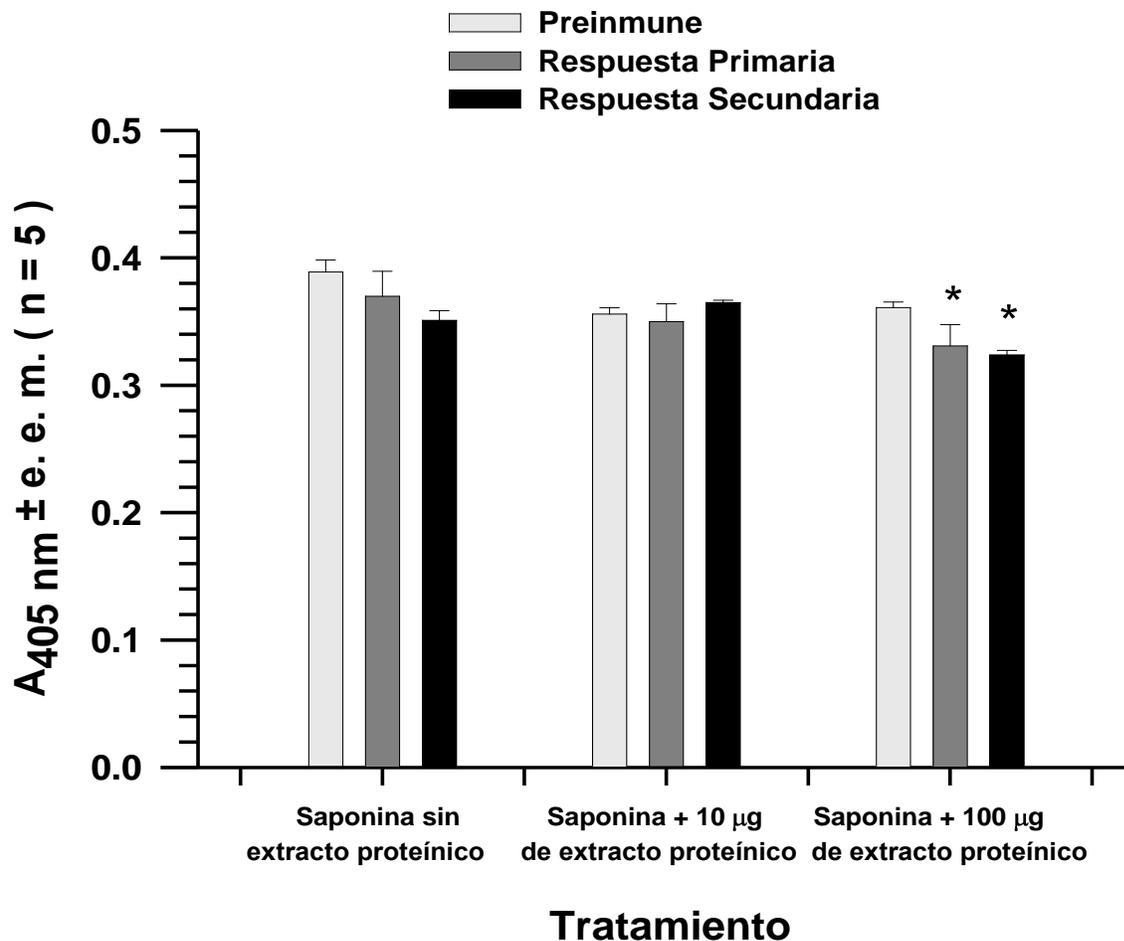


Figura 30. Modificación de la respuesta humoral (producción de IgG específica) en ratones BALB/c machos de 12 semanas por inmunización vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815. Sueros de prueba diluidos 1:1000 en PBS 1X.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la comparación de la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización) contra la respuesta preinmune de cada grupo.

2) Tratamiento de los ratones BALB/c machos con dos estrógenos naturales (17 β -estradiol ó estriol) ó uno sintético (dietilestilbestrol)

A.- Actividad citotóxica de esplenocitos

Los tres estrógenos que se estudiaron causaron aumentos de distinta intensidad en la actividad de DHL de los esplenocitos de los ratones tratados con respecto al grupo control (figura 31). Los esplenocitos de ratones del grupo tratado con 17 β - estradiol presentaron una señal 41% mayor que la de los del grupo tratado con el vehículo, sin diferencia estadísticamente significativa; la señal de daño celular del grupo tratado con estriol fue entre 3 y 4 veces mayor, con diferencia estadísticamente significativa, y la del grupo tratado con dietilestilbestrol fue mayor entre 12 y 13 veces, con significancia estadística ($p < 0.05$). Los tratamientos con estriol y dietilestilbestrol produjeron daño celular mayor con respecto al tratamiento con 17 β - estradiol (156% y 799% respectivamente, $p < 0.05$). El daño de los esplenocitos de ratones tratados con dietilestilbestrol fue 253% mayor que el de aquellos tratados con estriol ($p < 0.05$).

El daño celular siguió una tendencia similar en los co-cultivos células blanco/células efectoras los efectos de los estrógenos administrados a la que se observó en las células efectoras. El co-cultivo del grupo tratado con 17 β - estradiol presentó una señal de daño celular 3% menor con respecto a la correspondiente al grupo control, sin diferencia estadísticamente significativa; la señal de daño celular del grupo tratado con estriol resultó 90% mayor que la del grupo control, sin diferencia estadísticamente significativa; y la señal de daño celular del grupo tratado con dietilestilbestrol fue entre 5 y 6 veces mayor que la del grupo control, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El tratamiento con estriol produjo un daño celular 102% mayor, y el dietilestilbestrol un daño 455% mayor con respecto al grupo tratado con 17 β - estradiol; siendo el daño celular del tratamiento con dietilestilbestrol 175% mayor al del tratamiento con estriol ($p < 0.05$).

Efecto del tratamiento con estrógenos en la respuesta citotóxica de esplenocitos de ratón Co-cultivos mastocitoma P-815/Esplenocitos de ratón (1/10)

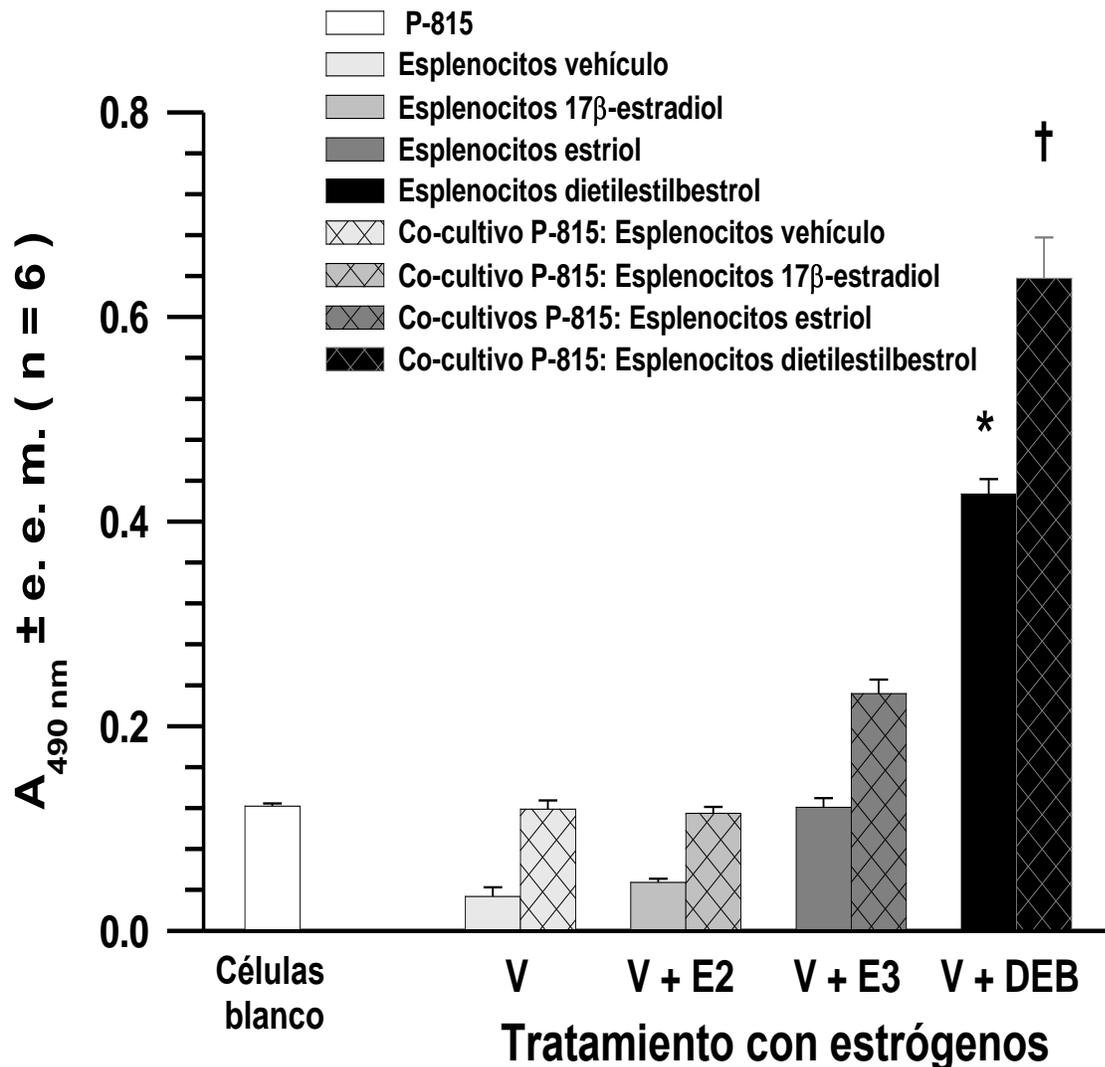


Figura 31. Citotoxicidad mediada por células evaluada al día 30 (día 15 posterior a la segunda inmunización con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815 por vía intraperitoneal) de co-cultivos mastocitoma P-815 (2,500 células/pozo): esplenocitos (25,000 células/pozo) de ratones BALB/c machos de 12 semanas tratados por vía subcutánea con estrógenos los tres días posteriores a la primera inmunización (días 1, 2 y 3) y segunda inmunización (días 16, 17 y 18), mediante actividad de DHL liberada.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del daño de esplenocitos de animales de los grupos tratados con estrógenos con respecto al grupo control (tratado solamente con vehículo); † Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del daño de co-cultivos (1:10) células de la línea P-815/esplenocitos de animales de los grupos tratados con estrógenos con respecto al grupo control (tratado solamente con vehículo).

VII. RESULTADOS

Los efectos de los tratamientos con estrógenos sobre la viabilidad celular evaluada mediante reducción de MTT se observan en la figura 32. El grupo tratado con 17β -estradiol presentó una señal de viabilidad celular 28% menor con respecto al grupo control, sin diferencia estadísticamente significativa; el grupo tratado con estriol presentó una señal 65% mayor que la del grupo control, con diferencia estadísticamente significativa; y el grupo tratado con dietilestilbestrol presentó una señal 69% menor a la del grupo control, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La viabilidad de los esplenocitos de ratones tratados con estriol fue 130% mayor, y con dietilestilbestrol 56% menor con respecto al grupo tratado con 17β -estradiol; y 81% menor para los esplenocitos de ratones tratados con dietilestilbestrol con respecto a los de ratones tratados con estriol ($p < 0.05$).

En los co-cultivos se observaron, en general, las mismas tendencias descritas anteriormente, con excepción de que el grupo de células efectoras que mostró mayor viabilidad celular fue el tratado con estriol y en los co-cultivos el grupo tratado con 17β -estradiol fue el que tuvo mayor viabilidad celular, y la diferencia en la señal de viabilidad celular del grupo tratado con estriol con respecto al grupo control se redujo en el caso de los co-cultivos.

Con respecto al grupo control, el grupo tratado con 17β -estradiol presentó una señal de viabilidad celular 43% mayor; el grupo tratado con estriol presentó una señal 2% mayor; y el grupo tratado con dietilestilbestrol tuvo una señal 52% menor, los dos últimos con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La viabilidad celular resultó 28% menor para los co-cultivos del grupo tratado con estriol sin diferencia estadísticamente significativa y 66% menor para los del grupo tratado con dietilestilbestrol con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo tratado con 17β -estradiol; y 73% menor para los co-cultivos del grupo tratado con dietilestilbestrol con respecto a los del grupo tratado con estriol, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Se encontró una relación inversamente proporcional entre el daño y la viabilidad celulares (figuras 15 y 16) en los controles de células efectoras (a mayor daño celular menor viabilidad), con excepción de los esplenocitos de ratones tratados con estriol, que presentaron un daño celular intermedio (segundo de mayor a menor) y la mayor viabilidad.

En los co-cultivos se encontró una relación inversamente proporcional daño-viabilidad en los grupos tratados con estradiol (el menor daño celular y la mayor viabilidad de todos los grupos) y dietilestilbestrol (el mayor daño celular y la menor viabilidad de todos los grupos), mientras que en la relación entre el grupo control y el grupo tratado con estriol no se observó ninguna tendencia clara.

Efecto del tratamiento con estrógenos en la viabilidad celular

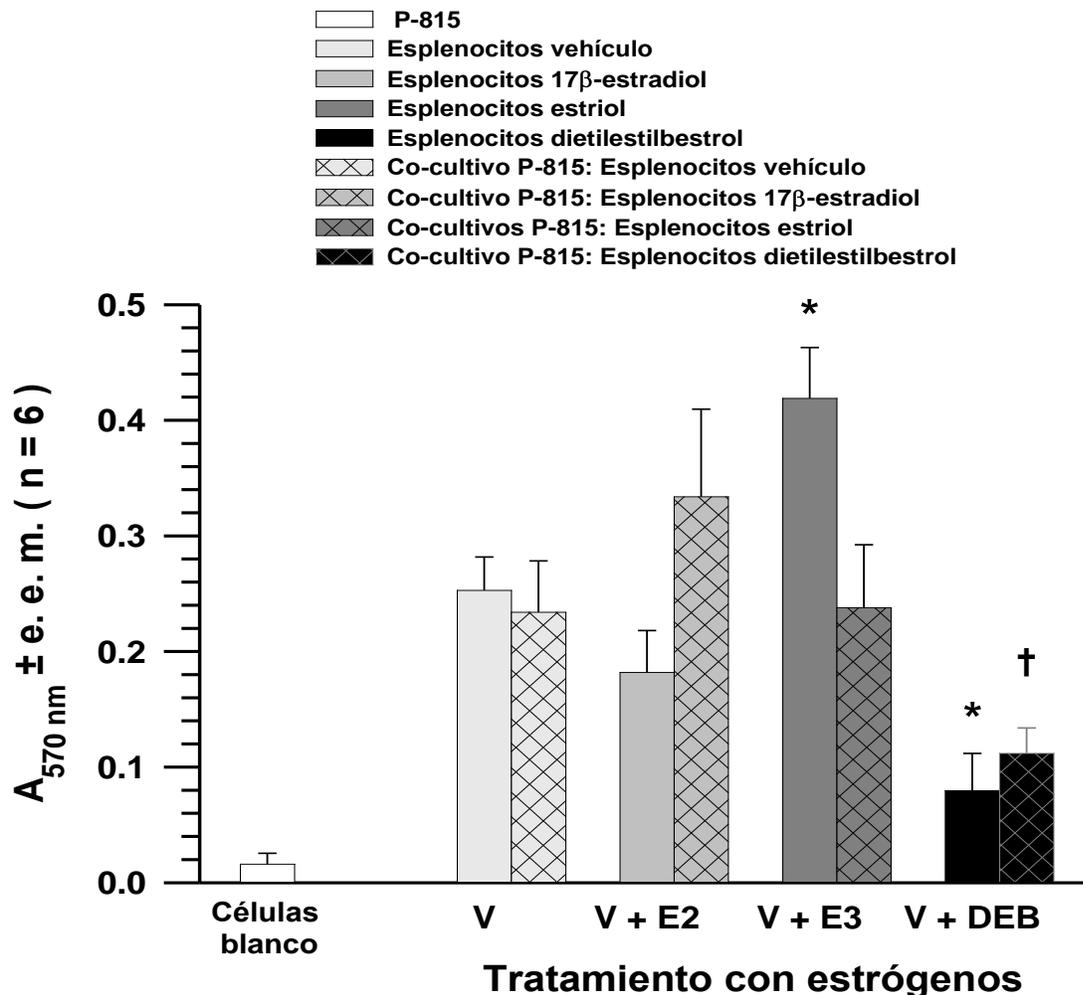


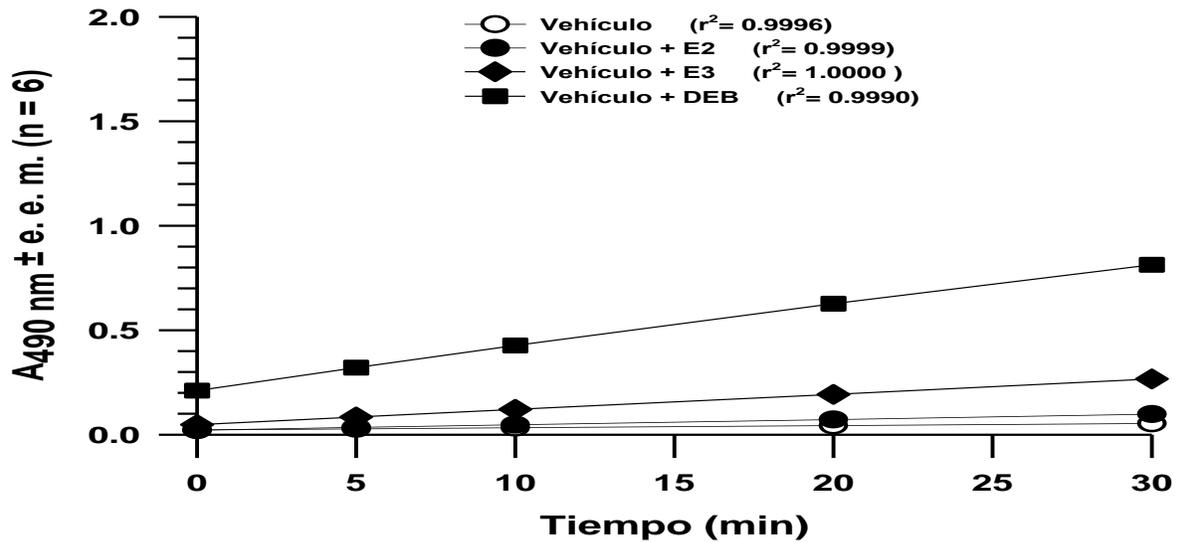
Figura 32. Viabilidad de los co-cultivos estimada mediante la reducción de MTT evaluada al día 30 (día 15 posterior a la segunda inmunización con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815 por vía intraperitoneal). Co-cultivos mastocitoma P-815 (2,500 células/pozo): esplenocitos (25,000 células/pozo) de ratones BALB/c machos de 12 semanas tratados por vía subcutánea con estrógenos los tres días posteriores a la primera inmunización (días 1, 2 y 3) y segunda inmunización (días 16, 17 y 18).

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del daño de esplenocitos de animales de los grupos tratados con estrógenos con respecto al grupo control (tratado solamente con vehículo); † Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del daño de co-cultivos (1:10) células de la línea P-815/esplenocitos de animales de los grupos tratados con estrógenos con respecto al grupo control (tratado solamente con vehículo).

VII. RESULTADOS

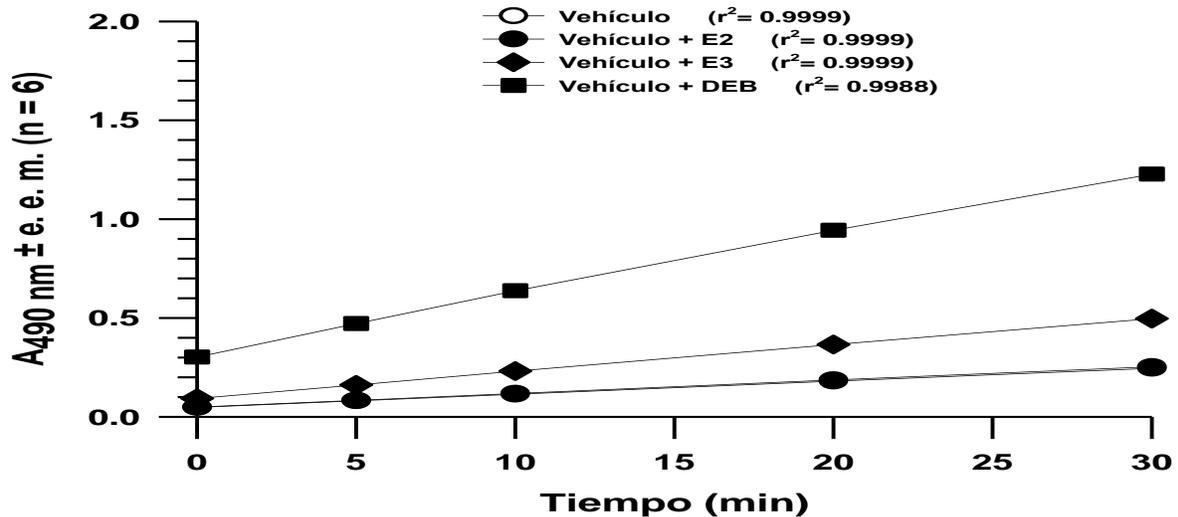
Para comprobar que la estimación de actividad de Deshidrogenasa Láctica se llevó a cabo en un intervalo de tiempo en el que se tuviera linealidad, se construyeron gráficos para representar la cinética enzimática (figura 33), a partir de los datos experimentales obtenidos realizando lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm a diferentes tiempos después de adicionar el sustrato para la enzima.

Efecto del tratamiento con estrógenos en la actividad de DHL liberada de esplenocitos de ratón



A

Efecto del tratamiento con estrógenos en la actividad citotóxica de esplenocitos de ratón Co-cultivos mastocitoma P-815/Esplenocitos de ratón (1/10)



B

Figura 33. Cinéticas de actividad de Deshidrogenasa Láctica (DHL) liberada de células dañadas al día 30 (día 15 posterior a la segunda inmunización con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815 por vía intraperitoneal). A, construida a partir de los datos obtenidos de los controles de células efectoras (2,5000 esplenocitos/pozo) de ratones BALB/c machos de 12 semanas tratados por vía subcutánea con estrógenos los tres días posteriores a la primera inmunización (días 1,2 y 3) y segunda inmunización (días 16,17 y 18). B, construida a partir de de los datos obtenidos de los co-cultivos células blanco (2,500 células P-815): células efectoras (25,000 esplenocitos/pozo) de ratones BALB/c machos de 12 semanas tratados por vía subcutánea con estrógenos los tres días posteriores a la primera inmunización (días 1,2 y 3) y segunda inmunización (días 16,17 y 18). Se empleó el kit para detección de citotoxicidad (LDH) de Roche Applied Science.

B.- Niveles séricos de IgG contra extracto proteínico de células de la línea P-815

Como se resume en la tabla III, ninguno de los estrógenos con los que se trató a los animales produjo modificaciones significativas en los niveles séricos de IgG específica. Se observa que en todos los grupos la respuesta humoral disminuye al día 15 posterior a la primera inmunización con 100 μ g de extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815 (fase de respuesta primaria) con respecto a la respuesta preinmune, y que ésta vuelve a disminuir al día 15 posterior a la segunda inmunización.

El tratamiento con vehículo no produjo un cambio estadísticamente significativo en la producción de anticuerpos en la fase de respuesta primaria, pero sí en la fase de respuesta secundaria, lo cual coincide parcialmente con lo obtenido en el experimento para estudiar el efecto de la inmunización en la producción de anticuerpos (figura 29), ya que la inmunización con 100 μ g de extracto proteínico produjo cambios significativos en ambas fases de la respuesta inmune, por lo que aparentemente el tratamiento con el vehículo modificó la producción de anticuerpos en la fase de respuesta primaria.

Tabla III. Modificación de la respuesta humoral (producción de IgG específica) en ratones BALB/c machos de 12 semanas por tratamiento vía subcutánea con 2 estrógenos naturales (E2 ó E3) ó uno sintético (DEB) durante los tres días posteriores a la inmunización vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815.

Fase de la respuesta inmune	Grupo de animales tratados con estrógenos (dosis $10^{-2.3}$ M) $A_{405\text{ nm}} \pm$ error estándar de la media (e.e.m.)			
	T-1 Vehículo (Aceite de maíz)	T-2 Vehículo + 17β - Estradiol (E2)	T-3 Vehículo + Estríol (E3)	T-4 Vehículo + Dietilestilbestrol (DEB)
Preinmune	0.325 ± 0.0110	0.368 ± 0.0182	0.391 ± 0.0144	0.308 ± 0.0119
Primaria	0.306 ± 0.00755 ↓ 5.8% n.s.	0.349 ± 0.00838 ↓ 5.2% n.s.	0.358 ± 0.00816 ↓ 8.4% n.s.	0.307 ± 0.0123 ↓ 0.3% n.s.
Secundaria	0.288 ± 0.00831 ↓ 11.4% * $p < 0.05$	0.332 ± 0.0116 ↓ 9.8% n.s.	0.355 ± 0.0199 ↓ 9.2% n.s.	0.283 ± 0.0107 ↓ 8.1% n.s.

Se muestran los niveles séricos de IgG estimados mediante ELISA indirecto en la respuesta preinmune, la fase de respuesta primaria y la fase de respuesta secundaria. Los sueros de prueba fueron diluidos 1:1000 en PBS 1X.

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las modificaciones en la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización) respecto a la respuesta preinmune para cada grupo. En caso contrario se indica n.s.

En la tabla IV se puede observar que los niveles séricos de Ig específica en la respuesta preinmune del grupo tratado con estriol eran mayores que los del grupo control con diferencia estadísticamente significativa, manteniéndose así en el transcurso del tiempo, a pesar de ello, como se observó en la tabla anterior, dicho estrógeno no modificó la producción de anticuerpos en ninguna de las fases de respuesta inmune estudiadas; lo mismo puede decirse acerca del tratamiento con dietilestilbestrol, que presentó un comportamiento similar, aunque sin diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo. En el caso del tratamiento con 17β -estradiol, los niveles séricos de anticuerpos durante la fase de respuesta primaria fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo control, aunque tampoco modificó significativamente los niveles séricos de IgG específica a lo largo del tiempo (tabla III).

Tabla IV. Modificación de la respuesta humoral (producción de IgG específica) en ratones BALB/c machos de 12 semanas por tratamiento vía subcutánea con 2 estrógenos naturales (E2 ó E3) ó uno sintético (DEB) durante los tres días posteriores a la inmunización vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815.

Fase de la respuesta inmune	Grupo de animales tratados con estrógenos (dosis $10^{-2.3}$ M) $A_{405\text{ nm}} \pm$ error estándar de la media (e.e.m.)			
	T-1 Vehículo (Aceite de maíz)	T-2 Vehículo + 17 β - Estradiol (E2)	T-3 Vehículo + Estríol (E3)	T-4 Vehículo + Dietilestilbestrol (DEB)
Preinmune	0.325 \pm 0.0110	0.368 \pm 0.0182 ↑ 13.2% n.s.	0.391 \pm 0.0144 ↑ 20.3% * p< 0.05	0.308 \pm 0.0119 ↓ 5.2% n.s.
Primaria	0.306 \pm 0.00755	0.349 \pm 0.00838 ↑ 14.0% * p< 0.05	0.358 \pm 0.00816 ↑ 17.0% * p< 0.05	0.307 \pm 0.0123 ↑ 0.3% n.s.
Secundaria	0.288 \pm 0.00831	0.332 \pm 0.0116 ↑ 15.3% n.s.	0.355 \pm 0.0199 ↑ 23.3% * p< 0.05	0.283 \pm 0.0107 ↓ 1.7% n.s.

Se muestran los niveles séricos de IgG estimados mediante ELISA indirecto en la respuesta preinmune, la fase de respuesta primaria y la fase de respuesta secundaria. Los sueros de prueba fueron diluidos 1:1000 en PBS 1X.

* Diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) en la respuesta preinmune, la fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización) y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización) de los grupos tratados con estrógenos con respecto a las del grupo control. En caso contrario se indica n.s.

Los resultados descritos anteriormente se ven resumidos en la figura 34, mostrando que el tratamiento con los estrógenos estudiados posterior a la inmunización no modificó los niveles de anticuerpos específicos contra el extracto proteínico obtenido de células de la línea P-815.

Efecto del tratamiento con estrógenos en los niveles de IgG sérica anti-extracto proteínico de células de la línea P-815

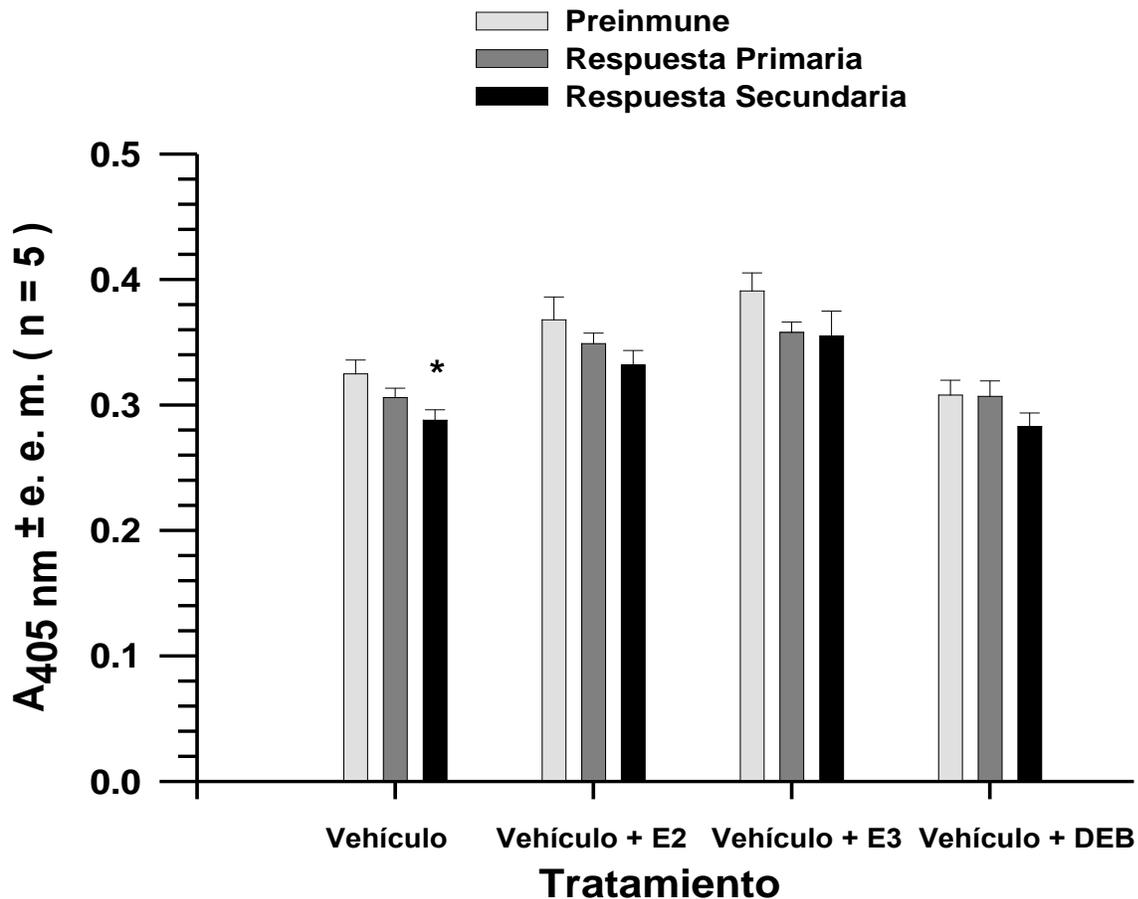


Figura 34. Modificación de la respuesta humoral (producción de IgG específica) en ratones BALB/c machos de 12 semanas por tratamiento vía subcutánea con 2 estrógenos naturales (E2 ó E3) ó uno sintético (DEB) durante los tres días posteriores a la inmunización vía intraperitoneal con extractos proteínicos obtenidos de células de la línea P-815. Sueros diluidos 1:1000.

Se muestran los niveles séricos de IgG durante la respuesta preinmune (día 0), fase de respuesta primaria (día 15 posterior a la primera inmunización), y la fase de respuesta secundaria (día 15 posterior a la segunda inmunización).

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las modificaciones de los niveles séricos de IgG durante la fase de respuesta primaria y la fase de respuesta secundaria con respecto a la respuesta preinmune, para cada grupo.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio empleamos por separado tres diferentes estrógenos, una dosis total de 540 μg (de 17β -estradiol) para un ratón de 30 g de peso. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con 17β -estradiol (estrógeno natural con la mayor actividad estrogénica) en ratones BABL/c machos no modificó la actividad citotóxica de los esplenocitos de ratón en los co-cultivos, pero tampoco afectó su la viabilidad de los esplenocitos. Los resultados que obtuvimos difieren de los obtenidos por Hao (2007), que estudió el efecto *in vivo* del estradiol en ratón en el número y actividad citotóxica de células NK. Hao observó que el tratamiento con 100 $\mu\text{g/Kg/día}$ de 17β -estradiol disuelto en aceite de sésamo y administrado diariamente por vía subcutánea durante dos semanas en ratonas C57BL/6 de 8 semanas de edad, las que previamente al tratamiento fueron ovariectomizadas, no restableció la capacidad citotóxica de las células NK, la cual se vio reducida por la ovariectomía, debido la disminución de la expresión de moléculas de superficie como CD69, NKp46, NKG2DL y 2B4, que actúan como receptores activadores, así como una disminución en el nivel de secreción de granzima B y FasL, que son necesarios para que las células NK lleven a cabo su acción citotóxica. También observó un aumento intracelular de interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$), factor soluble regulador negativo de la actividad citotóxica de las células NK. En ese mismo estudio el tratamiento con estradiol produjo un aumento en el número de células NK ($\text{NK1.1}^+/\text{CD3}^-$), debido al aumento en la expresión de los genes *Mcm7* y *Mcm10* (involucrados en la proliferación celular), estimada mediante ensayo de microarreglos. Hao empleó una dosis total de 42 μg para ratonas de 30 g de peso (12 veces menor que la que nosotros empleamos).

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento *in vivo* con estriol (estrógeno natural con actividad estrogénica muy baja), modificó significativamente la viabilidad de las células efectoras (esplenocitos de ratón) (65% mayor que el control), pero no su actividad citotóxica, indicando que dicho estrógeno podría presentar efectos similares a los observados por Hao con el 17β -estradiol, aunque administrado en dosis mayores.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este incremento en la viabilidad, fue estimado mediante la reducción de MTT. Es de notar que este indicador es muy empleado para ensayos de proliferación celular, al incrementar el número de células se incrementan las lecturas de manera directamente proporcional, ya que mide la actividad mitocondrial. Es posible que el incremento observado con respecto al grupo control se haya debido a un incremento de la población celular como lo describió Hao con el 17β -estradiol, sin embargo debido al tiempo de incubación (24 horas), sería poco probable, más bien podría deberse a un incremento en la actividad mitocondrial.

En nuestro estudio el tratamiento con dietilestilbestrol (estrógeno sintético no esteroide, con potente actividad estrogénica) en dosis equimoleculares al 17β -estradiol y estriol, produjo en los co-cultivos un efecto citotóxico 436% mayor con respecto al grupo tratado con el vehículo. Este efecto se observó igualmente en las células efectoras cuando se estudiaron por separado (1,167% mayor con respecto al grupo tratado con el vehículo). Si se compara la viabilidad de estas células, se observa también una disminución importante en los co-cultivos con respecto al grupo control (52%), que también se observa en las células efectoras (69%). Kalland (1980) encontró que el tratamiento de ratonas recién nacidas con DEB disminuyó marcadamente la actividad de células NK cuando éstas ya eran adultas, de manera más evidente en las cepas C57BL/6 y BALB/c, aunque también en ratones NMRI; no detectó evidencia de supresores celulares ó humorales inducidos por el tratamiento con DEB, lo cual podría apuntar hacia un efecto citotóxico directo del DEB. El mismo investigador (1984) estudió los efectos del DEB sobre la actividad de células NK en ratones C57BL/6 machos, sin observar cambios en la actividad lítica de los esplenocitos de los animales tratados, sin embargo, encontró que el DEB redujo el número de linfocitos capaces de reconocer células blanco, mientras que las células NK individuales tuvieron una actividad lítica y capacidad de reciclaje incrementadas, mostrando además que fueron preestimuladas *in vivo*. En un tercer estudio Kalland (1984) encontró que en ratonas NRMI, tratadas neonatalmente con DEB, la actividad de células NK estaba reducida en todos los compartimentos linfoides y no se debía a una simple redistribución de las células efectoras, sino a la reducción del número de células capaces de unirse a las células

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

blanco; y que las células individuales destruían a las células blanco de manera normal. Se mostró que el número reducido de células efectoras estaba determinado al nivel de médula ósea. Lo anterior nos hace pensar que el incremento en la actividad de la DHL observado en los esplenocitos de ratón y en los co-cultivos se debió a un efecto citotóxico *in vivo* del DEB sobre las células efectoras (el cual no se observó con los estrógenos naturales aún empleando concentraciones farmacológicas), en concordancia con los resultados de los investigadores mencionados.

El tratamiento que administramos con cada uno de los tres estrógenos estudiados, no modificó la respuesta inmune humoral primaria ni la secundaria.

Li (2009) observó que el tratamiento con 17β -estradiol ($100 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$, disuelto en aceite de sésamo), administrado diariamente por vía subcutánea durante dos semanas a ratonas de 8 a 10 semanas de edad (que habían sido ovariectomizadas previo al tratamiento), no modificó los niveles de IgG en ratonas BALB/c, lo cual coincide con nuestros resultados, a pesar de que la dosis que administramos fue mayor que la empleada en dicho estudio.

Ezaki (1982) reportó que cuando se administraron 10 mg de estriol (suspensión acuosa) por vía intraperitoneal a ratones (C57BL/6 x DBA) F_1 (BDF $_1$) de 8 a 10 semanas 5 días antes de la inmunización vía intravenosa con suspensiones de células rojas de sangre de oveja, la respuesta primaria de anticuerpos se vio disminuida, pero la respuesta de anticuerpos de memoria se vio marcadamente incrementada cuando el estriol fue administrado previo a la estimulación primaria con antígeno, probablemente por una distribución alterada de antígeno debido a la actividad fagocítica activada del sistema retículo-endotelial. Esa observación contrasta con nuestros resultados, ya que el tratamiento con estriol (dosis 18 veces menor que la empleada por Ezaki) no modificó los niveles de IgG durante las fases de respuesta primaria y secundaria, ni presentó diferencias con respecto a lo observado en el grupo control.

El efecto citotóxico que el tratamiento con DEB tuvo sobre los esplenocitos de ratón nos hace pensar que éste es estirpe-específico (sobre células que llevan a cabo respuesta

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

citotóxica), o bien, sobre las células cooperadoras que activan la generación de células citotóxicas. La producción de anticuerpos no se vio modificada con respecto al grupo control, hecho que indirectamente podría indicar que el DEB no resultó citotóxico para células encargadas de llevar a cabo una respuesta humoral, o para las células que las activan.

Se sabe que los macrófagos son requeridos para la generación de células citotóxicas (linfocitos T citotóxicos) y la producción de anticuerpos, así como para la respuesta proliferativa a mitógenos (Golub, 1987). Un efecto tóxico del tratamiento con DEB sobre los macrófagos podría haber alterado su interacción con las células efectoras de las respuestas citotóxica y humoral, lo cual puede ser descartado tomando en cuenta que ninguna de las dos respuestas se vieron modificadas.

Las conclusiones que pudimos obtener mediante la realización de este estudio son las siguientes:

1. Los tratamientos *in vivo* en ratones BALB/c machos de 12 semanas con los estrógenos naturales 17β -estradiol o estriol, administrados posteriormente a la inmunización con antígenos alogénicos no modificaron la respuesta citotóxica.
2. El tratamiento *in vivo* en ratones BALB/c machos de 12 semanas con el estrógeno sintético dietilestilbestrol administrado posteriormente a la inmunización con antígenos alogénicos sí modificó la respuesta citotóxica.
3. El tratamiento *in vivo* con estrógenos naturales o sintéticos no modificó la respuesta inmune humoral primaria ni secundaria contra antígenos alogénicos.
4. El tratamiento *in vivo* con el estrógeno sintético dietilestilbestrol tuvo un efecto citotóxico sobre los esplenocitos de ratón.

IX. REFERENCIAS

1. Arens R, Schoenberger SP. Plasticity in programming of effector and memory CD8+ T-cell formation. *Immunol Rev.* 2010 235(1):190–205.
2. Aparicio P, Gallart T. J 11 Activación de células NK. En línea: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>. Consultado el jueves 14 de octubre de 2010 a las 21:00 hrs.
3. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS. McGraw Hill. 11th Ed. 2006:1542-44.
4. Capellino S, Montagna P, Villaggio B, *et al.* Hydroxylated estrogen metabolites influence the proliferation of cultured human monocytes: possible role in synovial tissue hyperplasia. *Clin Exp Rheumatol.* 2008 26(5):903-9.
5. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, *et al.* Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol.* 2009 6(1):15-25.
6. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, *et al.* Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull.* 200225(12):1600-03.
7. Ezaki T, Nawa Y, Hayama T, *et al.* Modulation of the immune responses against SRBC after oestriol treatment in mice. *Clin Exp Immunol.* 1982 48:239-43.
8. Feinberg BB, Tan NS, Walsh SW, *et al.* Progesterone and estradiol suppress human mononuclear cell cytotoxicity. *J Reprod Immunol.* 1992 21(2):139-48.
9. Gachlin G, Michelin O, Luescher IF, *et al.* Antigen recognition by lymphocytes. *els*, John Wiley & Sons. 2001.
10. Gold SM, Sasidhar MV, Morales LB, *et al.* Estrogen treatment decreases matrix metalloproteinase (MMP)-9 in autoimmune demyelinating disease through estrogen receptor alpha (ER α). *Lab Invest.* 2009 89(10):1076–83.
11. Golub ES. *Immunology: a synthesis.* Sinauer. 1st Ed. 1987:243-49, 449.
12. Hao S, Zhao J, Zhou J, *et al.* Modulation of 17 β -estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *Int Immunopharmacol.* 2007 7:1765-1775.
13. Herbert WJ, Wilkinson PC, Stott DI. *The dictionary of Immunology.* Academic Press 4th Ed. 1995.

14. Ignatowska-Jankowska B, Jankowski M, Glac W, *et al.* Cannabidiol-induced lymphopenia does not involve NKT and NK cells. *J Physiol Pharmacol.* 2009 60(3): 99-103.
15. Jun DY, Park HS, Kim JS, *et al.* 17 α -Estradiol arrests cell cycle progression at G2/M and induces apoptotic cell death in human acute leukemia Jurkat T cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 231(3):401–12.
16. Lash GE, Robson SC, Bulmer JN. Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* 2010 XXX:1-6.
17. Lefevre EA, Carr BV, Prentice H, *et al.* A quantitative assessment of primary and secondary immune responses in cattle using a B cell ELISPOT assay. *Vet Res.* 2009 40:03.
18. Li X, Xu Y, Ma L, *et al.* 17 β -Estradiol enhances the response of plasmacytoid dendritic cell to CpG. *PLoS ONE* 2009 4(12):e8412.
18. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2010 3:361-370.
19. Loo DT. TUNEL assay: An overview of techniques. *Methods Mol Biol.* 2002 203:21-30.
20. López-Botet M, Peña J. 10 Activación de células NK. En línea: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>. Consultado el jueves 14 de octubre de 2010 a las 21:00 hrs.
21. López-Botet M, Peña J. 12 Activación de células NK. En línea: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>. Consultado el jueves 14 de octubre de 2010 a las 21:00 hrs.
22. López-Botet M, Peña J. 14 Citotoxicidad. En línea: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>. Consultado el jueves 14 de octubre de 2010 a las 21:00 hrs.
23. Madrenas J, Robarts JP. Lymphocytes: Antigen-induced gene activation. *els, Nature Publishing Group.* 2001.
24. Matsuda K, Yamamoto N, Masaki S. Antigens: lipids. *els, Nature Publishing Group.* 2001.
25. McMurray RW, Ndebele K, Hardy KJ, *et al.* 17- β -Estradiol supresses IL-2 and IL-2 receptor. *Cytokine.* 2001 14(6):324–333.

IX. REFERENCIAS

26. Molina JA. Efecto del estradiol y del dietilestilbestrol en tres procesos del sistema inmune del ratón. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. División de Estudios de Posgrado. México, D. F. 1995.
27. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, *et al.* NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ.* 2008 15:226–33.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
29. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, *et al.* Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood.* 2005 105(4):1614-21.
30. Oykman P, Mody CH. Direct microbicidal activity of cytotoxic T-lymphocytes. *J Biomed Biotechnol.* 2010 1-9.
31. Paulie S, Perlmann H, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. *els*, John Wiley and Sons. 2005.
32. Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, *et al.* Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J Immunol Method.* 1997 208:151-158.
33. Rodeiro I, Alemán C, Acosta CP, *et al.* Evaluación citotóxica del D-002: una droga con actividad antiulcerosa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2004 35(2):109-112.
34. Saitoh H, Maeda K, Yamakawa M. *In situ* observation of germinal center cell apoptosis during a secondary immune response. *J Clin Exp Hematopathol.* 2006 46(2):73-82.
35. Tilburgs T, Claas FHJ, Scherjon SA. Elsevier trophoblast research award lecture: Unique properties of decidual T cells and their role in immune regulation during human pregnancy. *Placenta.* 2010 31(A)(24):S82-S86.
36. Trambas CM, Griffiths GM. Delivering the kiss of death. *Nat Immunol.* 2003 4(5):399-402.
37. Voskens CJ, Watanabe R, Rollins S, *et al.* Ex-vivo expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010, 29:134-46.
38. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2009 82:24-31.

X. APÉNDICES

1) Materiales, equipos y reactivos

A.- Materiales

Material de vidrio

- Frascos WHEATON de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.
- Pipetas KIMAX y PYREX de 1, 5 y 10 mL.

Manejo de animales

- Jaulas transparentes de policarbonato con reja metálica.
- Módulo metálico para colocar jaulas de policarbonato.
- Tubos capilares KIMAX de 1.5-1.8 x 100 mm.
- Jeringas de plástico para insulina de 1 mL con aguja desmontable JAYOR y BD PLASTIPAK.
- Agujas calibre 20 de 38 mm de longitud.
- Mechero Bunsen.
- Pinzas y tijeras quirúrgicas.

Cultivos celulares

- Filtros MILLIPORE de membrana de nitrocelulosa, con poro de 0.22 μm de diámetro, de 25 y 47 mm.
- Vaso para filtración MILLIPORE de 250 mL con tapa.
- Botellas para cultivo celular *NUNC* de cuello angulado con 25 cm^2 de área de cultivo y volumen total de 50 mL.
- Botellas para cultivo celular *NUNC* de cuello recto con 80 cm^2 de área de cultivo y volumen total de 260 mL.
- Tubos *NUNC* cónicos de 15 mL para centrífuga.
- Micropipetas y puntas eppendorf de 0.1-2.5 μL , 0.5-10 μL , 2-20 μL , 10-100 μL y 100-1000 μL .
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Cajas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro.
- Tinas eppendorf de plástico de 40 mL con tapa.
- Colectores SIGMA con tamiz para cultivo de tejido.
- Cámara de Neubauer mejorada REICHERT de 1 mm de profundidad.

Ensayos de citotoxicidad y ELISA

- Placas para cultivo de 96 pozos *NUNC* Delta Surface desechables.
- Pipeta multicanal Costar para 8 puntas.
- Inmuno placas *NUNC* MaxiSorp Surface de 96 pozos de fondo plano ópticamente claro.

- Inmuno módulos *NUNC* MaxiSorp Surface de 16 pozos de fondo plano ópticamente claro.

B.- Equipos

Conservación de muestras y reactivos

- Congelador TORREY de 21 ft³.

Centrifugación y agitación

- Centrífuga SIGMA 2-16 (Shropshire, Reino Unido).
- Rotor SIGMA 11192 para tubos cónicos (Shropshire, Reino Unido).
- Camisas SIGMA 13041 para tres tubos cónicos (Shropshire, Reino Unido).
- Rotor SIGMA 11123 para placas de cultivo (Shropshire, Reino Unido).
- Camisas SIGMA 13223 para placas de cultivo (Shropshire, Reino Unido).
- Microfuga Heraeus Biofuge *pico*.
- Película PARAFILM para laboratorio (Chicago, IL)
- Vortex GENIE 2 Scientific Industries (Philadelphia, Pa)

Preparación de reactivos y esterilización de medios de cultivo

- Balanza analítica OHAUS Adventurer.
- Parrilla de agitación Thermolyne nuova stirrer.
- Bomba GAST ROC-R.

Manejo de animales

- Balanza OHAUS

Cultivos celulares

- Campana de flujo laminar NUAIRE Class II A NU-425-400 SERIES 30.
- Incubadora NUAIRE NU-4750 SERIES 1 con chaqueta de agua e inyección automática de CO₂.

Ensayos de citotoxicidad y ELISA

- Lector para placas de ELISA BioTek ELx800 (Winnosky, VT).

C.- Reactivos

Preparación de reactivos

- Agua bidestilada *Fast WATER* (México, D.F.)
- NaCl cristal J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México).
- NaOH perlas J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México).

- EDTA sal disódica dihidratada GIBCO BRL (Grand Island, NY).
- EGTA polvo J.T. Baker (Phillipsburg, NJ).
- Triton X-100 Roche Applied Science (Mannheim, Alemania).
- Suero Bovino Fetal definido HyClone Thermo SCIENTIFIC (South Logan, Utah).
- Tris UltraPure (invitrogen, Carlsbad, CA; Paisley, Escocia, Reino Unido; Auckland, Nueva Zelanda).
- NH_4Cl MERCK (Whitehouse Station, NJ).
- NaHCO_3 polvo J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México).
- Na_2CO_3 polvo J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México).
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ cristal J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México).
- Na_2HPO_4 anhidro J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México).
- NaN_3 SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO; Steinheim, Alemania).
- Tween 20 SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO; Steinheim, Alemania).
- Leche descremada en polvo Svelty Digestión 0%, sin grasa, Nestlé (México, D.F.; Vevey, Suiza).

Cultivo celular

- Medio RPMI 1640 con L-glutamina, sin NaHCO_3 , con rojo de fenol como indicador (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO). Se adicionó NaHCO_3 en una concentración de 2 g / L. Esterilizado por filtración en membrana.
- Medio DMEM alto en glucosa, con L-glutamina y clorhidrato de piridoxina, sin rojo de fenol, sin piruvato de sodio, sin NaHCO_3 (GIBCO BRL, Grand Island, NY). Se adicionó NaHCO_3 en una concentración 3.2 g / L. Esterilizado por filtración en membrana.
- Solución estabilizada de penicilina y estreptomycin (10000 U y 10 mg/mL en NaCl al 0.9% SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO; Steinheim, Alemania).

Obtención y cuantificación de extractos proteínicos

- Mezcla inhibidora de proteasas para extractos de células y tejidos de mamíferos SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO; Steinheim, Alemania).
- Micro BCA Reagent A (MA) Thermo SCIENTIFIC (Rockford, IL)
- Micro BCA Reagent B (MB) PIERCE (Rockford,IL)
- Micro BCA Reagent C (MC) Thermo Scientific (Rockford,IL)

Inmunización

- Saponina

Tratamiento con estrógenos

- Aceite de maíz la Gloria KMD México (México, D.F.).
- E2 y E3 Organon (México, D.F.).
- DEB MERCK (Whitehouse Station, NJ).

Ensayos de citotoxicidad

- Kit para detección de citotoxicidad (DHL) Roche Applied Science (Indianapolis, IN; Mannheim, Alemania).
- MTT Millipore (Billerica, MA)
- HCl J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México).
- Anticuerpo (IgG) de cabra anti-IgG de ratón, cadena ligera, conjugado a fosfatasa alcalina, AP200A, CHEMICON INTERNATIONAL (Temecula, CA).
- p-nitrofenilfosfato di(Tris)-sal SIGMA (St. Louis, MO).
- Dietanolamina SIGMA (St. Louis, MO).
- $MgCl_2$ cristal J.T. BAKER CHEMICAL CO (Phillipsburg, PA)
- DMSO SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO; Steinheim, Alemania).

2) Preparación de reactivos**A.- Medio RPMI-1640**

- Medir 900 mL de agua bidestilada y transferir a un matraz Erlenmeyer de 2000 mL.
- Agregar todo el contenido del frasco con el medio al matraz Erlenmeyer, enjuagar el frasco con agua bidestilada para recuperar la mayor cantidad posible de medio.
- Disolver utilizando un agitador magnético.
- Ajustar pH a 4 con HCl al 50%
- Agregar 2 g de $NaHCO_3$ hasta $pH \approx 7.3$
- Ajustar pH con HCl o NaOH 1 N
- Agregar agua bidestilada hasta completar 1000 mL
- Esterilizar por filtración

B.- Medio DMEM

- Medir 900 mL de agua bidestilada y transferir a un matraz Erlenmeyer de 2000 mL
- Transferir todo el contenido del sobre con medio al matraz Erlenmeyer
- Disolver utilizando un agitador magnético
- Agregar 3.2 g de $NaHCO_3$ hasta $pH \approx 7.3$
- Ajustar pH con HCl ó NaOH 1 N
- Agregar agua bidestilada hasta completar 1000 mL
- Esterilizar por filtración

C.- Tris 17 mM

- Colocar 25 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 100 mL
- Pesar 0.104 g de Tris y transferirlos al vaso de precipitados, disolver con ayuda de un agitador magnético
- Ajustar pH a 7.2 con NaOH ó HCl 1 N
- Agregar agua bidestilada hasta completar 50 mL

D.- Cloruro de amonio 144 mM para lisis de eritrocitos

- Colocar 15 mL de Tris 17 mM en un vaso de precipitados de 50 mL
- Pesar 0.1526 g cloruro de amonio y transferirlos al vaso de precipitados
- Disolver utilizando un agitador magnético
- Agregar agua bidestilada hasta completar 20 mL
- Esterilizar por filtración

E.- Amortiguador de carbonatos

- Colocar 100 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 250 mL.
- Pesar 1.59 g de Na_2CO_3 y agregarlos al vaso de precipitados
- Pesar 2.93 g de NaHCO_3 y agregar al vaso de precipitados
- Pesar 0.2 g de azida de sodio y agregar al vaso de precipitados
- Homogenizar con ayuda de un agitador magnético
- Transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL
- Agregar agua bidestilada hasta completar 1000 mL
- Ajustar pH a 9.6

F.- Amortiguador de fosfatos

* PBS 10X

+ Solución 1:

- Colocar 500 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 2000 mL
- Pesar 42.2 g de fosfato dibásico de sodio hidratado ó 21.29 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y adicionarlos al vaso de precipitados.
- Pesar 87.66 g de NaCl y adicionarlos al vaso de precipitados
- Disolver y homogenizar usando un agitador magnético
- Agregar agua bidestilada hasta completar 1000 mL

+ Solución 2:

- Colocar 50 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 250 mL.
- Pesar 2.07 g de fosfato monobásico de sodio y transferirlos al vaso de precipitados.
- Pesar 8.76 g de NaCl y transferirlos al vaso de precipitados
- Agregar agua bidestilada hasta completar 100 mL

- Adicionar la solución 2 a la 1
- Ajustar pH a 7.4 ± 0.2

* PBS 1X: Tomar 100 mL de PBS 10 X y adicionar 900 mL de agua bidestilada.

G.- Amortiguador Tris

- Colocar 100 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 250 mL

- Pesar 1.576 g de Tris y agregar al vaso de precipitados.
- Homogenizar con un agitador magnético adecuado
- Transferir a un vaso ó matraz de 1000 mL.
- Agregar agua bidestilada para completar 1000 mL
- Ajustar pH a 7.4 ó 9.6

H.- Leche descremada al 1% en PBS 1X

- Colocar 10 mL de PBS 1X en un vaso de precipitados de 25 mL ó en un frasco vial.
- Pesar 0.1 g de leche descremada Svelty digestión 0% grasa y tranferir al vaso de precipitados con PBS IX.
- Homogenizar mediante agitación.
- Transferir a un envase adecuado, envolver alrededor de la tapa con película Parafilm.

I.- Tween 20 al 0.1% en PBS 1X ó Tris pH 7.4

- Colocar 50 mL de PBS 1X ó Tris pH 7.4 en un vaso de precipitados de 100 mL.
- Tomar 50 μ L de Tween 20, pipeteando lentamente.
- Transferir los 50 mL de Tween 20 al vaso de precipitados conteniendo al amortiguador correspondiente.
- Descargar el Tween 20 en el vaso de precipitados mediante pipeteo repetido hasta desalojar completamente el tensoactivo de la pipeta.
- Homogenizar la solución mediante agitación mecánica ó empleando un agitador magnético.

J.- Sustrato para fosfatasa alcalina

- Colocar 2 mL de amortiguador Tris pH 9.6 en un vaso de precipitados
 - Pesar 46 mg (0.046 g) de p-nitrofenilfosfato, tranferir al vaso de precipitados con Tris pH 9.6 y disolver mediante agitación mecánica.
 - Tomar 1000 μ L de dietanolamina mediante pipeteo suave y cuidadoso, transferir al vaso de precipitados.
 - Tomar 1 μ L del líquido contenido en el envase del cloruro de magnesio y transferir al vaso de precipitados, homogenizar mediante agitación mecánica.
- (Nota: si se observa precipitación ó aumento de turbidez en el líquido al añadir el cloruro de magnesio será necesario preparar el sustrato nuevamente, probando adicionar una cantidad menor de cloruro de magnesio para evitar la precipitación).**

3) Código numérico para marcaje de ratones

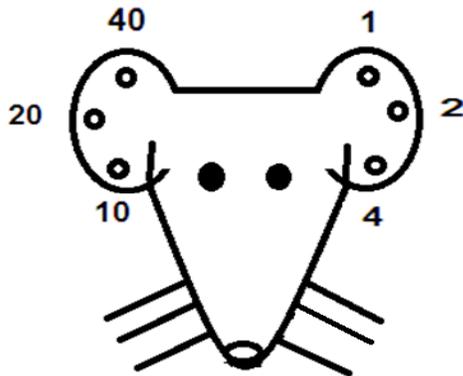


Figura 35. Código numérico predeterminado en nuestro laboratorio para llevar a cabo el marcaje de los animales mediante perforación de las orejas. Se muestra cómo identificar a cada ratón marcado por el número asignado a la posición de las orejas donde se realizan las perforaciones.

4) Recuento de células en la cámara de Neubauer

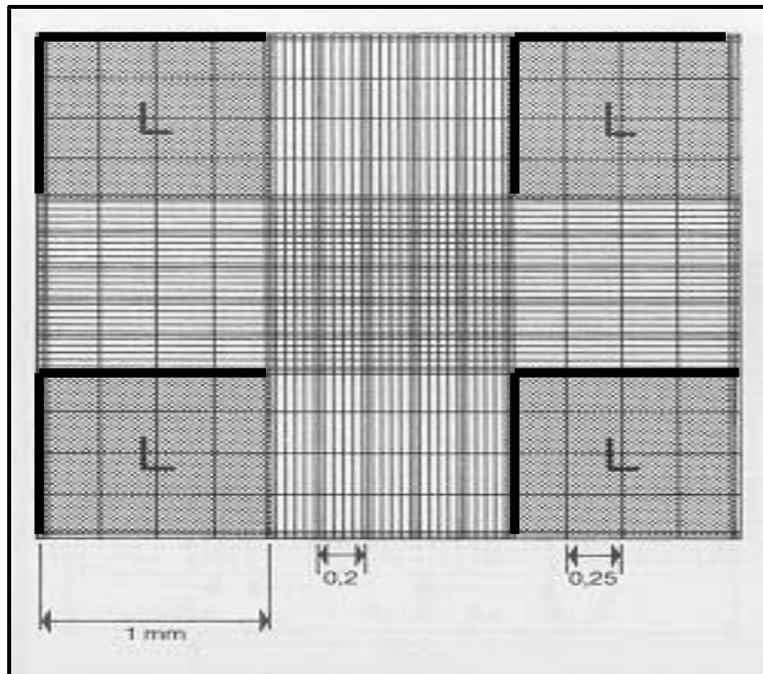


Figura 36. Representación esquemática de una cámara de Neubauer. Es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. El área sombreada y marcada (L) corresponde a 1 mm². La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 mm³, es decir 0.1 μL.

Imagen y texto de Manuel Reina, Universidad de Barcelona, España. Tomados de la red en <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>.

El conteo se lleva a cabo en las zonas marcadas como L, tomando en cuenta las celdillas exteriores resaltadas con las líneas negras. Se obtiene el promedio de las células contadas en cada uno de los cuadrantes (dividir entre 4), y posteriormente para calcular el número de células en cada mL de suspensión celular se multiplica por un factor de 10,000:

$$\frac{\text{Promedio de células}}{0.1 \mu\text{L}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}}$$

En la multiplicación mostrada se justifica el factor de 10,000, ya que $1000/0.1 = 10000$. Si se realizaron diluciones de la suspensión celular, para calcular el número de células por cada mililitro se debe multiplicar el número obtenido anteriormente por el número de veces que se diluyó la muestra.

XI. GLOSARIO

Activación: estimulación de procesos celulares iniciada como respuesta a un estímulo externo que llega a una célula.

Alogénico: genéticamente distinto dentro de la misma especie.

Anticuerpo: proteína con las propiedades moleculares de una inmunoglobulina y capaz de combinación específica con un antígeno.

Antígeno: molécula que provoca una respuesta inmune específica cuando es introducido en los tejidos de un animal.

Diferenciación: proceso por el cual una célula de un tipo pasa a un tipo celular más especializado.

Estratos balanceados de peso: método para formar grupos de animales basado en el peso corporal.

Hipermutación somática: mutaciones que ocurren rápidamente en los genes de la región Variable (región V) de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina durante la formación de células B de memoria, produciendo muchas más secuencias de región Variable de las que se encuentran en los genes de línea germinal de las cuales son originadas.

Inmunidad: no susceptibilidad a los efectos invasivos ó patogénicos de organismos extraños ó a los efectos tóxicos de sustancias antigénicas. Estado de responsividad elevada hacia el antígeno, de tal forma que ese antígeno es capturado o eliminado más rápidamente que en el estado no inmune.

Inmunización: administración de antígeno para producir una respuesta hacia él.

Inmunoglobulina: miembro de una familia de proteínas, cada una compuesta por cadenas ligeras y cadenas pesadas que se mantienen unidas mediante puentes disulfuro.

Isotipo: clasificación de una molécula mediante comparación de su estructura primaria o antigénica con aquella de moléculas estrechamente relacionadas encontradas dentro de todos los miembros de la misma especie. Aplicado a las inmunoglobulinas, el isotipo describe la clase y subclase de la inmunoglobulina, el tipo y subtipo de cadena ligera y también puede ser aplicado a los grupos y subgrupos de la región variable.

Maduración: proceso por el cual una célula se diferencia para realizar una función específica.

Proliferación: incremento en el número de células como resultado de crecimiento y división celular.