



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICA DE
HIBRIDACIÓN *IN SITU* PARA LA DETECCIÓN DE
mRNA DE CITOCINAS EN INTESTINO PORCINO.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ

ASESOR:

Ph D. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estandarización de la técnica de hibridación in situ para la
detección de mRNA de citocinas en intestino porcino.

que presenta la pasante: Elizabeth Ortiz Sánchez
con número de cuenta 9129659-7 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 26 de Junio del 2001

PRESIDENTE PhD. Marco Antonio Vega López

VOCAL Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega

SECRETARIO Dr. Víctor M. Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE M. en C. Norma L. Delgado Buenafuente

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Quien no conoce nada, no ama nada, quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve...

Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor... quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas... nada sabe acerca de las uvas.

Paracelso

Este trabajo se realizó en el laboratorio 1 del Área 1 del Dr. Efraín Garrido Guerrero, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional.

*Esta tesis se realizó bajo el apoyo del proyecto de **CONACYT** número 26361-B*

Dedicatoria

Este trabajo y todo lo que el implica es gracias a ti mi Dios, porque solo Tú me brindaste la oportunidad de tener a los mejores padres, a los mejores hermanos, a los mejores maestros y amigos que me apoyaron para que esto se hiciera realidad. De verdad no hay palabras para agradecerte lo cuido que eres conmigo.

Considero que ser Papá o Mamá, es el más grande proyecto en la vida; cual quiera posee una capacidad intelectual que puede desarrollar para generar un conocimiento, pero no cualquiera tiene el amor y la paciencia para llevar a un hijo donde ustedes, mis padres, me han llevado. Ustedes han hecho que me realice plenamente, y por todo esto y más dedico este trabajo como un tributo a su comprensión y dedicación.

También quiero dedicar este trabajo a mis hermanos: Juan Carlos, Miguel Angel y José Eduardo, por su compañía, por todos los momentos que hemos vivido y por soportar mis malos ratos.

Elizabeth

Agradecimientos

Para poder realizar una buena tesis, se necesita de un buen tutor, y yo tuve uno muy bueno: al Pb D. Marco Antonio Vega. A usted le ofrezco mucho más que mil gracias por la confianza que depositó en mí al darme este proyecto, más aún, le doy millones de moles de gracias por su valiosa amistad.

De igual forma quiero agradecer al Dr. Efraín Garrido por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio desinteresadamente, no exigió nada y nos dio todo... gracias por su confianza y por todo su apoyo.

Quiero agradecer de una manera "mega" al Btol. Pedro Cbáñez por su valiosa ayuda prestada sin la cual no hubiese sido posible realizar este trabajo. Usted fue mi maestro y le agradezco la paciencia y dedicación que siempre me brindó; gracias por cada enseñanza que nunca olvidaré... caray, pero lo que más le agradezco es su amistad...gracias "Señor Pedro".

"Quien ha encontrado un amigo ha encontrado un gran tesoro..." Sir, 6

Es inevitable no agradecer a todos mis maestros que he tenido, desde el kínder hasta los de la Universidad, ya que todos ellos han participado para que hoy sea una profesionista.

Por último, que no por eso menos importante, ofrezco todo mi agradecimiento y cariño a todos mis amigos, que no quiero escribir sus nombres por temor a que omita alguno....

¡ Gracias a ti !

iiii Goya, Goya... cabún cabún ra, ra... Universidad !!!!!

Feliz el hombre que se dedica a la sabiduría y se hace preguntas hasta que tenga respuestas; que interioriza los caminos de la sabiduría y reflexiona en sus secretos; que la persigue como el cazador, acecha sus pasos, atisba por sus ventanas y escucha a sus puertas; acampa junto a su casa y fija sus estacas junto a sus murallas.

Sirácides 14, 20-24

INDICE

- Abreviaturas	1
- Resumen	2
- Introducción	3
- Antecedentes	
o Respuesta inmunitaria mucosal	4
o Citocinas	8
Interleucina 2	10
Interleucina 4	12
Interleucina 10	13
o Citocinas en la mucosa intestinal	16
o Producción de citocinas en el intestino	17
o Respuesta inmunitaria mucosal hacia helmintos	18
Etiología y ciclo biológico de <i>T. spiralis</i>	19
Respuesta inmunitaria mucosal	19
Triquinosis	21
o Detección de citocinas	23
Hibridación <i>in situ</i> (ISH)	24
- Justificación	27
- Objetivos	27
- Hipótesis	27
- Diseño experimental	28
- Material	
A. Plásmidos	29
B. Cepas	30

- Diagrama de flujo	31
- Metodología	
A. Obtención de ribosondas	32
-Obtención de células para la extracción de RNA total	32
-Extracción de RNA total de células con Trizol	34
-Extracción de RNA total de tejido (intestino) con Trizol	34
-Transcripción reversa	35
-PCR	36
-Obtención del molde de DNA de la β -actina	38
Reacciones de linearización	38
-Obtención de las ribosondas: transcripción <i>in vitro</i>	39
-Detección de las ribosondas por Dot blot	41
B. Hibridación in situ (ISH)	43
-Obtención de las muestras	43
Células	43
Tejidos	43
-Pretratamientos de las muestras	44
-Prehibridación	44
-Hibridación	45
-Detección: método no isotópico	46
-Controles	46
- Resultados	
A. Diseño de las ribosondas	47
1. Diseño de los oligonucleótidos	47
2. Obtención de DNA molde	
a. Extracción de RNA	49
b. RT-PCR	50

c. Obtención de DNA molde para la β -actina	53
Subclonación del cDNA de la β -actina (pBAC)	55
Restricciones de p23.1 y pBAC	58
3. Obtención de las ribosomas: transcripción <i>in vitro</i>	61
B. ISH	65
- Figuras	68
- Análisis de Resultados	82
- Conclusiones	91
- Referencias	92
- Apéndice I	98
- Apéndice II	105

INDICE DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS

TABLAS

1. Reacciones de Transcripción reversa.
2. Continuación de la reacción de transcripción reversa.
3. Reacciones de PCR.
4. Reacciones de linearización.

CUADROS

1. Plásmidos empleados para la obtención de ribosomas.
2. Cepas de trabajo para la obtención de plásmidos.
3. Tamaños de los productos de PCR de las diferentes interleucinas.
4. Patrón de restricciones para el plásmido pBAC de 4958 pb.
5. Concentración de las ribosomas marcadas con DIG.
6. Secuencia de las ribosomas para el mRNA de las IL-2, IL-4 e IL-10.

FIGURAS

1. Organización de sistema inmunitario intestinal.
2. Secuencia completa del cDNA que codifica para la IL-2 porcina.
3. Secuencia completa del cDNA que codifica para la IL-4 porcina.
4. Secuencia completa del cDNA que codifica para la IL-10 porcina.
5. Obtención y cultivo de células mononucleares sanguíneas para la extracción de RNA total.
6. Electroforesis de RNA sobre geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.
7. Electroforesis de productos de RT-PCR en geles de agarosa (RNA de yeyuno de cerdo).
8. Electroforesis de DNA molde de la IL-2, IL-4 e IL-10 para la obtención de ribosomas en geles de agarosa..
9. Electroforesis de plásmidos de β -actina en gel de agarosa.
10. Electroforesis del DNA de la β -actina subclonado en pBS SK +/-.
11. Electroforesis en gel de agarosa de pBAC digerido con las enzimas KpnI, Xba I, Bam HI y AclI.

12. Electroforesis de los plásmidos de β -actina linearizados.
13. Dot blots para la cuantificación de la concentración de las ribosondas marcadas con DIG.
14. Hibridación *in situ* del mRNA de la β -actina en yeyuno de cerdo (200X).
15. Hibridación *in situ* en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 h con concanavalina A (400X).
16. Hibridación *in situ* del mRNA de la β -actina en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 h con concanavalina A (400X).
17. Hibridación *in situ* del mRNA de la IL-2 en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 h con concanavalina A (400X).
18. Hibridación *in situ* del mRNA de la IL-4 en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 h con concanavalina A (400X).
19. Hibridación *in situ* del mRNA de la IL-10 en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 h con concanavalina A (400 X).
20. Detección del mRNA de la IL-2 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200X).
21. Detección del mRNA de la IL-2 en criptas de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200 X).
22. Detección del mRNA de la IL-4 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200X).
23. Detección del mRNA de la IL-4 en criptas de yeyuno porcino por hibridación *in situ*.
24. Detección del mRNA de la IL-10 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200X).
25. Detección del mRNA de la IL-10 en criptas de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200X).
26. Detección del mRNA de la IL-10 en criptas de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (400X).
27. Detección del mRNA de la IL-10 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (400 X).

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
A	Adenina	LP	Lámina propia
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos	L.L.P	Linfocito de lámina propia
BCIP	5-bromo,4-cloro,3-indol fosfato	LM	Larva muscular
CC	Célula cebada	LPP	Linfocito de placa de Peyer
C	Citocina	LT	Linfocito T
°C	Grados centígrados	LRN	Larva recién nacida
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario	min	Minutos
Con A	Concanavalina A	mM	Milimolar
CPA	Célula presentadora de antígeno	MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CTL	Linfocito T citotóxico	M ϕ	Macrófagos
DEPC	Diethyl pirocarbonato	mRNA	Acido ribonucleico mensajero
DIG	Digoxigenina	mRRNAA	Más de un mRNA
DNA	Acido desoxirribonucleico	NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio
EOS	Eosinófilos	NK	Natural killer
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfato	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
FA	Fosfatasa alcalina	PLP	Periodato-Lúxina-Paraformaldehído
Fc γ	Fracción cristalizabile de IgE	PP	Placa de Peyer
G	Guanina	PPCCRR	Más de una reacción de PCR
GALT	Tejido linfóide asociado a intestino	RC	Citotoxicidad redirigida
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos	RNA	Acido ribonucleico
H&E	Tinción de Hematoxilina-Eosina	rNTP	Ribonucleótidos trifosfato
Ig	Inmunoglobulina	RT-PPCCRR	Más de una reacción de RT-PCR
IL-	Interleucina	SC	Citotoxicidad espontánea
ISH	Hibridación <i>in situ</i>	seg	Segundos
IFN- γ	Interferón gama	T	Timina
kDa	Kilodaltones	TCR	Receptor de célula T
KGF	Factor de crecimiento de keratinocitos	TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
LAK	Del inglés Lymphokines activated killer	Tm	Temperatura de disociación
LB	Linfocito B	TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
LIE	Linfocito intraepitelial	U	Uracilo

RESUMEN

El sistema inmunitario intestinal puede generar tolerancia contra la flora normal y los alimentos, lo que lo diferencia de la inmunidad sistémica que es esterilizante. Estas actividades pueden realizarse a través de perfiles específicos de citocinas en los tejidos que pueden ser de tipo TH1 (IL-2 e IFN- γ), TH2 (IL-4, IL-6 IL-9) y TH3 (IL-10 y TGF- β). En este trabajo se desarrolló una estrategia para detectar la expresión de mRNA de IL-2, IL-4 e IL-10 en yeyuno de cerdo. Se diseñaron sondas de RNA (ribosondas) con el fin de detectar los mensajeros de citocinas producidos intracelularmente por el sistema inmunitario, *in vitro*, por RT-PCR y en intestino por hibridación *in situ* (ISH). Se empleó al cerdo como un modelo experimental dada su cercanía filogenética al humano. Para la ISH se obtuvieron ribosondas para el mRNA de las IL-2, IL-4 e IL-10 marcadas con digoxigenina (Dig) por transcripción *in vitro*, partiendo de productos de PCR que contienen los promotores adecuados para la transcripción. Como control positivo de la técnica de ISH se diseñaron sondas para β -actina y como control positivo de expresión se emplearon linfocitos sanguíneos de cerdo cultivados con Concanavalina A. Se realizaron ISH sobre frotis y cortes de intestino fijados con PLP. En el intestino de cerdo se pudo comprobar la expresión cualitativa de IL-2 e IL-4 por RT-PCR. Se realizó ISH en intestino sin infección y se observó una baja expresión de las citocinas comparada con las sondas sentido correspondientes, por lo que fue necesario forzar al sistema.

Para ello se infectaron cerdos experimentalmente con *Trichinella spiralis*, un parásito helminto, donde se observó un incremento de la expresión de mRNA de las citocinas, comparadas con los tejidos sin infección. La técnica de ISH nos permitió detectar la diferencia en la expresión de dichas citocinas *in situ*. En este trabajo encontramos que la IL-10 es la citocina que más se expresa (cualitativamente) lo que llevó pensar que esta citocina es muy importante para el sistema inmunitario mucosal, además de que se observó que las células epiteliales de las vellosidades y de las criptas en el intestino, expresan mRNA de citocinas, abriendo la posibilidad de que estas células formen parte del sistema inmunitario, como células accesorias.

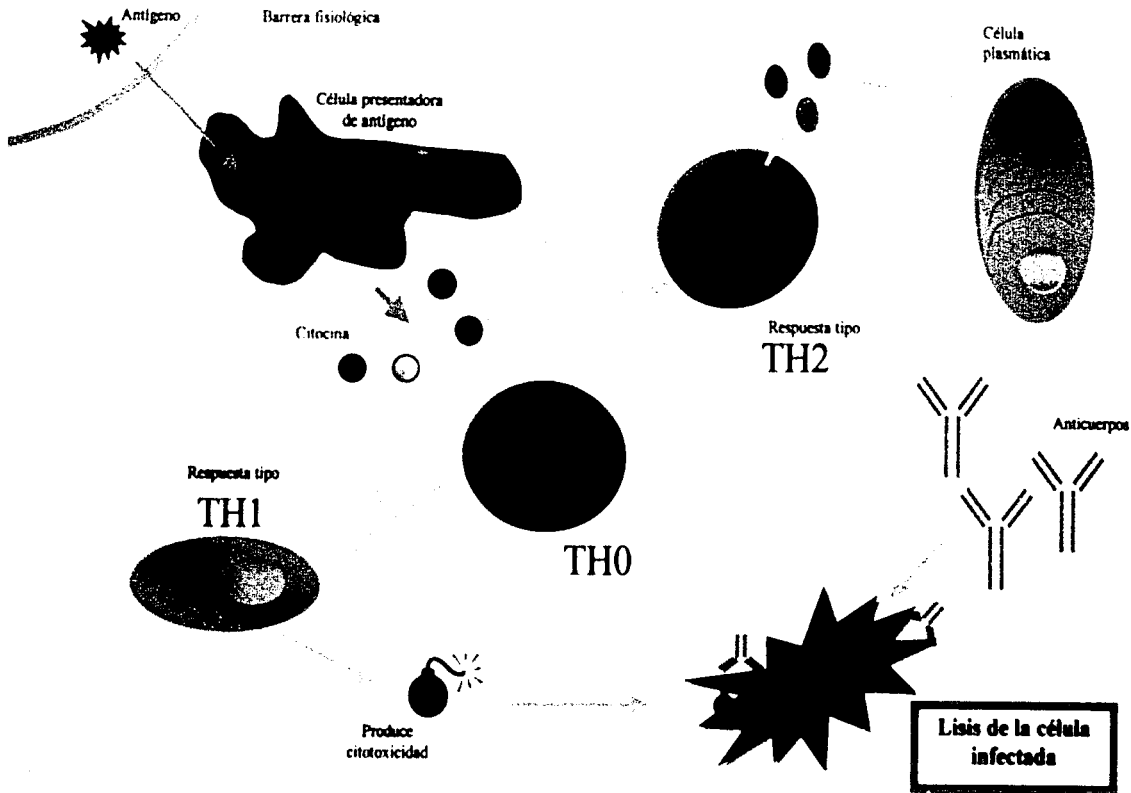
INTRODUCCIÓN

Las mucosas son las superficies de contacto con el medio ambiente más extensas del organismo (aproximadamente 400m²) por lo que también constituyen una excelente vía de entrada de los patógenos (Elson y Mestecky, 1995). La mucosa intestinal puede generar dos tipos de respuesta protectora cuando se expone a un antígeno, una respuesta inmunitaria contra flora normal y patógenos y otra de tolerancia a antígenos de la dieta. Para la inducción de estas respuestas inmunitarias se requiere del procesamiento y la presentación de los antígenos a los linfocitos T CD4+ por células presentadoras de antígeno (CPA) que expresen en su superficie moléculas de clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (Elson y Mestecky, 1995). De esa presentación de antígeno y de la producción de citocinas locales dependerá, en buena medida, la generación de tolerancia o de respuesta inmune.

El estudio de la interacción entre las células del sistema inmunológico y de los mecanismos de activación celular, la producción de mediadores solubles y la naturaleza de la relación que se establece con el antígeno, permitirá el mejor entendimiento de la regulación de la respuesta inmunitaria local (Vega, 1994) y con ello el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y cura de enfermedades a nivel de mucosas (intestinal, respiratoria, genito-urinaria y ocular).

El cerdo dada su similitud filogenética con el humano y su importancia económica, se usa como modelo para estudiar la regulación del sistema inmunológico intestinal. En este trabajo se diseñaron sondas de RNA (ribosondas) con el fin de detectar los RNA mensajeros de citocinas en yeyuno de cerdos por hibridación *in situ* (ISH). La estandarización de esta técnica permitió detectar la expresión de las interleucinas 2 (IL-2), IL-4 e IL-10.

La detección de citocinas en intestino permitirá entender mejor el perfil producido ante un estímulo antigénico e identificar el tipo de células que intervienen en la regulación de la respuesta local.



Sistema Inmune

ANTECEDENTES

Respuesta inmune mucosal

El organismo se enfrenta cotidianamente a patógenos como bacterias, virus, hongos y parásitos que pueden desencadenar enfermedad. Para protegerse de ellos, el cuerpo posee barreras efectivas, que pocos agentes infecciosos pueden penetrar intactos (Roitt, 1996). Generalmente, la vía de acceso de esos patógenos, es a través del epitelio mucosal del tracto respiratorio, urogenital y gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal ha sido considerado como el mayor órgano linfóide del organismo, el cual puede producir una respuesta inmunitaria específica contra patógenos y tiene la capacidad de generar tolerancia hacia los alimentos (Beagly y Husband, 1998). La respuesta del intestino a la invasión por patógenos, resulta de una interacción compleja entre mecanismos inespecíficos de defensa como pH, movimientos peristálticos, producción de moco, secreción de colinas e inflamación y eventos inmunológicamente específicos.

Las células epiteliales y los linfocitos intraepiteliales (IIE) son los componentes del sistema inmunitario intestinal con los que ocurre el primer contacto con los patógenos y los alimentos. Además, células epiteliales, macrófagos y monocitos, pueden proveer tempranamente de señales para inducir la respuesta inflamatoria aguda a través de la liberación de citocinas pro inflamatorias (IL-1 α , IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- α , MCP-1 y TNF- α); el tipo de respuesta de citocinas depende del sitio de infección y del patógeno que se presente (Chris, Seth y Gray, 1998).

Por otra parte, los linfocitos de la lámina propia (LLP), que en su mayoría tienen el fenotipo CD4+, son secretores de IL-4 e IL-5 principalmente, las cuales favorecen la producción de IgG y de IgA por las células plasmáticas. Además, los linfocitos de las placas de Peyer (LPP) son linfocitos inductores, principalmente del cambio de isotipo para la producción de IgA por las células plasmáticas (Mowat y Viney, 1997).

Las células cebadas y los eosinófilos contienen una gran cantidad de gránulos en su citoplasma y pueden inducir la eliminación de algunos parásitos intestinales (Grancis *et al.*, 1993; James, 1995). Se ha reportado que las células cebadas murinas producen una variedad de citocinas incluyendo: TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 e IL-13 (Eise y Finkelman, 1998).

En humanos se ha encontrado que las células cebadas de pulmón, expresan mRNA para IL-4, IL-5 y GM-CSF en una activación IgE dependiente (Lorentz, *et al.*, 2000). Por otra parte los basófilos expresan IL-4 e IL-5 principalmente, y están involucrados en mantener la respuesta TH2 en reacciones tardías (Brown y Hural, 1997).

El sistema inmunitario intestinal está organizado como se esquematiza en la figura 1. En el epitelio de las vellosidades, se encuentran los linfocitos intraepiteliales (LIE) cuyo fenotipo es principalmente CD2+CD8+ y CD2⁻ CD4⁻ CD8⁻ (dobles negativos) (Beagly y Husband, 1998). En la lámina propia, se encuentran localizados los linfocitos LLP CD4+, células MHC-II+, células dendríticas, macrófagos (M ϕ), eosinófilos (EOS), células cebadas (CC) y células plasmáticas (CP) secretoras de IgA.

En las placas de Peyer, denominadas sitios inductores de la respuesta inmunitaria mucosal, se distinguen las células M (CM) en su epitelio, linfocitos B (LB) en la zona folicular y una zona interfolicular de linfocitos T (LT) (James, 1995; Beagly y Husband 1998).

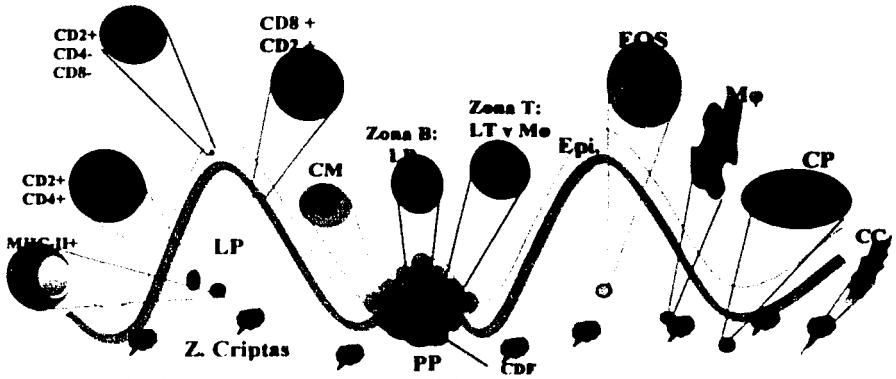


Figura 1. Organización del Sistema Inmunitario intestinal. Se esquematizan las vellosidades, la zona de criptas y las placas de Peyer (PP). Las vellosidades están divididas en lámina propia (LP) y epitelio (Epi). En la zona de las criptas se pueden encontrar células plasmáticas (CP), eosinófilos (EOS) células cebadas (CC) y macrófagos (Mφ). En la PP, se esquematizan las células M (CM) en el epitelio, una zona de LT donde se encuentran linfocitos T, Mφ y CPA, y una zona B donde se encuentran LB y células dendríticas foliculares (CDF) (Abreu Martin y Targan, 1996; James, 1995; Beagly y Husband 1998; Vega, 1994).

Los LIE son las primeras células del sistema inmunitario que tienen contacto con los patógenos y están localizados en el epitelio columnar de las vellosidades. En el ratón, las tinciones inmunohistoquímicas y el análisis por citometría de flujo muestran que la mayoría de los LIE son células CD3+ y TCR $\gamma\delta$ y tanto los linfocitos TCR $\alpha\beta$ como los $\gamma\delta$ juegan un papel importante en la actividad citotóxica *in vitro* así como en la defensa mucosal. Los linfocitos $\gamma\delta$ reconocen antígenos autólogos, expresados en células epiteliales como consecuencia de estrés o infección (Beagly y Husband, 1998).

Ullrich y colaboradores (1990), encontraron que en humanos las células T $\gamma\delta$ están localizadas preferentemente en el epitelio intestinal y son fenotípicamente diferentes a las células TCR $\alpha\beta$ las cuales constituyen la mayoría de los LLP y los LIE. La principal característica de los LIE son sus gránulos azurofilicos intracitoplasmáticos, similares a los de las células NK, que se tiñen con Giemsa en secciones de tejido. Se ha detectado la presencia de perforinas y granzimas en esos gránulos, pero no contienen histamina y no expresan receptor para Fc ϵ por lo que su relación con las células cebadas es controversial. Los LIE en ratas, pueden presentar actividad de célula NK, de linfocito T citotóxico (CTL) tanto MHC-II Ag específico, como CTL aloreactivo, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad redirigida (RC) y citotoxicidad espontánea (SC) (Beagly y Husband, 1998). Estas células representan una población de células linfoides íntimamente asociadas con las superficies epiteliales constituyendo la interfase entre el medio ambiente externo e interno (Mayrhofer y Whatey, 1983).

Por otro lado, los LLP son células que residen en la mucosa entre la membrana basal del epitelio y la *muscularis mucosae*. En cerdos, se ha encontrado que 90% de los LLP se encuentran en la zona de células MHC-II+, localizada dentro de la misma LP (Haverson, Stokes y Bailey, 1997) y del 65 al 80 % de los LLP CD3+ son CD4+.

También se ha encontrado que las células T CD4+ de cerdo se encuentran exclusivamente en el área de la lámina propia (Vega López *et al.*, 1993; Abreu-Martín y Targan, 1996).

Se ha demostrado que la mayoría de los LLP son de fenotipo de memoria (CD45RO) y de célula cooperadora/inductora (CD4+). De la subpoblación de LLP CD8+, la mitad expresan la molécula CD28, asociada con la función citotóxica. También se ha encontrado que un alto porcentaje de los LLP expresan el receptor para IL-2 durante su activación (Bailey *et al.*, 1998). Una de las funciones que se le atribuyen a los LLP es que proveen de ayuda para la síntesis de IgA e IgM. (Targan *et al.*, 1995). También, en la LP se localizan macrófagos y células dendríticas.

Toda esta red de células en la mucosa, está regulada por la producción y secreción de citocinas. Las citocinas son los mensajeros moleculares solubles del sistema inmunitario por medio de los cuales se induce y amplifica la respuesta de anticuerpos y la mediada por células (Husband *et al.*, 1999).

Citocinas

El sistema inmunitario mucosal en mamíferos consiste, además de tejido linfoide y células asociadas a las membranas mucosales, de moléculas efectoras para la protección del hospedero. Entre esas moléculas efectoras están las citocinas, las cuales regulan la respuesta inmunológica.

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas producidas por las células con un peso molecular menor a los 30 kDa. Generalmente ejercen una función parácrina o autocrina, se unen a sus receptores celulares con alta afinidad, tienen un radio de acción corto e inducen la alteración de los patrones de expresión de genes en las células blanco, modificando las funciones celulares al incrementar o disminuir la proliferación, la secreción de citocinas y de otras biomoléculas (Husband *et al.*, 1999). Los estímulos antigénicos que recibe el sistema inmunitario mucosal determinan el tipo de citocinas del microambiente mucosal. En forma general, el sistema inmunitario puede generar dos tipos de respuesta, la tipo TH1 que favorece la inmunidad celular y esta dada por la producción IL-2, IL-3, TNF- α , GM-CSF, INF- γ y linfoxina y la tipo TH2 que estimula la respuesta de anticuerpos e involucra la síntesis de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 IL-9 IL-10 y TNF- α (Mosmann y Moore, 1991). Las células TH1 son promotoras de la inmunidad celular, pero no cooperan con los linfocitos B (LB), mientras que las células TH2, cooperan con los LB para la secreción de anticuerpos.

Se ha encontrado que los LIE en estado de reposo producen IFN- γ e IL-5, sin embargo, después de su activación, la mayoría adoptan un perfil TH1, particularmente de tipo inflamatorio, secretando IL-1 α , IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO- α , MCP-1 y TNF- α (Beagly y Husband, 1998).

La activación de LIE intestinales por anticuerpos monoclonales (mAb) anti TCR induce la producción de IL-2, IL-3, IL-6, IFN- γ y TGF- β , pero no la de IL-4 o IL-5, pero cuando los LIE son estimulados con proteínas de choque térmico (HSP) de *Mycobacterium*, secretan IL-3, IL-6, GM-CSF e IFN- γ , pero no IL-2, IL-4, IL-5. De este modo la activación aparentemente es selectiva al estímulo (Beagly y Husband, 1998). Estos datos justifican el estudio del perfil de citocinas que se genera en el intestino en respuesta a una infección.

En forma particular, el microambiente intestinal está aparentemente orientado para la producción de citocinas de tipo TH2 (IL-4, IL-5, e IL-10) y tipo TH3 (TGF- β e IL-10). Se ha encontrado que las citocinas de tipo TH2 y TH3 son las encargadas de inducir el cambio de isotipo de células B para la producción de IgA (Iwasaki y Kelsall, 1999). En contraste con la respuesta TH1 y TH2, las células TH3 proporcionan ayuda para la producción de IgA y la secreción primaria de TGF- β . Las células TH3 aparentemente son diferentes a las TH2 ya que se ha demostrado la secreción de TGF- β por células CD4+ en ratones deficientes de IL-4 (Krause, Blank y Shoefeld, 2000).

Las células TH2, cooperan con los LB para la secreción de IgM, IgG, IgA e IgE a través de la IL-4, que permite la diferenciación de la célula precursora TH0 a TH2, bloqueando la diferenciación a células TH1 (Abehsira, *et al.*, 1992).

Para estudiar los perfiles mínimos de citocinas que se generan ante diferentes estímulos se ha propuesto a la IL-2 como citocina clave que caracteriza el perfil TH1, a la IL-4 para el TH2 y la IL-10 para el perfil TH3.

Interleucina 2

Esta citocina fue identificada por primera vez como factor de crecimiento de células T (Morgan *et al.*, 1976). Las células T son las que producen la mayor cantidad de IL-2, sin embargo, se ha reportado que las células NK, macrófagos y células B también la producen (Justement *et al.*, 1989).

La IL-2 está constituida por 133 aminoácidos (aa) con un peso molecular de la proteína nativa de 15400 daltones, además es susceptible a varias glicosilaciones sobre el residuo 3 de treonina, las que aparentemente no influyen en su actividad (Clemens, 1991).

El receptor de IL-2 (IL-2R) es un complejo de 3 proteínas, las cadenas IL-2 R α (Tac, p55), IL-2 R β (p70/75) e IL-2R γ (p64) (Sugamura *et al.*, 1996). Las tres cadenas pueden unirse individualmente a la IL-2 con diferentes afinidades; sin embargo, la unión de IL-2 es mejor cuando se une al heterotrímero $\alpha\beta\gamma$. La molécula IL-2R γ es también un componente de receptores de varias citocinas involucradas en la regulación de la hematopoyesis (IL-2, 7, 9, 13 y 15) (Husband *et al.*, 1999). La observación de que el IL-2R se expresa sobre células del linaje B y sobre células B activadas, sugiere que está citocina también puede estar involucrada en la regulación de la respuesta inmunitaria humoral (Clemens, 1991).

Los cDNA de la IL-2 de humano, murino, bovino, así como de porcino, ya han sido clonados, secuenciados y expresados.

Se ha encontrado que la IL-2 humana mantiene el crecimiento de células humanas, porcinas, murinas y ovinas, mientras que la IL-2 porcina actúa sobre células humanas, y la IL-2 ovina sólo mantiene el crecimiento de células ovinas y bovinas (Goodall, *et al.*, 1991).

Se ha encontrado que la secuencia de aminoácidos de la IL-2 porcina madura exhibe 72 % de homología con la IL-2 humana y ovina, y en la unión de la proteína con su receptor la IL-2 porcina muestra un alto grado de similitud con la humana y después con la bovina. (Goodall, *et al.*, 1991).

La secuencia del mRNA de la IL-2 de cerdo se muestra a continuación:

```

BASE COUNT      191 a    100 c    104 g    178 t
ORIGIN
  1 atgtataaga tgcagctctt gtgttgccatt gcaactaacc ttgcactcat ggcaaacggt
  61 gcactactt caagctctac aaagaacaca aagaacaac tggagccatt gctgctggat
 121 ttacagtgc  ttttgaagga agttaagaat tacgagaatg ctgatctctc caggatgctc
 181 acatttaast tttacatgcc caagcaggct acagattga aacctctca gtgttagta
 241 gaagaactca aagctctgga gggagtgcta aatttaggtc aaagcaaaaa cctcgactca
 301 gcaaatatca aggaatcaat gaacaatc acgcgaacag ttttggaaact aaagggatct
 361 gaaccaagtt tcaaatgtga atatgatgat gagacagtaa ctgctgttga atttctgaac
 421 aatggatta  ccttttgtca aagcatctac tcaacactga ctgataaatt aagtgcctct
 481 catgttaast gtatcaggct ttctatttat ttaaatattt aaattttata ttatttttt
 541 gatgcattgt gttctaactt ttgtaatact agt
//

```

Figura 2. Secuencia completa del cDNA que codifica para la IL-2 porcina. En letras negras se muestra la posición de cada uno de los oligonucleótidos empleados para el diseño de las ribosondas necesarias para la hibridación *in situ* (ISH). Esta secuencia fue tomada de la base de datos GenBank de PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov, Número de acceso: X56750)

Interleucina 4

Fue identificada por primera vez en 1982 como un factor que induce la proliferación y secreción de IgG1 en células B murinas (Paul, 1991). La IL-4 es producida por linfocitos TH2 (CD4+) y T CD8+, además de basófilos, células cebadas y células T NK 1.1+ (Husband *et al.*, 1999). La IL-4 de humano adulto contiene 129 aa (15000- 19000 daltones) con 2 posibles sitios de glicosilación (Clemens, 1991). El receptor de la IL-4 (IL-4R) es un complejo de alta afinidad. La IL-4 se une a la cadena α (p140, CD124) y a la cadena IL-2R γ . IL-4R se ha encontrado en bajos niveles de expresión sobre células T y B, monocitos, granulocitos, fibroblastos, y células epiteliales (Paul, 1991).

La IL-4 incrementa la replicación de DNA de células B preactivadas con anti-IgM, además de que aumenta la producción de IgE por células estimuladas con anti-CD40. La IL-4 junto con la IL-2 y 5 o IFN- γ incrementan la secreción de IgA (Husband *et al.*, 1999).

Por otra parte, se han realizado comparaciones entre las secuencias de aminoácidos de la IL-4 humana, porcina, bovina y murina y se ha encontrado que la mayoría de las especies difieren entre los residuos de aminoácidos del 60 al 81, respecto a la secuencia de la proteína humana. Así mismo, los 6 residuos de cisteína, involucrados en los puentes disulfuro en el humano, están conservados en la IL-4 de cerdo (Bailey *et al.*, 1993).

La secuencia del mRNA de la IL-4 de cerdo se muestra a continuación:

BASE COUNT	148 a	119 c	103 g	120 t			
ORIGIN	1	tcagtqcaaa	tagagctcta	ttcatgggtc	tcacctcccc	actgatccca	accctggctc
	61	gcttactggc	atgtaccagc	aacttcgtcc	acggacacaa	gtgcgacatg	acottacaag
	121	agtcctcaa	aa ctttgaac	attctcacag	cgagaagaa	ctcgtgcattg	gaqctgcccg
	181	tgacggacgt	ctttgctgcc	ccagagaaca	cgacggagaa	gaaaccctc	tgccgggctc
	241	cgactgtgct	tcggcaca ta	tcacagac cc	acacgtgcat	gaagagcctc	ctgagcggac
	301	ttgacaggaa	cctgagcagc	atggcaaac	tgacctgttc	tgtgcatgaa	gccaaqaaga
	361	gcactttgaa	agactttctg	gaaaggttaa	agacgattat	gaaggagaa	tactcaaaqt
	421	gttgangctg	actattttta	atttatgatt	ttatacact	tattttaaaa	atatttatat
	481	atttataact					

Figura 3. Secuencia completa del cDNA que codifica para la IL-4 porcina. En letras negritas se muestra la posición de cada uno de los oligonucleótidos empleados para el diseño de las ribosondas necesarias para la hibridación *in situ* (ISH). Esta secuencia fue tomada de la base de datos GenBank de PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov; Número de acceso: X68330)

Interleucina 10

La interleucina 10 fue descrita desde 1989 como un factor producido por células TH2 murinas, que inhibe la secreción de citocinas de perfil TH1 y fue nombrada como factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF). Esta interleucina es también producida por células T, células B1, células cebadas, macrófagos y queratinocitos humanos (Husband *et al.*, 1999). La IL-10 de cerdo, como proteína madura, pesa 18 kDa y consta de 175 aa (Blanco *et al.*, 1995). Hasta ahora se ha identificado el receptor de la IL-10 en humanos (hIL-10R) que tienen un peso de 120 a 140 kDa.

De la secuencia de aminoácidos (578 aa) se ha determinado un peso aproximado de 61 kDa, por lo que se puede pensar que la proteína esta glicosilada.

También se ha identificado el receptor de IL-10 de ratones (mIL-10R) el cual posee un tamaño muy semejante al hIL-10R. Este receptor posee una estructura muy similar a un grupo de receptores llamado CR II al cual pertenece el receptor de IFN- γ (Liu, *et al.*, 1994).

Entre las funciones que se le atribuyen a la IL-10, está la de inhibir una variedad de funciones de macrófagos incluyendo la inhibición de la activación por LPS, inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) y de la función de CPA para células TH1 (Moore, 1993). Al mismo tiempo, la IL-10 incrementa la proliferación de células B humanas, la secreción de anticuerpos, aumenta la proliferación de células cebadas y la expresión de proteasas (Husband *et al.*, 1999).

La estimulación de células B humanas, particularmente células de memoria con anti-CD40 más IL-10, produce la secreción de una gran cantidad de IgM, IgA e IgG (Briere *et al.*, 1994; Rousset, García y Banchereau 1991). La IL-10 también inhibe la secreción de citocinas, particularmente de IFN- γ , por células TH1, células CD8+ y células NK. Este efecto requiere la presencia de macrófagos como CPA. Además, esta citocina está involucrada en el fenómeno de tolerancia oral (Weinstock 1999).

Se ha demostrado que hay 82 % de homología en la secuencia de nucleótidos entre la IL-10 de cerdo y la humana y 74 % de homología en la secuencia de aminoácidos entre estas especies. La homología a nivel de nucleótidos entre el cerdo y el ratón es de 75 % y de 68 % a nivel de secuencia de aminoácidos (Blanco, *et al.*, 1995).

La secuencia del mRNA de la IL-10 se muestra en a continuación:

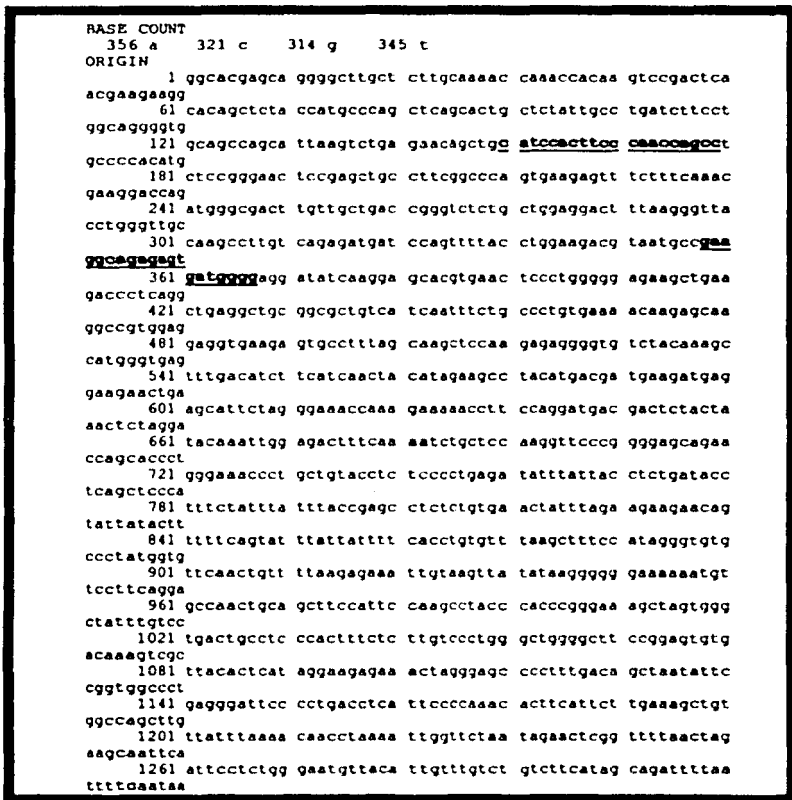


Figura 4. Secuencia completa del cDNA que codifica para la IL-10 porcina. En letras negras se muestra la posición de cada uno de los oligonucleótidos empleados para el diseño de las ribonucleas necesarias para la hibridación *in situ* (ISH). Esta secuencia fue tomada de la base de datos GenBank de PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov Número de acceso: L20001).

En forma general, los genes de las citocinas están localizados en el cromosoma 5 en humanos y en el cromosoma 11 en ratones (Clemens, 1991)

Citocinas en la mucosa intestinal

La mucosa intestinal es extremadamente extensa en los mamíferos y consiste en una red integrada por tejidos linfoides, células epiteliales mucosales y moléculas efectoras para la protección del organismo. Entre estas moléculas están las citocinas y sus receptores, que son reguladoras de la respuesta inmunitaria. Es importante mencionar que los LT CD4+, aislados de tejidos linfoides mucosales, se encuentran fuertemente inclinados hacia la respuesta TH2 (Husband *et al.*, 1999).

Generalmente se ha reportado que los LIE producen IFN- γ e IL-5 *in vitro* y tienen una relativamente alta producción de IFN- γ , IL-1 y TNF- α *in situ*, además de factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y una citocina epiteliotrófica, por lo que posiblemente otra función de los LIE *in vivo* es la de promover el crecimiento y renovación de las células epiteliales a través de la producción de mediadores solubles (Mowat y Viney, 1997).

En la LP los linfocitos secretan IL-1 (Kenneth *et al.*, 1993) que es una citocina con múltiples actividades biológicas como la de favorecer la producción de proteínas de fase aguda y ser un pirógeno endógeno. Se producen IL-1 α e IL-1 β cuyas funciones son muy semejantes y dependen del microambiente.

Se ha encontrado que la IL-1 induce la secreción de IL-6, IL-8 por LIE e incrementa la producción de mRNA para TGF- β (Kenneth *et al.*, 1993; McGee, Vitkus y Lee 1996; Beagly y Husband, 1998). En cerdos, los LLP secretan grandes cantidades de citocinas efectoras como IFN- γ e IL4 en presencia de IL-2 e IL-5 (Bailey *et al.*, 1998). De éstas, la IL-4 es la citocina más secretada por LLP y células cebadas. La IL-4 puede ser inhibitoria de la expresión de receptor de IL-2 en LT murinos y de la producción de IL-2 por LT en humanos. Esta interleucina inhibe el desarrollo de células LAK (LT asesinos

activados por linfocinas) (Ebert y Roberts, 1996). Las citocinas secretadas por los LLP CD4+ estimulan la secreción de grandes cantidades de IgA al regular la diferenciación de LB (Mowat y Viney, 1997).

Se ha encontrado que las células epiteliales del intestino grueso, macrófagos y linfocitos TH2 en humanos expresan mRNA y la proteína de IL-10. La IL-10 inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias, de hecho inhibe la producción de citocinas TH1 (IFN- γ , IL-2), mientras que el perfil TH2 dado por la IL-4 e IL-5 se ve poco afectado (Autschbach *et al.*, 1998). También se ha visto que la IL-10 se une a un receptor específico sobre las células epiteliales intestinales y puede regular su contribución en la inflamación y en la respuesta inmunitaria en el intestino (Denning *et al.*, 2000). La IL-10 también está involucrada en el mecanismo de tolerancia contra antígenos propios o de la dieta, a través de la generación de una subpoblación de linfocitos T CD4 + , designados como células T reguladoras (Tr1) (Asseman y Powrie, 1998).

Producción de citocinas en el intestino

La inflamación en la mucosa intestinal, por agentes irritantes o por patógenos intestinales, se ve acompañada por la secreción de citocinas como la IL-1, IL-5, IL-6 y TNF- α , principalmente. La IL-6 está involucrada en respuestas inflamatorias incluyendo la inducción de proteínas de fase aguda, diferenciación de macrófagos y proliferación de LT, de hecho la IL-6 con la IL-5 induce la producción de altos niveles de IgA por los LB maduros de las placas de Peyer (Mc Gee, *et al.*, 1993).

La IL-1 es una citocina que induce la secreción de IL-6 por muchos tipos de células. La mucosa intestinal de conejos infectados con *E. coli* enteropatogénica ha mostrado un incremento en los niveles de IL-1 (Rachmilewitz, *et al.*, 1988).

Estudios realizados por hibridación *in situ* han demostrado que las primeras células que producen mRNA de IL-1 β después del daño producido en la mucosa son las células epiteliales de las criptas (Radema, Van Deventer y Corami, 1991).

Otra citocina involucrada es TGF- β , la cual se le ha propuesto el papel de inducir el cambio de isotipo de IgM a IgA. Trabajos realizados por hibridación *in situ* han mostrado que el número de células que expresan el mRNA de TGF- β se incrementa tanto en LP y epitelio de ratones infectados con *T. spiralis* y en pacientes con gastritis (McGee *et al.*, 1993).

Las células cebadas son células relacionadas con infecciones intestinales, principalmente por parásitos, además de que son células efectoras importantes en las reacciones alérgicas de tipo inmediato, actuando mediante la liberación de mediadores preformados como histamina, proteasas, leucotrienos, prostaglandinas y citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 y TNF- α (Lorentz *et al.*, 2000).

En el caso muy particular de procesos inflamatorios en humanos se ha encontrado la secreción de citocinas por los LLP en la enfermedad de Crohn y en la colitis, donde se ha visto un incremento en la producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α (Abreu-Martin y Targan, 1996).

Respuesta inmunitaria mucosal hacia helmintos

Toda esta red de moléculas efectoras, se puede ver modificada cuando el tejido se enfrenta a una infección. En las infecciones intestinales por parásitos, el parásito genera una relación íntima con las defensas mucosales del hospedero para poder establecerse en la mucosa, siendo importante el perfil de citocinas generado. Entre las infecciones intestinales parasitarias más concurrentes en humanos, se encuentran las infecciones por protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Gardia lamblia*, nemátodos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis* y cestodos como *Taenia saginata* (Weinstock, 1999).

Los estudios de citocinas en la mucosa intestinal son importantes para identificar las células que las producen y también para evaluar los cambios que ocurren durante las infecciones. Como ejemplo de estas infecciones, están las causadas *Trichinella spiralis*, que infecta al humano a través de la vía enteral, se localiza durante 2-3 semanas en el intestino delgado y, posteriormente, en forma enquistada en las masas musculares.

Etiología y ciclo biológico de *Trichinella spiralis*

Las larvas musculares de *Trichinella spiralis* (fase infectiva) ingeridas con la carne infectada (generalmente carne de cerdo mal cocida) se liberan con la digestión gástrica. Casi en forma inmediata migran hacia el duodeno y penetran el epitelio de la mucosa. En tres días sufren cuatro cambios o mudas conforme crecen y maduran. Las hembras grávidas liberan larvas recién nacidas que atraviesan la mucosa, pasan al sistema linfático y de ahí al torrente circulatorio para finalmente penetrar las fibras del músculo estriado en donde se enrollan y enquistan, transformando cada célula muscular invadida en una célula nodriza. Las larvas infecciosas dentro de los quistes sobreviven por meses y años, hasta que finalmente son destruidas por el proceso granulomatoso, dejando una cicatriz fibrótica, donde se ven involucradas células cebadas, basófilos y eosinófilos (Finkelman *et al.*, 1991).

Respuesta inmunitaria mucosal

La invasión y migración dentro de la monocapa epitelial por las larvas infectivas (blanco de la respuesta inmune), produce daños significativos en las membranas celulares y organelos, lo que incrementa la transcripción de mRNA para IL-1 β , IL-8 y ENA-78, por células mononucleares como los macrófagos (Grencis, *et al.*, 1993; Venturiello, Grambartolemei y Constantino, 1995; Chris, Seth y Gray 1998).

Por otra parte, *in vitro*, eosinófilos, neutrófilos y fagocitos mononucleares pueden actuar como células efectoras en la destrucción de larvas de helmintos por mecanismos dependientes de anticuerpos específicos y/o del complemento. La activación de eosinófilos lleva consigo la expresión de receptores para IgE, IgG y de complemento, se incrementa la síntesis y secreción de enzimas y gránulos proteicos, jugando así un papel importante en la protección contra el parásito. La eosinofilia, observada durante una infección intestinal por nemátodos, va acompañada del incremento de los niveles de IL-5. Sin embargo, la función *in vivo* de los eosinófilos es aún desconocida (Venturiello, Grambartolemei y Constantino 1995).

Las infecciones con helmintos intestinales en roedores, están asociadas con la generación de hiperplasia de células cebadas en el intestino (mastocitosis intestinal), posiblemente bajo el control de IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 (Finkelman *et al.*, 1991), además de que se acompaña de la elevación del número de eosinófilos, e incremento de IgE. Por otro lado, la IL-13 ha mostrado ser importante en la resistencia contra *T. muris* (Else y Finkelman, 1998).

La IL-4 induce la expresión de moléculas de superficie como MHC-II y CD23 que es un receptor de baja afinidad para la Fc ϵ (McGee, Vitkus y Lee, 1996; Brown y Hural, 1997). Además se ha encontrado en ratones que la IL-4 aparentemente es importante en el desarrollo de resistencia primaria a infecciones con *T. spiralis*. Esta interleucina es la más secretada por LLP de humanos (Grencis, Hultner y Else, 1991).

La IL-4 es una molécula que amplifica la respuesta TH2 en infecciones por helmintos y una de las funciones que se le atribuye es inducir la expresión de IgE por LB. En ratones infectados con *T. spiralis* provoca una severa respuesta inflamatoria en el intestino delgado, donde las células cebadas representan el mayor componente. Se piensa que la unión de IgE a receptores de alta afinidad (Fc ϵ RI) presentes en mastocitos intestinales activa estas células (Iwasaki y Kelsall 1999).

El papel de otras citocinas tipo TH2, como la IL-9, en la resistencia a infecciones con *T. muris* y *T. spiralis* es evidente, ya que esta citocina se produce en altas concentraciones en cepas resistentes de ratones. En el caso de *T. spiralis*, se ha encontrado que la IL-9 probablemente incrementa la respuesta TH2 y específicamente en la mastocitosis generando así la secreción de proteasas por células cebadas mucosales en el intestino y suero, facilitando la expulsión de *T. spiralis* del intestino de ratas (Eise y Finkelman 1998).

El microambiente dado por las citocinas y la presentación de antígenos en la mucosa durante una infección promueven la diferenciación de las respuestas TH1 y TH2. La IL-12 promueve el desarrollo de la respuesta TH1 y la IL-4 la de la respuesta TH2.

Las células dendríticas y los macrófagos son las células que más producen IL-12, mientras que no se ha definido con exactitud las células que son capaces de producir IL-4 tempranamente, aunque las células NK 1.1 CD4+ $\gamma\delta$ son candidatas para esa producción. Además, estas células aceptan la presentación de antígeno vía moléculas CD1 y no moléculas MHC convencionales. Las moléculas CD1 se expresan en una alta proporción en las células del epitelio intestinal siendo candidatas como CPA de parásitos intestinales (Grencis *et al.*, 1993).

Triquinelosis

La triquinelosis es una de las zoonosis cosmopolita más peligrosa para la especie humana causada por el nematodo *Trichinella spiralis*. En México se ignora su frecuencia a pesar de los numerosos brotes epidémicos que se han presentado. La parasitosis tiene como huéspedes habituales a los cerdos. La infección, que en éstos produce, es de carácter primario, alcanzando al ser humano en forma secundaria. A menudo, la sintomatología suele confundirse con avitaminosis, carencias minerales, Peste Porcina Clásica, como así también algunas lesiones nerviosas.

Con relación a la característica de la patología y clínica humanas, puede encuadrarse a ésta como una parasitosis evidenciada por fiebre, trastornos intestinales, algias musculares, edemas periorbitales y un cuadro hemático típico de hiperesoinofilia.

Trastornos cardíacos y neurotóxicos pueden acompañar a la sintomatología mencionada, dándole a la misma un carácter de grave. Sin embargo, puede que estos síntomas no tengan manifestación aparente o bien, se hallen minimizados.

Se puede decir, que es una helmintiasis *sui generis*, que presenta profundas diferencias con casi todas las parasitosis conocidas. No tiene vectores de ninguna especie, desarrollándose totalmente dentro del mismo hospedador (Martínez I, *et al.*., 2000).

La triquinosis en el hombre

Al igual que el cerdo y otros animales, el ser humano adquiere la Triquinosis por consumir carne de cerdo parasitada, insuficientemente cocinada o cruda, como los chacinados (estén salados o ahumados). Dependerá de la cantidad de larvas ingeridas, que se manifieste o no en forma clínica (con sintomatología). Para que un ser humano presente síntomas, debe ingerir no menos de 70 larvas. Desde la ingestión del alimento parasitado, hasta la aparición de los primeros síntomas, transcurren como término medio diez (10) días. El curso, irregular de esta parasitosis, presenta una característica única para este tipo de afecciones y es la fiebre, poca o muy marcada, remitente y que puede llegar hasta los 41°C. En general, este curso puede dividirse en tres fases:

Fase intestinal.

Liberación de las larvas contenidas en la carne parasitada ingerida, crecimiento, transformación en adultos, cópula y larviposición. Se caracteriza por presentar pérdida de apetito, vómitos, dolor abdominal y diarrea. Se lo suele llamar tifoideo o coleriforme e induce a confusión con toxinas alimenticias o infecciones microbianas.

Fase de migración larvaria.

Distribución de las larvas por la sangre e invasión de los músculos estriados. Aparece el síntoma que más contribuye al diagnóstico que es el edema (hinchazón) palpebral, dolores musculares, dolor de cabeza y fiebre. Hay alguna sintomatología respiratoria, neurológica y fenómenos de alergia. Se le puede denominar fase reumatoidea.

Fase de recuperación.

Cuando la infestación es moderada, la enfermedad suele durar unos 10 días, en tanto que en las más severas puede prolongarse un (1) mes o más. Se produce el enquistamiento de las larvas en los músculos, con desarrollo de fenómenos tóxicos o de hipersensibilidad. Pueden persistir los dolores musculares por varios meses (Martínez I, *et al.*, 2000).

Detección de citocinas

La detección de citocinas se realiza principalmente revelando la presencia de la proteína por ensayos de ELISA e inmunohistoquímica, pero también es posible evidenciar al mRNA de la citocina a través de RT-PCR e hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* es una herramienta que permite detectar la expresión y la localización de mRNA en el tejido, en células cultivadas e inclusive la expresión de genes en los cromosomas. En el caso particular del modelo porcino las técnicas de biología molecular, como la hibridación *in situ*, representan una alternativa para la detección de citocinas, dado que se conocen las secuencias de los mRNA de la mayoría de las interleucinas de cerdo (Goodall *et al.*, 1991; Bailey *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1995). Los modelos animales son instrumentos importantes para el desarrollo de conocimientos prospectivos al humano. Por su similitud a la fisiología y patofisiología al humano, el cerdo se ha convertido en un modelo popular para el estudio de enfermedades cardiovasculares e intestinales (Urs, 1995).

Hibridación *in situ* (ISH)

La hibridación es una técnica inmunohistoquímica de localización del mRNA y DNA específico en tejidos, células o cromosomas (hibridación *in situ*) (Gall y Pardue, 1969). Esta técnica está basada en la formación de secuencias complementarias de ácidos nucleicos de cadena sencilla (monocatenarios) que, bajo condiciones apropiadas, dan lugar a la formación de un híbrido (bicatenario). Para ello es importante determinar la concentración adecuada de los reactivos, la temperatura de disociación o de fusión de los ácidos nucleicos llamada también, temperatura de desnaturalización (T_m) y la fuerza iónica, ya que bajo condiciones poco vigorosas de una fuerza iónica $< 0.3 M$ y una temperatura baja, se forman híbridos inestables de baja complementariedad y por lo tanto inespecíficos; por el contrario, en condiciones de fuerza iónica vigorosa ($> 0.4 M$) y a la temperatura adecuada, se formarán híbridos estables con 100 % de complementariedad, es decir, específicos (Beesely, 1993).

El cálculo de la T_m adecuada para un proceso de hibridación *in situ* se realiza mediante la siguiente fórmula (Herrington y McGee, 1992):

$$T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \log M + 0.41 (\%G+\%C) - 500/n - 0.61 \% \text{ formamida.}$$

Donde M = fuerza iónica y n = longitud de la sonda

Es indispensable tomar en cuenta la presencia de formamida en la mezcla de los reactivos, ya que ayuda a disminuir la T_m hasta $30 \text{ } ^\circ\text{C}$, evitando así la destrucción de los tejidos, las células y la desnaturalización de las proteínas de interés (Herrington y McGee, 1992). Por otro lado, se considera que los cortes histológicos incluidos en parafina, después de la fijación con paraformaldehído, permiten una excelente preservación del mRNA celular para la hibridación, además de que se conserva la morfología del tejido.

Esta técnica depende de la hibridación de un ácido nucleico marcado (sonda) con el ácido nucleico blanco. En la literatura revisada (Tornier *et al.*, 1987; Komminoth *et al.*, 1992; Wilcox, 1993; Birk y Grimm, 1994; Speel *et al.*, 1994; Bienz y Egger, 1995; Dijkman *et al.*, 1995; Schad *et al.*, 1996) se encontró que casi el 90 % de las ISH realizadas emplean sondas de RNA denominadas ribosondas, más que oligonucleótidos y cDNA. Esto se debe a que las ribosondas han demostrado ser más sensibles para detectar la mínima expresión de mRNA en secciones de tejido (Wilcox, 1993). En el caso de la búsqueda de genes escasos, se recomienda que estas ribosondas sean de un tamaño menor a 300 pb, ya que son más específicas que las sondas de mayor tamaño; en el caso de genes constitutivos como la β -actina no importa el tamaño de la sonda (Herrington y McGee, 1992; Komminoth *et al.*, 1992). Las ribosondas se unen con los mRNA de interés formando híbridos de RNA:RNA más estables, para esto, las ribosondas se generan a través de la clonación del gen de interés en un plásmido, con los promotores adecuados (T3, T7, SP6, etcétera) para llevar a cabo la transcripción *in vitro* y obtener así las ribosondas (Birk y Grim, 1994).

La transcripción *in vitro* es una técnica que permite obtener RNA a partir de DNA. Esta transcripción es semejante a la transcripción celular (excepto por los requerimientos de factores de transcripción). Se necesita de un DNA molde, en el cual se encuentra la región promotora donde se ancla la RNA polimerasa y así iniciar la reacción de transcribir el DNA en RNA. Estas enzimas necesitan de Mg^{2+} , de ribonucleótidos (rATP, rGTP, rCTP, rUTP) y una temperatura óptima que generalmente es 37 °C para realizar su función adecuadamente. Existen diferentes tipos de RNA polimerasas, dependiendo del sistema con el que se trabaje, ya que las polimerasas de los eucariotes son diferentes a las de los procariotes. La diferencia entre ellas es en cuanto a la necesidad de factores que faciliten el reconocimiento de las secuencias promotoras en el DNA para iniciar el proceso. En células procariotas se manejan las enzimas SP6 RNA polimerasa, T7 RNA polimerasa y T3 RNA polimerasa principalmente.

Respecto al método de detección existen métodos isotópicos (^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S) y no isotópicos (biotina, fosfatasa alcalina, digoxigenina, fluorescencia) para marcar las sondas. Las ribosondas marcadas con ^{35}S representan el método más sensible para la detección de mRNA en secciones de tejido (Komminoth *et al.*, 1992). Los radioisótopos tienen una vida media corta, y es peligrosa la exposición y manejo de los mismos. Los tiempos de exposición para el desarrollo de la señal pueden ser hasta de semanas, retardando así el trabajo además de que su costo es elevado.

Por todas estas limitaciones se han desarrollado métodos no isotópicos que no son peligrosos de manejar, pueden ser almacenados por períodos prolongados y pueden ser detectados por inmunohistoquímica con una sensibilidad equivalente a la de los isotópicos (Komminoth *et al.*, 1992; Karr *et al.*, 1995).

Por otra parte existen reportes de la aplicación simultánea de inmunohistoquímica e ISH lo que permite detectar la expresión de mRNA de interés así como los fenotipos de las células que los producen (Speel *et al.*, 1994; Lachumanan *et al.*, 1999).

La detección de la expresión de mRNA, es una herramienta útil que nos permite conocer el tipo de citocinas que se presentan en el microambiente de tejidos y al mismo tiempo identificar los tipos de células que las están expresando. La expresión de mRNA es un indicativo de la activación celular ya que al existir un estímulo, se inicia una cascada de transducción de señales que culmina con la expresión de mRNA y su posterior traducción para la síntesis de proteínas. Sin embargo es importante mencionar que no todo el mRNA que se expresa se traduce en proteína, de ahí la importancia de detectar la activación celular desde la expresión de mRNA de citocinas para posteriormente determinar el tipo de respuesta inmunitaria que se genera ante diferentes estímulos. Generalmente se ha detectado la expresión de mRNA de citocinas mucosales por RT-PCR en ratones y cerdos y en menor grado por hibridación *in situ* (ISH) en biopsias de humanos con colitis (Autschbach *et al.*, 1998). Sin embargo, dada la variabilidad biológica entre cada especie es importante desarrollar la ISH para la detección de citocinas en el intestino de cerdo como modelo de estudio del sistema inmunitario mucosal.

JUSTIFICACIÓN

Para entender mejor la regulación del sistema inmunitario intestinal, capaz de inducir tolerancia a los alimentos y la respuesta inmunológica contra los patógenos, se requiere estudiar el perfil de citocinas que predomina en el microambiente del tejido y caracterizar las células que lo producen, tanto en condiciones normales como de infección. En el humano los estudios en mucosas están limitados por razones éticas, por lo que el uso de animales de experimentación está indicado.

Una manera de conocer el tipo de citocinas que se genera en el microambiente intestinal, es a través de la detección de su expresión génica en el tejido por hibridación *in situ*.

OBJETIVOS

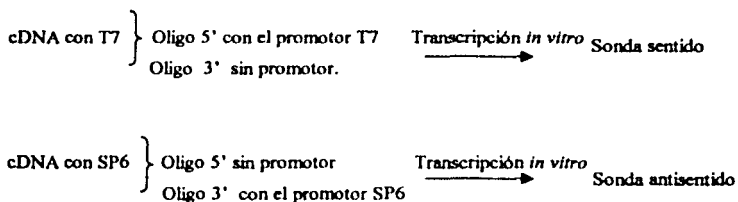
- Diseñar y producir ribosondas marcadas para la detección de mRNA de las citocinas IL-2, 4 y 10 porcinas para emplearlas en la técnica de hibridación *in situ*.
- Estandarizar la técnica de hibridación *in situ* para la detección de mRNA de IL-2, 4 y 10 en intestino de cerdo.
- Evaluar la utilidad de la técnica en el análisis de la producción de mRNA en intestino normal e infectado.

HIPÓTESIS

La mucosa intestinal está sujeta a múltiples desafíos antigénicos, por lo que la regulación de su respuesta inmunitaria se establece a través de interacciones celulares que involucran citocinas. La expresión constitutiva y ante infecciones de las citocinas puede ser determinada en el cerdo usando ribosondas específicas mediante la técnica de hibridación *in situ*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La obtención de las ribosondas se realizó partiendo de cDNA (de plásmido o de producto de transcripción reversa) para emplearlo en reacciones de PCR y obtener el DNA molde necesario para las reacciones de transcripción *in vitro*; la estrategia fue la siguiente:



La estandarización de la ISH se realizó tomando como control positivo de la técnica al gen de la β -actina que es una proteína constitutiva del citoesqueleto de las células eucariotas. Otro control empleado fueron células mononucleares de sangre periférica de cerdo activadas con Concanavalina A para inducir la expresión de las citocinas que se querían estudiar y tomar estas células como un control positivo de expresión. El control negativo de la técnica fue la utilización de la sonda sentido que posee la misma secuencia que el mRNA por lo que idealmente no debe hibridar y por lo tanto no debe verse señal, lo que asegura que una señal positiva con la sonda antisentido es indicativa de un resultado positivo específico para cada citocina.

Se utilizaron muestras de yeyuno de cerdos sanos de 8 semanas de edad y 2 semanas postdestete, fijadas con una solución de para-formaldehído-lisina-periodato (PLP) e incluidas en parafina.

MATERIAL

Plásmidos

Para la obtención del DNA necesario para la producción de ribosondas de IL-2, IL-4 y β -actina, se partió de plásmidos que contenían el cDNA que codifica para cada uno de estos genes. Las características de estos plásmidos se muestran en la cuadro 1.

Cuadro 1. Plásmidos empleados para la obtención de ribosondas.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS
pBluescript SK +/- (pBS)	Es un fagémido de 2958 pb. En el poli linker posee los promotores de transcripción T3 y T7 para procariontes. Posee resistencia a ampicilina (Stratagene).
pUC19-2**	Contiene la secuencia del cDNA que codifica para la IL-2 (573pb) de cerdo, con un peso total de 3259 pb. Posee el gen de resistencia a ampicilina.
pUC19-4**	Contiene la secuencia del cDNA que codifica para la IL-4 (490pb) de cerdo, con un peso total de 3176 pb. Posee el gen de resistencia a ampicilina.
p23.1***	Contiene la secuencia del cDNA (2.0 kb) de la β -actina de fibroblastos de humano clonada en la posición Bam HI dentro del vector pGEM-4Z (Promega Cat. P2151). Posee del gen de resistencia a ampicilina. El peso total del plásmido es de 4743pb. En el poli linker se encuentran las secuencias de los promotores de transcripción SP6 y T7 para procariontes.
PBAC	Posee el cDNA (2.0 kb) de la β -actina de fibroblastos de humano, clonado en el sitio Bam HI dentro del vector pBS SK +/- . El peso total del plásmido es de 4958 pb. Posee resistencia a ampicilina. Este plásmido fue parte del trabajo realizado en esta tesis (Ver apéndice II).

- Plásmido donado por la M en C. Elba Carrillo del Departamento de Genética y Biología Molecular de CINVESTAV-IPN.
- ** Plásmidos donados por el Ph D. Michael Bailey de la Universidad de Bristol, Inglaterra.
- *** Plásmido donado por el Dr. Efraín Garrido del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN!

Cepas.

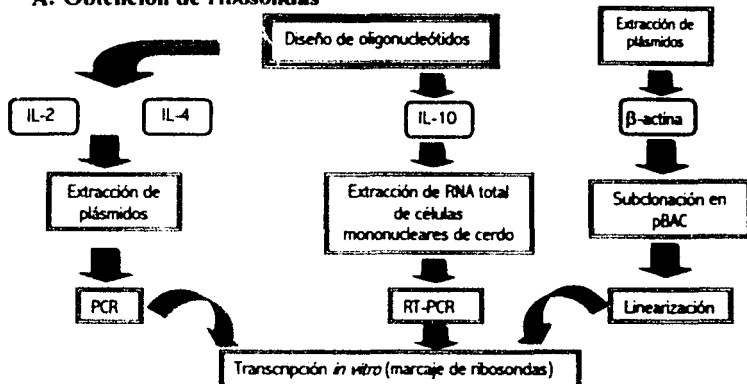
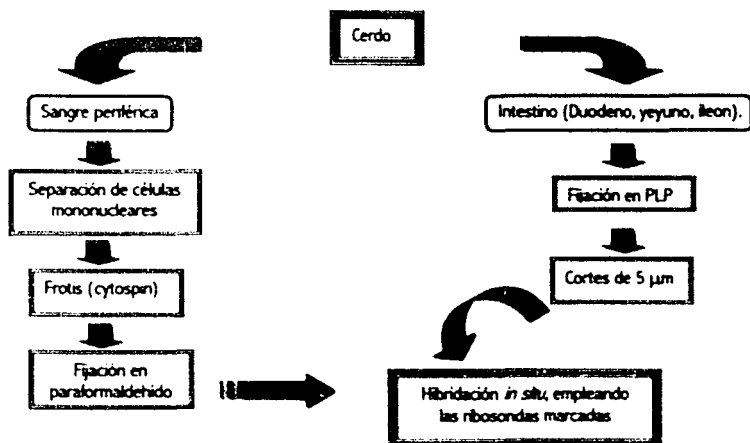
Para la obtención de plásmidos a gran escala, fue necesario transformar células bacterianas con los plásmidos deseados. Se partió de una cepa de *E. coli* competente (ver apéndice II) como la cepa DH5 α a la que se realizaron las transformaciones necesarias (ver apéndice II) para obtener las siguientes cepas:

Cuadro 2. Cepas de trabajo para la obtención de plásmidos.

CEPA	CARACTERÍSTICAS
DH5 α	Cepa de <i>Escherichia coli</i> Genotipo : F' <i>lnd</i> A1 <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> <i>m_K</i>) ⁺ <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>Rec A1</i> <i>gry A</i> (Nal ^r) <i>rel A1</i> Δ (<i>LacIZYA-argF</i>) <i>U169</i> <i>deoR</i> (Φ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i>) (Catálogo de Biolabs, 1999 pp 274).
CIL-2	DH5 α transformada con pUC19-2, que le confiere resistencia a ampicilina.
CIL-4	DH5 α transformada con pUC19-4, que le confiere resistencia a ampicilina.
Cp23.1	DH5 α transformada con p23.1, que le confiere resistencia a ampicilina.
CpBAC	DH5 α transformada con pBAC, que le confiere resistencia a ampicilina.

DIAGRAMA DE FLUJO

A. Obtención de ribosomas

B. Hibridación *in situ*

METODOLOGÍA

NOTA:

TODAS LAS SOLUCIONES EMPLEADAS PARA ESTAS TÉCNICAS FUERON TRATADAS CON DEPC (Ver apéndice I) Y SIEMPRE SE USARON GUANTES AL TRABAJARLAS.

A. Obtención de ribosomas

Obtención de células para la extracción de RNA total

Se tomaron muestras de sangre periférica de un cerdo de 40 kg de peso con cisticercosis (infectado experimentalmente) de la granja de la Facultad de Medicina Veterinaria de Ciudad Universitaria (sangre proporcionada por el Dr. Marco Bonilla del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM). Con esta sangre, se realizó la separación de células mononucleares mediante Ficoll-hypaque (densidad de 1.077 g/cm³) (Böyum, 1976). La sangre se obtuvo usando EDTA como anticoagulante y se diluyó 1:2 con HBSS⁻ (Ver apéndice I). A esta mezcla de sangre : HBSS⁻, se le adicionó medio volumen de Ficoll-hypaque estéril (SIGMA) con una jeringa nueva y estéril a la que se acopló una aguja calibre 18 de 6 pulgadas de longitud (Pipetting stainless steel Biomedical needles. Popper & Sons, Inc. Cat. 7937 61EA) también estéril. La aguja se sumergió rápidamente hasta el fondo del tubo y con mucho cuidado se adicionó el Ficoll lentamente para no romper las dos fases que se generaron. La sangre estratificada sobre el colchón de Ficoll/hypaque, se centrifugó a 900 x g, 45 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se separó la interfase de las células mononucleares que se formó entre el HBSS⁻ y el Ficoll. Estas células se lavaron 2 veces con HBSS⁻ a 100 x g, por 15min y se resuspendieron en el mínimo volumen de HBSS⁻ para cuantificarlas en una cámara de Neubauer en una dilución 1:2 con azul de tripano (al 0.2 %) para obtener el porcentaje de viabilidad. El número de células obtenidas se ajustó a 5.0 X 10⁶ células por mL en RPMI-C (ver apéndice I) y se incubó 500 µL por pozo en una placa de 24 pozos

con 5 µg de Con A en RPMI-C a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se cosecharon a las 6, 12 y 24 h; para realizar RT-PCR e ISH (Ver Figura 5).

El cálculo del número de células en la cámara de Neubauer se realizó promediando el número de células en los 5 cuadrantes y se multiplicó por 10 000 (Ver figura 5). Todo se hizo por duplicado: Número de células totales ÷ Promedio de los 5 cuadrantes * dilución de la muestra * 10 000 .

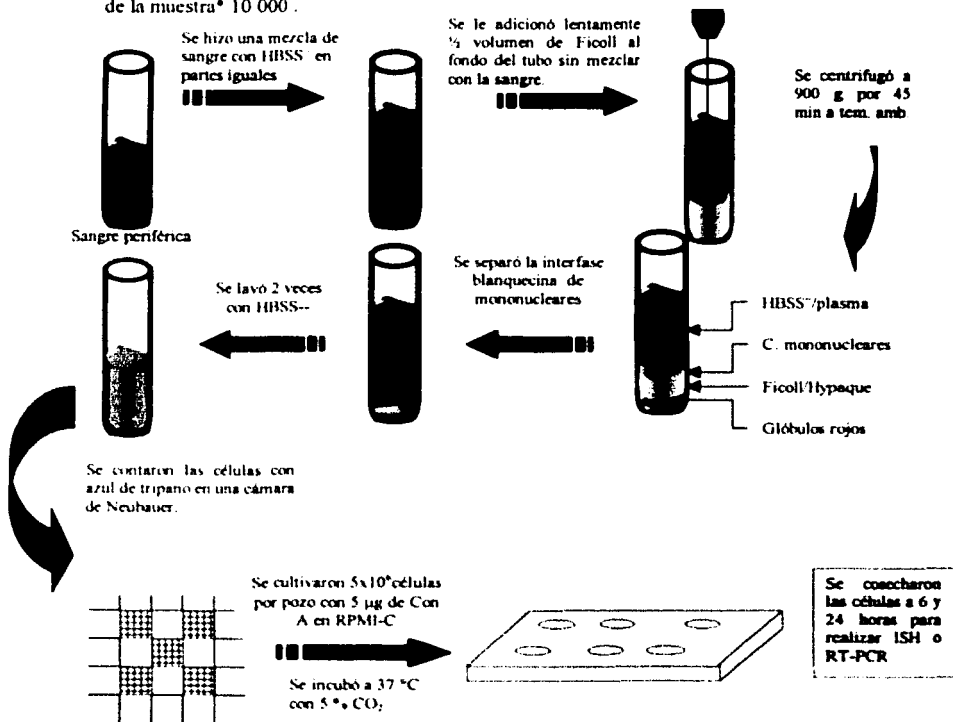


Figura 5. Obtención y cultivo de células mononucleares sanguíneas para la extracción de RNA total.

Se cosecharon las células a las 6 h y se sedimentaron 100 x g, por 3 min, se desechó el sobrenadante y el botón de células se dejó secar por 5 min y se congelaron directamente en nitrógeno líquido (-142 °C) guardándose a -70 °C hasta la extracción de RNA total. Las células destinadas para ISH, también se cosecharon a las 6 h y se realizaron frotis con 150000 células en un Cytospin (Shandon).

Extracción de RNA total de células con TRIZOL

Las células guardadas a -70 °C se descongelaron e inmediatamente se lisaron con 1 mL de trizol (GIBCO Cat. 10296-010). Se pasó la mezcla varias veces a través de una pipeta de 200 µL para favorecer el lisado. El lisado se incubó 5 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se le adicionaron 0.2 mL de cloroformo, se agitó la mezcla vigorosamente con la mano por 15 segundos y se incubó 5 min a 4 °C (en una cama de hielo y agua). Después se centrifugó a 10 000 x g, por 15 min a 4 °C. Se separó la fase acuosa a la que se le añadieron 0.5 mL de isopropanol frío por cada mL de trizol. Se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a no más de 10 000 x g por 10 min a 4 °C. Por último, la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75 %-DEPC(v/v) (Ver apéndice I) y se centrifugó a 7600 x g por 5 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µL de agua-DEPC.

Se cuantificó el RNA obtenido y se verificó su integridad en un gel desnaturante (ver apéndice II). Este RNA se empleó para realizar una RT-PCR y así obtener el DNA molde para sintetizar la ribosonda para la IL-10.

Extracción de RNA total de tejido (intestino) con TRIZOL

Se obtuvo una porción de 2 cm de yeyuno de cerdo normal y se enjuagó con PBS-DEPC e inmediatamente después se colocó en solución D 5.5 M (ver apéndice I) como medio de transporte. Inmediatamente después se le adicionó 1 mL de trizol frío a aproximadamente 10 mg de tejido y se procedió a triturar el tejido previamente congelado en nitrógeno líquido (todo esto en un mortero dentro de nitrógeno líquido) hasta obtener un polvo muy fino. Ya triturado el tejido se dejó descongelar y se siguió el protocolo para extracción de RNA total de células.

Transcripción reversa

Con esta reacción, se obtuvo DNA de una sola cadena complementario al RNA mensajero (cDNA) a partir del RNA extraído (transcripción reversa). El protocolo fue el siguiente:

Se realizó la siguiente reacción:

Tabla 1. Reacción de transcripción reversa

REACTIVO	VOLUMEN
RNA total (1-5 µg o 50-500 ng de mRNA)	volumen de acuerdo a la concentración
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/mL) (Roche)	1 µL
Agua -DEPC	c.b.p 20 µL

Esta mezcla de reacción se calentó a 70 °C por 10 min e inmediatamente se dejó enfriar en hielo por 10 min. Después se centrifugó 10000 x g, por 1 min y se le adicionaron los siguientes reactivos:

Tabla 2. Continuación de la reacción de transcripción reversa

REACTIVO	VOLUMEN
Búfer para la primera cadena 5 X	4 μ L
DTT (Ditiotreitol) 0.1 M (Roche)	2 μ L
dNTPs 10 mM (Roche)	1 μ L

Se mezclaron todos los reactivos y se incubaron a 42 °C por 2 minutos. Después se le adicionó 1 μ L (200 U) de la enzima Super Script II (Roche) y se incubó a 42 °C por 50 min. Finalmente se inactivó la enzima calentando la reacción a 70 °C por 15min. Con éste cDNA se realizó una PCR para obtener DNA de IL-10.

PCR

Se realizaron reacciones de PCR partiendo de DNA de los plásmidos pUC19-2 y pUC19-4 y el cDNA total obtenido mediante una reacción de transcripción reversa. Los oligonucleótidos que se emplearon en las reacciones de PCR llevaban la secuencia de los promotores de transcripción de procariontes SP6 y T7, diseñados en el programa OLIGO (versión 4.2 para MAC) a partir de la secuencia publicada del mRNA de cada interleucina (Birk y Grim, 1994). La secuencia de los promotores de transcripción en procariontes SP6 y T7 es la siguiente:

Promotor T7 : 5' TAA TAC GAC TCA TAG G 3'

Promotor SP6 : 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'

Estas secuencias fueron obtenidas en el catálogo GIBCO de 1998.

Con estos oligonucleótidos se realizaron todas las reacciones de PCR que se mencionan en esta tesis. Al mismo tiempo, para las interleucinas 2 y 4 se realizaron unas minipreps (ver apéndice II) con las cepas CIL-2 y CIL-4 donde obtuvimos suficiente DNA molde para las reacciones de PCR. Para realizar las reacciones de PCR se siguió el siguiente protocolo:

Tabla 3. Reacciones de PCR

Reactivo/DNA	[] final	IL-2 + (μ L)	IL-2 - (μ L)	IL-4 + (μ L)	IL-4 - (μ L)	IL-10 + (μ L)	IL-10 - (μ L)						
Búfer 10 X	1 X	5	5	5	5	5	5						
Mg ²⁺ 150 mM	1.5 mM	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5						
dNTPs 2.5 mM	0.25mM	4	4	4	4	4	4						
Oligonucleótidos (200 ng)	Oligo5'	G01	2	G11	2	H03	2	H02	2	G08	2	G06	2
	Oligo3'	A05	2	G12	2	G02	2	G03	2	F10	2	G07	2
Taq Pol.	2.5 U	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3						
DNA	200 ng	Dependiendo de la concentración de cada DNA											
Agua-DEPC		c.b.p 50 μ L .											

En la tabla 3 se muestran las siglas: G01, A05, G11, G12, H03, G02, H02, G03, G08, F10, G06, G07 de los oligonucleótidos que se diseñaron para obtener DNA de las interleucinas con los promotores SP6 o T7.

Las condiciones de reacción en el caso de IL-2 e IL-4 fueron: 94 °C por 5 minutos 1 ciclo, 94 °C por 1 min 30 seg, 72 °C por 1 min 30 seg, 62 °C por 1 min 30 seg, 72 °C 5 min, por 35 ciclos y un segmento final de 4 °C. En el caso de la IL-10: 94 °C 5 min 1 ciclo, 94 °C 30 seg, 64 °C 30 seg, 72 °C 30 seg, por 30 ciclos , 72 °C por 5 min, y un segmento final de 4 °C. Las condiciones de PCR de la IL-4 fueron establecidas por el Biol. Luis A. Calderilla y las condiciones de PCR para las IL-2 e IL-10 fueron obtenidas durante el desarrollo de esta tesis.

Los productos de PCR obtenidos, se purificaron a través del kit: Agarosa Gel DNA Extracción Kit (ROCHE Cat. 1696505. Ver apéndice II). Terminada su purificación se volvió a correr 1 μ L de la muestra en un gel de agarosa al 1.0 % y se cuantificó por espectrofotometría y por una placa de agarosa (ver apéndice II). Este producto de PCR llevaba ya la secuencia de los promotores de transcripción T7 y SP6 para procariontes, con los cuales se realizaron las reacciones de transcripción *in vitro* para obtener las ribosomas.

Obtención del molde de DNA de β -actina

Se realizó una miniprep (Ver apéndice II) de la cepa Cp23.1, para extraer p23.1 el cual fue purificado por extracción fenólica (Ver apéndice II) y posteriormente, se linealizó con la enzima de restricción *Eco* RI. Este plásmido lineal se empleó como molde de DNA para obtener la sonda antisentido (-) en la transcripción *in vitro*. Así mismo, se realizó una miniprep de CpBAC para obtener el plásmido pBAC, el cual se purificó por extracción fenólica. Este DNA se linealizó con *Xba* I y sirvió como molde de DNA para obtener la sonda sentido (+) mediante la transcripción *in vitro*.

La subclonación del cDNA de la β -actina se realizó en pBS SK+/- (Ver apéndice II) con la finalidad de obtener la sonda sentido con la enzima T7 RNA polimerasa (Ver resultados).

Reacciones de linealización

El plásmido p23.1 se linealizó con la enzima *Eco* RI y pBAC con *Xba* I (todas de GIBCO). Las reacciones de restricción fueron las siguientes:

Tabla 4. Reacciones de linealización

	p23.1	pBAC
Plásmido (10 μ g)	Volumen de acuerdo a la concentración del plásmido	
Búfer 10 X	1 X	1X
Agua destilada	Volumen de acuerdo al volumen de los plásmidos	
Enzima (10 U/ μ L)	1 U / μ L	1 U μ L

Nota: el volumen final de las reacciones depende siempre de la concentración del plásmido.

Estas reacciones se incubaron 2 h a 37 °C. Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1.0 % para corroborar la linearización de los plásmidos. Es importante mencionar que los volúmenes empleados en estas reacciones dependen directamente de la concentración de los plásmidos. Por otra parte también es importante seguir el protocolo marcado en la hoja técnica de cada enzima, según la marca.

Obtención de las ribosondas: Transcripción *in vitro*

Partiendo de los productos de PCR de la IL-2, IL-4 e IL-10 que contienen la secuencia de los promotores de transcripción SP6 y T7 y del DNA de la β -actina linearizado, se realizaron reacciones de transcripción *in vitro* para obtener sondas de RNA complementario (ribosondas), marcadas con digoxigenina-11-UTP. La digoxigenina (Dig) es un esteroide obtenido de la planta *Digitalis purpurea* que se une covalentemente al carbono 11 del uracilo o la adenina. Para su detección se empleó un anticuerpo anti-Dig conjugado con fosfatasa alcalina (FA). La reacción se hizo evidente con la adición del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (BCIP) y el cromógeno, cloruro de nitroazul de tetrazolium (NBT), produciendo un precipitado que va del color rojo a morado.

Las reacciones de transcripción *in vitro*, se realizaron mediante el siguiente protocolo:

a) Para obtener las sondas de β -actina:

REACTIVOS	[] final	Eco RI / T7 RNA polimerasa (-) (μ L)	Xba I / T7 RNA polimerasa (+) (μ L)
Búfer 10X (Roche) / 5X (GIBCO)	1 X	2	4 (GIBCO)
RNTPs (ATP,CTP,GTP, 10 mM, UTP 6.5 mM) (Roche)	1mM de ATP CTP, GTP, y 0.65 mM de UTP.	2	1.6
DIG-11-UTP 3.5 mM (Roche)	0.35 mM	2	Stock 1mM: 2
Inhibidor RNAsin 20 U/ μ L (Promega)	0.5 U/ μ L.	0.5	DTT 0.1 M: 1
DNA		1.0 μ g	100 ng
Agua-DEPC	c.b.p 18 μ L		
Enzima		2	2

b) Para obtener las sondas de IL-2, IL-4 e IL-10:

REACTIVOS (Roche)	[] final	DNA (-) (μ L)	DNA (+) (μ L)
Búfer 10X (Roche)	1 X	2	2
rNTPs (ATP,CTP,GTP, 10 mM, UTP 6.5 mM)	1mM de ATP ,CTP ,GTP y 0.65 mM de UTP.	2	2
DIG-11-UTP 3.5 mM	0.35 mM	2	2
Inhibidor RNAsin 20 U/ μ L.	0.5 U/ μ L	0.5	2
DNA 1 μ g		x	x
Agua-DEPC	c.b.p 18 μ L		
Enzima		SP6 : 2	T7: 2

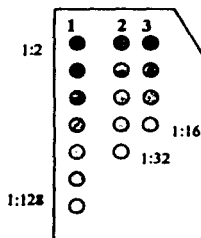
DNA (-): es el DNA que contiene la secuencia para el promotor de transcripción para SP6 y se transcribe con la enzima SP6 RNA polimerasa. DNA (+) contiene la secuencia para el promotor de transcripción para T7 y se transcribe con la enzima T7 RNA polimerasa.

Estas reacciones se incubaron 2 h a 37 °C. Transcurrida la primera hora de incubación fue necesario adicionar 1 µL extra de la enzima SP6 a los tubos correspondientes para una mejor eficiencia en el marcaje. Al terminar las dos horas de incubación se le adicionó a cada tubo de reacción 1 U/µL final de DNasa libre de RNAsa (PROMEGA Cat.M610A) y se incubaron 15 min a 37 °C. Posteriormente se detuvo la reacción con la adición EDTA a una concentración final de 0.02 M (es decir, una dilución 1:10 de EDTA 0.2 M), además se les adicionaron 2.5 µL de LiCl₄ 4 M y 100 µL de etanol absoluto frío. Se mezcló ligeramente y se centrifugó por 30 min, 10000 x g a 4 °C. Pasado el tiempo se dejó escurrir al máximo el alcohol y se resuspendió el RNA en 20 µL de agua-DEPC. El RNA obtenido se guardó a -20 °C. La sonda así guardada es estable por 1 año y a -70 °C por más tiempo.

Detección de las sondas por dot blot

Se colocó 1 µL de nuestro producto de transcripción *in vitro* sobre una membrana de nylon (Amersham) y se fijó por una hora a 80 °C, puesta la membrana sobre un papel 3 MM. Pasado el tiempo, se colocó dentro de una bolsa de plástico y se lavó con búfer de lavado (BW) por 3 min, después se bloqueó la membrana por 30 min con búfer de bloqueo (BB) y enseguida se le adicionó el anticuerpo (Roche Cat. 1093 274) en una dilución 1:5000 en BB y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 2 veces con B1 por 15 min. Posteriormente se equilibró la membrana con B3 por 5 min y posteriormente se le adicionó la solución de color (SC) y se incubó toda la noche en la oscuridad. Al siguiente día se detuvo la reacción con un lavado de TE pH 8.0 (ver apéndice I) por 10 min.

Por último se cuantificó la concentración de RNA marcado en la mezcla de reacción de la siguiente forma:



Se realizaron diluciones dobles de RNA marcado proporcionado por el Kit de detección (DIG DNA Detection Kit de ROCHE Cat.1175 041) cuya concentración fue de 100 ng de RNA marcado por μL , partiendo de una solución 1:20 como stock en agua-DEPC (carril 1); así mismo se realizaron diluciones de las muestras problema (carriles 2 y 3) que se desearon cuantificar. Posteriormente se realizó la siguiente operación:

1. La última dilución en la que se vio la marca del RNA patrón fue: 1:128
2. La última dilución en la que se vio la marca del RNA de la muestra 1 fue : 1:32
3. La última dilución en la que se vio la marca del RNA de la muestra 2 fue: 1:16

Con estos datos se obtuvo la concentración de RNA marcado en la mezcla de reacción:

$$[\text{RNA marcado}] = \frac{\text{última dilución de la muestra}}{\text{última dilución del patrón}} \times \text{concentración del patrón}$$

Por lo tanto:

$$[\text{RNA marcado de la muestra 1}] = \frac{32}{128} \cdot 100 \text{ ng}/\mu\text{L} = 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$[\text{RNA marcado de la muestra 2}] = \frac{16}{128} \cdot 100 \text{ ng}/\mu\text{L} = 12.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Con estas concentraciones se determinó la cantidad de microlitros necesarios de cada sonda para ajustar a 1 mg de RNA/ mL de búfer de hibridación.

B. Hibridación in situ (ISH)

Obtención de las muestras

Tejidos

Se emplearon dos muestras de yeyuno de cerdos sin infección de 8 semanas de edad. Estas muestras se fijaron con PLP (para-formaldehído, lisina y peryodato) (McLean y Nakane, 1974) por 24 h a 4°C. Después se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes de un espesor de 5 micras en un microtomo (Leica RM 2025) y se depositaron en laminillas cubiertas previamente con organosilano (γ -Methacryl oxypropyl trimethoxysilane de SIGMA. Catálogo 6514) al 2% en acetona (ver apéndice I). Las laminillas se dejaron secar toda la noche a 37 °C. También se trabajaron muestras de intestino porcino infectado experimentalmente con *T. spiralis*, con la finalidad de determinar si el sistema de ISH es capaz de revelar la expresión diferencial de citocinas, durante una infección comparado con un tejido control.

Células

Se tomaron muestras de sangre periférica de un cerdo de granja de 45 kg de peso infectado con cisticercosis. Con la sangre conseguida, se realizó la separación de células mononucleares mediante Ficoll/hypaque (ver obtención de células mononucleares para la extracción de RNA total) y se incubaron por 6 h para realizar ISH de los mRNA de la IL-2, 4 y β -actina; y 24 h para la IL-10. Se encontró que a las 6 h hubo un máximo de expresión de mRNA de IL-2 e IL-4 (tesis de licenciatura del BioL. Luis A. Calderilla). Sin embargo se decidió continuar con la incubación hasta las 24 h para tener células que posiblemente expresen en mayor cantidad algún mRNA de las citocinas que se estaban buscando y hacer más visible su expresión por ISH.

Ya obtenidas las células, se realizaron frotis en spot (con un Cytospin 3 (Shandon) a 2000 rpm por 3min) a una concentración de 1×10^6 células por ml. sobre laminillas silinizadas. Los frotis se fijaron con p-formaldehído al 4 % en PBS-DEPC (ver apéndice I) por 30 minutos, después se lavaron en PBS-DEPC por 10 min a temperatura ambiente. Se dejaron secar y se guardaron a 4 °C hasta su uso. Las muestras así fijadas y guardadas se conservan por un año (Herrigton y McGee, 1992).

Pretratamiento de las muestras

Las muestras de tejido se desparafinizaron 1 h a 60 °C (temperatura de fusión de la parafina) e inmediatamente se pasaron a xilol por 30 minutos. Después, las laminillas se hidrataron a través de alcoholes seriados (100, 90 y 70 %) preparados con agua-DEPC y por último en PBS (ver apéndice I). Después se pasaron a una solución de 10 µg/mL de proteinasa K (GIBCO Cat. 25530-049) en TE pH 8.0 (ver apéndice I) por 15 minutos a 37 °C. En el caso de los frotis, se lavaron en PBS-DEPC por 3 min y enseguida se pasaron a la solución de proteinasa K por 3 min. Enseguida, todas las laminillas se colocaron en una solución de glicina al 0.5 % en PBS por 3 minutos. Después se pasaron a una solución de trietanolamina 0.1 M, anhídrido acético al 0.25 % en PBS y se deshidrataron en etanol 70, 90 preparados en agua-DEPC y 100 %. Las laminillas se dejaron secar 1 h a temperatura ambiente.

Prehibridación

Las muestras se incubaron con 20 µL de mezcla de pre-hibridación que consiste en formamida al 50 %, SSC 4X (citrato-NaCl: ver apéndice I), EDTA 2 mM, 250 µg/mL de tRNA de levadura (GIBCO Cat. 16051-039), sulfato de dextrán al 10 % y solución de Denhardt al 1 X (Dijkman *et al.*, 1995). Posteriormente las laminillas se calentaron en un horno a 94 °C por 4 minutos e inmediatamente se colocaron sobre una cama de hielo

durante 15 minutos. Pasado el tiempo, se colocaron en una cámara de SSC al 0.2 X (Ver apéndice I) y formamida al 30 % en agua y se incubaron 1 h a 60 °C, temperatura promedio requerida por las sondas.

Hibridación

A las muestras se les agregó la mezcla de hibridación que consistió en la ribosonda marcada (1 µg/mL) en búfer de prehibridación (ver apéndice I) que se calentó previamente a 60 °C por 10 minutos para desnaturalizar el RNA, e inmediatamente después se colocó en hielo 15 min. Las laminillas se pusieron en la misma cama de formamida ocupada en la pre-hibridación y se dejaron toda la noche en un baño maría a 60 °C. Al día siguiente, se removió el exceso de la sonda, con lavados de astringencia de sales (dado por la concentración de citrato de sodio del SSC) y a la misma temperatura de hibridación (60 °C), los lavados que se realizaron fueron los siguientes: SSC 2X por 15 minutos, después se incubaron con RNAsa tipo A 10µg/mL (ROCHE CAT. 109 142) en TN propio para esta enzima (Tris HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 15 mM) a 37 °C por 30 minutos, después se lavaron con SSC 2X 15 min a la temperatura de hibridación, enseguida se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno, con una mezcla de formamida al 60 % y SSC 0.2 X, después se lavaron con SSC 2X, todos estos lavados a la temperatura de hibridación; enseguida se lavaron con TN pH 7.5 por 10 min., por último se incubaron con búfer de ácido málico-NaCl (ver apéndice I) a temperatura ambiente por 10 min. (Schad *et al.*, 1996). Finalmente se bloquearon las laminillas con un reactivo del kit DIG DNA detection (ROCHE. Catálogo 1 175 041) al 5 % en búfer de ácido málico-NaCl por 2 h a temperatura ambiente.

Detección. Método no isotópico: inmunodetección

Después de bloquear las laminillas, se les adicionó el anticuerpo anti-Dig conjugado con fosfatasa alcalina (FA) (ROCHE Cat. 1093274) a una dilución 1:200 en búfer de bloqueo al 1% (ver apéndice) y se dejaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las laminillas en TN con Tween-20 al 0.1 % por 10 minutos, seguido de un lavado con TN por 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se les adicionó la solución de color que contiene NBT/BCIP en búfer de Tris HCl pH 9.5, NaCl, y MgCl₂ (ver apéndice I) y se incubaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda y oscura. Se monitoreó la reacción de desarrollo de color cada media hora con la ayuda de un microscopio óptico.

La lectura y el análisis de los resultados se realizó a través de un analizador de imágenes mediante el programa Image *Pro plus* versión 4 para Windows (Media Cybernetics EEUU).

Controles

A. Control positivo:

1. Células mononucleares de sangre periférica de cerdo estimuladas 6 y 24 h con Con A a 37°C.
2. Control positivo de la técnica: Se usó β -actina como gen constitutivo de las células.

B. Control negativo

1. Hibridación con la ribosonda sentido + (la misma secuencia del mRNA).

RESULTADOS

A. Diseño de las ribosondas

1. Diseño de los oligonucleótidos (oligos)

Según la metodología propuesta, fue necesario el diseño de oligonucleótidos específicos para las sondas que utilizamos en la técnica de hibridación *in situ*. El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante el software OLIGO versión 4.2 para MAC, obteniendo las siguientes secuencias:

IL-2 (Goodal et al., 1991)

a) Oligonucleótidos para obtener el molde de DNA que codifica para la sonda sentido con el promotor T7 (letras en negritas):

Oligo5' 5' TAA TAC GAC TCA TAG G AAC **g**gT **g**CA CCT ACT TCA A**g**C TCT AC 3'

Oligo3' 5' **g**TC A**g**T **g**TT **g**A**g** TA**g** AT**g** CTT T**g**A C 3'

b) Oligonucleótidos para obtener el molde de DNA que codifica para la sonda antisentido con el promotor SP6 (letras en negritas):

Oligo5' 5' AAC **g**gT **g**CA CCT ACT TCA A**g**C TCT AC 3'

Oligo3' 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG **g**TC A**g**T **g**TT **g**A**g** TA**g** AT**g** CTT T**g**A C 3'

IL-4 (Bailey et al., 1993)

a) Oligonucleótidos para obtener el molde de DNA que codifica para la sonda sentido con el promotor T7 (letras en negritas):

Oligo5' 5' TAA TAC GAC TCA TAG G CAC CTT ACA **A_gA** **gAT** CAT CAA AAC C3'
 Oligo3' 5' CTT CTT **g_gC** TTC A**g** CAC **A_gA** ACA **g_g3'**

b) Oligonucleótidos para obtener el molde de DNA que codifica para la sonda antisentido con el promotor SP6 (letras en negritas):

Oligo5' 5' CAC CTT ACA **A_gA** **gAT** CAT CAA AAC C3'
 Oligo3' 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG CTT CTT **g_gC** TTC AT**g** CAC **A_gA** ACA **g_g3'**

IL-10 (Blanco et al., 1995)

a) Oligonucleótidos para obtener el molde de DNA que codifica para la sonda sentido con el promotor T7:

Oligo5' 5' TAA TAC GAC TCA TAG G **A_gA** **gA_g** T**gA** T**g_g** **g_gA** **g_gA** T3'
 Oligo3' 5' CA**g** **A_gA** **g_gC** TC**g** **gTA** AAT AA3'

b) Oligonucleótidos para obtener el molde de DNA que codifica para la sonda antisentido con el promotor SP6:

Oligo5' 5' **A_gA** **gA_g** T**gA** T**g_g** **g_gA** **g_gA** T3'
 Oligo3' 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG CA**g** **A_gA** **g_gC** TC**g** **gTA** AAT AA3'

Nota: las letras en minúscula se escriben así para no confundir la *g* con otra letra.

Para realizar el diseño de los oligonucleótidos se siguieron los siguientes parámetros:

- a) Que la ΔG° = negativa
- b) T_m semejante entre el par de Oligos
- c) Que no existan estructuras hairping que son hibridaciones entre la misma secuencia del oligonucleótido. La presencia de estas estructuras evita que los oligonucleótidos se alineen correctamente para comenzar la reacción de PCR.
- d) Que no generen productos de PCR inespecíficos.
- e) Que generen productos de PCR de un peso de entre 100 y 300 pb.

2. Obtención de DNA

a. Extracción de RNA

Partiendo de la metodología mencionada en la sección de material y métodos, se realizaron extracciones de RNA de tejido y de células mononucleares de sangre periférica de cerdo (ver figura 6). El RNA que se obtuvo se mostró íntegro, tanto el de tejido (figura 6A) como el de células (figura 6B), ya que se observaron las bandas correspondientes a los rRNA 18 S y 28 S (S es la unidad de Svedberg) principalmente, el tRNA y el mRNA, que fue la especie que se empleó para realizar la transcripción reversa con la cual obtuvimos cDNA y de éste las PPCCRR para obtener un DNA molde para las reacciones de transcripción *in vitro*.

El RNA total de las células (figura 6B), se empleó para obtener DNA (por RT-PCR) cuya secuencia fue específica para la IL-10, además de que poseía la secuencia de los promotores de transcripción bacterianos para obtener las ribosondas apropiadas para hibridar el mRNA de la IL-10.

Con el RNA total extraído de yeyuno de cerdo sin infección (figura 6A), se determinó la expresión de IL-2, IL-4, *in vitro*, por RT-PCR.

b. RT-PCR

Con el RNA mostrado en la figura 6, se realizaron reacciones de RT-PPCCRR siguiendo la metodología mencionada en material y métodos. Con el cDNA obtenido a partir del RNA del tejido (figura 6A) se realizaron reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos para la IL-2 e IL-4 y se pudo demostrar la expresión de mRNA de las citocinas IL-2 (167 pb) e IL-4 (164 pb) comparadas con los productos de las PPCCRR para estas mismas citocinas, pero tomando como cDNA molde a los plásmidos pUC19-2 y pUC19-4 (ver material y métodos).

Con estos resultados (Figura 7, carriles 2 y 3) se demostró que el intestino de cerdo expresa mRNA de las IL-2 e IL-4 en condiciones normales.

Para realizar ISH, se necesita de sondas específicas debidamente marcadas para detectar la expresión de mRNA. Para tal fin, se realizaron reacciones de PCR para obtener un DNA molde de la IL-2 e IL-4 empleando el cDNA clonado en los plásmidos pUC19-2 y pUC19-4 así como oligonucleótidos específicos para cada interleucina que contienen la secuencia del promotor bacteriano SP6 o T7. Los productos de PCR obtenidos se muestran en la figura 8, los cuales se emplearon para realizar transcripción *in vitro* con las enzimas RNA polimerasas correspondientes y así obtener las sondas de RNA (ribosondas) específicas para el mRNA de la IL-2 e IL-4.

En el panel A de la figura 8 se muestra el producto de PCR de la IL-2 con un tamaño molecular aproximado de 167 pb. En la figura 8B se observan los productos de PCR de la IL-4, los cuales muestran un tamaño que corresponde al esperado (164 pb). En el panel 8C, se muestra el producto de RT-PCR de la IL-10.

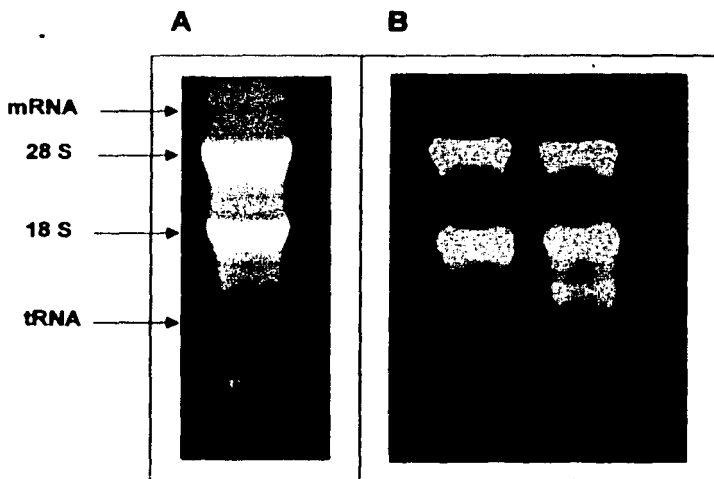
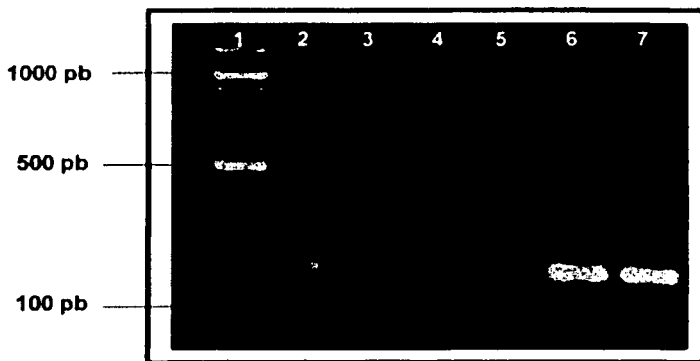


Figura 6. Electroforesis de RNA sobre geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes

El panel A corresponde a una de las muestras de RNA de tejido total de yeyuno de intestino de cerdo. En el panel B se muestra el RNA de células mononucleares de sangre periférica de cerdo. Ambos geles son desnaturalizantes al 1.25 % corridos a una corriente de 40 V por 60 min. (ver apéndice II). Estos RNA están en agua-DEPC y se guardaron a -70 °C.

Se ve que el RNA que se extrajo está íntegro, ya que se observan las bandas definidas correspondientes al rRNA 18S y 28 S. Con este RNA se realizaron reacciones de RT-PCR para la detección de citocinas *in vitro* (RNA de tejido) y para obtener el DNA molde y que la ribosonda de la IL-10 (RNA de células).



Gel de agarosa al 1.5 % . 60 V, 1 h.

Figura 7. Electroforesis de productos de RT-PCR en geles de agarosa. (RNA de yeyuno de cerdo)

Carril	Muestra
1	Marcador de Peso Molecular (GIBCO Cat.15 628-50) de 100 pb.
2	Producto de PCR para IL-2 con cDNA 1
3	Producto de PCR para IL-4 con cDNA1
4	Producto de PCR para IL-2 con cDNA2
5	Producto de PCR para IL-4 con cDNA2
6	Producto de PCR control IL-2
7	Producto de PCR control IL-4

Con el RNA obtenido a partir de yeyuno de cerdo (Figura 6A) se realizó una RT-PCR, con la cual se detectó la expresión de la IL-2 e IL-4. Estos productos de PCR se realizaron a partir de dos cDNA obtenidos del mismo RNA. Solo con el cDNA1 se lograron obtener productos de PCR para la IL-2 e IL-4. Los tamaños moleculares de la IL-2 (167 pb) e IL-4 (164 pb) corresponden en el gel, además de que se comparan con los productos de PCR con el DNA control, que es el plásmido que contiene el cDNA de estas citocinas.

Para poder realizar esta RT-PCR, se partió de RNA extraído de células mononucleares sanguíneas de cerdo cultivadas con Con A por 6 h (Figura 6B). El tamaño de este producto de PCR fue el esperado de 220 pb comparado con el marcador de tamaño molecular (Ver cuadro 3).

En la figura 8, se observan los productos de PCR referidos con el promotor T7 que contienen el DNA molde de cada citocina con los cuales se obtuvo la sonda sentido, mediante transcripción *in vitro*. Esta sonda sentido posee la misma secuencia que el mRNA de cada citocina por lo que fueron empleadas como control negativo de la técnica. Así mismo los productos de PCR referido como SP6, se emplearon como DNA molde para obtener la sonda antisentido, por transcripción *in vitro*, que contiene la secuencia complementaria al mRNA que se deseaba detectar.

Cuadro 3. Tamaños de los productos de PCR de las diferentes interleucinas.

INTERLEUCINA	PM DEL PRODUCTO DE PCR (PB)
IL-2	167
IL-4	164
IL-10	220

c. Obtención de DNA molde para la β -actina

Para asegurar el correcto funcionamiento de la técnica de ISH se produjeron un par de ribosondas específicas para el gen constitutivo de la β -actina, involucrada en la formación del citoesqueleto celular. Se obtuvo DNA molde que contiene el cDNA de la β -actina de humano a partir del plásmido p23.1 y pBAC. En la figura 9A se muestra la integridad de los plásmidos pBAC (ver apéndice II) y en panel 9B el plásmido p23.1 extraídos por precipitación con polietilenglicol y purificados a través de fenol:CHCl₃ (ver apéndice II).

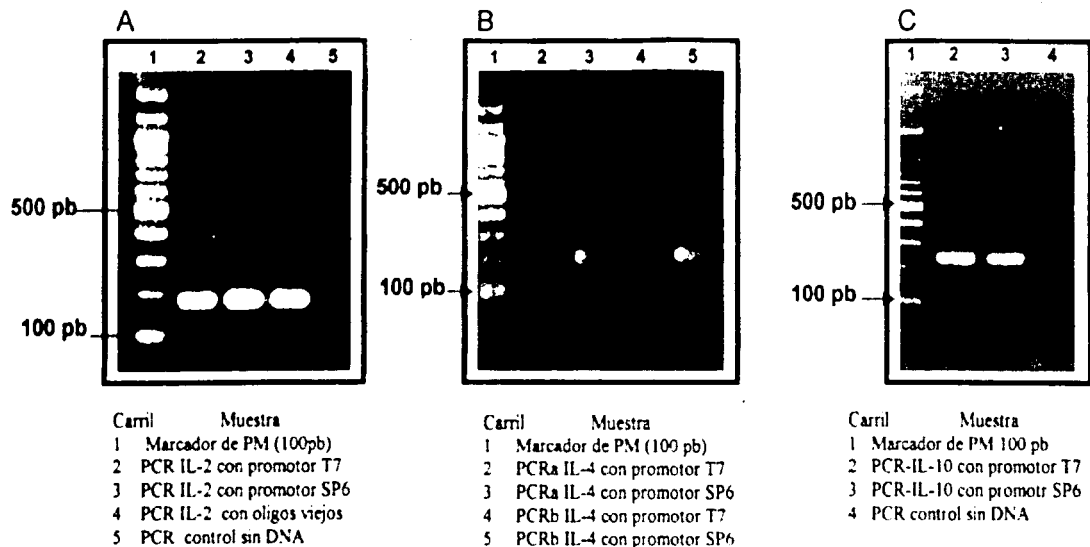


Figura 8. Electroforesis de DNA molde de la IL-2, IL-4 e IL-10 para la obtención de ribosondas en geles de agarosa

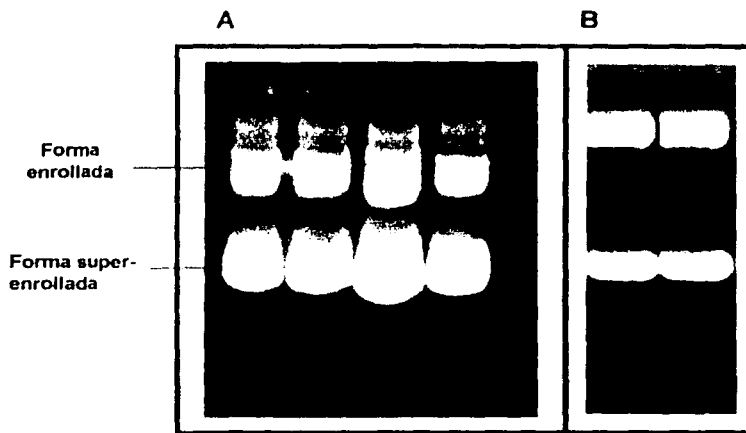
El DNA molde para la generación de las ribosondas de la IL-2 (panel A) e IL-4 (panel B) se obtuvo a partir de reacciones de PCR con los plásmidos pUC19-2 y pUC19-4. El DNA molde para la ribosonda de IL-10 (panel C) se obtuvo a partir de reacciones de RT-PCR partiendo del RNA mostrado en la figura 6B. Los productos de PCR y de RT-PCR con el promotor T7 sirvieron de molde para adquirir la sonda sentido y los productos con SP6 se emplearon para las sondas antisentido de cada citocina.

Las 2 bandas que corren en el frente en la figura 9 corresponden a la forma super-enrollada y la segunda banda de abajo hacia arriba corresponde a la forma enrollada o helicoidal. Los plásmidos se pueden encontrar en diferentes formas: super-enrollado, helicoidal y circular relajada y un mismo plásmido puede presentar indistintamente 2 ó 3 formas.

- *Subclonación del cDNA de la β -actina*

El cDNA de la β -actina fue subclonado en el vector pBluecript SK (Stratagene) con la finalidad de facilitar su manejo y obtener la sonda sentido. Esta subclonación se realizó siguiendo la metodología descrita en el apéndice II. En la figura 10 se muestra el análisis de la subclonación del fragmento de la β -actina de 2000 pb en el vector pBS-SK de 2958 pb. En esta figura, se muestran los plásmidos obtenidos de las colonias que posiblemente podían tener el plásmido que se buscaba. Estas colonias candidatas se obtuvieron mediante la transformación bacteriana con la reacción de ligación para obtener el plásmido pBAC (ver apéndice II). Para discriminar si el plásmido obtenido de cada colonia candidata es el pBAC, se realizaron reacciones de corte generándose un mapa de restricción con el cual se realizó el análisis para la identificación del plásmido. En la figura 10, se puede observar que los plásmidos sin restringir tienen un corrimiento muy similar dependiendo de su forma (helicoidal, enrollada, entre otras) que no son dependientes del tamaño molecular del plásmido (Figura 10 carriles 3, 5, y 7). En los carriles 2, 4 y 6 de esta misma figura se muestran los plásmidos restringidos con la enzima AclI, que corresponden al plásmido pBAC ya que posee dos sitios de corte, además de que se determinó que la orientación del inserto en el vector fue de 3' - 5' respecto al promotor T7 (ver cuadro 4), lo que favoreció la obtención del DNA molde para generar la sonda sentido.

Con la finalidad de asegurar que se tenía el inserto de β -actina, se realizaron reacciones con enzimas que poseen un solo sitio de corte en el plásmido pBAC (se linealizó): Kpn I y Xba I.

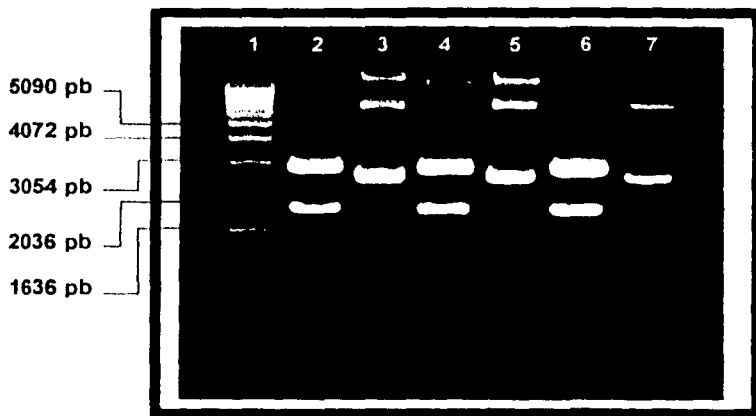


Gel de agarosa al 1.0 % en TAE, 70 V, 90 min

Figura 9. Electroforesis de plásmidos de β -actina en gel de agarosa

- A. Plásmido pBAC extraído por la técnica de polietilenglicol y purificado por extracción fenólica (ver apéndice III)
- B. Plásmido p23.1 extraído por la técnica de polietilenglicol y purificado por extracción fenólica (ver apéndice III)

El control positivo de la técnica fue la ISH de la β -actina cuyas sondas se obtuvieron por transcripción *in vitro* partiendo de los plásmidos p23.1 y pBAC (ver figura 5). En esta figura se muestra la integridad de los plásmidos con los cuales se trabajaron. Se observa que ambos plásmidos poseen la forma enrollada y la super-enrollada.



Gel de agarosa al 1.0% en TAE 1X, 70 V, 60 min.

Figura 10. Electroforesis del DNA de la β -actina subclonado en pBS SK+/-

CARRIL

- 1 Marcador de peso molecular (1 Kb GIBCO)
- 2 Restricción de la clona candidata No 1 con Accl.
- 3 Clona candidata No 1 sin restringir
- 4 Restricción de la clona candidata No 2 con Accl.
- 5 Clona candidata No 2 sin restringir
- 6 Restricción de la clona candidata No.3 con Accl
- 7 Clona candidata No 3 sin restringir

Para la obtención de la sonda antisentido se subclonó el DNA de la β -actina en el vector pBS SK+/- en el sitio Bam HI. La subclonación se realizó según el protocolo descrito en el apéndice II. Se realizaron reacciones de restricción con la enzima Accl para eliminar clonas que no poseen al DNA de interés. Los fragmentos generados con esta enzima corresponden a los tamaños esperados según el análisis teórico basado en la secuencia de nucleótidos (ver cuadro 4)

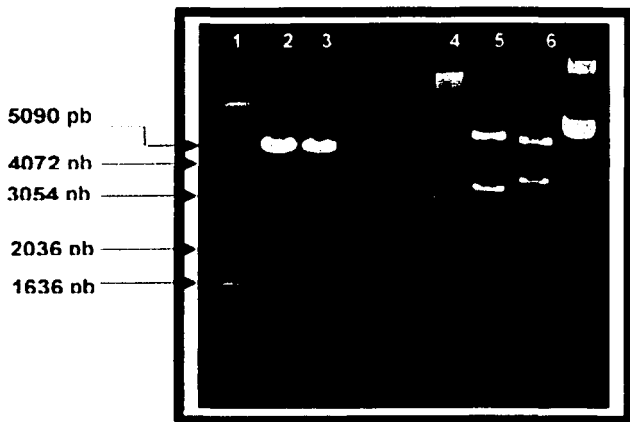
Con estas reacciones de linealización se pudo determinar que el tamaño del plásmido de las colonias candidatas corresponde al tamaño del plásmido que se esperaba, es decir de 4958 pb (Figura 11, carriles 2 y 3. Ver cuadro 4). Así mismo, se realizaron restricciones con la enzima Bam III, que es el sitio donde se realizó la clonación por lo que con esta enzima se liberó el inserto de la β -actina (de 2000 pb). Con estos resultados, se confirmó que el plásmido pBAC contiene el cDNA de la β -actina (Figura 11 y cuadro 4).

Cuadro 4. Patrón de restricciones para el plásmido pBAC de 4958 pb.

ENZIMA	FRAGMENTO GENERADO (pb)
	Posición 3' - 5' (pb)
Acc I	1942 y 3016
Sma I	1849 y 3109
Bam III	2958 y 2000
Xba I	Linealización: 4958
Kpn I	Linealización: 4958

- *Restricciones de p23.1 y pBAC.*

Antes de someter el DNA molde del plásmido, a una reacción de transcripción *in vitro*, es recomendable linealizar los plásmidos. Por tal motivo, el plásmido p23.1 se linealizó con la enzima Eco RI, para enseguida transcribir con la enzima RNA polimerasa T7 y obtener la sonda antisentido para la β -actina. El plásmido pBAC se linealizó con la enzima Xba I, con la cual el DNA molde obtenido se transcribió con la RNA polimerasa T7 y así se obtuvo la sonda sentido para este mismo gen. Los plásmidos al ser linealizados, dejan de presentar las formas enrolladas helicoidales típicas de un plásmido circular, permitiendo así que se genere una sola banda que opone más resistencia al corrimiento electroforético (Figura 12).



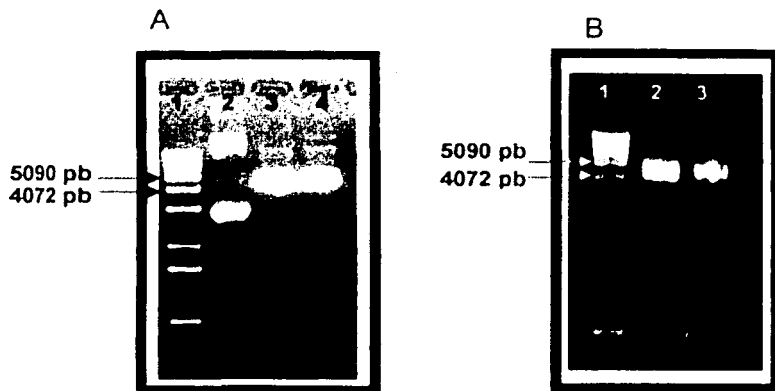
Gel de agarosa al 1.0% en TAE 1X, 60 V, 60 min.

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de pBAC digerido con las enzimas KpnI, XbaI, Bam HI y AccI.

CARRIL

- 1 Marcador de PM (1 Kb GIBCO)
- 2 pBAC restringido con Kpn
- 3 pBAC restringido con Xba
- 4 Marcador de PM (1 Kb GIBCO)
- 5 Restricción de pBAC con Bam HI
- 6 Restricción de pBAC con AccI
- 7 pBAC sin restringir

Para poder realizar las reacciones de transcripción *in vitro* y emplear las RNA polimerasas adecuadas, fue necesario saber la orientación con la cual se insertó el DNA de interés (β -actina), por eso se efectuaron restricciones con las enzimas KpnI, XbaI y AccI. Los fragmentos generados por estas enzimas indicaron que la orientación del inserto fue de 3'-5', por lo que la sonda antisentido se pudo obtener con la RNA polimerasa T7



Geles de agarosa al 1.0 % en TAE, 70 V, 60 min

Figura 12. Electroforesis de los plásmidos de β -actina linearizados.

Panel A

Carril

- | | |
|---|--------------------------------------------------|
| 1 | Marcador de PM (1 Kb: GIBCO
Cat. 10 787-018). |
| 2 | p23.1 sin restringir |
| 3 | Restricción con Eco RI |
| 4 | Restricción con Hind III |

Panel B

Carril

- | | |
|---|------------------------------|
| 1 | Marcador de PM (1 Kb: GIBCO) |
| 2 | Restricción de pBAC con Xba |
| 3 | Restricción de pBAC con Kpn |

Los plásmidos p23.1 y pBAC se linearizaron para poder someterlos a reacciones de transcripción *in vitro*. Cada linearización se realizó con enzimas diferentes que poseen solamente un sitio de corte. En el caso de p23.1 se tomó el DNA linearizado con la enzima *EcoRI* y el pBAC con *XbaI*. El tamaño de los plásmidos corresponde con los tamaños esperados por el análisis teórico, 4985 pb para pBAC y 4975 pb para p23.1

3. Obtención de las ribosondas: transcripción *in vitro*

Los DNA molde con los promotores T7 y SP6 para las IL-2, IL-4 e IL-10 y el DNA molde de la β -actina (p23.1 y pBAC), previamente restringido, se purificaron de geles de agarosa (Productos de PCR, figura 8) y por extracción fenólica (DNA de β -actina) con la finalidad de eliminar enzimas, Mg^{2+} , EDTA y otras sales que pudieran afectar la reacción de transcripción (Ver apéndice II). Estos DNA molde se cuantificaron espectrofotométricamente (apéndice II) y dependiendo de su concentración se tomaron las cantidades precisas con las cuales se realizaron las reacciones de transcripción *in vitro* (ver material y métodos). Con estas reacciones se obtuvieron las sondas de RNA o ribosondas que posean la secuencia específica para hibridar con su mRNA blanco. Estas ribosondas se marcaron mediante la incorporación del ribonucleótido UTP-11-digoxigenina durante la reacción de transcripción (ver material y métodos). La digoxigenina es un esteroide extraído de la planta *Digitalis purpurea* (marcaje no isotópico) que se puede hacer evidente con el uso de un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una enzima como peroxidasa o fosfatasa alcalina.

Secuencias de las ribosomas

Con los oligonucleótidos diseñados, se obtuvieron las sondas de RNAc para el mRNA de la interleucina-2, interleucina-4 e interleucina-10. La secuencia de cada ribosonda fue la siguiente:

Interleucina 2 (de la posición 61 a 215)

Longitud de la sonda: 167 pb

5' gcaactactt caagctctac aaagaacaca aagaascaac tggagccatt gctgctggat
ttacagttgc ttttgaagga agttaagaat tacgagaatg ctgatctctc caggatgctc
acatttaaat tttacatgcc caagcaggct acagaattga aacac 3'

Interleucina 4 (de la posición 133 a 272)

Longitud de la sonda: 164 pb

5' c accttacaag agatcatcaa aaccttgaac attctcacag cgagaagaag ctgctgcatg
gagctgcccg tgacggaccg ctttctgccc ccagagaaca cgacggagaa ggaaccttc
tgcgggctt cgactgtgct tcggcacatc tacagacacc a 3'

Interleucina 10 (de la posición 150 a 348)

Longitud de la sonda: 220 pb

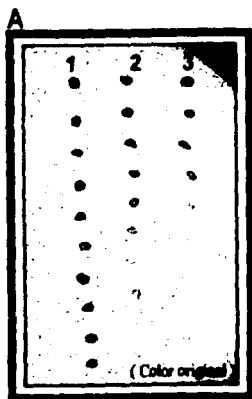
5'c atccacttcc caaccagcct gccccacatg ctccgggaac tccgagctgc ctctggccca
gtgaagagtt tctttcaaac gaaggaccag atggcgact ttttctgac cgggtctctg ctggaggact
ttaagggtta cctgggttc caagccttct cagagatgat ccaqtttac ctggaagacg taatgccaa
ggcagagagt gatggg 3'

Cuadro 6. Secuencias de las ribosomas para el mRNA de las IL-2, IL-4 e IL-10

Se determinó la concentración de RNA marcado de cada sonda obtenida (figura 13 y cuadro 5), mediante Dot blots (ver material y métodos). Fue necesario cuantificar la concentración de las ribosondas para así poder asegurar que adicionamos la misma cantidad de RNA marcado en cada experimento de ISH para cada citocina y poder comparar cualitativamente la expresión de mRNA de la IL-2, IL-4 e IL-10.

Cuadro 5. Concentración de ribosonda marcada con DIG.

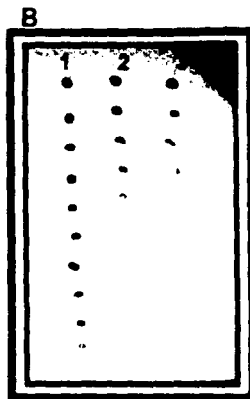
Sonda marcada ng/ μ L	Sentido ng/ μ L	Antisentido ng/ μ L
β -actina	12.5	12.5
IL-2	12.5	12.5
IL-4	12.5	12.5
IL-10	6.25	22.5



A. Detección de las ribosomas de mRNA para IL-2.

CARRIL

- 1 Diluciones dobles del estándar de RNA marcado del kit (100 ng/μL)
- 2 Diluciones dobles de la sonda sentido para IL-2
- 3 Diluciones dobles de la sonda antisentido para IL-2



B. Detección de las ribosomas de mRNA para β-actina

CARRIL

- 1 Diluciones dobles del estándar de RNA marcado del kit (100 ng/μL)
- 2 Diluciones dobles de la sonda sentido de β-actina
- 3 Diluciones dobles de la sonda antisentido de β-actina



C. Detección de las ribosomas de mRNA para IL-4 e IL-10

CARRIL

- 1 Diluciones dobles del estándar de RNA marcado del kit (100 ng/μL)
- 2 Diluciones dobles de la sonda sentido para IL-4
- 3 Diluciones dobles de la sonda antisentido para IL-4
- 4 Diluciones dobles de la sonda antisentido para IL-10

Figura 13. Dot Blots para la cuantificación de la concentración de las ribosomas marcadas con DIG

Con los DNA molde que se purificaron previamente (ver apéndice II), se realizaron transcripciones *in vitro* para obtener las ribosomas sentido y antisentido correspondientes a la IL-2, IL-4, IL-10 y β-actina. Durante estas reacciones, se incorporaron nucleótidos marcados con digoxigenina (11-UTP-DIG), para lo que fue necesario cuantificar la concentración de RNA marcado en cada reacción. Estas cuantificaciones se realizaron mediante Dot Blots según el protocolo marcado en el apéndice II.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

B. Hibridaciones *in situ* (ISH)

Con las ribosondas marcadas obtenidas se realizaron ensayos de ISH para detectar la expresión de IL-2, IL-4 e IL-10. Como ya se mencionó, se efectuó la ISH del mRNA de la β -actina como control positivo, ya que el gen de la β -actina es un gen constitutivo de todas las células. Antes de trabajar con los tejidos, se realizaron ISH en células mononucleares sanguíneas de cerdo cultivadas con concanavalina A (ConA) para activar inespecíficamente a las células y forzar la expresión de diversos mRNAs, entre ellos los de citocinas. En la figura 16 se muestra la detección del mRNA de la β -actina; con la sonda sentido (que no hibrida) se aseguró que no existe fondo en la técnica por los reactivos empleados durante la hibridación; con la sonda anti sentido se confirmó que la señal observada fue específica.

Todas las células de esta misma muestra fueron positivas para la detección de mRNA de β -actina. Así mismo se realizó la detección del mRNA de la IL-2 (Figura 17), IL-4 (Figura 18) e IL-10 (Figura 19) en células mononucleares sanguíneas de cerdo por ISH en las mismas condiciones en las que se realizó la detección del mRNA de la β -actina. Un dato interesante, es que se logró obtener una buena señal del mRNA de la IL-2 e IL-4 a las 6 h de estimulación con ConA, pero no de la IL-10 la cual se observó hasta las 24 h de incubación con ConA (Figura 15).

En la detección del mRNA de la IL-2 e IL-4 (figuras 17 y 18) se observó un ligero color con la sonda sentido, sin embargo la señal obtenida por la sonda anti sentido fue más intensa por lo que las ribosondas de IL-2, IL-4 e IL-10 fueron adecuadas para la detección del mRNA correspondiente.

Con estos resultados se decidió realizar la detección de mRNA de cada citocina en tejido por ISH. Para tal fin, se trabajó con dos muestras de yeyuno de cerdo de 6 semanas de edad. Estas muestras fueron fijadas en para-formaldehído-lisina-peryodato (PLP) y después se incluyeron en parafina (ver material y métodos).

En la figura 14 se muestra la ISH para la detección del mRNA de la β -actina en yeyuno de cerdo. Con este resultado se logró confirmar que la técnica de ISH posee las condiciones adecuadas para detectar la expresión de mRNA en tejido.

Con lo observado en la figura 14, se realizó ISH en yeyuno de cerdo para detectar la expresión de mRNA de la IL-2 en la zona de las vellosidades (figura 20) y en la zona de las criptas (Figura 21) de un cerdo sano y de un infectado experimentalmente con *T. spiralis*. Se sabe que la intensidad de la marca puede considerarse directamente proporcional a la cantidad de mRNA presente, siempre y cuando las muestras se hayan trabajado bajo las mismas condiciones (Manual de Hibridación *In situ* de Boehringer, 1998). Así, se realizó una aproximación cualitativa y se observó un ligero aumento de la cantidad de mRNA expresado en las vellosidades de yeyuno del cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* en comparación con el animal control o sin infección.

Al parecer tanto las células de la LP como las del epitelio de las vellosidades expresaron mRNA de IL-2. Así mismo, las células del epitelio de las criptas fueron las que mostraron una mayor marca que las células de la LP de esta zona, además de que las células epiteliales de las criptas contienen una mayor cantidad de mRNA de la IL-2 comparada con las células epiteliales de las vellosidades. Sin embargo al comparar las criptas del tejido sin infección con el tejido infectado, se observó que en aquellas criptas de tejido sin infección, fueron pocas las células epiteliales que mostraron mRNA de IL-2 mientras que las células epiteliales de las criptas del animal infectado, en su gran mayoría, expresaron este mRNA. Es importante mencionar que la IL-2 es una citocina involucrada en la proliferación de diferentes estirpes celulares del sistema inmunológico en donde haciendo una aproximación cualitativa, también se puede decir que hubo un aumento en la cantidad de mRNA de esta citocina en los dos animales infectados trabajados.

En la figura 22 se muestra la detección del mRNA para la IL-4 por ISH en vellosidades de yeyuno de animales sin infección e infectados con *T. spiralis*. Una estimación cualitativa de la expresión de este mensajero señaló que el mRNA de la IL-4 es aproximadamente el doble que en las vellosidades de yeyuno de cerdos con infección comparada con el tejido sin infección. Esta expresión se pudo observar en células epiteliales y en las células de la LP. En la figura 22 se pudo observar, en el cerdo infectado, la presencia del estado adulto de *T. spiralis* invadiendo el epitelio de una vellosidad en donde la expresión de mRNA de IL-4 sobre las regiones cercanas al parásito no se vio alterada.

En la figura 23, se observó que en algunas criptas de animales sin infección hay células epiteliales que expresaron mRNA de la IL-4 así como células de la LP de esta zona. En las criptas de animales con *T. spiralis*, se observó una mayor proporción de células epiteliales que expresan mRNA de IL-4. Al parecer la infección con *T. spiralis* puede inducir un incremento en la expresión de IL-4 en células epiteliales y de la LP de las criptas.

En la figura 24 se muestra la expresión de mRNA de IL-10 por ISH. En esta figura se muestra un incremento cualitativo en la expresión de mRNA de estas citocinas en las vellosidades de yeyuno de animales infectados con *T. spiralis*. Esta expresión de mRNA se observó marcadamente en el epitelio de las vellosidades aunque las células de la LP también expresaron una buena cantidad de este mensajero.

La expresión del mRNA de la IL-10 en la zona de criptas también se vio incrementada en el tejido con *T. spiralis* comparado con 2 animales sin infección (Figura 25). En la figura 26 y 27 se puede observar que las células epiteliales de las vellosidades y de las criptas fueron las que expresaron una mayor cantidad de mRNA de la IL-10.

Sonda sentido

Sonda antisentido



Figura 14. Hibridación in situ de mRNA de la β -actina (200X). Se realizó la hibridación in situ (ver material y métodos) para la β -actina en ayuno de cerdo normal. Se detectó la hibridación entre el mRNA y la ribosonda marcada con DIG mediante la adición de un anticuerpos anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina. Se puede observar que se eliminó completamente la fosfatasa endógena del intestino. Esta hibridación fue el control positivo de la técnica.

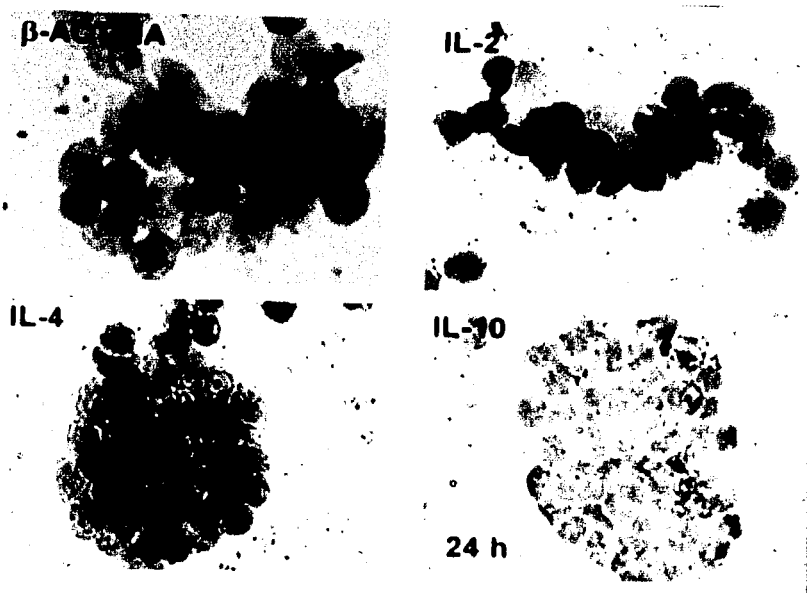
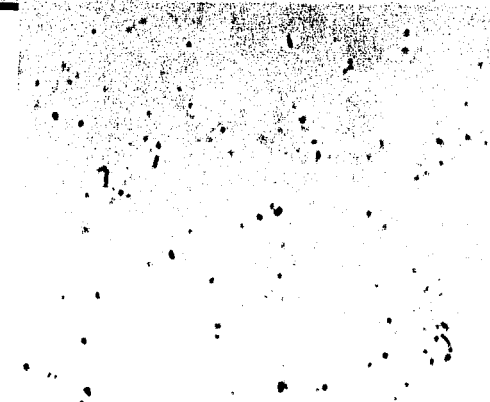


Figura 15. Hibridación in situ en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 horas con Concanavalina A. Estas células mononucleares fueron obtenidas de sangre periférica de un cerdo con cisticercosis. Se cultivaron con ConA por 6 y 24 h. Las células se cosecharon y se colocaron 15000 células en cada muestra mediante el cytospin (Shandon). Las células sobre el portaobjetos se fijaron y se les realizó ISH para detectar la expresión de mRNA de la β -actina, IL-2, IL-4 e IL-10. En esta figura se muestran las hibridaciones con las sondas antisentido. Estas células sirvieron como control positivo de expresión.

Sonda sentido



Sonda antisentido

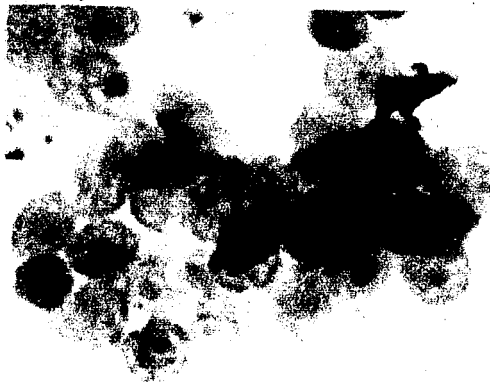
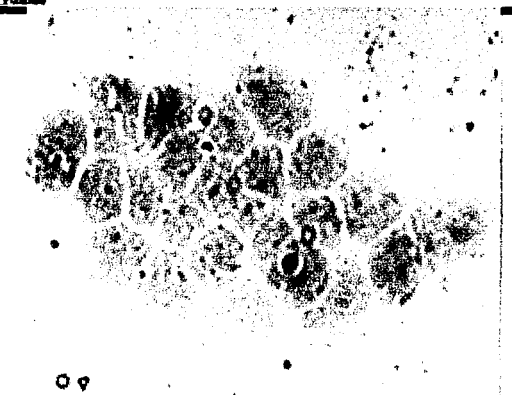


Figura 16. Hibridación in situ de mRNA de la β -actina en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 horas con Concanavalina A. En esta figura se muestra la hibridación de células mononucleares extraídas de sangre periférica de un cerdo infectado con cisticercosis. Las células fueron cultivadas por 6 h con ConA y posteriormente cosechadas. Estas células se fijaron y se les realizó ISH para detectar la expresión de mRNA de la IL-2. El fondo se ve morado por el filtro del microscopio. Fue necesario usar este filtro para poder hacer visibles a las células hibridadas con la sonda sentido.

Sonda sentido

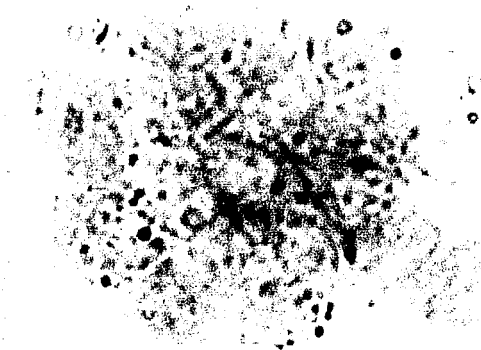


Sonda antisentido



Figura 17. Hibridación in situ de mRNA de IL-2 en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 horas con Concanavalina A Se muestra la hibridación de células mononucleares extraídas de sangre periférica de un cerdo con cisticercosis. Las células fueron cultivadas por 6 h con ConA y posteriormente oscochadas. Estas células se fijaron y se les realizó ISH para detectar la expresión de mRNA de la IL-2.

Sonda sentido



Sonda antisentido



Figura 18. Hibridación in situ de mRNA de IL-4 en células sanguíneas de cerdo cultivadas 6 horas con Concanavalina A. Se muestra la hibridación de células mononucleares extraídas de sangre periférica de un cerdo con cisticercosis. Las células fueron cultivadas por 6 h con ConA y posteriormente cosechadas. Estas células se fijaron y se les realizó ISH para detectar la expresión de mRNA de la IL-4.

Sonda sentido

Sonda antisentido

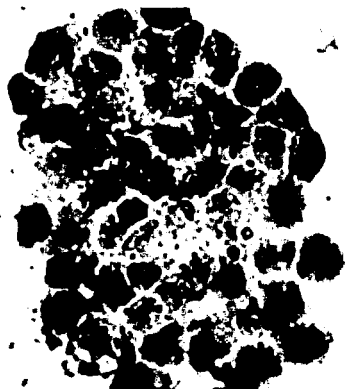
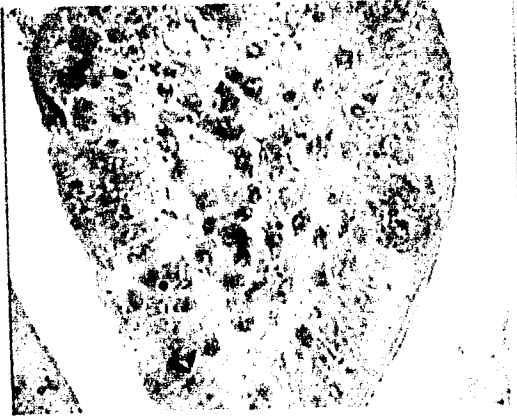


Figura 19. Hibridación in situ de mRNA de IL-10 en células sanguíneas de cerdo cultivadas 24 horas con Concanavalina A. Se muestra la hibridación de células mononucleares extraídas de sangre periférica de un cerdo con cisticercosis. Las células fueron cultivadas por 24 h con ConA y posteriormente cosechadas. Estas células se fijaron y se les realizó ISH para detectar la expresión de mRNA de la IL-10.

Sin infección



Infectado con *T. spiralis*

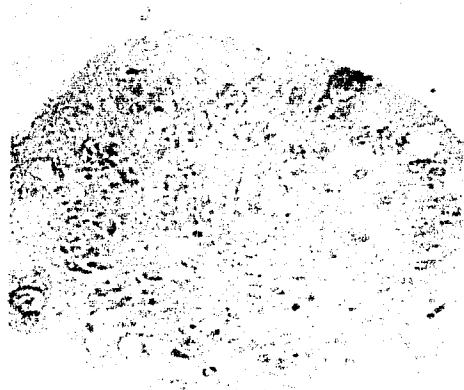


Figura 20. Detección de mRNA de IL-2 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (400X). Se realizaron cortes de yeyuno de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* y sin infección. Con estos se realizó hibridaciones *in situ* para detectar la diferencia en la expresión de mRNA de la IL-2 en las vellosidades de yeyuno de cerdo con y sin infección. Las muestras fueron trabajadas a la par.

Sin infección

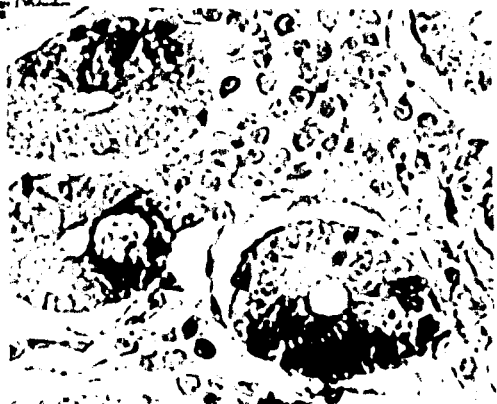
Infectado con *T. spiralis*

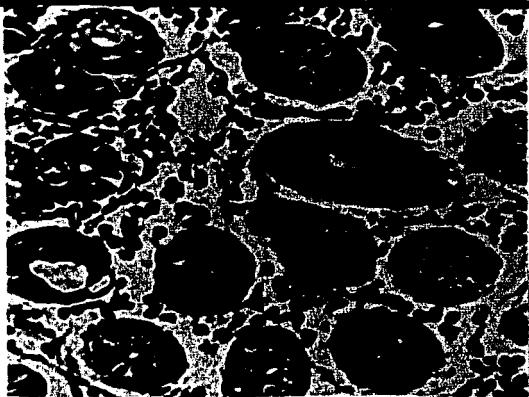
Figura 21. Detección de mRNA de IL-2 en criptas de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (400X). Se realizaron cortes de yeyuno de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* y sin infección. Con estos se realizó hibridaciones *in situ* para detectar la diferencia en la expresión de mRNA de la IL-2 en la zona de criptas de yeyuno de cerdo con y sin infección. Las muestras fueron trabajadas a la par. La señal positiva se observa de color rojo a morado.

Sin infección

Infectado con *T. spiralis*

Figura 22. Detección de mRNA de IL-4 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200X). Se realizaron cortes de yeyuno de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* y sin infección. Con estos se realizó hibridaciones *in situ* para detectar la diferencia en la expresión de mRNA de la IL-4 en las vellosidades de yeyuno de cerdo con y sin infección. Las flechas amarillas indican la presencia del parásito incrustado en la base de la vellosidad. Las muestras fueron trabajadas a la par. La señal positiva se muestra de color rojo a morado.

Sin infección



Infectado con *T. spiralis*

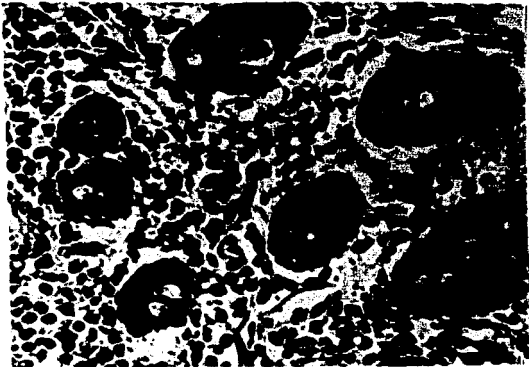


Figura 23. Detección de mRNA de IL-4 en criptas de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200X). Se realizaron cortes de yeyuno de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* y sin infección. Con estos se realizó hibridaciones *in situ* para detectar la diferencia en la expresión de mRNA de la IL-4 en la zona de criptas de yeyuno de cerdo con y sin infección. Las muestras fueron trabajadas a la par. La señal positiva se muestra de color rojo a morado.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Sin infección

Infectado con *T. spiralis*

Figura 24. Detección de mRNA de IL-10 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (200X). Se realizaron cortes de yeyuno de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* y sin infección. Con estos se realizó hibridaciones *in situ* para detectar la diferencia en la expresión de mRNA de la IL-10 en las vellosidades de yeyuno de cerdo con y sin infección. Las muestras fueron trabajadas a la par. La señal positiva se muestra de color rojo a morado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

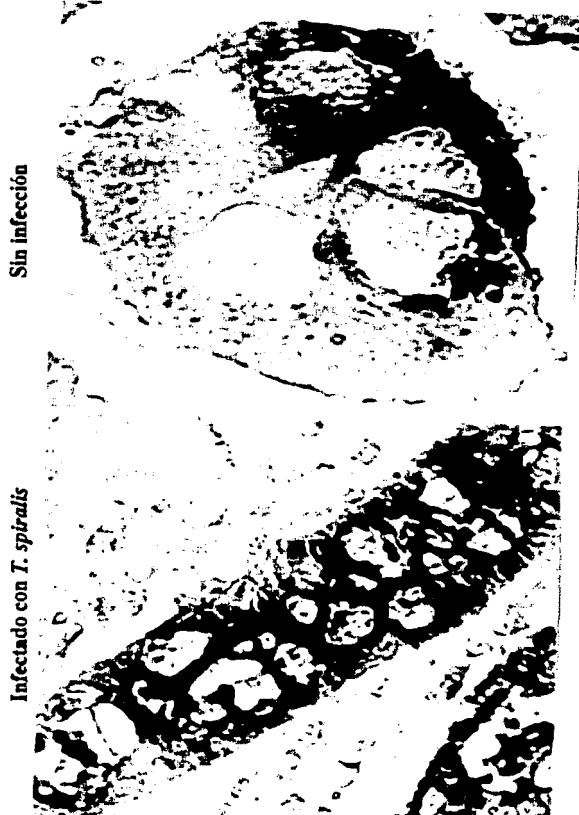


Figura 26. Detección de mRNA de IL-10 en las criptas de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (400 X). Se realizaron cortes de yeyuno de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* y sin infección. Esta es una ampliación de una de las criptas de la figura anterior. En estas criptas se ve una diferencia marcada en la cantidad y el número de células que expresan RNA de IL-10 entre estos dos tejidos. La señal positiva se observa de rojo a morado-azul.

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

Sin infección

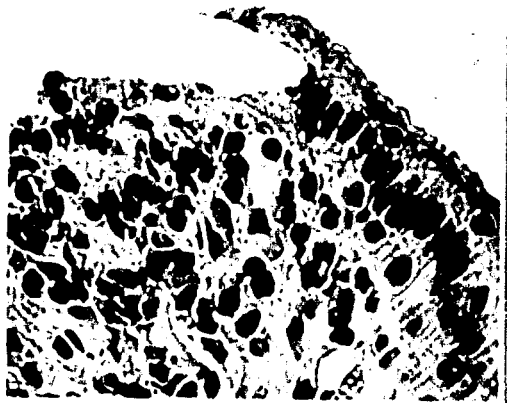
Infectado con *T. spiralis*

Figura 27. Detección de mRNA de IL-10 en vellosidades de yeyuno porcino por hibridación *in situ* (400 X). Esta es una amplificación de una de las vellosidades de cada muestra. En esta figura se observa la expresión diferencial del mRNA de la IL-10 entre estos tejidos. Así mismo se observa que las células epiteliales expresan este mensajero.

ES CON
FALLA DE ORIGEN

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El sistema inmunitario mucosal es uno de los componentes principales del sistema inmunológico y está constantemente expuesto a antígenos de los alimentos, microbianos y medioambientales. El tracto gastrointestinal (200-400 m³) se enfrenta a cientos de gramos de antígenos provenientes de los alimentos y esta exposición mucosal crea un interesante dilema entre montar una respuesta inmunitaria protectora en contra de patógenos o generar tolerancia en una circunstancia particular para no causar daño al tejido. Las funciones del sistema inmunológico mucosal se realizan a través de los linfocitos dispersos en la LP de la vellosidades y de la zona de criptas, en nódulos linfáticos, LIE, LPP y células accesorias como células dendríticas, células cebadas y eosinófilos (Stokes, Haverson y Bailey, 1996, Cummins y Thompson, 1999). Esta red de células está regulada por la producción de citocinas las cuales son capaces de inducir y amplificar la respuesta inmunológica humoral y la mediada por células (Husband *et al.*, 1999).

Las citocinas ejercen muchas actividades biológicas dependiendo del intervalo de expresión de sus receptores en diferentes células. Sus efectos son dependientes del contexto celular y del estímulo antigénico y pueden ser modulados por otros mediadores del crecimiento celular así como por la combinación de otras citocinas. La mayoría de las citocinas producidas por el sistema inmune tienen una función en la defensa del huésped contra de infecciones por patógenos (Meager, 1998).

De manera general, el sistema inmunológico puede generar 2 tipos de respuesta, la tipo TH1 que favorece la inmunidad celular, representada por la IL-2, IL-3, TNF- α , GMC-CSF, IFN- γ y linfotoxina, y la respuesta TH2 que estimula la inmunidad humoral y está representada por las IL-4, IL-5, IL-9, IL-10. Los factores que determinan la respuesta predominante (TH1 o TH2) frente a un patógeno en realidad no están bien definidos. Sin embargo se ha visto que un contacto entre microbios y células del sistema inmunitario innato (macrófagos, granulocitos, células cebadas, etc) estimula la producción de IL-12 e IL-4 las cuales inducen las respuestas de tipo TH1 o TH2 respectivamente (Husband, Capítulo. 10, 1999).

Es importante realizar estudios de la expresión de citocinas en el intestino, con objeto de conocer mejor los mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria local ante diferentes desafíos. En este trabajo se empleó como modelo al cerdo por diversas razones; el cerdo es un animal doméstico de importancia económica, sus hábitos alimenticios son semejantes al hombre, es decir, también es omnívoro, pero sobre todo es importante ya que es fisiológicamente muy parecido al sistema gastrointestinal humano lo que lo hace susceptible a infecciones parasitarias similares. Además de que existen pocos estudios de la regulación de la respuesta inmunológica en estos animales. En este trabajo se realizó la detección de la expresión de la IL-2 IL-4 e IL-10 por hibridación *in situ* (ISH).

La ISH es una herramienta que permite examinar la expresión génica a nivel de células individuales o en tejidos estructuralmente complejos. A semejanza del Northern blot, depende de la hibridación de la sonda marcada (RNA o DNA) con la secuencia del mRNA. La ISH generalmente permite detectar de 10-20 copias de mRNA por célula (Komminoth y Werner, 1997). En contraste, la capacidad de una buena inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de citocinas es limitada, debido a la naturaleza de estas moléculas, ya que son secretadas extracelularmente, se difunden rápidamente de su sitio de secreción y generalmente tienen una vida media muy corta, por lo que ISH presenta algunas ventajas. Otra de las ventajas de la ISH es que nos permite usar al máximo los tejidos que son obtenidos por biopsias, embriones y cultivos celulares además de que ayuda a determinar *in situ* las células que están expresando el ácido nucleico de interés. (Wilcox, 1993). En casos particulares, como en este trabajo, la ausencia de anticuerpos monoclonales contra la proteína impide la realización de una IHQ, por lo que se hace uso de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para la proteína y así diseñar las sondas específicas que detectan la expresión de cada mRNA de interés.

Entre las desventajas de la ISH está el tiempo empleado para su realización que va de 2 a 3 días (si es una detección no isotópica, de lo contrario el tiempo se amplía a semanas o meses), se necesita experiencia para el manejo de tejidos y sobre todo para manejar adecuadamente los ácidos nucleicos, en especial RNA, para la generación de las sondas que se van a emplear (Wilcox, 1993; Komminoth y Werner, 1997).

La imagen de la expresión de un gen a nivel celular puede aportar información acerca de la función de un producto génico dentro de un tejido (Yang *et al.*, 1999). Por lo que se realizó la estandarización de la técnica de ISH para detectar mRNA de la IL-2, IL-4 e IL-10 y determinar el tipo de respuesta inmunológica que se genera en el intestino de cerdo. Se empleó la IL-2 como prototipo de una respuesta inmunitaria TH1, y la IL-4 e IL-10 como prototipo de una respuesta tipo TH2. En el caso de la IL-10 también se puede considerar parte de la respuesta tipo TH3, sin embargo el TGF- β , es la citocina prototipo de esta respuesta. Para poder diferenciar adecuadamente la expresión de la respuesta TH1 se necesita evaluar la expresión de mRNA del IFN- γ ya que se sabe que esta citocina inhibe la expresión de citocinas tipo TH2 (Meager, 1998).

Antes de iniciar la estandarización de la técnica de ISH se comprobó, mediante PCR, que el intestino de cerdo expresa al menos mRNA de la IL-2 e IL-4 (Figura 7) siendo esto la base para su búsqueda por ISH y parte de la estandarización de esta técnica fue la obtención de las sondas apropiadas. Los plásmidos pUC19-2 y pUC19-4 permitieron obtener por PCR el DNA apropiado de la IL-2 e IL-4 respectivamente para obtener las ribosondas mediante transcripción *in vitro* ya que poseen clonado el cDNA de cada citocina (Figura 8). En el caso de la IL-10, el DNA molde se obtuvo por RT-PCR partiendo de RNA total de células mononucleares sanguíneas de cerdo (Figura 6 y 8). Fue necesario este procedimiento ya que no se cuenta con el cDNA de la IL-10 clonado dentro de un vector adecuado. Este DNA también se sometió a transcripción *in vitro* para obtener la ribosonda correspondiente (Birk y Grimm, 1994). Esta estrategia en particular facilita la obtención de sondas para identificar la expresión de mRNA o de DNA de cualquier proteína a la cual se le conozca su secuencia nucleotídica sin necesidad de clonarla en un vector. Con este procedimiento se pueden obtener sondas de DNA (solo RT-PCR) o sondas de RNA, en donde los oligonucleótidos empleados en la RT-PCR contienen la secuencia de un promotor que facilite la transcripción y así obtener ribosondas.

Las ribosondas marcadas con digoxigenina de las citocinas de trabajo, tuvieron una concentración promedio de 12.5 ng/ μ L de RNA marcado, siendo esto una buena eficiencia de marcado, lo que permitió realizar la estandarización de la ISH (Figura 13, cuadro 3).

El marcaje de sondas no-isotópico puede ofrecer una sensibilidad muy similar a un radiomarcaje, además de que el tiempo de término de la ISH disminuye y sin riesgos de contaminación (Kominoth *et al.*, 1992). Aunque la reacción para la obtención de color en el caso de la fosfatasa alcalina asociada con digoxigenina es una reacción de óxido-reducción donde se obtiene un precipitado, el método de radiomarcaje nos permite una mejor resolución para la visualización de granos dado por la hibridación con los ácidos nucleicos (Karr, 1995).

Una vez obtenidas las herramientas necesarias se ejecutó la estandarización de la técnica de ISH dentro del sistema de yeyuno de cerdo. Se realizaron ISH para el mRNA de β -actina (gen constitutivo de todas las células), la cual fue positiva, lo que mostró que la técnica funcionó adecuadamente bajo las condiciones establecidas en la sección de material y métodos de esta tesis. Es importante mencionar que la temperatura de hibridación (60 °C) fue la óptima para hibridar específicamente las 3 sondas empleadas. Los lavados de astringencia (formamida y SSC) y la concentración de la solución de bloqueo (al 5 % por 2 horas) fueron parámetros importantes para la estandarización de la técnica disminuyendo el color del fondo. Otro parámetro importante fue el tiempo de incubación con el anticuerpo anti-DIG conjugado con la fosfatasa alcalina (toda la noche a 4 °C), el cual no incrementó el color del fondo y la incubación de las laminillas con el sustrato de la enzima (NBT/BCIP) fue variada (de 20 minutos a 2-3 horas) dependiendo de la concentración de la sonda marcada y del mRNA blanco, evitando así un exceso de fondo. El producto de reacción del NBT/BCIP es insoluble en agua, permitiendo su localización histoquímica. Para bajos números de copias de especies de mRNA, las ribosondas marcadas con DIG no pueden ser detectadas con Ab anti-DIG fluoresceinados. Se ha reportado que los protocolos que emplean ribosondas marcadas con DIG y reveladas con NBT/BCIP son sensibles para la detección de mRNA comparable con protocolos donde usan ribosondas radiomarcadas. Una ventaja adicional del sistema de marcado con digoxigenina es la estabilidad prolongada de las sondas marcadas a -80 °C .

Una de las desventajas del uso de anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina es que los tejidos por sí mismos tienen fosfatasa alcalina (fosfatasa alcalina endógena), y en este trabajo demostramos que los tratamientos que sufre la muestra procesada para la ISH, eliminan el efecto de la fosfatasa alcalina endógena (Karr *et al.*, 1995).

Otro de los controles que ayudó para la estandarización de la ISH fue el empleo de células mononucleares de sangre periférica de cerdo activadas con concanavalina A (Con A). Con A es una lectina capaz de activar inespecíficamente (vía integrinas) las tirosinas cinasas, las cuales mediante la vía de transducción de señales JNK y MAPK activan factores de transcripción como fos y jun (AP-1) y STAT, los cuales se unen en la región reguladora no traducible (UTR) en el extremo 5' de cada gen para activar la transcripción de los mRNA de las diferentes citocinas (Meager, 1998).

Con estas células activadas se comprobó que las ribosondas obtenidas en esta tesis, fueron capaces de detectar específicamente la expresión de mRNA de la IL-2, IL-4 e IL-10, *in situ* sobre diferentes muestras de yeyuno de cerdo.

Las sondas marcadas con DIG y reveladas con NBT/BCIP demuestran una tinción en citoplasma y en núcleo tanto en células individuales (cystospin) como en tejido. La presencia de mRNA en el núcleo puede explicarse debido a que en el núcleo existe mRNA inmaduro (RNA con intrones y exones) que puede hibridar con las ribosondas diseñadas ya que estas son pequeñas (164 -220 pb), además de que las sondas menores a 200 pb pueden unirse inespecíficamente a proteínas nucleares (Bienz y Egger, 1995), lo que explica el ligero fondo que se observa en las ISH de los mRNA de la IL-2 e IL-4 presentadas en este trabajo.

Se ha demostrado que la sensibilidad de la ISH permite observar diversas e importantes características sobre la activación de células T y el patrón de expresión de mRNA de citocinas en células individuales y en tejido, es decir, con esta técnica se puede determinar cuáles células están siendo activadas a través de diferentes estímulos.

Tomando en consideración los resultados obtenidos con las ISH en tejido, el sistema inmunitario del tracto intestinal, específicamente el yeyuno de cerdo en condiciones normales puede expresar mRNA de IL-2, IL-4 e IL-10, principalmente por las células epiteliales de las vellosidades y de las criptas. Se ha visto que la IL-2 es secretada por células T, células NK, macrófagos y células B y se sabe que en las vellosidades encontramos LIÉ, en la LP encontramos, LLP, macrófagos, células NK y células B (LP de criptas). Se ha visto que los LLP aislados del intestino de cerdo producen RNA de IL-2 seguido de una activación policlonal (Bailey, Hall y Stokes, 1994). Además de que se ha reportado que las células cebadas de ratones expresan también IL-2, por lo que el resultado encontrado en la ISH en yeyuno de cerdo esta relacionado con lo encontrado en la literatura (Justement, Kreiger y Cambier, 1989; Else y Finkelman 1998).

La IL-4 es una citocina secretada por células T y por células cebadas localizadas en la LP de las vellosidades y las criptas. Esta citocina es importante para inclinar la respuesta a TH2 (Ebert y Roberts, 1996). Bailey y colaboradores en 1994, encontraron por ensayos *in vitro* que los LLP de cerdo, mantienen alta la transcripción del mRNA de la IL-4, lo que podría coincidir con la expresión de mRNA de este citocina detectada en yeyuno de cerdo por ISH. La IL-4 tiene un papel *in vivo* un tanto complejo en el cual se cree que estimula el incremento de eosinófilos, probablemente por la inducción de la IL-5. Un incremento en la expresión de IL-4 entonces llevará a una presencia de eosinofilia en el intestino favoreciendo una reacción inflamatoria que ayude a expulsar algunos parásitos como *T. spiralis* (Meager, 1998).

La IL-10 es una citocina muy interesante ya que está involucrada en mantener la tolerancia oral además de que inhibe la expresión de citocinas del tipo TH1. Esta citocina es expresada por células T, células B1, células cebadas, macrófagos y queratinocitos humanos (Husband, *et al.*, 1999). Los resultados mostrados en esta tesis indican la presencia de mRNA de IL-10, principalmente en las células epiteliales de las vellosidades y las criptas.

Autoschibach y colaboradores en 1998, encontraron por ISH que las células epiteliales de las vellosidades y de la zona de criptas del intestino grueso de humanos expresan en forma difusa mRNA de IL-10 y por inmunohistoquímica encontraron que la proteína esta localizada en células epiteliales y en una menor proporción por células mononucleares de LP. En cerdos solo se ha reportado la presencia de mRNA de IL-4 e IL-10 en colon de animales infectados con *S. japonectum* (Oswald *et al.*, 2001) y producción de mRNA de IL-10 en ganglios linfáticos mesentéricos de colon (Masnfield *et al.*, 1998). Por lo tanto se puede plantear que la IL-10 es una de las citocinas que se expresa en mayor cantidad en el intestino para mantener la tolerancia oral y para regular las respuestas inflamatorias que se presenten.

De las tres citocinas analizadas, se observó una mayor expresión del mRNA de la IL-10. Es importante mencionar que no todo el mRNA que se transcribe se traduce, por lo que no se asegura que se produzcan las tres citocinas al mismo tiempo. Los mRNA de citocinas dejan el núcleo y son traducidos por polirribosomas en el retículo endoplásmico. La traducción (síntesis de la proteína) de las citocinas esta sujeta a procesos reguladores que aún no están definidos (Meager, 1998) y se puede considerar que esto depende del contexto celular. Además es también importante mencionar que el mRNA tiene una vida media definida que puede ir de minutos a horas y si no estan presentes todos los factores necesarios para la traducción, el mRNA decae (es degradado por un complejo proteico llamado degradosoma) y la cantidad de proteína disminuye.

Sin embargo, de acuerdo a las funciones de la IL-2, IL-4 e IL-10 se puede decir que se esta desencadenando una respuesta inmunológica inclinada a TH2 aunque no se descarta un balance con la respuesta TH1 por la expresión del mRNA de la IL-2. Al parecer la IL-2 podría ser común para la respuesta TH1 y TH2 ya que su principal función es la de estimular el crecimiento de las células T y actúa como factor de maduración y diferenciación de células B y células T (Meager, 1998), por lo que es necesario que se determine la expresión de IFN- γ como prototipo de la respuesta tipo TH1. El balance entre estas dos sub poblaciones puede ser muy importante para mantener la homeostasis mucosal y la defensa del hospedero contra varios patógenos (Husband, capítulo 10, 1999).

Dentro del sistema de estandarización de la ISH se encontró que esta técnica es capaz de detectar la diferencia en la expresión de mRNA de citocinas entre un yeyuno de cerdo infectado con *T. spiralis* y otro sin infección. En estos experimentos la expresión de mRNA de IL-10 en las muestras de yeyuno de dos animales (experimentos por triplicado) sobresale, lo que sugiere que se está desencadenando una respuesta TH2 formal por la expresión de IL-4 e IL-10. Sin embargo, este resultado es preliminar, se necesitan más experimentos para aseverar esta situación. La IL-10 está relacionada también con una respuesta tipo TH3 (o Tr1), ya que se ha visto que linfocitos TH3 producen altos niveles de esta citocina. La respuesta tipo TH3 también esta representada por producción del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β), por lo que se necesitará detectar la expresión de esta citocina para evidenciar o no este tipo de respuesta (Kitani *et al.*, 2000).

Las infecciones por helmintos están asociadas con respuestas de tipo TH2 más que con TH1, pero la respuesta puede depender de la enfermedad; una respuesta TH1 puede encontrarse en estados tempranos y la respuesta TH2 en estados tardíos. En ratones las infecciones por *H. polygyrus*, *N. Brasiliensis* y *T. canis*, aparentemente inducen una respuesta TH2 mientras que *T. spiralis* y *S. mansoni* inicialmente inducen una respuesta TH1 la cual es reemplazada mas tarde por una respuesta TH2. Cuando la respuesta TH2 es dominante la IL-4 e IL-5 son secretadas permitiendo una alta y persistente secreción de anticuerpos (IgE, IgA) y es concomitante con la expansión, activación e incremento de eosinófilos y células cebadas (Meager, 1998).

El papel de los eosinófilos en la resistencia del hospedero hacia helmintos *in vivo* permanece aun confuso; *in vitro* se les ha encontrado una actividad citotóxica potencial. El efecto de los eosinófilos en la resistencia a *T. spiralis* depende en gran parte de la variabilidad genética de cada hospedero (Lammas *et al.*, 1992). Aún no está claro si los eosinófilos actúan en contra de los helmintos en humanos y de hecho hay pocos reportes del papel de las células TH2 en infecciones parasitarias en ambas especies. Sin embargo la inducción de la respuesta TH2 por parásitos permite la generación de la eosinofilia y la producción de grandes cantidades de sustancias inflamatorias, lo que puede contribuir a la inmunopatología asociada con infecciones por helmintos.

La producción de muchas citocinas es controlada por mecanismos transcripcionales y traduccionales que aun no están bien establecidos, por lo que el uso de la ISH puede ser de gran utilidad para la investigación de la activación de células T, patrones de citocinas y la localización histológica de las células que expresan las citocinas en lesiones inflamatorias (Karr *et al.*, 1995). Además los estudios *in situ* son importantes para determinar la regulación de la respuesta inmunológica de la mucosa intestinal, ya que esta difiere de la respuesta sistémica. Una de las habilidades de sistema inmunitario es reconocer el repertorio de antígenos que han sido generados durante la evolución. El sistema inmunológico mucosal, a diferencia del sistémico, está relacionado con una mayor cantidad de antígenos debido a que es la superficie de contacto más extensa del organismo. El isotipo de inmunoglobulinas en el sistema inmune sistémico difiere de las generadas en el sistema mucosal, por ejemplo, en sangre IgG es la inmunoglobulina en mayor concentración y la IgA dimérica en las mucosas. Bailey y colaboradores en 1999, observaron que la transcripción y secreción de la IL-2 permanece constante en LLP aislados de intestino de cerdo y disminuye cuando son activados, mientras que los linfocitos de sangre periférica de cerdo expresan y secretan citocinas cuando son activados con agentes mitogénicos como la Con A. Ebert y Roberts en 1996, encontraron que los linfocitos intraepiteliales al ser activados *in vitro* con IL-2 en presencia de la IL-4 secretada por LPL, muestran una reducción en su proliferación y citotoxicidad, lo que podría explicar la respuesta baja de los linfocitos intraepiteliales. En este trabajo se detectó la producción de mRNA de IL-4 en yeyuno de cerdo la cual podría ayudar a explicar la baja reactividad de los LLP del intestino que podría ayudar en alguna forma a mantener la tolerancia oral, además de la expresión de mRNA de IL-10, que es la citocina importante en este fenómeno. Es por esto que es importante estudiar las respuestas inmunitarias sistémicas y mucosales con más detalle para determinar sus diferencias en función y regulación.

CONCLUSIONES

- Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos específicos para el mRNA de las IL-2, IL-4 e IL-10 de cerdo que contienen una secuencia adicional de los promotores de transcripción procarióticos de SP6 y T7.
- Con los oligonucleótidos diseñados se realizó la obtención de ribosondas para detectar la expresión de mRNA de las IL-2, IL-4 e IL-10.
- El empleo de esta estrategia facilita la obtención de sondas específicas para determinar la expresión de cualquier proteína a nivel de ácido nucleico, cuya secuencia nucleotídica sea conocida.
- Se logró detectar la expresión de mRNA de las IL-2, IL-4 e IL-10 en yeyuno de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* y sin infección, por hibridación *in situ* con las ribosondas obtenidas.
- La expresión de mRNA de la IL-2, IL-4 e IL-10 se vio incrementada en yeyuno de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis*.
- La expresión de mRNA de la IL-2, IL-4 y principalmente de la IL-10 se observó preferentemente en células epiteliales, las cuales podrían formar parte de las células accesorias del sistema inmunitario mucosal.
- Este trabajo deja abierta la posibilidad de que en el intestino se desencadene una respuesta inmunitaria tipo TH2 y TH3 principalmente, es decir, no son excluyentes, lo que podría explicar la prolongada permanencia del parásito en el intestino porcino como parte del fenómeno de tolerancia oral y evidenciaría las diferencias entre la respuesta inmunológica sistémica y la respuesta inmunitaria mucosal.

REFERENCIAS

- Abeshiera O, Gibert M, Joly M, Théza J y Jankovic D. 1992. "IL-4 plays a dominant role in the differential development of TH0 into TH1 and TH2". *J. Immunol.* **148**: 3820-3829.
- Abreu-Martin M y Targan S. 1996. "Regulation of immune Responses of the intestinal mucosal". *Cri. Rev. Immunol.* **16**:277-309.
- Aranda R, Sydora B y Kronenberg M. 1999. Capítulo 26. Intraepithelial lymphocytes functions. En "Mucosal Immunology". Pearay L, Mesyecky J, Lamm M, Strober W, Bienstock J and McGhee J Editores. Segunda edición. Academic Press. San Diego CA. EE.UU. pp.429-437.
- Asseman C y Powrie F. 1998. "Interleukin 10 is a growth factor for population of regulatory T cells". *Gut.* **42**(2):157-168.
- Autschbach F, Braunstein J, Helmke B, Zuna I, Schürmann G, Niemir Z, Wallich R, Otto H y Meuer S. 1998. "In situ Expression of interleukin-10 in Noninflamed Human Gut in inflammatory Bowel Disease". *Am. J. Pathol.* **153**: 121-130.
- Bailey M., Perry A., Bland P., Stokes C, y Hall L. 1993. "Nucleotide and deduced amino acid sequence of porcine interleukin 4 cDNA derived from lamina propria Lymphocytes". *Biochimica et Biophysica Acta.* **1171**: 328-330.
- Bailey M., Hall L., Bland E, y Stokes R. 1994. "Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal lamina propria of pigs". *Immunology* **82**:577-583.
- Bailey M, Haverson K y Stokes C. 1997. "Models for the function of T cells in the intestinal lamina propria". *Periodicum Biologorum.* **99**(3):307-311
- Bailey M, Plunkett A, Clarke D, Sturgess K, Haverson K, y Stokes C. 1998. "Activation of the T cells from the intestinal lamina propria of the pig". *Scand. J. Immunol.* **48**:177-182.
- Balkwill R.F. "Cytokines. A practical Approach". 1995. Second Edition. Irl Press. New York. EE.UU. 1-54.
- Beagly K W. y Husband A. J. 1998. "Intraepithelial Lymphocytes: Origins, Distribution and Function". *Cri. Rev. Immunol.* **18**: 237-254.
- Beesley J. 1993. "Immunocytochemistry A Practical Approach". IRL Press. New York. U.S.A. 177-238.
- Bienz K. y Egger D. 1995. "Immunocytochemistry and in situ hybridization in the electron microscope: combined application in the study of virus-infected cells". *Histochem.* **103**: 325-338.
- Birk P. E. y Grimm P. 1994. "Rapid nonradiative in situ hybridization for interleukin-2 mRNA with riboprobes using the polymerase chain reaction". *J. Immunol Methods.* **167**: 83-89.
- Blancho G., Gienello P., Germana S., Baetscher M., Sachs D. y LeGuern C. 1995. "Molecular identification of porcine interleukin 10: Regulation of expression in kidney allograft model". *Immunology.* **92**: 2800-2804.
- Böyum A.1976. "Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages". *Scand. J. Immunol.* **5**:suppl5,9-14

- Briere F., Servet-Delprat C., Bridon J.M., Saint-Remy J.M. y Banchereau J. 1994. "Human Interleukin 10 Induces Naive Surface Immunoglobulin D+ (sIgD) B Cells to Secret IgG1 and IgG3". *J. Exp. Med.* 179: 757-762.
- Bromley L., Mc Carthy SP, Stickland JF, Lewis CE, McGee JO. 1994. "Non-isotopic *in situ* detection of mRNA for interleukin-4 in archival human tissue". *J. Immunol. Methods.* 167(1-2):47-54.
- Brown M. y Hural J. 1997. " Functions of IL-4 and Control of Its Expression". *Cri. Rev. Immunol.* 17: 1-32.
- Chris K.F.L., Seth R. y Gray T. 1998. "Production of proinflammatory Cytokine and inflammatory Mediators in Human Intestinal Epithelial Cells after Invasion by *T. spiralis*". *Am. Soc. Microbiol.* 60(5): 2200 – 2023.
- Chomczynski P y Sacchi N. 1987. "Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction". *Analytical Biochemistry.* 162, 156-159.
- Clemens MJ. 1991. " Cytokines". BIOS Scientific Publishers Limited.Oxford Gran Bretaña: 1-38
- Cummins A y Thompson F. 1997. "Postnatal changes in mucosal immune response: A physiological perspective of breast feeding and weaning". *Immunol. Cell. Biol.* 75, 419-429.
- Denning T, Campbell N, Song F, Garofalo R, Klimpel G, Reyes V y Ernst P. 2000. "Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine". *Int. J. Immunol.* 12(2):133-139.
- Dijkman S, Mentzel A, Jong y Assmann J. 1995. " RNA *in situ* using Digoxigenin-labeled cRNA Probes. *Biochemica.* 2: 23-27.
- Ebert E y Roberts A. 1996. "IL-4 down-regulates the responsiveness of human intraepithelial lymphocytes". *Clin. Exp. Immunol.* 105: 556-560
- Else, F.D. Finkelman, C.R. y Maliszewski. 1994. " Cytokine-mediated Regulation of Chronic Intestinal Helminth Infection ". *J. Exp. Med.* 179:347-351.
- Else KJ. y Finkelman FD. 1998. "Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms". *Int. J. Parasitol.* 28(8):1145-1158.
- Elson Ch., O. y Mestecky . 1995. Capitulo 10. The Mucosal Immune System, en "Infections of the Gastrointestinal Tract". Blaser M, Smith P, Ravdin J, Greenberg H y Guerrant R. Raven Press, Ltd., Nueva York. 153-162.
- Finkelman F, Pearce E, Urban J y Sher A. 1991. " Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses". *Immunol. Today.* A62-A65
- Gall J. y Pardue M. 1969. "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 63(2):378-384.
- Gendelman H, Monech T, Narayan O, y Griffin D, 1983. " Selection of fixative for identifying T cell subsets , B cells and macrophages in paraffin-embedded mouse spleen". *J. Immunol. Methods.* 65: 137-145.
- Goodall J., Emery D., Bailey M., English L. y Hall L. 1991. " cDNA cloning of porcine interleukin 2 by polymerase chain reaction". *Biochemica et Biophysica Acta.* 1089: 257-258.
- Grecnis R, Hültner y Else K. 1991. "Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cells subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes". *Immunology.* 74: 329-332.

- Grencis R.K. Else K.J. Huntley J.F. y Nishikawa S.I. 1993. "The in vivo role of stem cell factor (c-kit ligand) on mastocytosis and host protective immunity to the nematode *Trichinella spiralis* in mice". *Parasite Immunology*. 15: 55-59.
- Haverson K, Stokes C y Bailey M. 1997. "Immunological Structure and Antigen- Presenting cells in the intestinal lamina propria". *Periodicum Biologorum*. 99(3): 335-341.
- Herrington C y McGee J. 1992. "Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach". IRL Press, New York. Capítulos 1-5. pp 1-218.
- Husband A, Kenneth W, Beagly J y McGhee. 1999. Capítulo 32 Mucosal cytokines, en "Mucosal Immunology". Pearay L, Mesyecky J, Lamm M, Strober W, Bienestock J and McGhee J Editores. Segunda edición. Academic Press. San Diego CA. E.U. pp.541-557.
- Iwasaki A, y Kelsall B. 1999. "Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses" *Am. J. Physiol*. 276: G1074-G1078.
- James S. P. 1995. Capítulo 15 Cellular Immune Mechanism of Defense in the Gastrointestinal Tract, en "Infections of the Gastrointestinal Tract". Blaser M, Smith P, Ravdin J, Greenberg H y Guerrant R. Raven Press, Ltd., Nueva York. 213-226.
- James S y Kiyono H. 1999. Capítulo 23 Gastrointestinal Lamina Propria T cells, en "Mucosal cytokines" en "Mucosal Immunology". Pearay L, Mesyecky J, Lamm M, Strober W, Bienestock J and McGhee J Editores. Segunda edición. Academic Press. San Diego CA. EE.UU. pp.381-396.
- Justement I., Kreiger J. y Cambier K. 1989. "Production of multiple lymphokines by the A20.1 B cell lymphoma after cross-linking from membrane Ig Inmobilized anti-Ig. *J.Immunol*. 143: 881-889.
- Karr I., Panoskaltis A, Jimin L, Weaver C y Bucy R. 1995. "In situ hybridization for cytokine mRNA with digoxigenin-labeled riboprobes. Sensitivity of detection and double label applications". *J. Immunol Methods*. 182: 93-106
- Kenneth R., Philip S., West G., Cominelli F., Rachmilewitz D., Klein J. y Fiocchi C. 1993. "Localization of Intestinal Interleukin 1 Activity and Protein and Gene Expression to Lamina Propria Cells". *Gastroenterology*. 104:749-758.
- Kilshaw P., J. y Murrant S.J. 1990. "A New Surface Antigen on Intraepithelial Lymphocytes in the Intestine". *Immunology*. 20: 2201-2207.
- Kitani A, Chua K, Nakamura K y Strober W. 2000. "Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of TH3/T regulatory cell 1 T cells". *J. Immunol*. 165:691-702.
- Komminoth P., Merk F.B., Leav Y., Wolfe H.J. y Roth J. 1992. "Comparison of ³⁵S- and digoxigenin-label RNA and oligonucleotide probes for in situ hybridization". *Histochem*. 98: 217-228.
- Krause I, Blank M y Shoenfeld Y. 2000. "Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance". *Cri. Rev. Immunol*. 20: 1-16.
- Lammnas D, Wakelin D, Mitchell L, Tuohy M, Else K y Grencis R. 1992. "Genetic influences upon eosinophilia and resistance in mice infected with *Trichinella spiralis*". *Parasitology*. 105: 117-124.
- Lachumanan R, Armugam A, Durairaj P, Gopalakrishnakone P, Tan C y Jayaseelan K. 1999. "In situ Hybridization and Immunohistochemical Analysis of the expression of cardiotoxin of neuroxin genes in *Naja naja sputatrix*". *J. Histochem. Cytochem*. 47: 551-560.

- Liu Y, Wei S, Ho A, Malefyt R y Moore K. 1994. "Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor". *J. Immunol.* 152:1821-9
- Lorentz A, Schowenbergs S, Sellege G, Manns M y Bischoff S. 2000. "Human Intestinal Mast Cells are Capable of Producing Different cytokine Profiles: Role of IgE Receptor Cross-Linking and IL-4". *J. Immunol.* 164: 43-48.
- Mansfield L, Urban D, Holley-Shanks R, Murtargh M, Zarlenga D, Canals A, Gause W y Lunney S. 1998. "Construction of internal cDNA competitors for measuring IL-10 and IL-12 cytokine gene expression in swine". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65(1):63-74.
- Martínez I, Gutiérrez O, Romero R, Fernández P, Vázquez T, Pérez L. 2000. "Producción de anticuerpos monoclonales contra la larva recién nacida de *Trichinella spiralis*". *Rev. Mex. Patol. Clin.* 47:156-161.
- Mayrhofer, G y Whately, R. 1983 "Granular intraepithelial lymphocytes of the rat small intestine". *Int. Arch. Aller. Appl. Immunol.* 71:317-327.
- McGee D., Beagley K., Aicher E., McGhee J. 1993. "Transforming growth factor- β act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6". *J. Immunol.* 151(2):970-978.
- McGee D, Vitkus S. y Lee P. 1996. "The Effect of Cytokine Stimulation on IL-1 Receptor mRNA Expression by Intestinal Epithelial Cells". *Cell. Immunol.* 168: 276-280.
- McLane IW, y Nakane PK. 1974. "Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy". *J. Histochem. Cytochem.* 22(12):1077-83.
- Meager T. "The molecular biology of cytokines". 1998. John Wiley & Sons. EE.UU. 16-234.
- Morgan D, Ruscetti F y Gallo R. 1976. "Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow". *Science.* 193:1007-1008.
- Moore K, O'Garra A, Waal Malefyt R, Vieira P y Mosmann T. 1993. "Interleukin 10". *Annu. Rev. Immunol.* 11:165-190.
- Mosmann T. y Moore K. 1991. "The role of IL-10 in cross regulation of TH1 and TH2 responses". *Immunol. Today.* 12: A49-A53
- Mowat A y Viney J. 1997. "The anatomical basis of intestinal immunity". *Immunological Reviews.* 156: 145-166.
- Niimura M. y Tatsuoka H. 1996. "*Trichinella spiralis*: Ultra structural Localization of target Antigen Recognized by monoclonal Antibody". *Int. J. Parasitol.* 22(7): 865-872.
- Oswald P, Dozois C, Barlagne R, Fournout S, Johansen M y Bogh H. 2001. "Cytokine mRNA expression in pigs infected with *Schistosoma japonicum*". *Parasitology.* 122(pt 3): 299-307
- Paul J. 1991. "Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine". *Blood.* 77:1859-1870.
- Rachmilewitz D., Simon R., Sjogren J., Dondacaro M., Wasserman A. y Boedeker E. 1988. "Interleukin-1: a sensitive marker of colonic inflammation". *Gastroenterology.* 9: A363-A369.
- Radema S., Van Deventer S. y Cerami A. 1991. "Interleukin 1 β is expressed predominantly by enterocytes in experimental colitis". *Gastroenterology.* 100: 1180-1187.
- Rousset F, Garcia E y Banchereau J. 1991. "Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen". *J. Exp. Med.* 173:705-710.
- Roitt I, Brostoff J. y Male D. 1996. "Immunology". Cuarta edición en Inglés. Ed. Mosby. España.

- Sambrook J, Fritsch E y Maniatis T. 1989. "Molecular Cloning: a laboratory manual". Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EUA.
- Schad A., Fahimi H., Völki A. y Baumgart E. 1996. "Nonradioactive In situ Hybridization for Detection of mRNAs Encoding for Peroxisomal Proteins: Heterogeneous Hepatic Lobular Distribution after Treatment with a Single Dose of Bezafibrate". *J. Histochem. Cytochem.* **44** (8): 825-834.
- Speel E., Herbergs J. Ramackers F., y Hopman H. 1994. "Combined Immunocytochemistry and Fluorescence In situ Hybridization for Simultaneous Tricolor Detection of Cell Cycle, Genomic, and Phenotypic Parameters of tumor Cells". *J. Histochem. Cytochem.* **42**(7): 961-966.
- Speel E., Herbergs J. Ramackers F., y Hopman H. 1994. "A novel Triple-color Detection Procedure for Brightfield Microscopy, combining In situ Hybridization with Immunocytochemistry". *J. Histochem. Cytochem.* **42**(10): 1299-1307.
- Stokes CR, Haverson K y Bailey M. 1996. "Antigen presenting cells in the porcine gut". *Vet. Immunol. Immunopathol.* **54**: 171-177.
- Sugamura K, Asao H, Tanaka K, Ishii N, Ohno K, Nakamura M, y Takeshita T. 1996. "The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID" *Ann. Rev. Immunol.* **14**: 179-205
- Targan S.,R, Deem RL, Liu M, Wang S, y Nel A.1995. "Definition of lamina propria T-cell responsive state-enhance cytokine responsiveness of T-cells stimulated through the CD2 pathway. *J. Immunol.* **154**:664-675.
- Tornier Y., Bernau D., Poliard A., Schoevaert D. y Feldman G. 1987. "Detection of Albumin mRNAs in Rat Liver by In situ Hybridization: Usefulness of Paraffin Embedding and Comparison of Various Fixation Procedures". *J. Histochem. Cytochem.* **35**(4): 453-459.
- Ullrich R., Schieferdecker H.L., Ziegler K., Riecken E.O., y Zeitz M. 1990. "□□ T Cells in the Human Intestine Express surface Markers of Activation and are Preferentially Located in the Epithelium". *Cell. Immunol.* **128**: 619-627.
- Urban J, Madden K, Svetic A, Cheever A, Trotta P, Gause E, Katona I, y Finkelman F. 1992. "The importance of the TH2 Cytokines in protective immunity to nematodes". *Immunological Rev.* **127**:205-220.
- Urs Pauli. 1995. "Porcine TNF: are view". *Vet. Immunol. Immunopathol.* **47**: 187-201.
- Vandendroeck K., Dijnmans R., Van Aerschoot A. y Billiau A. 1991. "Engineering by PCR-bases exon amplification of the genomic porcine interferon gamma DNA for expression in *Escherichia coli*". *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **180**(3): 1408-1415.
- Vega López, MA, Telema R, Bailey M, Stevens K y Stokes CR. 1993. "Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria". *Vet. Immunol. Immunopathol.* **37**(1):49-60.
- Vega López Marco Antonio. 1994. "Sistema Inmune Intestinal Porcino", en *Ciencia Veterinaria 6*. Editor Moreno Chan R. Departamento de Inmunología CENID-Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Universidad Nacional Autónoma de México. México 146-168.

- Venturiello SM., Giambartolemei G. H. y Constantino S.N. 1995. " Immune cytotoxic activity of Human Eosinophils Against *T. spiralis* Newborn Larvae". Parasite Immunology. 17: 555- 559.
- Weinstock J. 1999. Capítulo 43 Mucosal cytokines en "Mucosal Immunology". Pearay L,Ogra J, Mesyecky J, Lamm M, Strober W, Bienestock J and McGhee J Editores. Segunda edición. Academic Press. San Diego CA. EE.UU. 709-718.
- Whary M.T., Zarkower A., Confer F.L., y Ferguson F.G. 1995. " Age-Related Differences in Subset Composition and Activation Responses of intestinal Intraepithelial and Mesenteric Lymph Node Lymphocytes from Neonatal Swine". Cell. Immunol. 163: 215-221.
- Wilcox J. 1993. " Fundamental Principles of In situ Hybridization". J. Histochem.Cytochem. 41(12): 1725-1733.
- Wilson A, Haverson K, Southgate K, Bland C, Stokes R and Bailey M. 1996." Expression of major histocompatibility complex class II antigens on normal porcine intestinal endothelium". Immunology. 88: 98-103.
- Yamamoto M, Fujihashi K, Kawabata K, McGhee J and Kiyono H. 1998. "A mucosal intranet: intestinal epithelial cells down-regulated intraepithelial, but not peripheral, T lymphocytes". J. Immunol. 160(5): 2188-2196.
- Yang H, Wanner J, Roper S y Chaudhari N. 199. " An Optimized Method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs". J. Histochem. Cytochem. 47: 431-445

APÉNDICE I

1. Fijador Paraformaldehído, lisina y peryodato (PLP)

(Mc Lane y Nakane, 1974)

1) Tampón de lisina-fosfato

a) Monohidrocloreto de lisina 0.2 M

Monohidrocloreto de lisina	3.62 g
Agua destilada c.b.p.	100 mL

b) Na_2HPO_4 0.1 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1.78 g
Agua destilada c.b.p.	100 mL

Mezclar una parte de a. y una parte de b. y ajustar el pH a 7.4 con HCl

2) Paraformaldehído al 8 %

a) Paraformaldehído	8g
b) Agua destilada c.b.p.	100 mL

Disolver el paraformaldehído en agua con agitación constante y calentando sin sobrepasar 60 °C.

PLP

Tampón de lisina	150 mL
Paraformaldehído al 8 %	50 mL
Peryodato	0.426 g
Glucosa	5.4 g (por cada 100 mL)

Esta solución se prepara el día que se va a emplear.

2. Agua DEPC

Se hace una solución al 0.1 % de Dietil pirocarbonato (SIGMA) en agua. Esta solución se homogeniza por agitación vigorosa y se deja toda la noche tapada con una torunda, dentro de una campana de extracción, para que se libere el CO₂ producido. Al siguiente día, se esteriliza por calor húmedo para inactivar el DEPC. Esta agua, es libre ya de RNAsas y se ocupa en la elaboración de las soluciones empleadas en la ISH.

3. PBS

Disolver:

- a) 8 g de NaCl
- b) 0.2 g de KCl
- c) 1.44 g de KH₂PO₄
- d) 0.29 g de Na₂HPO₄

Esto en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1 litro con agua destilada. Alicuotar y esterilizar por autoclave (121 °C, 15 libras, 20 minutos).

4. Soluciones para el cultivo de células mononucleares

1. HBSS = Solución salina Balanceada de Hanks

REACTIVO	P/ 1 LITRO 1X o PARA 100 mL 10X
Glucosa	1.0 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂ *	0.14 g
MgSO ₄ *	0.1 g
MgCl ₂ *	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
Na ₂ HPO ₄	0.06 g
NaHCO ₃	0.35 g
Rojo de fenol	Pizca
HEPES	Ajustar a una concentración final 5mM
H ₂ O desionizada	c.b.p. 1000 mL

* Nota en el HBSS — (sin calcio ni magnesio), no se adicionan estos reactivos.

2. Medio RPMI 1640 (Dutch modification)

El medio RPMI-1 (RPMI incompleto) se prepara según el marbete: 16.4 g de este polvo para 1 litro de agua desionizada. Además se adicionan 2 g de bicarbonato de sodio para 1000 mL de medio.

El RPMI-Completo. El RPMI- 1 necesita ser completado con los siguientes reactivos, para 100 mL de RPMI-C :

REACTIVO	CANTIDAD EN ML
SFB	10
L-glutamina (200 mM)	1.0
Penicilina/Streptomicina	1.0
Piruvato de sodio (100 mM)	1.0
2-Mercaptoetanol (10 µM)	0.1
RPMI-1	87.0

5. SSC 20 X

Disolver:

- a) NaCl 175.3 g
- b) Citrato de sodio anhidro 88.2 g

En 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0. Esterilizar por autoclave.

6. Búfer de pre-hibridación

El búfer de pre hibridación consta de los siguientes reactivos :

REACTIVO	STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
Formamida	100 %	50 %
SSC	20 X	4 X
EDTA pH 8.0	0.5 M	2 mM
tRNA de levadura (GIBCO)	5 mg/mL	250 µg/mL
Sulfato de dextrán (SIGMA)	50 % en agua-DEPC	10 %
Solución de Denhart	50 X	1 X

Este búfer se prepara en un tubo eppendorf, libre de RNAasas. A una muestra de 25 mm² se le adicionan máximo 30 µL de este búfer.

7. Solución de Denhardt 50 X

(Yang *et al.*, 1999)

- a) Albúmina sérica bovina al 1% (SIGMA Cat. A2153)
- b) Polivinil pirrolidona al 1 % (SIGMA Cat. PVP-40)
- c) Ficoll al 1 % tipo 400 (SIGMA Cat. F5415)

Estos reactivos se mezclan uno por uno y la solución se esteriliza por filtración (0.22 μ de diámetro). Esta solución a estas concentraciones es al 50 X.

8. Búfer de ácido málico (DIG DNA detection kit de Roche Cat. 1175 041)

- a) Ácido málico 100 mM
- b) NaCl 150 mM

Disolver los reactivos y después ajustar el pH a 7.5 con lentejas de hidróxido de sodio. Es importante que no se pase el pH. Debe quedar exacto y si se llegara a pasar, no se recomienda adicionar HCl. Esterilizar por autoclave.

9. Búfer de bloqueo

Disolver a 50 °C, 1 g de reactivo de bloqueo del *DIG DNA detection kit* en 10 mL de búfer de ácido málico.

10. Búfers empleados en Dot blots

a. B1 (búfer de ácido maléico):

1. Ácido maléico 100 mM

2. NaCl 150 mM

b. BW (búfer de lavado): B1 con 0.3 % de Tween-20.

c. BB (búfer de bloqueo)

d. SC (Solución de color): Se mezclan 45 μ L de una solución patrón de NBT (75 mg/mL en dimetil formamida 70 % en agua) y 35 μ L de BCIP (50 mg/ μ L en dimetil formamida 100 %).

10. Solución D

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Isotiocianato de sodio	5.5 M
Citrato de sodio pH 7.0	25 mM
Sarcosyl	0.5 %
2- β -mercaptoetanol	0.1 M

(Chomczynski y Sacchi, 1986)

11. Otros búfers

TN: Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5

TE: Tris HCl 10 mM, EDTA pH 8.0 1mM, pH 8.0

TAE 1 X: 0.04 M de Tris borato, y 0.001 M de EDTA, pH 8.0

12. Silantización de portaobjetos.

Se prepara una dilución del organosilano (γ -Methacryl oxypropyl trimethoxysilane de SIGMA) al 2% en acetona. Los portaobjetos se mantienen en esta solución por 30 minutos y se dejan secar toda la noche a 37°C

APÉNDICE II

1. Extracción de plásmido

- A. Se siembra una caja de LB amp 50 (50 µg de ampicilina /mL) con la cepa que contenga el plásmido que se desea extraer (Ej: CpIL-2, CpIL-4, Cp23.1, CpBAC). Se incuba 16-18 h a 35 °C.
- B. De esta caja, se toman un par de asadas que se inoculan en 200 mL de LB líquido con 50 µg de ampicilina/mL y se incuba a 37 °C toda la noche a 200 rpm.

Con este medio crecido:

1. Dos mL de cultivo fueron centrifugados a 10 000g ($r = 4.5$ cm), por 2 min.
2. Se le adicionaron 200 µL de TS
3. Se agitó fuertemente en vortex y se le adicionaron 200 µL de ELT, después se agitó suavemente.
4. Se dejó reposar la mezcla 5 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó la mezcla 30 min a 10 000 x g a temperatura ambiente.
5. Se tomó el sobrenadante, se le adicionó 1 volumen de SEPG y se mezclaron por inversión, dejando reposar la mezcla 17 min. Después se centrifugó a 10000 x g por 3 min.
6. Se eliminó el sobrenadante, se secó a vacío la pastilla y se resuspendió en 30µL de agua bidestilada. Si no se resuspende rápidamente calentar a 37 °C por 10 min.
7. Se purificó el plásmido por extracción fenólica (ver adelante).

BÚFER	CARACTERÍSTICAS
TS	Tris 50 mM pH 8.0 (guardar a -20 °C)
ELT	EDTA 100 mM, Lisozima 2 mg/mL, Triton X-100 0.1 %. Se guarda a -20 °C.
SPEG	Polietilén glicol PM 6000-8000 al 20 %, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8.0. Se guarda a 4 °C.

2. Purificación por extracción fenólica

1. Se adiciona 1 volumen de fenol equilibrado (pH>8.0) al DNA. Se agita vigorosamente y se centrifuga 3 min a 10 000 x g a temperatura ambiente.
2. Se separa la solución acuosa y se le adiciona 1 volumen de cloroformo. Se agita vigorosamente con el vortex y se centrifuga a 10 000 x g por 3 min a temperatura ambiente.
3. Se separa la fase acuosa y se le adicionan 2 volúmenes de etanol absoluto frío junto con 0.1 volumen de LiCl 4M. Se centrifuga a 10 000 x g a 30 min a 4 °C.
4. Se elimina el sobrenadante y se seca a vacío. Después se resuspende en 30 µL de agua-DEPC.
5. Se corre un gel de agarosa al 1.0 % agarosa para observar el tamaño o el producto de PCR purificado.

3. Preparación de geles de agarosa

Para correr una muestra de DNA se pueden emplear geles de agarosa del 1 al 2 % dependiendo del tamaño del fragmento del ácido nucleico a analizar. Se recomienda utilizar agarosa al 2 % cuando los fragmentos tienen un tamaño menor a las 150 pb. Para realizar un gel de agarosa al 1.0 % se siguen los siguientes pasos:

1. Pesar 0.2 g de agarosa (de preferencia ultrapura o grado Biol. Mol.)
2. Disolver en 20 mL de TAE 1.0 X
3. Disolver la agarosa completamente a calor, evitando llegar al punto de ebullición.
4. Adicionar 2 µL de un stock de bromuro de etidio (10 mg/mL).
5. Homogenizar y verter en una canastilla. Ponerle el peine adecuado y dejar solidificar.

Después se coloca la canastilla dentro de una cámara y se le adiciona el búfer de corrimiento, que es el mismo con el que se preparó el gel, en una concentración 1X. Enseguida las muestras se colocan en los carriles empleando para ello el búfer de muestra:

	Concentración final
Búfer de muestra = Azul de bromofenol	0.25 %
Glicerol en agua	30.0 %

De este búfer se adicionan 1 μL con 2 a 3 μL de la muestra. Siempre es importante correr las muestras junto con el marcador de DNA. Se corre a 100 V ó 14 mAmp; por un tiempo 30 – 60 min.

Nota: los geles se corren del cátodo (polo negativo) al ánodo (polo positivo).

4. Geles de agarosa desnaturalizante para RNA

Primero se dejan, la cámara de electroforesis que se va a emplear junto con el carro y el peine en NaOH 0.5 N toda la noche para inhibir RNAsas. Después se enjuagan con agua-DEPC y se dejan secar (se deben usar guantes)

1. Se hace un gel al 1.2 %. Para esto se pesan 0.3 g de agarosa y se disuelve en 18 mL de agua-DEPC.
2. Después se le agregan 2.25 mL de Búfer de corrimiento al 10 % más 4.47 mL de formaldehído (37 %).
3. Se deja solidificar a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción.
4. La muestra se prepara de la siguiente forma:
 - a. 3 μL de RNA
 - b. 1 μL de búfer de corrimiento 10X
 - c. 1.75 μL de formaldehído
 - d. 5.0 μL de formamida
 - e. 1.0 μL de búfer de muestra.

- f. 1.0 μ L de bromuro de etidio (1: 10 (v/v) en agua-DEPC, del stock 10 mg/ml.).
5. Todos estos elementos se calientan a 65 °C por 15 min e inmediatamente se colocan en hielo por 5 min. Todo el volumen contenido en el tubo de reacción se adiciona en los carriles del gel antes hecho y se deja correr a 60 V por 45 min. El gel se corre con el búfer de corrimiento 1X en agua-DEPC.

Búfers para la realización de geles desnaturalizantes

BÚFER	CARACTERÍSTICAS
De corrimiento 10 X	MOPS 0.2 M (pH 7.0) (SIGMA), acetato de sodio 80 mM, EDTA 10 mM (pH 8.0).
Búfer de muestra	Glicerol al 50 %, EDTA 1m M (pH 8.0), azul de bromofenol 0.25%, y el colorante xilen-cianol 0.25 %

5. Purificación de DNA de geles de agarosa (Agarosa gel extraction Kit. Bohringer, Cat:1696 505)

- 1.Cortar el fragmento de agarosa con el DNA que se desea purificar.
- 2.Adicionar 300 μ L de búfer 2 del kit a 1 μ g de DNA.
- 3.Adicionar 10 μ L de sílica gel por 1 μ g de DNA y 4 μ L más por cada μ g de DNA extra.
- 4.Incubar por 20 min a una temperatura de 56-60 °C y mezclar en vortex cada 3 minutos.
- 5.Centrifugar 30 seg a 10 000 x g a temperatura ambiente.
- 6.Adicionar 500 μ L de búfer 3 y homogenizar con vortex.
- 7.Centrifugar 30 seg a 10 000 x g a temperatura ambiente y después descartar sobrenadante.
- 8.Adicionar 500 μ L de Búfer 4 y homogenizar por vortex.
- 9.Centrifugar 30 seg a velocidad máxima a temperatura ambiente y después descartar el sobrenadante.

10. Repetir 1 vez.
11. Secar a temperatura ambiente por 15 minutos.
12. Reuspender en 25 μ L de agua destilada.
13. Incubar a 60 $^{\circ}$ C por 10 min.
14. Centrifugar 30 seg a 10 000 x g a temperatura ambiente y después tomar el sobrenadante que contienen el DNA. Repetir al menos dos veces sin juntar las dos extracciones para recuperar el máximo de DNA.
15. Cuantificar el DNA.
16. Identificar en un gel de agarosa.

6. Cuantificación del DNA

a) Espectrofotómetro

Se realiza una dilución 1:100 del ácido nucleico en agua destilada o agua-DEPC, según sea conveniente. Esta dilución se lee a una $\lambda = 260$ nm, calibrando con agua destilada o agua-DEPC. El cálculo de la concentración del ácido nucleico se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{Factor de conversión} \cdot V_{\text{total}}}{V_{\text{muestra}}} = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Factores de conversión (Catalogo Promega 2000) :

1. DNA de doble cadena = 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2. DNA de cadena sencilla = 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
3. RNA = 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

b) Placa de agarosa.

Se vierte agarosa al 1% en TAE IX con bromuro de etidio sobre una caja Petri y se deja gelificar a temperatura ambiente. Se le coloca 1 μ L de una dilución de DNA patrón en agua destilada. Este DNA puede ser DNA de esperma de salmón (GIBCO. Cat. 14 430 – 029), del cual se tienen conocimiento de su concentración, por lo que se parte de éste para realizar las diluciones necesarias para una curva estándar y poder determinar la concentración de nuestro problema. Después de colocado el DNA sobre la placa se deja difundir por 15 min a temperatura ambiente y después se observa en un transiluminador de luz U.V.

7. Células competentes y transformación con plásmidos bacterianos

1. Se hace un cultivo bacteriano de DH5 α en LB líquido a partir de preinóculo (en una dilución 1:100).
2. Se incuba a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.3 a 0.4 a una longitud de onda de 490 nm (densidad óptica donde las bacterias se encuentran en fase logarítmica de crecimiento).
3. Se centrifuga el cultivo a 2600 x g por 7 min a 4 °C y se resuspende en un volumen de CaCl₂ 0.1 M frío (volumen Δ) para alcanzar una D.O de 0.5. Este volumen se calcula de la siguiente forma:

$$0.5 / D.O = z \quad \text{y} \quad 100 / z = X \text{ volumen}$$
4. Dejar en hielo por 10 min.
5. Centrifugar a 2600 x g por 7 min a 4 °C y resuspender en 1/5 del volumen anterior.
6. Estas células se alícuotan en tubos eppendorf de 200 μ L cada una y se congelan en nitrógeno líquido. Se guardan a -70 °C. Estas células competentes solo son eficientes durante 1 mes; sin embargo se recomienda usarlas el mismo día en que realizaron.

TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO

7. Se le adicionan a 200 μL de células competentes, < 50 ng de DNA. La mezcla se incuba 30 min en hielo.
8. Se calienta la mezcla de DNA y células a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 90 seg.
9. Inmediatamente se coloca en hielo 2 min. Después se le adicionan 800 μL de LB y se incuba a 37 $^{\circ}\text{C}$ con agitación constante por una hora.
10. Se siembra masivamente una caja de LB amp 50 con las células transformadas. Así mismo se siembran las cajas con los controles adecuados.
11. Identificar el plásmido en un gel de agarosa al 1.0 %.

8. Subclonación de la β -actina en pBS SK +/-

1. El primer paso es poseer el vector en el que se va a clonar (en este caso pBS SK +/-) y el fragmento de DNA que se quiere clonar. El vector se lineariza con la misma enzima con la que el fragmento fue extraído del otro vector. Tanto el vector linearizado como el DNA de interés se purifican y se cuantifican debidamente, en este caso el vector empleado fue pBS-SK y fue restringido con Bam H1. En el caso del vector, es necesario someterlo a una reacción de desfosforilación:

Tomando como referencia que 1 μg de DNA equivale a 0.36 pmoles de DNA, se realiza la siguiente reacción de desfosforilación:

REACTIVO	CANTIDAD
DNA (Vector restringido)	0.36 pmoles
Fosfatasa alcalina de camarón (Roche Cat. 713 023) 1 U/ μL	1 μL
Búfer 10 X	1 μL
Agua -DEPC	cbp 10 μL

Se incubó 1 h a 37 °C. Se corrió un gel de agarosa, se purificó por el Kit, se cuantificó y se sometió a una reacción de ligación.

2. El DNA que se desea integrar al plásmido, en el caso de subclonación, es extraído de otro plásmido, con la misma enzima de restricción con la que se restringió el vector, esto para generar extremos cohesivos. En este caso, se extrajo el fragmento de la β -actina de p23.1 con Bam HI. Este fragmento se purificó y se cuantificó.

2. Con estos DNA se realizaron las siguientes reacciones de ligación:

REACTIVO	REACCIÓN 1	REACCIÓN 2	REACCIÓN 3
DNA vector	Desfosforilado 50 ng	Desfosforilado 50 ng	Fosforilado 50 ng
DNA de interés	Fosforilado 150 ng	Desfosforilado 150 ng	-----
Búfer 10 X	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Enzima T4 ligasa (Roche. Cat. 716 359) 1 U/ μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Agua-DEPC	cpb 10 μ L		

Se incubaron estas reacciones a 16 °C por 16 h. Después se realizaron las siguientes transformaciones:

1. Con el DNA de la reacción 1.
2. Con el DNA de la reacción 2.
3. Con el DNA de la reacción 3.
4. Con pBS-SK circular
5. Sin DNA.

Realizadas las transformaciones, se seleccionaron un número representativo de colonias candidatas de la subclonación realizada. Después se les realizaron unas minepreps y posteriormente su respectivo análisis por patrones de restricción.

Al subclonar el cDNA de la β -actina de p23.1 a pBS-SK, se obtuvo el plásmido pBAC, el cual fue identificado mediante el siguiente patrón de restricción:

- pBAC tiene un peso total de 4958 pb.

ENZIMA	FRAGMENTO ARROJADO (pb)	
	Posición 3' (pb)	Posición 5' (pb)
Acc I	1942 y 3016	146 y 4812
Sma I	1849 y 3109	159 y 4799
Bam HI	2958 y 2000	
Xba I	Linearización: 4958	
Kpn	Linearización: 4958	