



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Papel del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)
en la respuesta inmune innata durante la etapa aguda de
la infección con *Trypanosoma cruzi*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
JOSÉ LUIS REYES HERNÁNDEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS : DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

0349923



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **Papel del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en la respuesta inmune innata durante la etapa aguda de la infección con *Trypanosoma cruzi*.**

realizado por **José Luis Reyes Hernández.**

con número de cuenta **09721543-9**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director

Propietario: **Dra. Miriam Rodríguez Sosa**

Propietario: **Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez**

Propietario: **Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser**

Suplente: **Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés**

Suplente: **Dr. Guillermo Salgado Maldonado**

Consejo Departamental de Biología

M. en C. **Juan Manuel Rodríguez Chávez**

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespecial.

NOMBRE: José Luis Reyes
Hernández

FECHA: 18 Noviembre 05

FIRMA: José Luis Reyes

Para mi papá y mi mamá que son las personas que más quiero, son a quienes les debo todo. Los amo. No pude haber tenido mejores padres.

Para Paty e Israel que son mi gran ejemplo de esfuerzo.

Para Leo y Alex, a ver si así quieren más a su tío, porque el los quiere mucho.

Para chucho que es como mi hermano.

2A-N4L

Para Aaxin, Angélica, Beto, Tony, César, las chios, los julios, Dulce y las fasciolas. Por esas inolvidables visitas a las demás facultades y esas tardes en el pulpo.

Para Nayeli, Cynthia, Bety, Pame, Hugo y Angel, por todo lo que compartimos en la Prepa 2.

Para mis compañeras de pediatría.

Para los García Reyes, mi segunda familia.

Tx GD.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas y a la Dra. Miriam Rodríguez Sosa que me aceptaron en su laboratorio. Por toda la ayuda que hasta hoy me siguen dando y por todo lo que he aprendido de ellos. Mi admiración y respeto.

Al Dr. John David y Dr. Abhay Satoskar por la donación de los ratones transgénicos.

A la Dra. Bertha Espinoza por la donación de la cepa del parásito.

A la Dra. Ingeborg Becker por su ayuda en mi taller y sus valiosas opiniones.

A David Cruz por su ayuda en este proyecto.

Al Dr. Guillermo Salgado.

A Mónica Vázquez, Lorena Gómez e Irma Rivera por todo el apoyo que me dieron en las diferentes técnicas.

Al departamento de Bioterio y de Inmunología del I. N. De Cardiología I.CH.

Al laboratorio de Bioquímica Molecular FES Iztacala por permitirme amablemente su equipo de captura de fotos.

Al bioterio de FES Iztacala.

A los compañeros del Laboratorio 8 UBIMED

A la máxima casa de estudios, UNAM

Este proyecto fue apoyado por: CONACyT #42584-M y PAPIIT-UNAM-IN223003

INDICE

I RESÚMEN	1
II INTRODUCCIÓN	3
II.1 Respuesta inmune innata	3
II.2 Respuesta inmune adaptativa	4
II.3 MIF	5
II.4 Enfermedad de Chagas	8
III JUSTIFICACIÓN	12
IV OBJETIVO GENERAL	13
IV.1 Objetivos particulares	13
V HIPÓTESIS	14
VI MATERIAL Y MÉTODO	15
VI.1 Determinación de genotipo por PCR	15
VI.1.1 Extracción de DNA	15
VI.1.2 Amplificación del gen	15
VI.1.3 Electroforesis	16
VI.2 Infección y mantenimiento de la cepa	17
VI.3 Seguimiento de la parasitemia en sangre	17
VI.4 Sobrevida	17
VI.5 Histología	18
VI.6 Cultivo de parásitos (medio BHI)	18
VI.7 Obtención de Antígeno total de <i>T. cruzi</i>	19
VI.7.1 Cuantificación del antígeno	19
VI.8 Obtención de plasma sanguíneo	21
VI.9 Cultivo de células de bazo	21

VI.10 Cuantificación de citocinas en plasma por ELISA	22
VI.10.1 Sensibilización de la placa	22
VI.10.2 Muestras y curva	22
VI.10.3 Revelado del ELISA	23
VI.11 Determinación de anticuerpos específicos por ELISA	24
VI.11.1 Sensibilización de la placa con Antígeno	24
VI.11.2 Muestras	24
VI.11.3 Revelado del ELISA	24
VI.12 Ensayo de RT-PCR en células del corazón	25
VI.12.1 Extracción de RNA total	25
VI.12.2 Transcripción reversa para DNA complementario	25
VI.12.3 Amplificación del cDNA	26
VI.12.4 Electroforesis	27
VI.13 Citometría de flujo	28
VI.14 Análisis estadístico	29
VII RESULTADOS	30
VIII DISCUSIÓN	54
IX CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	61
X REFERENCIAS	63
XI APENDICES	70

I. RESÚMEN

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) fue descubierto en 1966 como una sustancia producida por linfocitos T activados con la capacidad de inhibir la migración de los macrófagos. Con el fin de estudiar la actividad inflamatoria y comprender de qué forma MIF colabora en la respuesta inmune, en el presente trabajo se estudió el papel de esta citocina en la enfermedad de Chagas experimental.

Ratones machos MIF^{-/-} y MIF^{+/+} se inocularon con *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro. Se monitorearon la presencia del parásito en sangre y la mortalidad, se encontró mayor susceptibilidad en los ratones MIF^{-/-} debido a que presentaron parasitemia más elevada y el doble de mortalidad comparado con los ratones MIF^{+/+}. Además, se realizaron cortes histológicos de corazón y se observó que en los ratones MIF^{-/-} se establecieron algunos nidos de amastigotes, mientras que en los ratones MIF^{+/+} no se encontraron nidos.

Para entender esta susceptibilidad se cuantificaron citocinas pro-inflamatorias, así como algunas citocinas anti-inflamatorias producidas tanto en suero como en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos re-estimulados con Ag total del parásito. En la cinética realizada en suero se notó la disminución de citocinas pro-inflamatorias (IFN γ , TNF α , IL-12, IL18 e IL-1 β) al inicio de la infección mientras que el nivel de citocinas anti-inflamatorias fue similar para IL-10 e IL-4.

Posteriormente, en los cultivos de células de bazo se observó que la producción de IFN γ , TNF α , IL-12 e IL-18 por parte de las células extraídas de ratones MIF^{-/-} estaba disminuida en la etapa temprana, mientras que la producción de IL-1 β , IL-4 e IL-10 no se vio afectada.

Se realizó una cuantificación de anticuerpos específicos contra el parásito. Se notó que existe una escasa producción de IgG1 en los ratones MIF^{-/-} en los primeros días de infección comparado con los ratones MIF^{+/+}. La producción de IgG2a fue alterada en la etapa más tardía, dado que los ratones MIF^{-/-} no lograron producir esta clase de anticuerpo al mismo nivel que los MIF^{+/+}.

Se realizaron ensayos de RT-PCR en corazón, los ratones MIF^{-/-} infectados expresaron más transcritos de los genes de actina, RANTES e IFN γ comparado con los ratones MIF^{+/+}. Finalmente, con ensayos de citometría de flujo se observó que los neutrófilos que migran al sitio de la infección tienen menor expresión del receptor para IFN γ en los ratones MIF^{-/-}.

Estos datos nos indican que MIF es necesario para controlar la enfermedad de Chagas murina, ya que no se puede iniciar ó es insuficiente la respuesta pro-

inflamatoria protectora que se encuentra en la etapa temprana de la infección en los ratones deficientes en MIF.

II. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de un organismo es el encargado de los mecanismos de defensa que confieren respuestas protectoras, rápidas y específicas contra sustancias ajenas, incluyendo microorganismos potencialmente patogénicos y macromoléculas como proteínas y polisacáridos (61).

Las diversas células, tejidos y moléculas responsables de llevar a cabo los eventos de inmunidad constituyen lo que conocemos como sistema inmune. La respuesta colectiva y coordinada de estas células y moléculas en respuesta a la invasión de sustancias ajenas al organismo conforman la respuesta inmune (1).

Así, la inmunología es la ciencia experimental encargada de estudiar los procesos que lleva a cabo el sistema inmune, con el fin de conferir inmunidad ó protección contra las enfermedades causadas por microorganismos y en algunos casos por macromoléculas. Para fines de estudio el sistema inmune se ha clasificado en dos partes, respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa (1).

II.1 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata se refiere a un sistema de defensa poderoso, pero inespecífico basado en mecanismos físicos, bioquímicos y celulares de defensa como el epitelio, que constituye una barrera física que impide la entrada de microorganismos. El sistema inmune además produce una gran variedad de sustancias antimicrobianas; las proteínas sanguíneas incluyendo a los miembros del sistema del complemento, las cuales tienen como función básica eliminar a través de lisis a los posibles patógenos; las citocinas, que llevan a cabo su acción a través de receptores y moléculas accesorias que forman cascadas de señalización y que están encargadas de coordinar las actividades celulares induciendo la expresión de genes ó en el caso de inmunoregulación, inhibiéndola. Y por último, en la respuesta inmune innata participan diferentes tipos de células, fagocíticas como macrófagos y neutrófilos, citotóxicas como las asesinas naturales (NK) por Natural Killer y granulocíticas como eosinófilos y basófilos(1).

Este tipo de respuesta se caracteriza por estar presente aún sin un estímulo y por reaccionar sólo a microbios y no a sustancias no infecciosas, las cuales si tienen la capacidad de despertar una respuesta inmune adaptativa (alergenos). Además, siempre responde de igual forma a repetidas infecciones, es decir, no tiene

especificidad. También carece de memoria inmunológica, ya que un encuentro previo con un antígeno (Ag) no garantiza que se genere una respuesta de manera más rápida, ni de mayor magnitud en el segundo encuentro con el mismo Ag(1).

II.2 Respuesta inmune adaptativa

Recibe este nombre debido a que en esta parte de la respuesta inmune se tiene la capacidad de responder adaptándose al tipo de infección y distinguir diferentes microbios y moléculas. Esta capacidad es llamada especificidad ó inmunidad específica. Otras características sobresalientes son: la memoria inmunológica, ya que después de la eliminación ó el contacto con un antígeno, se mantienen circulantes o se almacenan un grupo de células adaptadas para dicho estímulo ya conocido.

La parte celular está formada por linfocitos de 2 diferentes linajes. Estos linfocitos son producidos en la médula ósea, pero un linaje termina madura en el timo por lo que reciben el nombre de linfocitos T, mientras que los linfocitos B si maduran en médula ósea y reciben este nombre proveniente de "bone marrow". En la parte molecular se destacan anticuerpos (Ac), citocinas y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (1). Los linfocitos T tienen una subdivisión, hay linfocitos T citotóxicos (CTL) con el marcador de membrana CD8 y linfocitos T cooperadores (Th) con el marcador CD4. El primer grupo se encarga de eliminar células infectadas ó posibles células tumorígenas, así como de la producción de citocinas, mientras que los cooperadores coordinan la respuesta celular a través de la producción de estas citocinas(1). En 1996 el grupo de linfocitos Th recibió otro tipo de división basada en el patrón de citocinas que secretaban. Las células cooperadoras tipo 1 (Th1) son caracterizadas por la secreción de Interleucina (IL) 2, interferón (IFN) γ y el factor de necrosis tumoral (TNF) α que es un patrón llamado pro-inflamatorio, mientras que de forma contraria, las células cooperadoras tipo 2 (Th2) producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, también llamadas citocinas anti-inflamatorias. Hasta la fecha se sabe que son mutuamente excluyentes, es decir, la presencia de una inhibe al otro tipo de respuesta (56).

Los linfocitos B están encargados de producir anticuerpos para cada patógeno, por lo que son específicos. Son ayudados por células "presentadoras de antígeno" (APC) siendo las más importantes ó profesionales las células dendríticas, ayudadas de macrófagos. Optimizando ó complementando este trabajo de presentación de Ag encontramos un grupo de moléculas llamado complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Este complejo consta de especificidad y se dividen en moléculas de clase I y

moléculas de clase II, que son reconocidas por linfocitos CD8+ y por linfocitos CD4+, respectivamente (1).

II.3 Factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF)

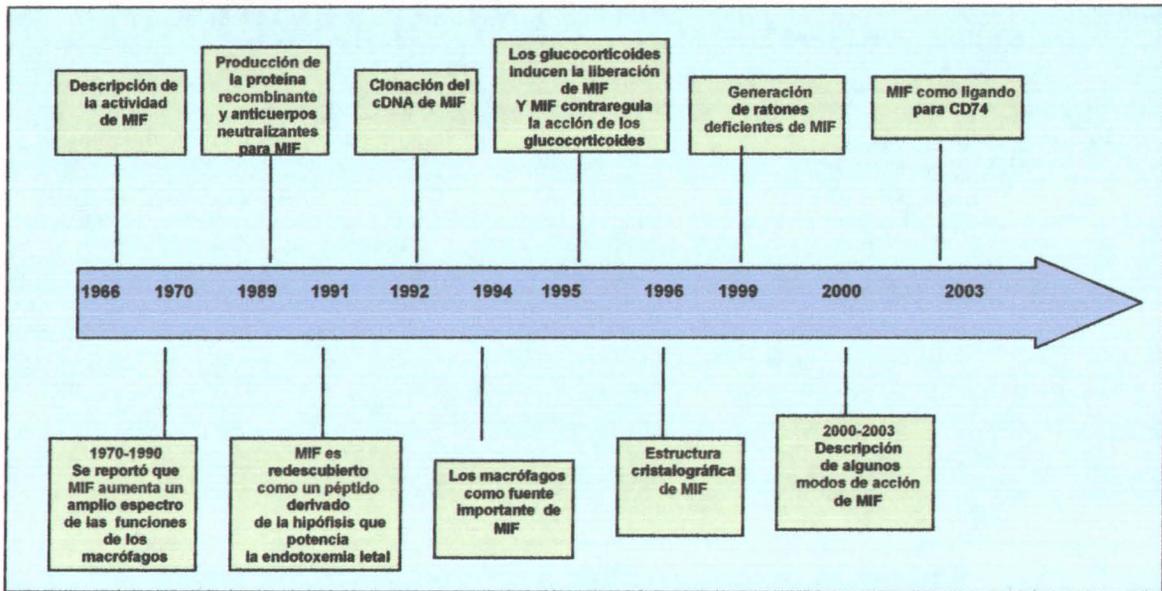
El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina que se descubrió a mediados de la década de los años 60 como un producto secretado por linfocitos T activados. Se relacionó con la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (74) y como su nombre lo indica, por inhibir la migración azarosa de los macrófagos (26). Sin embargo, durante más de dos décadas fue poco el interés acerca de las implicaciones de esta citocina en la respuesta inmune. En los últimos años se ha intensificado el estudio de MIF mediante la producción de anticuerpos neutralizantes, clonación del cDNA en humanos y ratones, así como la generación de la proteína recombinante de MIF y el hallazgo de que células de la hipófisis y otras células no linfoides son una fuente alterna de esta citocina (Ver figura 1). El peso molecular de MIF es de 12.5KDa, compuesta por 114 aminoácidos y es una proteína sin ningún otro tipo de molécula unida, ya sea lípido ó azúcar (12, 15, 18). Entre los avances más recientes se encuentra la descripción de su estructura tridimensional (76), que tiene algún tipo de actividad enzimática (70), que es secretado además de células T por macrófagos, linfocitos B, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células dendríticas, teniendo actividad autocrina sobre estas células(ver figura 1) (7, 14, 18, 58, 64, 71). No se ha identificado un receptor específico para MIF y solo se ha descrito la unión de MIF a CD74. Se ha propuesto que actúa después de ser fagocitado por sus células blanco, por lo tanto la vía de señalización utilizada por MIF también se desconoce (18). Los 2 hallazgos tal vez más sobresalientes son, por una parte, que gracias a la generación de ratones deficientes para MIF se descubrió la regulación positiva que ejerce esta molécula sobre un receptor importante de la inmunidad innata, el receptor tipo toll 4 (TLR-4), ya que estos ratones resultaron ser altamente resistentes al choque séptico por bacterias gram negativas (11, 68). Por otro lado, se ha estudiado el efecto de MIF sobre la vascularización *in vitro*, la división celular y el retraso de apoptosis en ciertas células, hechos que despertaron mucho interés, ya que se sugiere un importante papel de MIF en cáncer (8, 39, 42, 48, 55).

En los últimos años se han descrito otras características de MIF, incluyendo su destacado papel en la regulación de la respuesta inmune innata activando distintos tipos de células centrales en esta primera línea de defensa, como macrófagos (MΦ) y neutrófilos y el descubrimiento de que MIF está preformado en las células que los secretan. Además, induce la producción de citocinas como TNF α e IL-12, que son

esenciales en la resistencia contra microorganismos patógenos. En la inmunidad adquirida participa de manera importante como activador de linfocitos T (7). Recientemente también se ha observado su implicación ya sea de forma patogénica ó de forma protectora en diferentes enfermedades de tipo infecciosas como malaria, tifoidea, leishmaniasis y cisticercosis experimental, en algunas enfermedades de tipo autoinmune como artritis y miocarditis. También se ha descrito su importante papel en otras enfermedades en donde la respuesta inflamatoria está exacerbada, como gastritis y colitis y en reacciones alérgicas (9, 18, 24, 43, 51, 52, 58, 67, 73, 74).

(a)

LA HISTORIA DE MIF



(b)

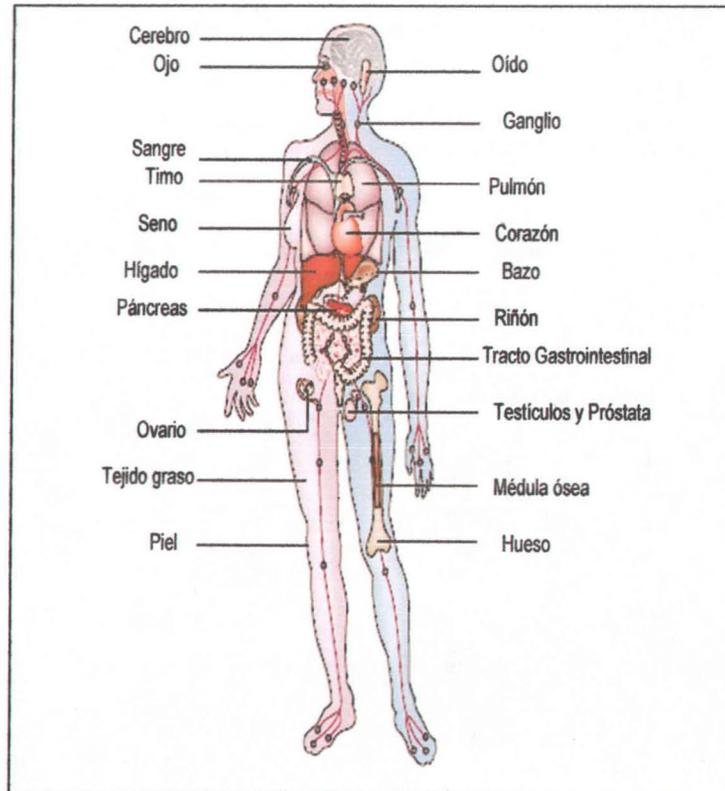
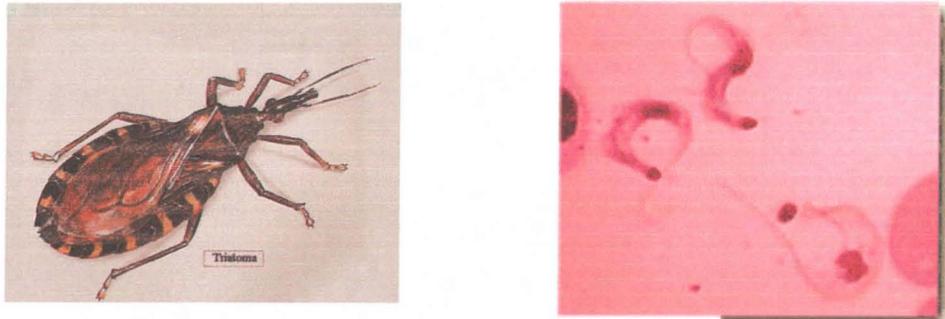


Figura 1.- Breve historia cronológica desde su descripción hasta diversas actividades destacadas dentro del sistema inmune (a) v el patrón de expresión de MIF (b)(18).

II.4 Enfermedad de Chagas

El parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* es causante de la enfermedad de Chagas o trpanosomosis americana (23). Esta enfermedad es exclusiva del Continente Americano. desde México hasta Argentina debido a que los tres géneros más importante del transmisor (*Triatoma*, *Rhodnius* v *Panstrongylus*) habitan en toda esta zona v representa la tercera enfermedad tropical con más casos reportados (Ver figura 2) (32).



(a) Transmisor en México. *Triatoma* spp. v *Trypanosoma cruzi* en sanare



(b) Patrón de distribución de la enfermedad de Chagas.

Figura 2.- a) Género del principal transmisor localizado en la Republica Mexicana v b) distribución de la enfermedad de Chagas. exclusiva del continente Americano. tomado de referencia 28.

La transmisión de la enfermedad de Chagas se realiza de 4 formas: accidentalmente, por transfusión de sangre infectada, de forma congénita y cuando el parásito es excretado con la materia fecal del artrópodo transmisor y puede penetrar hasta el torrente sanguíneo de algún hospedero. Esta enfermedad se ha dividido en 3 partes, la etapa aguda que se caracteriza por una respuesta inflamatoria y la presencia del parásito en la circulación. La etapa intermedia que se caracteriza por ser asintomática y sin presencia del parásito en sangre. Finalmente, la etapa crónica en la que igualmente no se detecta el parásito en sangre y en la que aproximadamente entre el 15 y 30% de las personas en esta etapa presentan fallas funcionales, principalmente en músculo cardíaco y en sistema digestivo (4). Se estima que en América Latina hay aproximadamente 14 millones de personas infectadas y cerca de 100 millones de personas en riesgo por habitar zonas en donde se distribuye el transmisor (28).

El ciclo de vida del parásito (figura 3) inicia cuando un artrópodo transmisor infectado, excreta materia fecal sobre la piel del hospedero mientras se alimenta, éste último introduce la fase infectiva (Tripomastigote metacíclico) generalmente por la ruptura del epitelio, ocasionada por la picadura. Dentro del hospedero se internaliza en las células del sistema inmune innato y se multiplica intracelularmente como amastigote (sin flagelo). El parásito es liberado al torrente sanguíneo por lisis de la célula hospedera. En el torrente de los reservorios mamíferos ú hospederos como el hombre lleva a cabo diferentes modificaciones morfológicas, originando formas intermedias (promastigote, epimastigote) para finalmente formar la fase de tripomastigote sanguíneo mediante el cual llega a los diferentes órganos. Este último estadio circulante, es tomado por el transmisor de hábitos hematófagos, a través de su proboscis para cerrar el ciclo. Una vez ingerido por el transmisor, el parásito pasa de las glándulas salivales al tracto digestivo, en donde los epimastigotes se dividen y posteriormente ocurre la metaciclogénesis. Dicho proceso consiste en la transformación de estadio de epimastigote a tripomastigote metacíclico en la parte terminal del recto, y se cree que es activado por la globina de la sangre ingerida y por la enzima del parásito llamada adenilil ciclasa (28, 65).



Copvriah: TDR/Wellcome Trust

Figura 3.- Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, en dónde se muestran los diferentes cambios morfológicos que realiza el parásito durante su paso por los hospederos.

Cuando *T. cruzi* logra entrar al torrente sanguíneo del hospedero mamífero se inicia la etapa aguda. El parásito tiene la capacidad de internalizarse en las diferentes células de los diferentes sistemas u órganos, siendo de las primeras las de la respuesta inmune innata como los macrófagos ($M\Phi$). El proceso de internalización se lleva a cabo a través del reclutamiento de lisosomas, proceso dependiente de Calcio, hacia el sitio de entrada del parásito (5, 27). El contacto del parásito con dichas células del sistema inmune es sumamente importante debido a que receptores expresados en estas células, tales como el receptor tipo toll 2 (TLR 2), se encargan de reconocer a uno de los principales antígenos (Aa) de *T. cruzi* como es Glicosilfosfatidilinositol (GPI), que a través de vías dependientes de la molécula de señalización Mvd 88, el hospedero comienza a montar una respuesta pro-inflamatoria ó Th1 (3, 19, 20, 69). En este tipo de respuesta sobresale la producción de importantes citocinas como IL-12 e IL-18 por parte de $M\Phi$ y el $IFN\gamma$ proveniente en esta primera etapa de células NK. Este conjunto de citocinas se relacionan con protección (2, 21, 22, 45, 54, 78, 79, 80, 81). El parásito tiene mecanismos que intentan modular la respuesta inmune y condicionarla de tal forma que le sea de beneficio (6, 35, 72).

Dependiendo del aislado ó cepa, los parásitos tardan algunos días o semanas para poder ser observados circulantes en sangre después de dividirse intracelularmente y liberarse por medio de lisis celular en el hospedero. Cuando es liberado en sangre, el parásito puede migrar a la mayoría de los órganos. El parásito se elimina de la mayoría de los órganos, con excepción del corazón, sistema nervioso central (SNC) y músculo esquelético, fenómeno llamado "tropismo celular" que depende de la cepa. El tropismo celular recientemente se relacionó con la incapacidad de las células del hospedero para translocar de manera óptima el factor de transcripción NF K B en los órganos de los cuales es más difícil eliminar al parásito, aunque esto no ha sido demostrado (38). Este factor es responsable del inicio de la transcripción de aproximadamente 60 genes, entre los que se encuentran citocinas implicadas en la resistencia a este parásito (72).

Para el control de la infección se requiere la presencia temprana de la respuesta humoral, importantemente las citocinas y la respuesta celular, sobre todo los MΦ activados a través de los intermediarios de nitrógeno reactivo como el óxido nítrico (NO) (10, 79). La citotoxicidad tiene un papel muy importante, ya que los mecanismos citotóxicos de las células NK son necesarios para eliminar al parásito en sangre desde los primeros días de la infección. Estos mecanismos no logran sostenerse por mucho tiempo, ya que los Interferones (IFN) α y β , encargados de activar ésta propiedad en células NK se producen en muy bajo nivel como respuesta a la infección con *T. cruzi*. (21, 49, 80, 81).

En la respuesta adaptativa, la parte celular mediada por la producción de citocinas de linfocitos T cooperadores y los linfocitos citotóxicos son indispensables para controlar la división del parásito. En la parte humoral la producción de Ac's, sobre todo los llamados líticos, son indispensables para eliminar el parásito, más que por lisis facilitando su fagocitosis (44).

III. JUSTIFICACIÓN

La trascendencia de MIF como blanco estratégico terapéutico está siendo cada vez más valorada, sin embargo, aún es escaso el conocimiento preciso y completo de los mecanismos en los que interviene MIF. El avance para comprender estos mecanismos es necesario para tratar de entender la forma básica en la que el sistema inmune se coordina para responder ante los diferentes patógenos, así como en las enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel que desempeña el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en la respuesta inmune durante la etapa aguda de la infección murina con *Trypanosoma cruzi*.

IV.1 Objetivos particulares

IV.1.1 Estudiar la posible susceptibilidad o resistencia establecida en los ratones deficientes de MIF (MIF^{-/-}) comparados con un grupo de ratones que portan el gen de MIF (MIF^{+/+}) durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi*.

-Se realizara el monitoreo de la parasitemia en sangre y un seguimiento visual, para determinar la tasa de mortalidad entre los dos grupos de ratones.

IV.1.2 Evaluar y comparar la respuesta inmune de tipo innata que presentan los ratones MIF ^{-/-} contra los ratones MIF ^{+/+} ambos infectados de igual forma con *T. cruzi*.

-Se cuantificará el nivel de citocinas pro-inflamatorias, así como el nivel de citocinas anti-inflamatorias en suero de los 2 grupos de ratones.

-Se analizará la población de células que se reclutan en el sitio de la infección, con el método de citometría de flujo.

-Se analizará la transcripción de algunos genes en el infiltrado leucocitario del corazón.

IV.1.3 Evaluar y comparar el inicio de la respuesta inmune de tipo adaptativa entre el grupo de ratones MIF^{-/-} con ratones MIF^{+/+} ambos infectados de igual forma con *T. cruzi*.

- Se cuantificará el nivel de anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2a específicos contra el parásito.
- Se evaluará la respuesta antígeno-específica de las células de bazo. Esta respuesta se analizara con la cuantificación de citocinas pro-y anti-inflamatorias en el sobrenadante de estas células cultivadas en presencia de antígeno del parásito.

V. HIPÓTESIS

Debido a su acción pro inflamatoria conocida, MIF es una molécula necesaria para controlar la infección murina con *Trypanosoma cruzi*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS ANIMALES EXPERIMENTALES UTILIZANDO PCR.

VI.1.1 Extracción de DNA:

Se utilizaron ratones machos para los dos grupos a experimentar y se siguió el método previamente reportado (47). Utilizando siempre guantes, material nuevo, estéril y libre de DNAsas-RNAsas se obtuvo aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de los ratones experimentales, se llevó a cabo la digestión de este tejido en tubos de 1.8 mL (Eppendorf) previamente identificados, en estos tubos se colocó la cola con 500 μ L de buffer de lisis (Apéndice 1) y 20 μ L de Proteinasa K (in vitro 100 μ g/ μ l) durante toda la noche en un incubador a 55°C.

Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante con micropipeta y se pasó a otros tubos Eppendorf con 500 μ l de isopropanol frío, se homogenizó invirtiéndolos de manera suave hasta que la precipitación del DNA fue evidente. Se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto para concentrarlo y se decantó la fase líquida para después lavar el botón de DNA con etanol frío al 75% en el mismo tubo, centrifugándolo a 14000 rpm por 5 minutos, se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por lo menos 1 hora. Cuando ya se tuvo el botón de DNA se secó y resuspendió en el tubo con 200 μ l de agua grado biología molecular, para nuevamente incubarlo toda la noche a 55°C.

Cuantificación de DNA: Esta parte se realizó utilizando una dilución 1:200 de muestra de DNA en agua. Se calibró con agua el espectrofotómetro (Jenway, Genova) y se leyeron las muestras a 260nm. La concentración final se obtuvo con el factor de 1 D.O. = 40 μ g

VI.1.2 Amplificación del gen

Para el reconocimiento del gen para MIF se utilizaron los primers específicos, referidos en Apéndice 2.

En éste proceso de PCR se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas con capacidad de 0.2 ml, en los cuales en una reacción con volumen final de 25 μ l se colocaron los siguientes reactivos (kit taq Platinum polimerase, In vitrogen) en orden:

	Para MIF	Para NEO
Buffer 10x	2.5 μ l	2.5 μ l
MgCl ₂ (50mM)	0.75 μ l	0.75 μ l
DNTP mix (5mM)	0.5 μ l	0.5 μ l
Primer F (50pM)	5.7 μ l	1 μ l
Primer R (50pM)	4.8 μ l	1 μ l
DNA Taq polimerasa (5U/ μ l)	0.25 μ l	0.25 μ l
Agua (Sigma)	9.25 μ l	11 μ l
Muestra DNA	1.25 μ l	1.25 μ l

Una vez que se tuvieron los tubos rotulados y con los respectivos reactivos se colocaron en el termociclador (Corbett Research) con la temperatura de alineación mencionada en apéndice 2.

VI.1.3 Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) 1% en Buffer TBE 1x (Apéndice 1) y 0.1% de bromuro de etidio (Apéndice 1) sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se mantuvo a 4°C por 30 minutos para que se solidificara.

Una vez hecho el gel, se hizo una dilución 1:4 de DNA y se colocaron por pozo, 2 μ l de muestra previamente diluida en 8 μ l buffer de carga blue juice (In vitrogen), a partir del segundo pozo ya que en el primero se colocaron 3 μ l del marcador de peso molecular 100pb (In Vitrogen).

Se colocaron las muestras en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 80 Volts, 45 Amperes durante 50 minutos. Se observó en un transiluminador con luz UV y se capturó la foto utilizando el programa Alphamager.

VI.2 INFECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA DEL PARÁSITO *Trypanosoma cruzi* EN EL LABORATORIO

Una vez determinado tanto el genotipo del grupo control (MIF+/+), como el del grupo de ratones deficientes de MIF (MIF-/-), se inocularon intraperitonealmente (i.p.) 5000 trypomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*, cepa Querétaro (donada por Dra. Bertha Espinoza G., I.I.B. UNAM) obtenidos por punción cardíaca de ratones previamente infectados, los parásitos se resuspendieron en 200 µl de solución salina estéril (Pisa). Para mantener la cepa se realizaron pases sucesivos en ratones BALB/c, se infectaron i.p. con 5000 tripomastigotes sanguíneos resuspendidos en 200 µl de solución salina estéril (Pisa), estos pases se realizaron durante todo el proyecto.

VI.3 SEGUIMIENTO DE LA PARASITEMIA EN SANGRE

Para determinar el nivel de parasitemia en sangre de los ratones infectados MIF+/+ y MIF -/-, se utilizó sangre extraída de la cola de cada uno de los animales experimentales y se diluyó 1:100 en una solución de PBS con heparina (Pisa). Se obtuvieron 5 µl de sangre periférica haciendo un corte en la vena caudal con un bisturí y esta se homogenizó en 495 µl de PBS/Heparina en un tubo Eppendorf de 1.8 ml.

Después se cargó la cámara de Neubauer (Hirschmann Techcolor) con 10 µl del homogenizado y se contaron los parásitos que había en los cuatro cuadrantes en la cámara para leucocitos y se cuantificó el número total con la fórmula:

$$\# \text{ parasitos / mL} = [\# \text{ parasitos / cuadrantes}] [\text{dilución}] [10^4]$$

Sustituyendo:

$$\# \text{ Parásitos por ml sangre} = \frac{\# \text{ parásitos}}{4} \times 100 \times 10^4$$

VI.4 SOBREVIDA

El monitoreo visual de la supervivencia de los ratones infectados MIF+/+ y MIF-/- se llevó a cabo diariamente en el departamento de bioterio, durante 40 días posteriores a la infección.

VI.5 HISTOLOGÍA

Esta parte se realizó en el departamento de patología del I.N.C.I.CH. por el M. en C. David Cruz Robles.

Después de 11 y 22 días post-infección, se extrajeron los corazones de ratones MIF-/- y ratones MIF+/+ infectados con *T. cruzi*. Se fijaron en paraformaldehído al 4% y se realizaron cortes de 15 micras y se tiñeron con hematoxilina-eosina, para analizar el grado de infiltrado leucocitario contando el número de células observadas en 25 campos tomados al azar a un aumento de 40x.

VI.6 CULTIVO DE PARÁSITOS

Se utilizó la cepa Querétaro de *T. cruzi* y se mantuvo en medio de cultivo bifásico de infusión cerebro corazón (BHI) enriquecido con 10% final de suero fetal bovino (Gibco) con solución salina al 0.85% como fase líquida. El agar se preparó de la siguiente forma:

BHI	3.7 gr.
Agar Nutritivo	2.3 gr.
Dextrosa	1.0 gr.
Agua Destilada	100 ml.

El medio de cultivo, la solución salina y el material de vidrio, como pipetas, se esterilizó en autoclave por calor húmedo a 15 lbs. de presión durante 15 minutos y enfriamiento lento.

Los parásitos se resebraron cada 15 días en medios de cultivo previamente esterilizados y suplementado con antibiótico, observando entre cada resiembra su viabilidad y estado axénico por medio de microscopía óptica.

VI.7 OBTENCIÓN DE ANTIGENO TOTAL DE *Trypanosoma cruzi*.

Se utilizaron los diferentes estadios extracelulares de la cepa Querétaro de *T. cruzi* de aproximadamente 25 días de crecimiento en el medio de cultivo, los cuales se concentraron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos en tubos estériles de 50 ml. Se decantó el sobrenadante y el botón se lavo tres veces con solución salina estéril por resuspensión y centrifugación a la misma velocidad y tiempo anterior.

Posteriormente, se realizó la lisis de las células utilizando Nitrógeno líquido y un incubador a 55°C para congelar y descongelar respectivamente con un total de 15 ciclos. Se examinó al microscopio la destrucción del parásito y se congeló hasta su uso. Posteriormente se determinó la concentración de proteína total, por el método de Lowry.

VI.7.1 Cuantificación de proteínas totales del Ag de *T. cruzi*

Para determinar la cantidad de proteína total del Ag obtenido se utilizó el método de cuantificación de proteínas Lowry modificado (50). Brevemente, se hizo una curva Standard con albúmina bovina serica (ICN, Biomedicals, Inc.) desde 0µg hasta 100 µg, se mezclaron los 3 reactivos: solución A, solución B y diferentes concentraciones de albúmina y agregar a cada tubo 3 ml. agitar y dejar reposar 10 minutos en oscuridad. Por último se le adicionó a cada tubo 0.4 ml del reactivo Folin-Cilcateau (J.T. Baker) diluido 1:2 en agua destilada, se agito y dejó reposar 30 min. Se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm y de blanco se utilizó PBS.

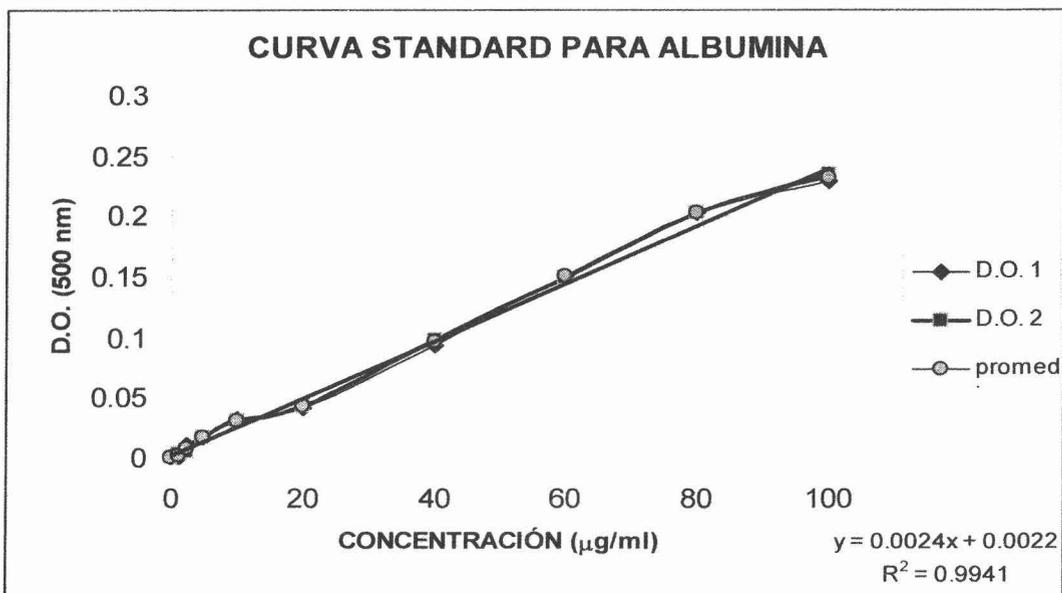
A las muestras obtenidas de la lisis de parásitos se les realizaron 5 diferentes diluciones: 1:400, 1:300, 1:150, 1:100 y 1:50. Una vez realizadas estas diluciones se leyó en un espectrofotómetro como ya se mencionó utilizando el factor 1 densidad óptica (D.O.) = 40 µg.

Para la curva se utilizaron la D.O. 1 y D.O. 2 de la lectura, el promedio, la intersección y la pendiente obtenidos del programa Excel (Microsoft) y se aplicó la formula $Y=mx+b$ (ver figura 4).

En donde $Y = D.O.$, $m =$ pendiente, $x =$ concentración y $b =$ intersección. Se utilizó el despeje $x = (y-b) / m$ para obtener la concentración de las diluciones realizadas.

De las concentraciones obtenidas de las 5 diluciones se tomó el promedio como la cantidad de Ag total obtenido.

Coeficiente correlación =0.9941, intersección = 0.0022 y pendiente = 0.0024



Alb (µg/ml)	D.O. 1	D.O. 2	promedio
0	0	0	0
1.25	0.0002	0.0037	0.00195
2.5	0.01	0.0047	0.00735
5	0.0167	0.0163	0.0165
10	0.0321	0.0306	0.03135
20	0.0419	0.0435	0.0427
40	0.0939	0.0976	0.09575
60	0.1497	0.149	0.14935
80	0.2018	0.2014	0.2016
100	0.228	0.2343	0.23115

Figura 4.- Curva Standard de albúmina, se presentan graficadas las dos densidades ópticas obtenidas y el promedio de estas contra la concentración de albúmina.

VI.8 OBTENCIÓN DE PLASMA

En los días 3, 7, 11, 20 y 30 posteriores a la infección se sangraron los ratones. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (phillips), se sometieron los ratones durante 3 minutos en esta caja para inducir dilatación en la vena caudal y facilitar el sangrado. Con un bisturí se cortó en la vena más sobresaliente para obtener de 400 a 700 μ l en un tubo (Eppendorf) con 10 μ l de Heparina (Pisa). El tubo con sangre se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm, se pasó el sobrenadante a otro tubo previamente identificado y se mantuvieron en congelación a -70°C hasta su uso en la determinación de citocinas y Ac's.

VI.9 CULTIVO DE CÉLULAS DE BAZO

En los días 11 y 22 post-infección se sacrificaron 3 ratones MIF $^{-/-}$ y 3 ratones MIF $^{+/+}$ igualmente infectados. En condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo (VECO) se les extrajo el bazo como previamente se describió (67) brevemente, se separaron las células del resto del tejido utilizando separadores celulares (B.D. Falcon, cell strainer) y se depositaron las células en tubos estériles de 10 ml (Nalge, Nunc Int). Para concentrarlas se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos y posteriormente fueron tratadas con 3 ml de solución hemolizante (apéndice 1) durante 10 minutos para eliminar los eritrocitos restantes. Se centrifugaron por 5 minutos y se decantaron. A las células libres de eritrocitos se agregó 2 ml de medio D-MEM (Gibco, suplementado con D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10% SFB y streptomina) para homogenizar y contar las células viables utilizando la prueba de exclusión con azul tripano, tomando 20 μ l de muestra y 20 μ l de azul tripano (Sigma chemical co). En la parte de linfocitos de la cámara de Neubauer se colocaron 10 μ l con micropipeta estéril del homogenizado y se contaron los 5 cuadrantes para obtener el número de leucocitos por mililitro, para después ajustar a 3×10^6 células/ml con medio D-MEM. Se colocaron 100 μ l por pozo en una placa de cultivo celular de 96 pozos (B.D. Falcon), para obtener una concentración final de 3×10^5 células/pozo. Una vez colocadas las células en la placa, se utilizaron 25 μ g por ml de Ag total de *T. cruzi* obtenido del medio de cultivo y lisados por choque térmico. Esta re-estimulación se llevó a cabo por 5 días en un incubador a 37°C con 5% de CO_2 y terminado el tiempo indicado, se recolectaron los sobrenadantes y congelaron a -70°C hasta su uso para cuantificar la producción de citocinas por ELISA.

VI.10 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS EMPLEANDO LA TECNICA DE ELISA (sándwich).

La medición se realizó en los días 3, 7, 11, 20 y 30 posteriores a la infección. Se utilizaron los pares de anticuerpos de Pharmingen (Becton Dickinson co.) para detectar IFN γ , IL-4, IL-10, IL-12 y el kit de Peprotech para TNF α , IL-18 e IL-1 β . En todos los casos el procedimiento fue similar, se siguieron las indicaciones del proveedor y como previamente se reportó (73).

VI.10.1 Sensibilización de la placa

Se diluyó el anticuerpo de captura 2 μ g/ml en el buffer de pegado (apéndice 1) se homogenizó y se colocaron 100 μ l por pozo utilizando una micro pipeta multicanal (Finnpipette) en una palca para ELISA de 96 pozos (NUNC, Maxisorp). Para que se llevara a cabo la reacción de pegado del anticuerpo a la placa, esta última se cubrió con papel aluminio e incubó a 4°C toda la noche.

VI.10.2 Muestras y curva

Al día siguiente se sacó la placa del cuarto frío y se lavo 3 veces con la solución de lavado (Apéndice 1), se secó por aspiración y durante una hora a 37°C se bloqueo el pegado inespecífico con 200 μ l de solución de bloqueo (Apéndice 1), después se lavó tres veces más y se secó por aspiración.

En el caso de los cultivos celulares se utilizaron 50 μ l de sobrenadante y 25 μ l para el plasma se colocaron en los pozos correspondientes para las muestras, posteriormente, para poder extrapolar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la correspondiente citocina recombinante murina, con diluciones al doble para cada una de las placas y se utilizaron las dos primeras líneas de cada placa, diluidas en solución de bloqueo. Las curvas se iniciaron partiendo de 50 ng hasta 0.01 ng y nuevamente se incubó la placa toda la noche a 4°C.

VI.10.3 Revelado del ELISA

La placa se llevó a temperatura ambiente, se lavó 4 veces y se secó por aspiración para adicionar el anticuerpo correspondiente a cada citocina marcado con biotina en un volumen de 100 μ l por pozo de una dilución de 2 μ g/ml de anticuerpo con biotina en solución de bloqueo, se incubó por una hora a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se lavo 4 veces la placa y se secó por aspiración.

Se preparó una dilución de 1:5000 de enzima streptoavidin peroxidasa (Amersham Biosciences) en solución de bloqueo, para obtener un volumen final de 10 ml de esta dilución y colocar 100 μ l por pozo para dejar incubar las placas por 35 minutos a temperatura ambiente.

Por último, se lavó 7 veces la placa después de la incubación con la enzima, se preparo la solución del sustrato de la enzima que es, 100 μ l de H₂O₂ al 3% (J.T.Baker) en 10 ml de ABTS (Apéndice 1) para poner 100 μ l por pozo, se dejó a temperatura ambiente 10 minutos y se llevó al lector de placa (Thermo Labsystems, Multiskan Ascent) utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

VI.11 DETERMINACIÓN DE NIVEL DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS (IgG2a é IgG1) ANTI-*Trypanosoma cruzi* EN PLASMA

VI.11.1 Sensibilización de la placa con Antígeno

La cuantificación de Ac's se realizó en los días 7, 11, 20 y 30 posteriores a la infección y se utilizó el método previamente reportado (66). Se utilizó una placa de 96 pozos (Nunc, Polisorp). Se diluyó 10 µg/ml de antígeno total de *T. cruzi* cepa Querétaro (obtenidos por lisis celular de este parásito mantenido en medio de cultivo, Apéndice 1) en PBS pH 9 y se colocaron 100 µl por pozo, se cubrió la placa y se incubó toda la noche a 4°C.

VI.11.2 Muestras

Después de dicha incubación las placas se lavaron 2 veces con solución de lavado (Apéndice 1) y se secaron por aspiración, una vez secas, se bloqueó el pegado inespecífico con 200 µl de solución de bloqueo durante una hora en un incubador a 37°C. Terminado el tiempo de bloqueo, se lavó 4 veces y se secaron las placas para colocar las muestras partiendo de una dilución de 1:25 para los días 7 y 11, mientras que para los días 20 y 30 en los cuales se espera mayor cantidad de anticuerpos se utilizó la dilución 1:50. Ya colocadas las muestras se incubaron las placas durante hora y media a 37°C, nuevamente se lavaron 4 veces y secaron por aspiración.

VI.11.3 Revelado del ELISA

Ya secas las placas se les colocó 100 µl por pozo del anticuerpo anti-IgG2a (Zymed) y anti- IgG1 (zymed), según fue el caso diluido 1:500 en una solución de 75% PBS y 25 % SFB (suero fetal bovino, Gibco) y se incubó por una hora a 37°C.

Por último se lavaron las placas 6 veces y secaron por aspiración, para después colocar 100 µl de la solución de revelado compuesta por 10 ml de ABTS (Apéndice 1) y 100µl de H₂O₂ al 3% (J.T. Baker.) Se esperó 30 minutos a temperatura ambiente para obtener la coloración y se utilizó el filtro de 405 nm de longitud de onda, en un lector de ELISA (Termo Labsystems).

VI.12 ENSAYO DE RT-PCR EN CÉLULAS DEL CORAZÓN.

VI.12.1 Obtención de RNA total de corazón:

A los días 22 posteriores a la infección se sacrificaron 2 ratones MIF+/+ y 2 ratones MIF-/- igualmente infectados y se realizó el ensayo de RT-PCR como previamente se reportó (37). En condiciones de esterilidad se les extrajo el corazón y utilizando una placa de cultivo celular de 24 pozos (Nunc), se homogenizó el corazón en un mililitro de trizol (Invitrogen), se tomó el líquido evitando los restos de tejido con micropipeta y puntas libres de RNasas y se depositó en tubos de 1.8 ml (Eppendorf) para congelarlos a -70°C hasta su uso.

Una vez descongeladas las muestras en los tubos, se agregó por cada tubo ó muestra 200 µl de cloroformo frío, se agitó suavemente y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos, terminado el tiempo indicado se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se pasó a otros tubos con 500 µl de Isopropanol frío, se mantuvieron a temperatura ambiente otros 10 minutos y se centrifugan a 14000 rpm por 10 minutos para obtener el concentrado de RNA que se resuspende y lava 2 veces con etanol al 75% y se deja secar en campana de flujo laminar y por ultimo se resuspenden en 20 µl de agua estéril y almacena a -70°C hasta su uso.

VI.12.2 Transcripción reversa para hacer DNA complementario (cDNA)

Se utilizó el Kit First Strand Synthesis Superscript II (In vitrogen) Brevemente, se utilizaron 3µg de RNA total y se siguió el protocolo propuesto por el proveedor (In Vitrogen).

Dentro de la campana de flujo laminal (Veco) se realizó la mezcla de los componentes del kit en tubos libres de RNAsas de 0.2 ml con los siguientes volúmenes:

10 mM dNTP mix 1µl

Oligo (dT) (0.5 µg/µl) 1µl

Los volúmenes que contenían los 3µg de RNA total eran variables en las diferentes muestras de los ratones, pero se ajustaron a 10 µl con agua grado molecular (sigma Aldrich) para cada reacción, se incubo por 5 minutos a 65°C en el

termociclador (corbett research) y los tubos se colocaron 1 minuto en una cama de hielo. Después de esta incubación a cada tubo se le adicionó los siguientes componentes con el volumen indicado:

Buffer 10X RT	2 μ l
25 mM MgCl	4 μ l
0.1 M DTT	2 μ l
Inhibidor de RNAsa (RNase OUT)	1 μ l

Se agitaron suavemente los tubos y se incubaron 2 minutos a 42°C, para posteriormente adicionar a cada reacción 1 μ l de enzima Superscript II RT (50 unidades), se incubo por 50 minutos a 42°C. Para terminar esta reacción los tubos se incubaron a 70 °C por 15 minutos y se colocaron en hielo por 5 minutos.

Cuando se obtuvo el cDNA a cada tubo se le agrego 1 μ l de enzima degradadora de RNA (RNase H) y se incubo a 37°C por 20 minutos. Una vez terminado el procedimiento indicado se realizó una dilución 1: 200 de la muestra en agua grado molecular para cuantificar la cantidad de cDNA obtenido, leyéndolo a 260 nm en un espectrofotómetro (Jenway) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

VI.12.3 Amplificación del cDNA

Cuando se determinó la cantidad de cDNA obtenido de cada ratón, con el objetivo de realizar un análisis semicuantitativo de diferencias en la transcripción de los diferentes genes analizados (IFN γ , RANTES, TLR-4, β actina y GAPDH) se ajusto a la concentración de 30 ng/ μ l y se hicieron diluciones de este 1: 2 y 1:4 finalizando en 15 y 7 ng respectivamente.

Los primers específicos que se utilizaron para cada gen son los referidos en el Apéndice 2.

Las reacciones se prepararon en tubos nuevos y libres de DNAsas con 0.2 ml de capacidad. Las mezclas se llevaron al volumen final de 25 μ l con las siguientes concentraciones:

Buffer 10 X	2.5 μ l
MgCl (25mM)	0.75 μ l
DNTP mix (5mM)	2 μ l
F (50pM)	1 μ l
R (50pM)	1 μ l
Taq Polimerasa (5 U/ μ l)	0.25 μ l

(Taq rTth para GAPDH, Roche)

La temperatura de alineación que se utilizó en el termociclador (Corbett Research) fue el mismo para los diferentes genes, excepto para el de GAPDH (apéndice 2).

VI.12.4 Electroforesis del gen amplificado

Para esta parte se hizo un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE 1X (apéndice 1) con 30 μ l de bromuro etidio (apéndice 1) y en una cámara molde se solidifico a 4°C por 30 minutos. Una vez terminado el programa de ciclado a cada tubo se le adiciono 6 μ l de buffer de carga (In Vitrogen), se homogenizo y se tomaron 10 μ l de muestra en cada pozo. Por ultimo se coloco en el primer pozo 3 μ l de marcador de peso molecular de 100 pb y se corrió durante 50 minutos a 85 volts y 45 amperes.

Para observar y capturar la imagen de las bandas obtenidas el gel se llevó a un transiluminador con luz UV y se utilizó el programa alphaimager.

VI.13 CITOMETRIA DE FLUJO PARA CARACTERIZAR LA POBLACIÓN CELULAR RECLUTADA AL SITIO DE INFECCIÓN

Cuando se cumplieron 22 días post-infección se decidió analizar las células reclutadas en la cavidad peritoneal. Ratones MIF+/+ y MIF-/- infectados con *T. cruzi* se sacrificaron. En la campana de flujo, se inyectaron i.p con 5 ml de solución salina estéril (pisa) para realizar un lavado peritoneal y con la jeringa se recuperaron células totales de peritoneo, que se colocaron en tubos de 15 ml previamente identificados. Los tubos con las células se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm para concentrarlas, se decantó el sobrenadante, dentro de la campana, se resuspendió el botón de células y se les adicionó a cada tubo 3 ml de buufer para FACS (apéndice 1). Se homogenizó la suspensión y se contó en cámara de Neubauer . Se ajustaron con buffer de FACS a 1 millón de células por ml. y se pasaron a tubos para análisis de citometria (Falcon, B.D.), donde nuevamente se concentraron las células centrifugando 10 minutos a 2000 rpm para decantar y resuspender con 200 μ l del mismo buffer. Por último se agregaron los anticuerpos conjugados con los distintos marcadores de fluorescencia y un anticuerpo isotipo (IgG2a) como control para pegado inespecífico, a una concentración de 0.2 μ g marcados de la siguiente manera:

Gr-1 Ly6g - PE (ficoeritrina, Caltag Laboratories)
IFN γ R α - FITC (fluoresceína, Santacruz Biotechnology)
TLR-2- FITC (fluoresceína, Santa Cruz Biotechnology)

Una vez agregados los anticuerpos se incubo durante 30 minutos a 4°C, se lavaron las células 2 veces más con buffer de citometría y se utilizó el programa Cell Quest y la maquina FACSCalibur (Becton Dickinson) para la captura y análisis de cada muestra.

VI.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se utilizó el programa Graph pad Prism 3.0. para obtener el promedio y error estándar de los datos, así, como para comparar las diferencias por medio de la prueba de t no pareada. Los valores de p menores a 0.05 se consideraron significativamente diferentes.

VII. RESULTADOS

VII.1 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS RATONES DEL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO EXPERIMENTAL.

En la figura 5 se muestra una electroforesis en gel de agarosa del amplificado del gen para MIF, en el carril 2 y 3 la amplificación del gen funcional para MIF (MIF+/+) del grupo de ratones utilizado como control. El producto de amplificación para MIF tiene un tamaño de 200 pb. En los carriles del 4 al 11 se observa solamente la banda representativa del gen de neomicina (Neo) con un tamaño de 500 pb y esta ausente la banda para el gen de MIF (MIF-/-). Estas muestras pertenecen al DNA de los ratones carentes de MIF. Por ultimo en el carril número 12 se muestra la amplificación del DNA de un ratón heterocigoto (MIF+/-) portador del gen de neomicina, pero también del gen de MIF.

Con este ensayo se comprobó que cada uno de los individuos utilizados en el presente trabajo cumplieran con la condición de ser silvestre (MIF+/+) ó Knockout en el gen de MIF (MIF-/-).

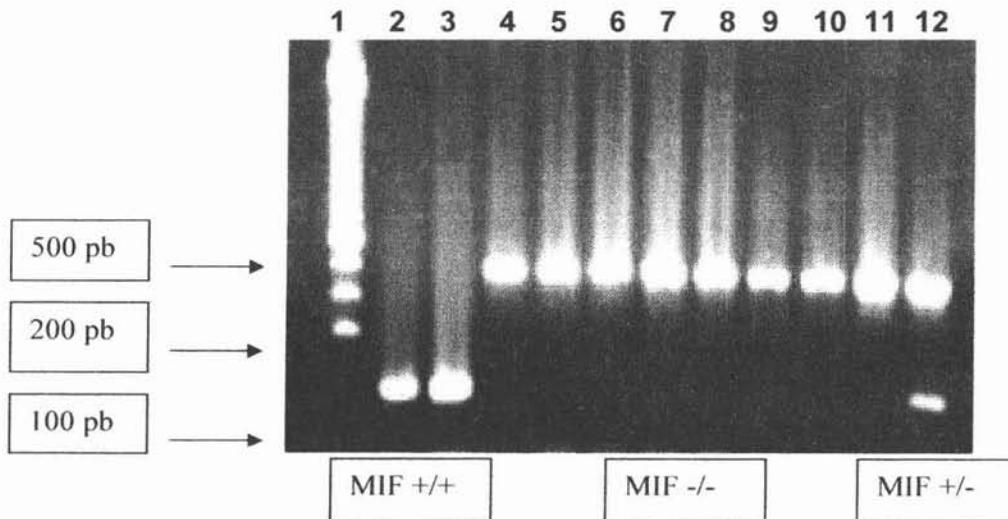


Figura 5.- Determinación del genotipo del grupo control (MIF+/+) y del grupo experimental (MIF-/-) utilizando PCR. Además se muestra el genotipo de un ratón heterocigoto (no utilizado en este trabajo).

VII.2 PARASITEMIA

Con el fin de comparar los niveles de parásitos en circulación entre los ratones control (MIF+/+) y experimentales (MIF-/-) se realizó un seguimiento en los primeros 40 días posteriores a la infección. En la figura 6 se muestran los resultados promedio obtenidos de 4 experimentos independientes. Los ratones MIF+/+ presentaron crecimiento del parásito en una curva típica, con un pico máximo de parasitemia alrededor del día 23 y con un promedio de 4×10^6 parásitos/ml. En cambio los ratones MIF-/- presentaron casi desde el inicio de la infección mayor número de parásitos en sangre. Estas diferencias fueron más marcadas en el día 23, 27 y 31 post-infección. El punto más alto en el nivel de parásitos circulantes en los ratones MIF-/- se alcanzó el día 27 y fue de 13×10^6 parásitos/ml.

Los ratones MIF-/- presentaron 3 veces más el nivel de parásitos en sangre en el pico de parasitemia (día 27), respecto al grupo control. Es importante observar también que a partir del día 23 post-infección, en el que los ratones MIF+/+ presentaron el pico de parasitemia, se observó una tendencia al control de la duplicación del parásito, mientras que en ese mismo punto en los ratones MIF-/- se observó todavía mayor incremento en la parasitemia. Por otra parte, al día 35 post-infección en los ratones MIF+/+ ya no se detectaron parásitos circulantes en sangre, a diferencia de los ratones MIF-/-, en los que aún se encontró un número significativo de parásitos circulando.

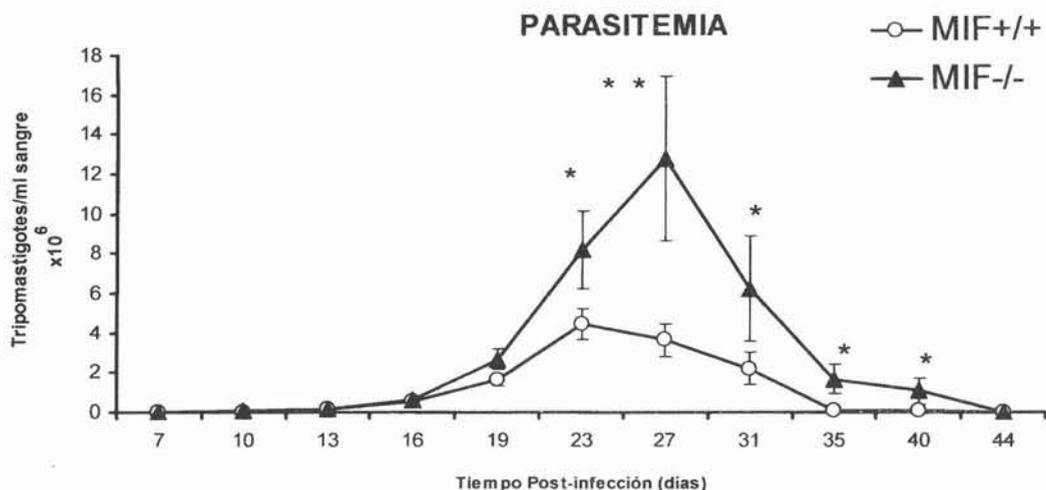


Figura 6.- Evolución de la parasitemia después de la infección i.p. con 5000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Querétaro. Los ratones MIF^{-/-} (▲) son más susceptibles que los ratones MIF^{+/+} (○). Los datos muestran la media ± ES de al menos 16 ratones correspondientes a 4 experimentos independientes. * p<0.05 y ** p<0.001 ambos casos con respecto al control. Los promedios se compararon con prueba de t (Graphpad Prism).

VII.3 SOBREVIDA

Con el fin de determinar el papel de MIF en la resistencia o susceptibilidad, en los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-} similarmente infectados con *T. cruzi*, se monitoreó la sobrevivida durante los primeros 40 días post-infección.

Con la dosis de *T. cruzi* utilizada (5000 tripomastigotes) se observó que los ratones MIF^{+/+} tuvieron una sobrevivida del 70% después de 40 días de infección (Fig.7). Por el contrario, los ratones MIF^{-/-} que recibieron una dosis igual de parásitos tuvieron una menor capacidad tanto para controlar la infección (Fig 6) como para sobrevivir a la misma, ya que sólo sobrevivió el 30% de estos ratones (Fig.7). Alrededor del día 23 p.i. (coincidentemente con la separación del nivel de parasitemia entre grupo control y grupo experimental), murieron más rápidamente los ratones MIF^{-/-} reflejando que el nivel de parásitos en sangre, en este modelo experimental influyó en la sobrevivida de los ratones. A pesar de que en los ratones MIF^{-/-} infectados no se observó 100% de mortalidad, fue significativa la diferencia en el porcentaje de sobrevivida entre los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-}, sugiriendo que en ausencia de MIF los

ratones fueron más susceptibles a *T. cruzi*, y en consecuencia también resalta la importancia de MIF en la respuesta inmune contra esta infección.

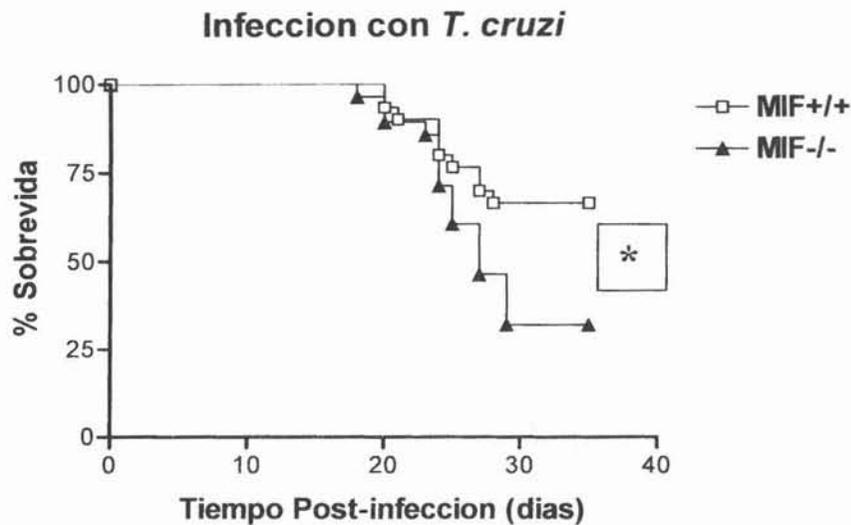


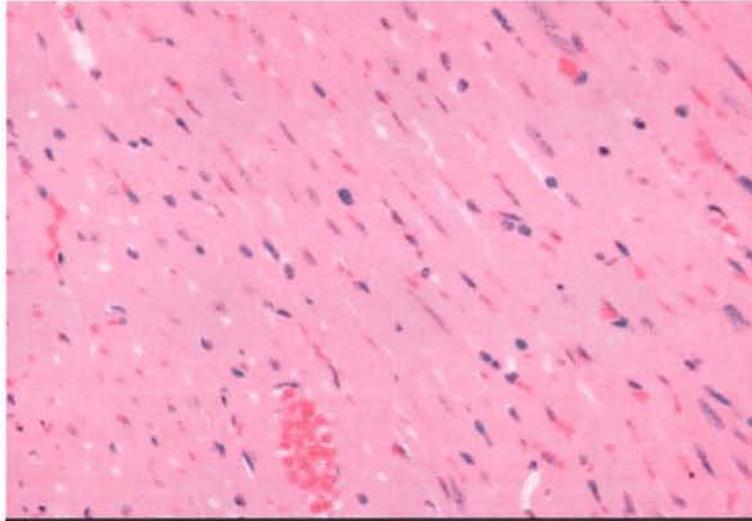
Figura 7.- Curva de supervivencia de los ratones MIF+/+ (▲) vs ratones MIF-/- (□) ante un inoculo i.p. de 5000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro. Los datos son representativos de 4 experimentos diferentes. * $p < 0.05$ respecto al control con la prueba log rank, (Graphpad Prism).

VII.4 HISTOLOGÍA

En las figuras 8 y 9 se muestran los cortes hechos en el corazón de ratones MIF-/- y MIF+/+ infectados con *T. cruzi* a los 11 y 22 días p.i.. Se observó que al día 11 post-infección no hay nidos de amastigotes en ninguno de los grupos de ratones infectados (MIF-/- vs MIF+/+), además las fibras musculares del corazón se encontraron en un estado normal, es decir no se encuentran en distensión (fig. 8).

En cambio al día 22 post-infección se observó que los ratones MIF-/- presentaron varios nidos de amastigotes y un notable daño en las fibras del músculo cardíaco comparados con los ratones MIF+/+, en los cuales no se observaron nidos de amastigotes y el daño fue menor en las células del corazón (fig. 9)

(a) MIF^{-/-}



(b) MIF^{+/+}

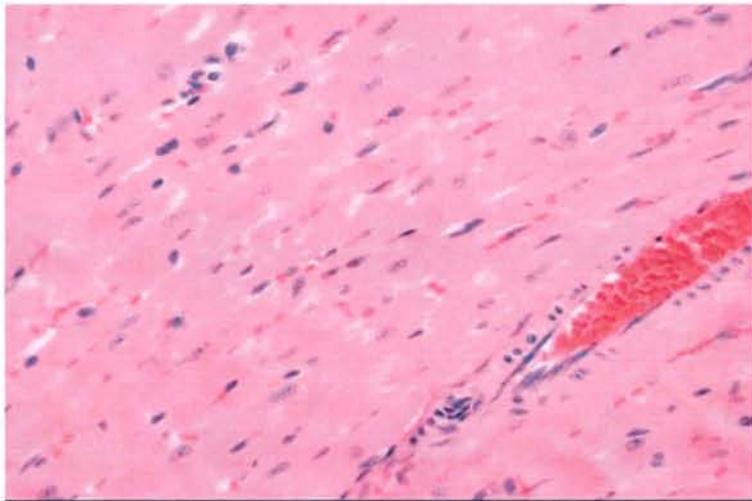
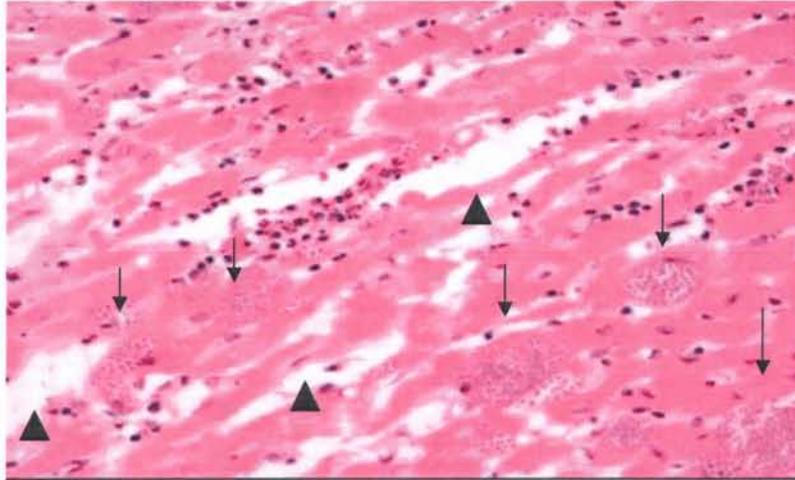


Figura 8.- Se muestra un corte de corazón representativo de los ratones MIF^{-/-} y otro corte de MIF^{+/+} infectados con 5000 tripomastigotes de *T. cruzi*, estos cortes se realizaron a los 11 días post-infección. No se observa daño en las fibras del corazón además, no hay nidos de amastigotes. Las imágenes que se presentan están con el aumento de 40X.

(a) MIF^{-/-}



(b) MIF^{+/+}

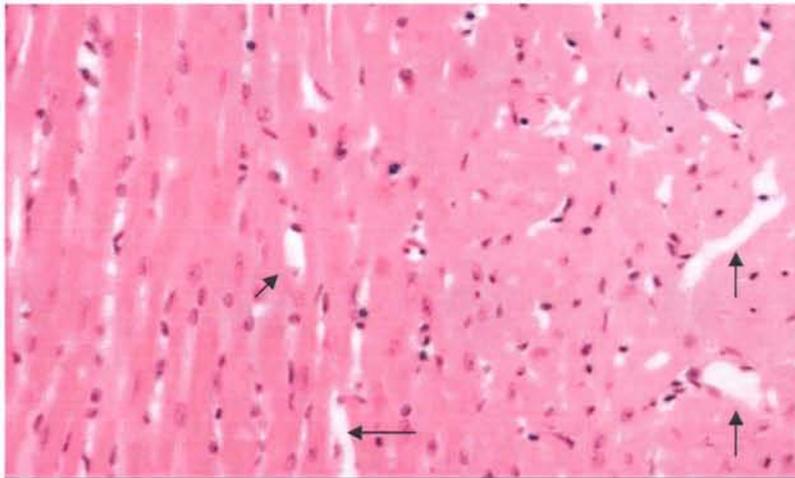


Figura 9.- Cortes de corazón de ratones infectados con 5000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. Estos cortes se realizaron al día 22 post-infección y se observó que en los ratones MIF^{-/-} (A) ya son notables los nidos de amastigotes (flechas), mientras que en los ratones MIF^{+/+} no se encontró ninguno (B). De igual forma, debido a la infección se observa que las fibras musculares se encuentran más dañadas en los ratones MIF^{-/-} (cabeza de flecha), mientras que en los ratones MIF^{+/+} el daño en las fibras es menor (flecha).

VII. 5 NIVEL DE CITOCINAS EN SUERO

VII.5.1 Citocinas pro- inflamatorias

Con el propósito de determinar la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias secretadas por los ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi*, se obtuvieron y analizaron sueros de diferentes tiempos post-infección. Así, en las figuras 10 y 11 se puede observar que los niveles de IL-1 β e IL-18 en los ratones MIF^{-/-} fueron significativamente menores durante los primeros 11 días p.i. comparados con los niveles de estas mismas citocinas encontrados en el suero de los ratones MIF^{+/+}. Sin embargo, a partir del día 20 p.i. el nivel de estas citocinas en los ratones MIF^{+/+} disminuyó perdiéndose las diferencias entre ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-}.

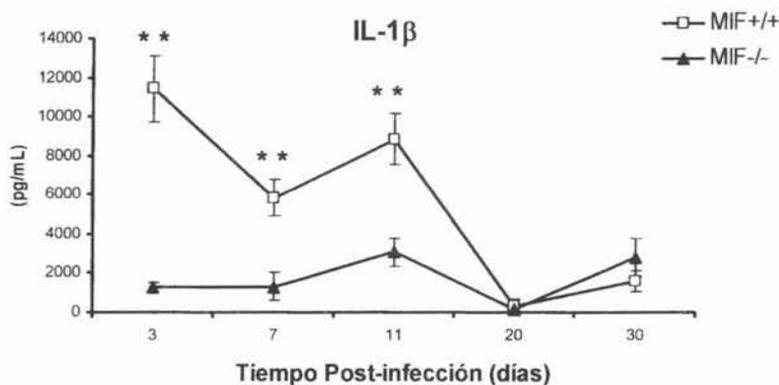


Figura 10.- Nivel de IL-1 β en suero de ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con 5000 trypomastigotes de *T. cruzi*. Los ratones MIF^{-/-} después de la infección tuvieron significativamente disminuido el nivel de IL-1 β comparado con los ratones MIF^{+/+}. Los resultados obtenidos representan la media \pm ES de 2 experimentos independientes, con iguales resultados y con al menos 9 ratones por punto hasta el día 20 y con 4 en el día 30. **p < 0.001 prueba de t (Graphpad Prism).

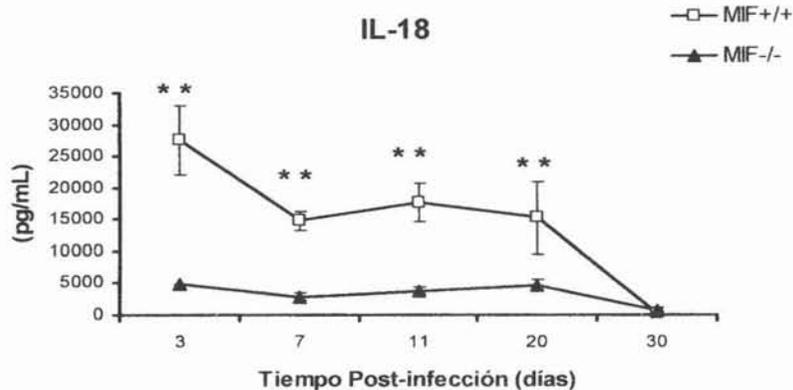


Figura 11.- Nivel de IL-18 en suero de ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi*. Después de la infección en los ratones, se observó que los ratones MIF^{-/-} tuvieron significativamente disminuida la producción de IL-18 comparado con los ratones MIF^{+/+}, dicha disminución, a diferencia del resto de las citocinas, se prolongó hasta los primeros 20 días p.i. Los datos graficados son la media \pm ES de al menos 10 ratones por punto, excepto al día 30 y representan 2 experimentos independientes. ** P<0.001, prueba de "t" de students (Graphpad Prism).

Por otra parte, también se determinó en suero la producción de citocinas como IL-12, IFN γ y TNF α . En las figuras 12, 13 y 14 (IL-12, IFN γ y TNF α , respectivamente) se puede observar que los niveles de estas citocinas en los ratones MIF^{-/-} con respecto a los ratones MIF^{+/+} estuvieron disminuidas significativamente los primeros 3 y 7 días p.i., aunque después se reestableció la producción de estas.

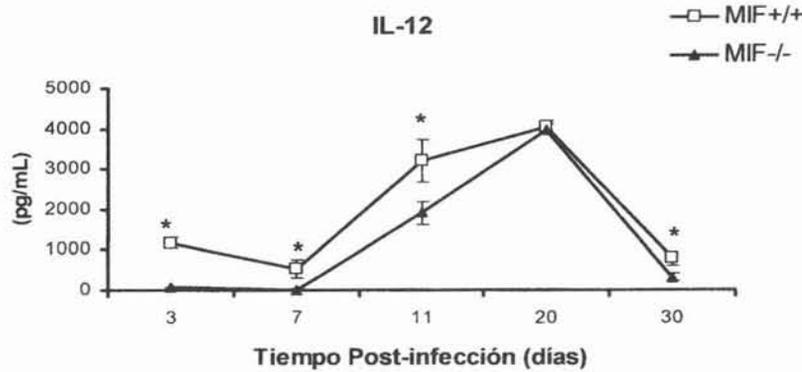


Figura 12.- Nivel de IL-12 en suero de ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi*. Durante los primeros 7 días post-infección los ratones MIF^{-/-} no tuvieron un nivel detectable de IL-12, hecho contrario a los ratones MIF^{+/+}. Después los ratones MIF^{-/-} empezaron a producir IL-12, pero fue hasta el día 20 p.i. que igualaron la producción de los ratones MIF^{+/+}. La grafica presenta los promedios \pm ES de la medición que se llevo a cabo en 15 ratones por punto, excepto el día 30 y representan 3 experimentos independientes. Los promedios se compararon por prueba de "t" y *p<0.05 (Grphpad Prism).

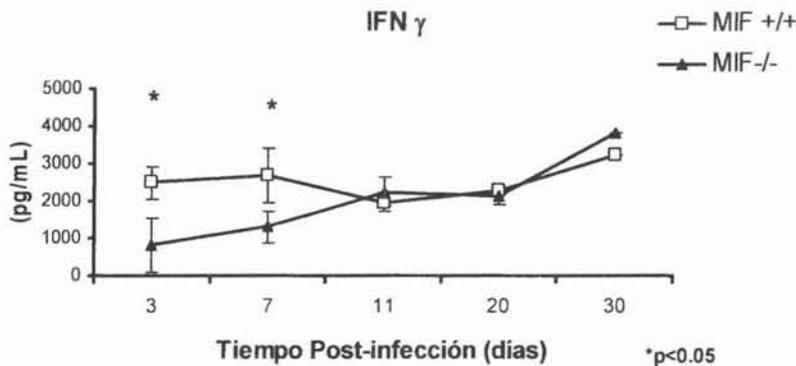


Figura 13.- Los ratones MIF^{-/-} tienen una producción disminuida de IFN γ solo al inicio de la infección comparados con el suero de los ratones MIF^{+/+}. Después de infectar con *T. cruzi* a los ratones MIF^{-/-} y de igual forma a ratones MIF^{+/+}, la diferencia en la producción de IFN γ , solo fue al inicio de la infección. Los puntos graficados representan el promedio \pm ES de 12 animales, excepto día 30, de 3 experimentos independientes. *p<0.05 prueba de t (Graphpad Prism).

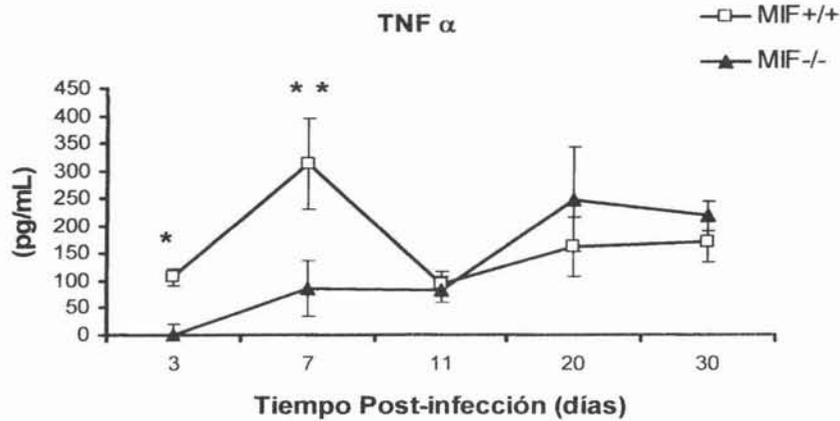


Figura 14.- La producción de TNF α , coincidentemente con la producción de IFN γ en el suero de los ratones MIF $^{-/-}$, solo se vio afectada en los primeros 7 días posteriores a la infección *T. cruzi*. Los datos mostrados son el promedio \pm ES de 12 ratones por punto, excepto día 30, de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ comparación por prueba de "t" (Graphpad Prism).

VII.4.2 Citocinas anti-inflamatorias

La IL-4 e IL-10 son citocinas consideradas dentro del grupo con efectos anti-inflamatorios (1). En la infección aguda con *Trypanosoma cruzi* niveles altos tanto de IL-4 como de IL-10 y otras citocinas como TGF- β han sido asociados a mayor susceptibilidad (21, 54, 75). En este trabajo de tesis se determinó la concentración en suero de IL-4 e IL-10. En la figura número 15 se muestran los niveles en suero de IL-4 en los días 3, 7, 11, 20 y 30 post-infección de los dos grupos experimentales (MIF $^{-/-}$ y MIF $^{+/+}$). Los niveles de IL-4 se encontraron disminuidos en los primeros 7 días posteriores a la infección en el grupo de ratones MIF $^{-/-}$, mostrando que estos ratones no deben su mayor nivel de susceptibilidad a un exceso en la producción de IL-4.

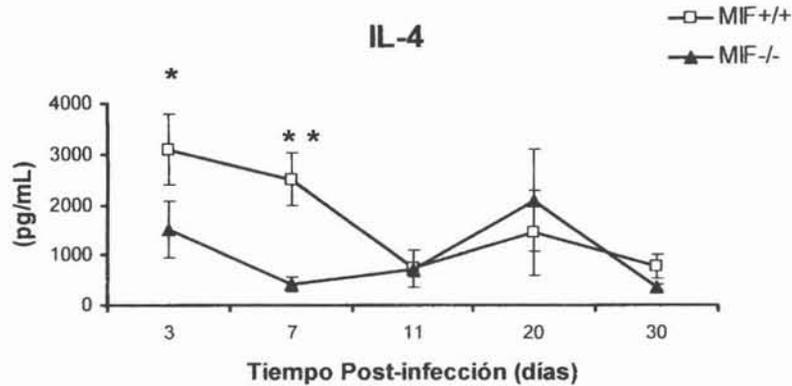


Figura 15.- Nivel de IL-4 en el suero de los ratones MIF+/+ y MIF-/- infectados con *T. cruzi*. Los datos representan el promedio \pm ES de 10 ratones por punto, excepto día 30, de 3 experimentos independientes.* $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ prueba de "t" para comparar promedios (Graphpad Prism).

En cuanto a IL-10 no hubo diferencias en el nivel secretado de esta citocina entre los ratones MIF-/- y MIF+/+, excepto al día 7 post-infección (fig.16). Sin embargo, cabe hacer notar que los niveles de IL-10 detectados inicialmente en el día 3, disminuyeron desde entonces significativamente hasta el día 30 tanto en los ratones infectados MIF+/+ como los ratones MIF-/-.

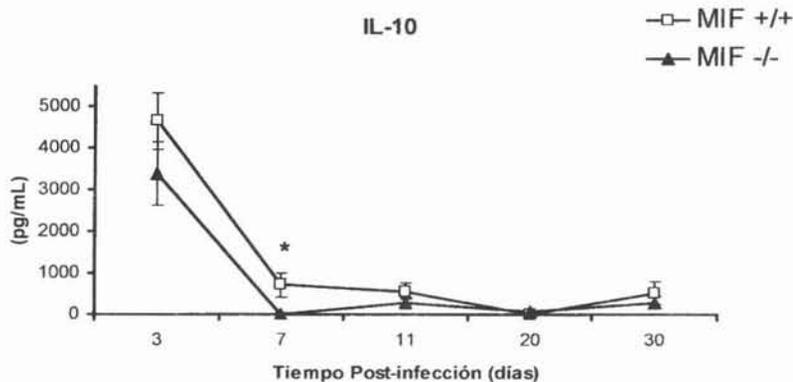


Figura 16.- Nivel de IL-10 en suero de los ratones MIF-/- y MIF+/+ infectados con *T. cruzi*. A excepción del día 7 post-infección la producción de esta citocina fue la misma tanto en los ratones MIF-/-, como en los ratones MIF+/+. La gráfica muestra los promedios de 10 ratones por punto, excepto día 30, de 3 experimentos independientes.* $p < 0.05$ se considero significativo por prueba de t (Graphpad Prism).

VII.5 CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS Ag-ESPECIFICOS

VII.5.1 Nivel de IgG2a anti-*Trypanosoma cruzi* en suero.

La grafica número 17 es representativa de 2 experimentos con resultados prácticamente idénticos, en los que se realizó una cinética de la producción de anticuerpos en los puntos indicados. El isotipo IgG2a se ha utilizado como marcador de una respuesta de tipo Th1, ya que esta bien establecido que el cambio ó “switch” del anticuerpo hacia éste isotipo es favorecido por este tipo de respuesta, específicamente por el IFN γ (1).

En nuestro modelo experimental se observó que en los días 7 y 11 posteriores a la infección los niveles de IgG2a son muy bajos en ambos grupos de ratones (MIF-/- vs MIF+/+) no habiendo diferencias en estos tiempos, mientras que en los días 20 y 30 post-infección, cuando posiblemente ya se inició una respuesta inmune de tipo adquirida, se notó claramente que los ratones MIF+/+ tienen la capacidad de producir 13 y 10 veces más este isotipo respectivamente en los puntos de tiempo analizados que los ratones MIF-/-.

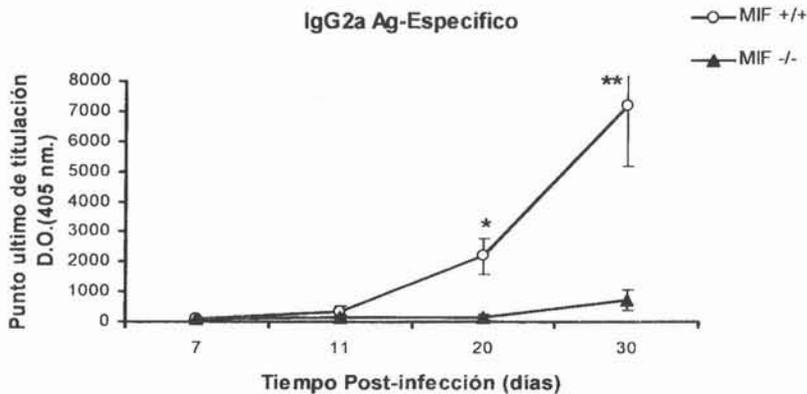


Figura 17.- Nivel de IgG2a Ag-especifico en el suero de ratones MIF+/+ y MIF -/- infectados con *T. cruzi*. Los ratones MIF+/+ muestran una tendencia hacia el aumento de este Ac. con el tiempo y que tal vez se mantenga después de los 30 días post-infección. Por el contrario los ratones MIF-/- no producen la misma cantidad de IgG2a a partir del día 20 post-infección. Los datos presentados son el promedio \pm ES de 8 ratones de 2 experimentos con resultados iguales en donde * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$, prueba de t (Graphpad Prism).

VII.5.2 Nivel de IgG1 anti-*Trypanosoma cruzi* en suero.

La grafica número 18 es representativa de 2 experimentos con iguales resultados. Los niveles de este anticuerpo en suero están disminuidos los primeros 11 días posteriores a la infección en los ratones MIF^{-/-}, pero a partir del día 20 y hasta el día 30 del seguimiento de la infección estos ratones lograron producir el mismo nivel de IgG1 con respecto al grupo de ratones infectados MIF^{+/+}.

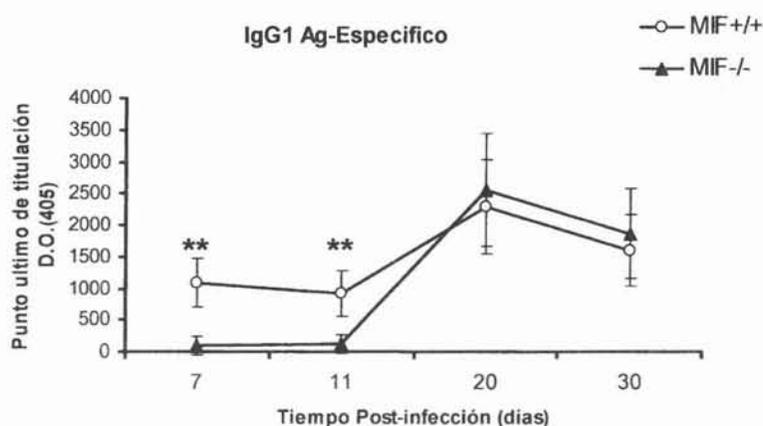


Figura 18.- Cuantificación de IgG1 anti-*Trypanosoma cruzi* en el suero de los ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+}. A pesar de ser una etapa muy temprana de la infección se logró detectar IgG1 en el suero de los ratones MIF^{+/+}. Por el contrario en estos primeros días no se pudo detectar este anticuerpo en los ratones MIF^{-/-}, sin embargo, a partir del día 20 post-infección el nivel fue el mismo en los dos grupos. Los valores presentados son el promedio \pm ES de la cuantificación de éste Ac en 8 ratones de 2 experimentos independientes, con resultados similares y ** $p < 0.001$ prueba de t (Graphpad Prism).

VII.6 PRODUCCIÓN DE CITOCINAS DE CÉLULAS DE BAZO ANTE UNA RE-ESTIMULACIÓN *In-vitro* CON Ag TOTAL DE *Trypanosoma cruzi*.

VII.6.1 Citocinas pro-inflamatorias

En los días 11 y 22 post-infección fueron sacrificados ratones de ambos grupos (MIF +/+ y MIF -/-). Se obtuvieron células totales de bazo y se reestimularon con Ag total de *T. cruzi* por 5 días, como ya se detalló en material y métodos. En el sobrenadante de dichos cultivos se determinó la producción de IL-12, IL-18, TNF α , IL-1 β e IFN γ . Se observó que al día 11 posterior a la infección el nivel de IL-12, IL-18, IFN γ y TNF α en los ratones MIF-/- estuvo disminuido y fue estadísticamente significativo cuando se comparó con los ratones MIF +/+. Sin embargo, esta diferencia se perdió conforme la infección avanzó, ya que a los 22 días post-infección, a excepción del IFN γ , los 2 grupos de ratones produjeron niveles similares de esta citocina (Figuras 19, 20, 21, 22 y 23).

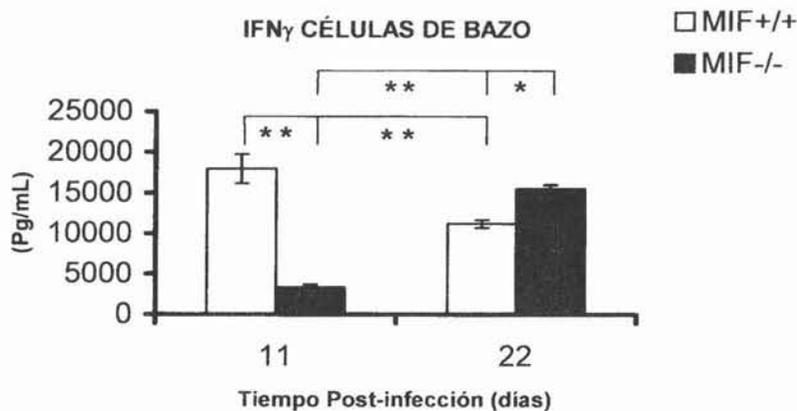


Figura 19.- Nivel de IFN γ en sobrenadante del cultivo de células de bazo después de una re-estimulación *in vitro* con Ag total de *T. cruzi*. A los 11 días post infección las células de los ratones MIF-/-, no pueden producir la misma cantidad de IFN γ que las células de los ratones MIF+/+. Por el contrario al día 22 p.i. los ratones MIF-/- logran producir significativamente más IFN γ que los ratones MIF+/+, además de que estos últimos tienen una significativa caída en la producción de esta citocina. Los valores graficados son el promedio de 8 ratones de 3 experimentos independientes en donde **p<0.001 y *p<0.05, prueba de t (Graphpad Prism).

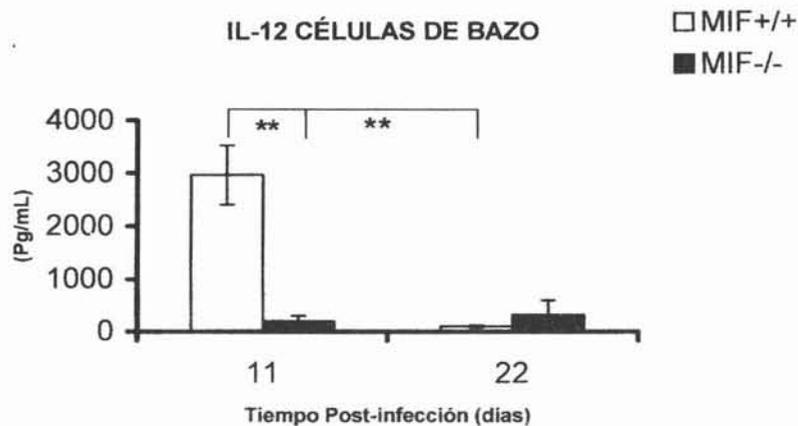


Figura 20.-Nivel de IL-12 en sobrenadante de cultivo de células de bazo de ratones MIF-/- y MIF+/, después de una re-estimulación con Ag total de *T. cruzi* a 11 y 22 días post-infección. Los ratones MIF-/- tuvieron una producción disminuida solo en el tiempo más temprano, en el día 22 p.i. el nivel es el mismo debido a que los ratones MIF+/- dejan de producir IL-12. Se muestran los valores promedio \pm ES de 8 ratones de 3 experimentos que se realizaron independientemente. Prueba de t ** $p < 0.001$ (Graphpad Prism).

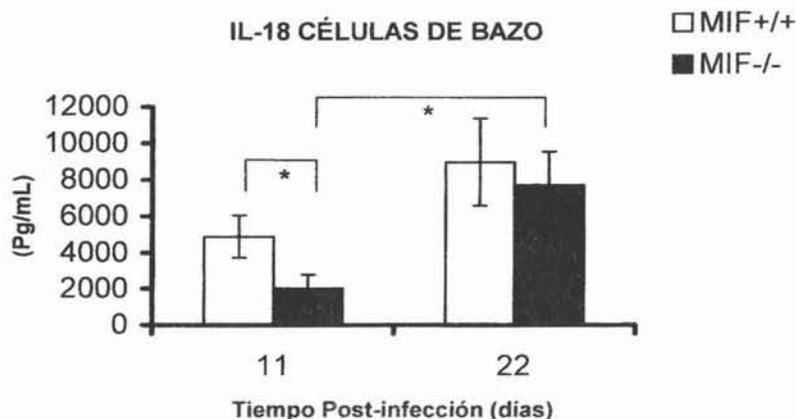


Figura 21.- Nivel de IL-18 en el sobrenadante de células de bazo de ratones MIF-/- y ratones MIF+/- después de re-estimular con Ag total de *T. cruzi*. El nivel de IL-18 se observó disminuido en los ratones MIF-/- solo a 11 días p.i. ya que para el día 22 los ratones MIF-/- tuvieron un significativo aumento de producción de IL-18. La gráfica representa promedio \pm ES de 8 ratones que formaron parte de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ Prueba de t (Graphpad Prism).

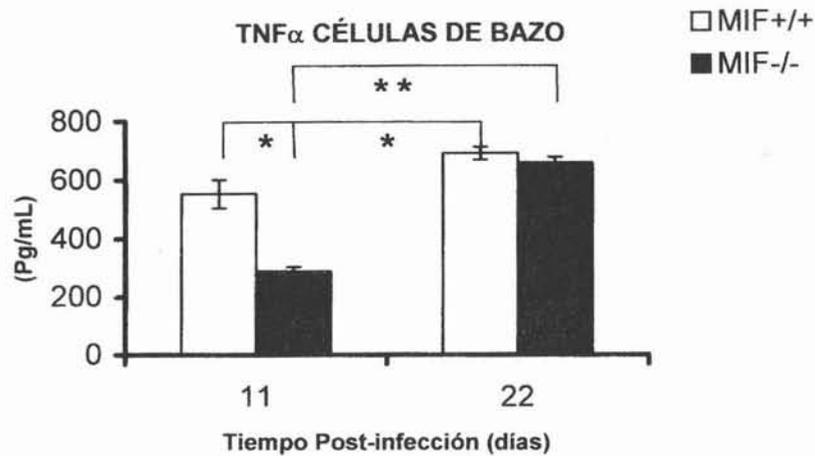


Figura 22.- Nivel de TNF α en sobrenadante de células de bazo de ratones MIF $^{-/-}$ y ratones MIF $^{+/+}$ re-estimuladas con Ag total de *T.cruzi*. Las células de los ratones MIF $^{-/-}$ a los 11 días p.i. no pueden producir el mismo nivel de TNF α que las células de los ratones MIF $^{+/+}$, esta disminución se perdió con el paso del tiempo, ya que para el día 22 los 2 grupos de ratones tuvieron un aumento significativo, pero estuvieron al mismo nivel. Los datos que se muestran son el promedio \pm ES de 8 ratones provenientes de 3 experimentos con resultados similares. * $p < 0.05$ Prueba de t (Graphpad Prism).

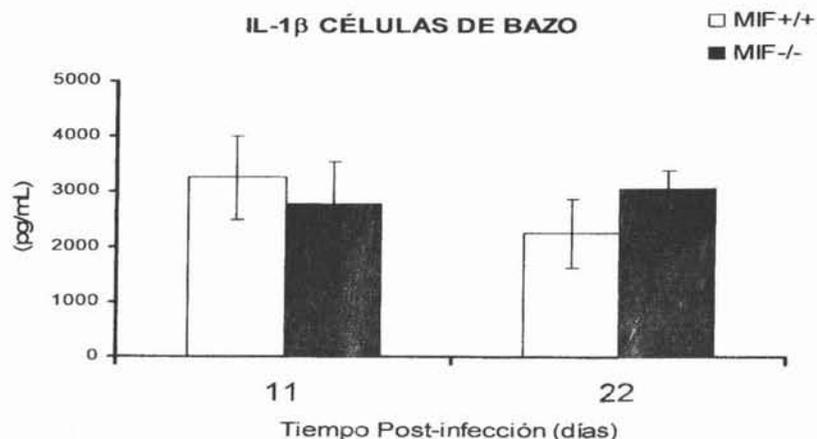


Figura 23.- Nivel de IL-1 β en sobrenadante de cultivo de células de bazo re-estimuladas con Ag de *T. cruzi*. Tanto las células de los ratones MIF $^{-/-}$, como las de los ratones MIF $^{+/+}$ pueden producir IL-1 β al mismo nivel en los distintos puntos de

tiempo, en los cuales se realizó la cuantificación de esta citosina, además no se encontraron diferencias en producción del día 11 al día 22 p.i..

VII.6.2 Citocinas anti-inflamatorias

Por otro lado, la determinación de los niveles de citocinas anti-inflamatorias como son IL-4 e IL-10 se realizó igualmente en el sobrenadante del cultivo ante una respuesta Ag-específica. En las figuras número 24 y 25 se puede observar que la ausencia de MIF no afectó la producción de estas citocinas, en el día 11, ni en el día 22 posteriores a la infección, así, como tampoco entre estos 2 días, ya que los niveles en los sobrenadantes del cultivo no fueron diferentes entre los dos grupos de ratones infectados.

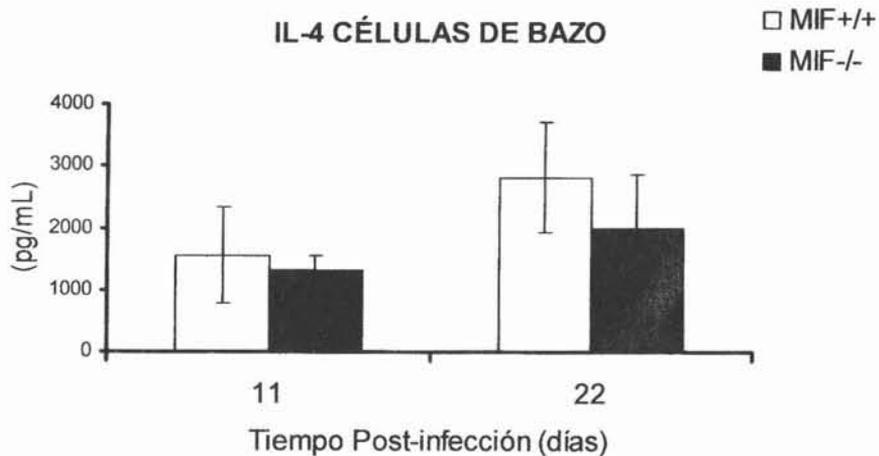


Figura 24.- Nivel de IL-4 en sobrenadante del cultivo de células totales de bazo re-estimuladas con Ag de *T. cruzi*, obtenidas a dos diferentes tiempos de ratones MIF^{-/-} y ratones MIF^{+/+} infectados. Se observó que las células de los ratones MIF^{-/-} producen la misma cantidad de IL-4, comparadas con las células obtenidas de los ratones MIF^{+/+} y no se encontró aumento significativo del día 11 al día 22 p.i. La gráfica representa el promedio de 8 ratones de 3 experimentos independientes. Prueba de t (Graphpad Prism).

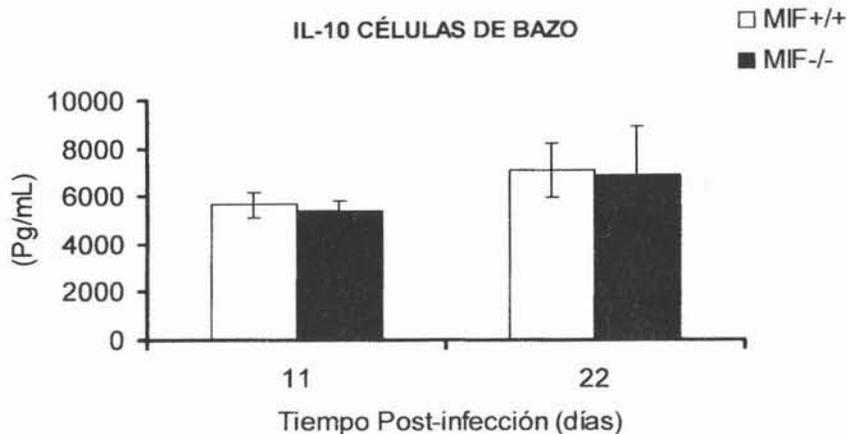


Figura 25.-Nivel de IL-10 en el sobrenadante de cultivo de células de bazo re-estimuladas con Ag total de *T. cruzi* obtenidas de ratones MIF^{-/-} y ratones MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi*. Al igual que en el caso de IL-4, el nivel de IL-10 no se vio afectado en los ratones MIF^{-/-} y mostrando que MIF regula diferencialmente a las citocinas y en condiciones distintas, ya que fue re-estimulación *in vitro*. Los datos son el promedio de 8 ratones por grupo que representan 3 experimentos independientes. Prueba de t (GraphPad Prism).

VII.7 ENSAYO DE RT-PCR EN CÉLULAS DEL CORAZÓN.

Con el fin de investigar tras la infección con *T. cruzi*, si existió una regulación a nivel transcripcional de algunas citocinas por parte de MIF, se realizó la extracción de RNA total de corazón, para evaluar la transcripción de los genes de citocinas en las células que migraron a este sitio como principal blanco para este parásito. Ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi* se sacrificaron en condiciones asépticas a los 22 días post- infección, debido a que en este punto pareciera ocurrir algo en los ratones MIF^{-/-} porque es cuando comienzan a presentar más parásitos en sangre comparados con los ratones MIF^{+/+}.

En la figura número 26 se presentan los resultados al día 22 de RT-PCR de RNA total extraído de corazón de 2 ratones MIF^{-/-} y 2 ratones MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi*, así como de ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} no infectados, como control. Se puede observar, que hay un aumento en la expresión de los diferentes genes si se compara a los animales infectados con los no infectados, mostrando que hay un efecto en la expresión de los genes en respuesta a la infección.

En segundo lugar, se encontró que los ratones MIF^{-/-} infectados expresaron más transcritos de IFN γ y RANTES comparados con los ratones MIF^{+/+}, ya que además de tener más densidad la banda con 30 ng de cDNA, se confirma esto con dos diluciones de este mismo cDNA, representadas en la figura como 15 y 7 ng. Para el gen de TLR-4 parecen tener el mismo nivel de expresión los dos grupos de ratones. Por último, se decidió utilizar la isoforma β de actina como control interno, sin embargo, se observaba constantemente modificado en los 2 grupos de ratones infectados, hasta que se encontró un reporte en el cual se afirmaba que la interacción de *T. cruzi* con los cardiomiocitos del hospedero provocan la sobre expresión de esta isoforma de actina (53) y se tuvo que tomar la expresión de la enzima Gliceraldehidofosfato Deshidrogenasa (GAPDH) como control.

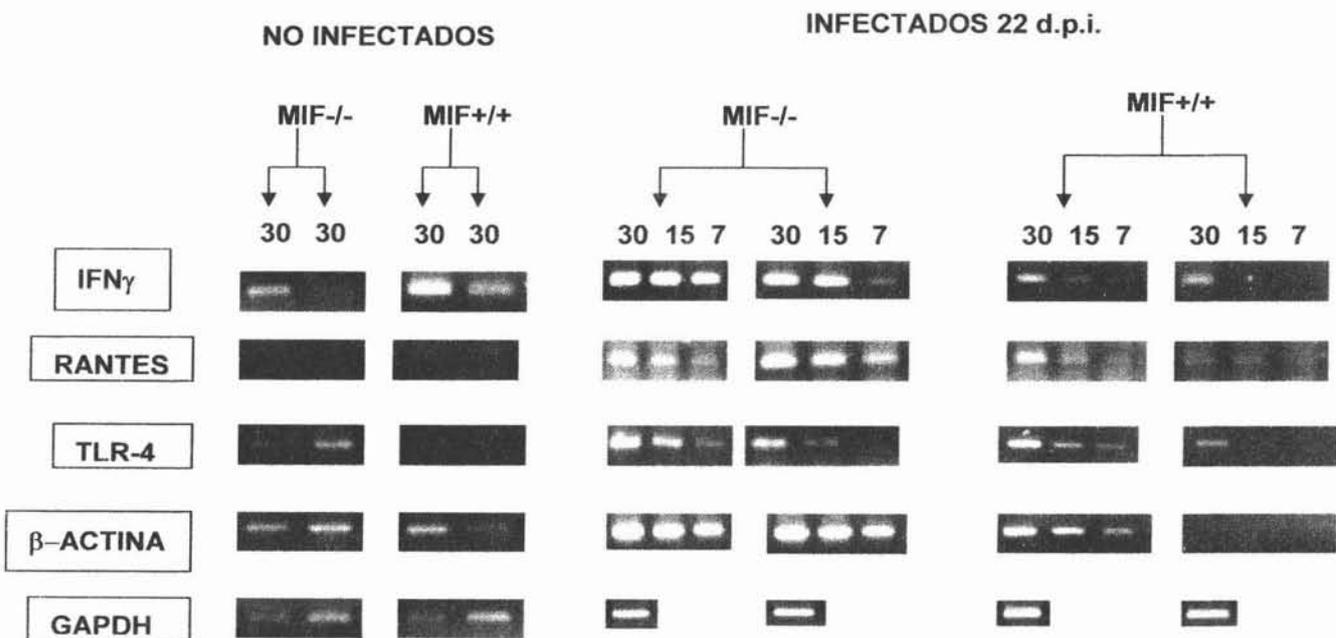


Figura 26.- Comparación de la expresión de IFN- γ , RANTES, TLR-4, β -actina con el control GAPDH, entre los 2 grupos de ratones infectados y con respecto a ratones no infectados. Se partió de 30ng de cDNA y se diluyo 1:2 y 1:4, representados en la figura como 15 y 7 ng, respectivamente, mientras que para los ratones no infectados y para GAPDH se muestra solamente la banda obtenida de la amplificación con 30 ng de cDNA.

VII.8 CITOMETRIA DE FLUJO

Se extrajeron células totales de peritoneo de ratones MIF^{-/-} y ratones MIF^{+/+} no infectados e infectados con *T. cruzi* a los 5 y 22 días p.i. En la figura 27 se observa que los ratones sin infectar ya sea MIF^{-/-} ó MIF^{+/+} tienen en cavidad peritoneal el mismo porcentaje de células Gr-1⁺ (neutrófilos), pero en el día 5 p.i. se observó un ligero aumento del porcentaje de dichas células. Por el contrario, en el día 22 en los ratones MIF^{-/-} se detectó el doble de células Gr1⁺ comparado con los ratones MIF^{+/+}. Sin embargo, la expresión del receptor de IFN γ se vió disminuida en ratones MIF^{-/-} no infectados comparados con los MIF^{+/+} no infectados. En el día 5 p.i. prácticamente es el mismo porcentaje de células que expresan este receptor y en el día 22 p.i. la diferencia se aumenta, teniendo los MIF^{-/-} un menor porcentaje de este receptor.

Por su parte el TLR-2 se encuentra similar en los ratones no infectados de los dos grupos y 5 días después del reto observamos como, incluso los ratones MIF^{-/-} expresan un poco más de TLR-2, esta diferencia no se consideró significativa. En el día 22 p.i. se notó que los ratones MIF^{-/-} no tuvieron la capacidad de mantener la expresión de este receptor y el caso contrario es que los ratones MIF^{+/+} aumentaron su expresión comparados con el día 5 y con los MIF^{-/-} en el día 22.

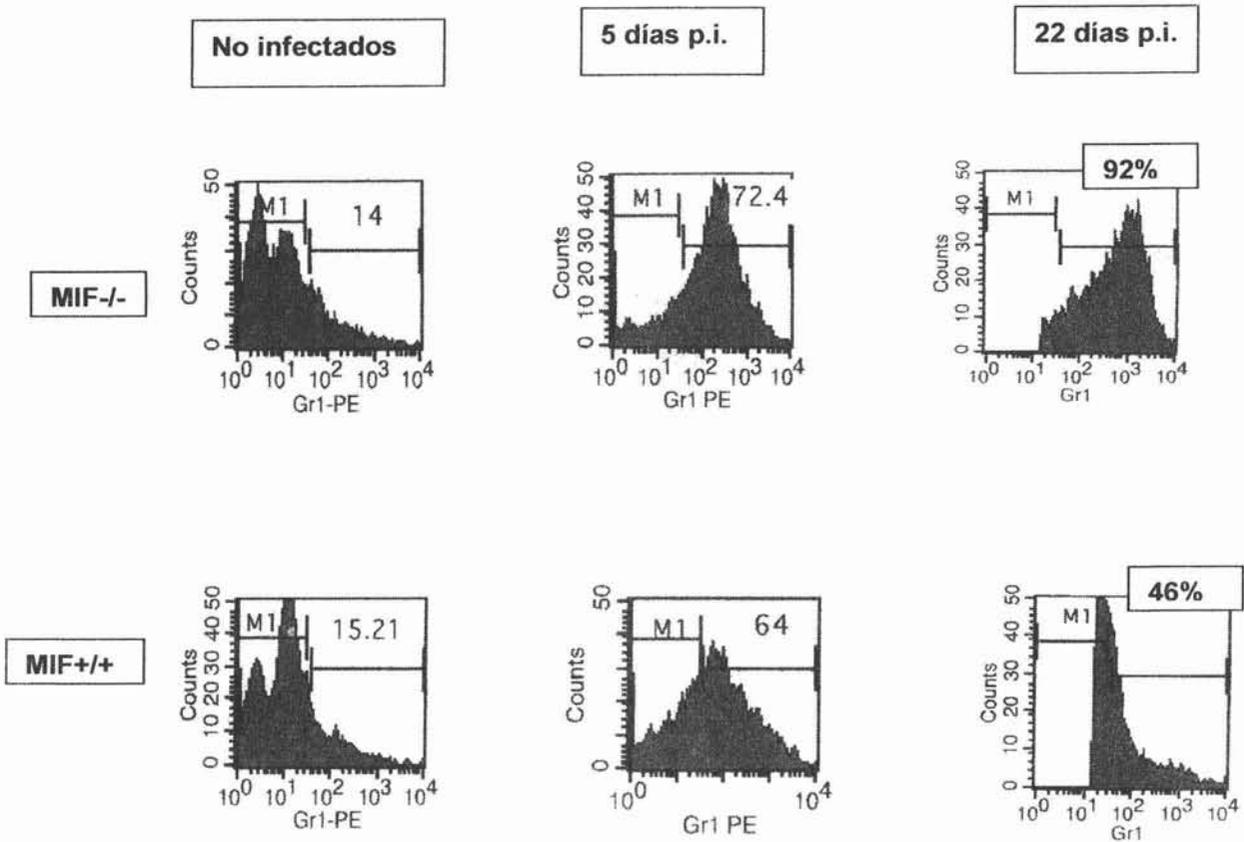


Figura 27.- Análisis fenotípico de células totales de peritoneo, se observó que los ratones MIF^{-/-} muestran un mayor reclutamiento de neutrófilos en la cavidad peritoneal. No se encontró diferencia significativa en los ratones no infectados. A los 5 d.p.i. se nota un ligero aumento en el porcentaje de células Gr-1⁺ (MIF^{+/+} 64% vs MIF^{-/-} 72.4%) mientras que en el día 22 claramente se ve que en los ratones MIF^{-/-} migraron el doble de neutrófilos de los que migraron en ratones MIF^{+/+} (92% de células Gr-1⁺ vs 46%, respectivamente). Los datos son representativos de 2 ratones por grupo para los no infectados y de 5 ratones para los infectados \pm ES.

Figura 28 a)

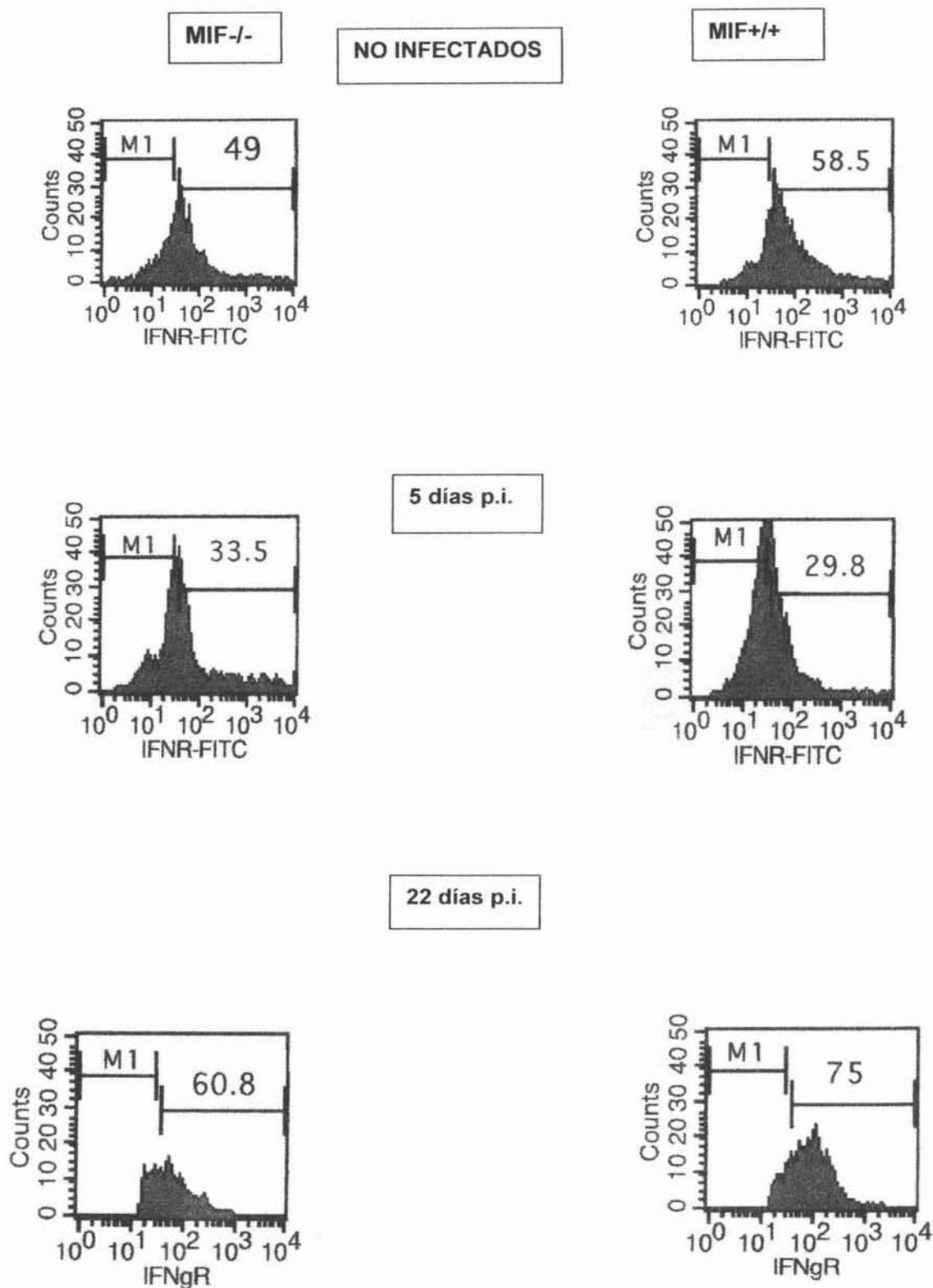


Figura 28 b)

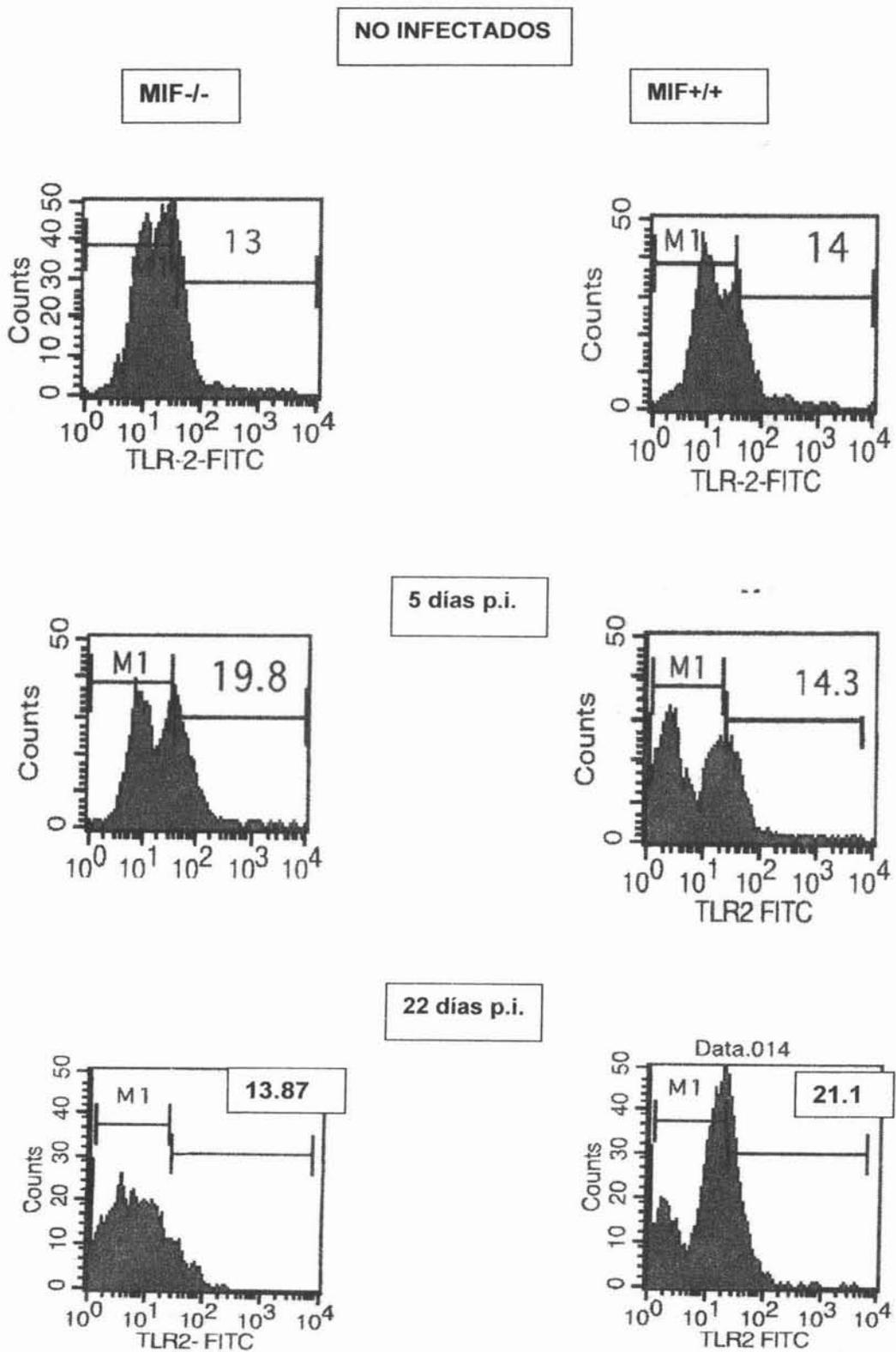


Figura 28.- a) Los ratones MIF+/+ presentan mayor expresión del receptor de IFN γ que los ratones MIF-/- a nivel basal (58.5% vs y 49%) esta diferencia se hizo mayor en el día 22 (75% vs 60.8%), además el día 5 p.i. es el único en el que el nivel de expresión fue similar entre los dos grupos de ratones (29.8% vs 33.5%).

b) En el caso de TLR-2 el nivel basal de expresión es el mismo en ratones MIF+/+ y en ratones MIF-/- (13% vs 14%), a los 5 días p.i. los ratones MIF-/- expresaron un poco más que los ratones MIF+/+ (19.8% vs 14.3%, respectivamente), aunque no se consideró una diferencia significativa, por último de manera similar al receptor de IFN γ , la diferencia más notoria se encontró en el día 22 p.i. (MIF+/+ 21.1% vs MIF-/- 13.87%). Los datos presentados se obtuvieron de la región en la cual se localizaban solamente células Gr-1+ y son los promedios \pm ES de 5 ratones infectados por cada grupo y 2 para los ratones no infectados.

VIII. DISCUSIÓN

Inicialmente el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) se describió como un producto de linfocitos T activados en la hipersensibilidad de tipo retardada (26), pero actualmente se sabe que es una citocina pro-inflamatoria multifuncional involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias (17, 52, 58). Sin embargo, aunque se ha demostrado la relevancia que tiene en la respuesta inmune innata y en la respuesta inmune de tipo adaptativa, aún no están claramente definidos los mecanismos inmunológicos en los que MIF podría participar.

Con el objetivo de aumentar el conocimiento en lo que respecta al papel de MIF dentro de la respuesta inmune se utilizó el modelo murino de la enfermedad de Chagas. En este modelo se sabe que la respuesta de tipo pro-inflamatoria innata es de gran importancia para controlar al parásito y de éste modo se trató de establecer la participación de MIF en la regulación de la respuesta inmune innata y en la resistencia a ésta infección parasitaria. Por otro lado, es conocido que en esta infección tienen gran relevancia las citocinas de tipo 1 como IL-12, IFN γ y TNF α en la resistencia a esta enfermedad (45, 54, 66, 80), cuya regulación por MIF no ha sido bien establecida.

Después de haber infectado i.p. con una dosis de 5000 tripomastigotes de la cepa Querétaro de *Trypanosoma cruzi* a ratones deficientes del gen funcional para MIF (MIF $-/-$) y a un grupo control de ratones (MIF $+/+$) ambos con fondo genético BALB/c, se dio seguimiento al curso de la infección y de la respuesta inmune en los primeros 30 días posteriores a la infección. Se pudo observar en este tiempo que la capacidad de controlar la división del parásito en los ratones MIF $-/-$ era deficiente, ya que estos ratones presentaron entre 3 y 4 veces más parásitos circulantes en sangre respecto a los ratones MIF $+/+$, como se observó en la curva de parasitemia (figura 6).

En años recientes se describió que el ligando encontrado en los macrófagos de humanos para la proteína gp83 secretada por *T. cruzi* incrementa la entrada del parásito a las células del hospedero utilizando la vía de las MAP cinasas, específicamente manteniendo la fosforilación de ERK1 y ERK2 (83). Este proceso de fosforilación es realizado también por MIF (18), razón por la cual podríamos esperar una disminución al inicio de la infección en la entrada a las células del hospedero por parte del parásito y por lo tanto disminución o igualdad en el nivel de parasitemia en los ratones MIF $-/-$, este hecho no se encontró. Esto sugiere que esta vía de internalización no es tan importante como lo es la vía de reclutamiento de lisosomas (5).

Los cortes histológicos (figura 9), confirman la mayor susceptibilidad establecida en los ratones MIF^{-/-} debido al daño en corazón, ya que se facilitó el establecimiento de *T. cruzi*.

Cuando se analizaron la curva de mortalidad y de parasitemia, observamos que a los 22 días p. i. aparentemente ocurre algo en los ratones MIF^{-/-} que pierden la capacidad de controlar la división del parásito, ya que es éste día en donde se comienza a ver diferencia en el nivel de parasitemia. Otra opción de dicho fenómeno es que hasta éste día 22 se hace evidente la falta de una respuesta innata óptima.

Se decidió analizar la respuesta en células de bazo y el ensayo de RT-PCR a los 22 días p.i..

Existen reportes que resaltan la importancia de las citocinas pro-inflamatorias como IFN γ , IL-12 y TNF α como factores que participan en el control inicial de *T. cruzi*, a través de la activación de macrófagos (54,80, 81). Para evaluar la posible alteración de la producción de estas moléculas en nuestro modelo, se realizó una medición en 5 distintos días, durante los primeros 30 días post-infección y se compararon los niveles de estas citocinas entre los dos grupos de ratones infectados (MIF^{-/-} vs MIF^{+/+}). Se encontró que en los primeros días post-infección, este tipo de respuesta en el grupo de los ratones MIF^{-/-} infectados se encuentra abatida por la poca producción de IL-12, IFN γ y TNF α , aunque después de los 20 días post-infección los niveles son similares entre los 2 grupos de ratones infectados. Esto sugiere que MIF es necesario para una respuesta rápida de citocinas pro inflamatorias, ya que la ausencia de MIF retrasa drásticamente la aparición de la respuesta pro-inflamatoria. En algunos casos (figura 10 y 11) hacia el final de la curva de parasitemia, se observó que la igualdad en la producción de IL-1 β e IL18 se debe a que los ratones MIF^{+/+} dejan de producir estas citocinas, más que a un aumento en la producción de estas citocinas por parte de los ratones MIF^{-/-}.

Hasta ésta primera parte podríamos dilucidar parcialmente la explicación respecto a la susceptibilidad presente en los ratones MIF^{-/-}, ya que nuestros datos coinciden con reportes previos en el hecho de que la etapa temprana es determinante para el resto de la infección (21, 49). En esta etapa temprana los ratones MIF^{-/-} no alcanzaron el mismo nivel de IFN γ , IL-12, y TNF α que los ratones MIF^{+/+}. Por otra parte, está claramente establecido que las células de la respuesta inmune innata como los macrófagos y las células NK son las primeras en tener contacto con el parásito y son las responsables de iniciar la respuesta inmune a través del reconocimiento de uno de los principales antígenos de *T. cruzi* (GPI) por el receptor tipo toll 2 (TLR2), que junto con la vía de señalización dependiente de MyD88, son necesarios para producir

citocinas pro-inflamatorias (19, 20). Con base en estas observaciones es posible que la baja producción de $\text{IFN}\gamma$, IL-12 y $\text{TNF}\alpha$ iniciales pudiera ser debido a que la carencia de MIF tendría como consecuencia una posible disminución en la expresión de TLR-2.

En lo que concierne a otras 2 citocinas pro-inflamatorias como IL-18 e IL-1 β , la producción disminuida en los ratones MIF $^{-/-}$ se prolongó hasta los 20 días post-infección. El hecho de esta prolongada carencia sugiere junto con otros reportes, que existe una relación muy cercana entre MIF y estas citocinas (46, 52, 58) y sugiere que hay una regulación específica de MIF sobre estas citocinas. Este punto llama la atención debido a que se sabe que la caspasa 1 (ICE) es esencial para la maduración y secreción de IL-18 e IL-1 β (25), por lo cual creemos que son necesarios más estudios para tratar de averiguar si es que pudiera existir una regulación por parte de MIF sobre esta enzima. A pesar de que estas dos citocinas importantemente promueven la migración de leucocitos hacia el sitio de infección (1), se encontró que los ratones MIF $^{-/-}$ con todo y la falta de IL-1 β e IL-18 presentan mayor infiltrado celular en cavidad peritoneal (figura 27).

Por otro lado si sobreponemos las gráficas 11 y 12 de citocinas en suero podemos observar que en el tiempo en el que los niveles de IL-12 e IL-18 están disminuidos en los ratones MIF $^{-/-}$, hay una producción normal de $\text{IFN}\gamma$ en comparación a los ratones MIF $^{+/+}$, sugiriendo que la producción del $\text{IFN}\gamma$ se da en forma independiente de IL-12 e IL-18, hecho que es necesario comprobar de igual forma con más estudios, ya que solo se tenía reportado que IL-18 puede sustituir a IL-12 para la producción de $\text{IFN}\gamma$ (54, 57) y aquí se observó una producción aparentemente normal a pesar de un bajo nivel de IL-12 y de IL-18, sugiriendo un mecanismo alterno para la producción de $\text{IFN}\gamma$, donde tal vez IL-23 ó $\text{IFN}\alpha$ (80) pudieran tener un papel relevante.

Se han publicado numerosos reportes afirmando que para *T. cruzi* la respuesta de tipo Th1 es la que confiere resistencia, y que por el contrario, la respuesta tipo Th2 se asocia a susceptibilidad (45, 54, 66, 78). Con el fin de establecer si la mayor susceptibilidad observada en los ratones MIF $^{-/-}$ se asociaba a algún perfil de citocinas específico se cuantificaron las citocinas tipo Th2 como IL-4 e IL-10. Sin embargo, la producción de estas citocinas en los ratones MIF $^{-/-}$ no se encontró por arriba del nivel que presentaron los ratones MIF $^{+/+}$, por el contrario, la producción de IL-4 también estuvo disminuida en los primeros 7 días de la infección (fig. 15), descartando la posibilidad de que el exceso en esta citocina fuera causante de dicha susceptibilidad.

Datos similares se hallaron para IL-10 siendo el día 7 post-infección el único punto en donde se registró la disminución en los ratones MIF^{-/-} (fig. 16).

En cuanto a la producción de anticuerpos, se mostró la cinética de producción de IgG2a anti-*T. cruzi* específica en ratones MIF^{-/-} y ratones MIF^{+/+} igualmente infectados (figura 17). Se observó que fue hasta el día 20 post-infección cuando la IgG2a comenzó a aparecer, pero interesantemente sólo en los ratones MIF^{+/+}, fenómeno que prosiguió hasta el día 30 post-infección. Los ratones MIF^{-/-} no tuvieron la capacidad de generar niveles específicos importantes de IgG2a. Se sabe que el IFN γ es el factor más relevante para la producción de dicho isotipo (1) y que éste isotipo (IgG2a) confiere protección contra el parásito (62). Interesantemente, se observó que en el periodo del día 20 al 30 post-infección cuando se encuentra el pico de parasitemia este anticuerpo es escaso en los ratones MIF^{-/-}, que sugiere que éste mecanismo también está participando en la protección. Después de observar que desde el día 11 p.i. los ratones MIF^{-/-} presentaron el mismo nivel de IFN γ y que coincidió con un bajo nivel de IgG2a en los ratones MIF^{-/-}, dicho fenómeno indica que la producción disminuida de IgG2a no se debe a la falta de esta citocina y que podría ser el receptor de IFN γ en linfocitos B el que está afectado como consecuencia de la carencia de MIF.

Además, asociamos la carencia de IL-4 al inicio de la infección, con la baja producción de IgG1 (figura 18). Se sabe la importancia de esta citocina para el cambio hacia este isotipo (1, 54), por lo cual asociamos la falta de IL-4 con la baja producción de IgG1 en los ratones MIF^{-/-}. Además, la falta de este anticuerpo al inicio de la infección, se propone como un factor más de susceptibilidad para los ratones MIF^{-/-}, por que los anticuerpos de la subclase IgG son esenciales para facilitar la fagocitosis del parásito (1) y para la actividad lítica del complemento (44). Se ha reportado la sobresaliente participación en la resistencia a *T. cruzi* de estas subclases como anticuerpos líticos (62). Nuestros datos coinciden con un reporte en el que se observa como el primer anticuerpo en aparecer en la escala del tiempo es IgG1 a pesar de ser favorecido por una citocina Th2 y después aparece IgG2a, tomando en cuenta que la cuantificación que se realizó, fue de igual forma Ag-específica (62).

Los niveles de IL-4 e IL-10 se determinaron en sobrenadantes de cultivo de células totales de bazo *In vitro*, después de una re-estimulación con Ag total de *T. cruzi*. Para esta parte se eligieron el día 11 y 22 post-infección.

La producción de estas citocinas anti-inflamatorias no se afectó en ninguno de los dos puntos analizados, mostrando que MIF participa promoviendo la producción de citocinas de forma diferencial y que en este caso no hay gran influencia de MIF sobre IL-4 e IL-10. Sin embargo, se observó gran influencia por parte de MIF sobre citocinas pro-inflamatorias, porque a excepción de IL-1 β , el resto de este tipo de citocinas (IFN γ , IL-12, IL-18, TNF α en las figuras 19, 20, 21 y 22, respectivamente) se observaron significativamente disminuidas en los sobrenadantes de dichos cultivos en el día 11 post-infección, confirmando la relevancia que tiene MIF en la inmunidad innata como parte de la cascada para iniciar la respuesta inflamatoria y de resistencia, en este caso contra *T. cruzi*.

Además, se confirmó para el caso de IFN γ , IL-12, IL-18 y TNF α que en los ratones MIF $^{-/-}$, después de que avanza la infección se puede producir una cantidad normal de estas citocinas, ya que a los 22 días se notó un aumento estadísticamente significativo por parte de los ratones MIF $^{-/-}$ (figuras 19, 20, 21 y 22). Esto demostró que aunque los ratones MIF $^{-/-}$ tienen la capacidad de reponerse, en cuanto a producción de citocinas, si estas no se producen de forma normal desde el inicio de la infección, se aumenta la susceptibilidad a *T. cruzi*. También resalta el importante papel de los linfocitos como productores de citocinas, ya que la mayoría de células de bazo son linfocitos (1).

En la figura número 26 se mostró que al cuantificar el mRNA de IFN γ y RANTES (CCL5) al día 22 post-infección en el corazón de los ratones, se encontró que para los ratones MIF $^{-/-}$ aparentemente hay más expresión del IFN γ y RANTES. Esto se le atribuye a dos factores: primeramente, en conjunto con los demás datos en este día todo parece normal en los ratones MIF $^{-/-}$ en cuanto a la producción de citocinas, por otro lado, según los cortes histológicos hay mayor número de leucocitos en el corazón de los ratones MIF $^{-/-}$ por lo que estos dos fenómenos en suma podrían ser la probable causa de mayor intensidad en las bandas de los ratones MIF $^{-/-}$, además esto es consistente con el hecho de que los esplenocitos de los ratones MIF $^{-/-}$ secretan más IFN γ al día 22 p.i. (figura 19).

De la misma forma se analizó la expresión de TLR-4, receptor que se sabe está disminuido en los macrófagos de ratones MIF $^{-/-}$ (68). Se observó en la figura 26 que tienen el mismo nivel de expresión los dos grupos de ratones MIF $^{-/-}$ y MIF $+/+$, apoyando el hecho de que lo que se observó es reflejo de un mayor infiltrado ó que posiblemente la disminución de este receptor es solo en M Φ . Creemos que si este mismo tipo de análisis se realizara en un tiempo más temprano en la infección y separando las células sobre todo los macrófagos, debido a que se sabe que sin MIF

los macrófagos no tienen una óptima activación y que MIF participa en la activación de estos (14, 43, 55, 73), posiblemente refleje una cosa distinta a lo encontrado, es decir, que se detecten problemas de expresión sobre todo de genes como el de IL-12, IL18, IL-1 β y TNF α en macrófagos.

Posiblemente, la falla es a nivel de la translocación de NF-kB, además la fuente principal de IL-18 y de IL-1 β son los macrófagos (1) y el hecho de que estas citocinas sean las más afectadas, podría ser muy probablemente el indicio de la falla en este tipo de células.

Por otro lado, en esta misma figura 26 se observa que los ratones MIF $^{-/-}$ tienen sobre expresión de β actina, lo cual se lo atribuimos a el hecho de estar más parasitados y no al infiltrado leucocitario ya que se reporto que los cardiomiocitos sobre expresan β actina con la presencia del parásito (53). Este último hecho podría deberse a que la actina tiene un papel importante en el proceso de internalización por parte de *T. cruzi* (34).

En la figura 27 también se notan claramente más neutrófilos (células Gr-1+) en cavidad peritoneal de los ratones MIF $^{-/-}$, comparado con los ratones MIF $^{+/+}$.

En resumen, la carencia de IL-18, IL-1 β y el hecho de que MIF induce la producción de una importante quimiocina como IL-8 por parte de células dendríticas (58) es posible que moléculas alternas promuevan este alto grado de migración de neutrófilos. Una importante opción podría ser el TGF β ya que se considera un potente quimio-atrayente para estas células, pero no un activador de ellas (63). Este hecho coincide perfectamente con lo observado, debido a que a pesar de la presencia de más células consideradas protectoras para el caso de la enfermedad de Chagas (82), no se pudo eliminar al parásito, ni de sangre periférica (figura 6), ni de los tejidos blanco (figura 9). Para confirmar este hecho evaluamos la expresión de TGF β en corazón por RT-PCR tiempo real, encontramos que los ratones MIF $^{-/-}$ infectados presentan significativamente mayor expresión de TGF β que los ratones MIF $^{+/+}$, al menos en el día 22 p.i. (Resultados preliminares).

En el ensayo de citometría de flujo, se encontró baja expresión del receptor de IFN γ en el día 22 p.i. en los neutrófilos de los ratones MIF $^{-/-}$. En este tiempo estos ratones muestran mayor parasitemia y mortalidad, por lo cual estos datos sugieren que los neutrófilos podrían tener una activación por debajo de lo normal comparados con los neutrófilos de los ratones MIF $^{+/+}$. El hecho de no tener la misma cantidad de receptor de IFN γ (IFN γ R) sugiere que posiblemente los neutrófilos no pueden ayudar a producir citocinas, ni eliminan al parásito fagocitado, porque esta citocina es esencial para activarlos (82). Además del IFN γ R, se analizó la cantidad de TLR-2 en la

membrana de las células Gr-1+ y se notó una disminución del 7.3% aprox. en los ratones MIF^{-/-}, esta diferencia no se considera significativa, pero creemos que puede estar afectando el estado de activación normal de los neutrófilos.

En conclusión de esta parte, podemos decir que MIF es esencial en los neutrófilos para sostener la expresión de TLR-2 y si a esta carencia del receptor le sumamos el hecho de que se sabe que MIF es producido por neutrófilos activados y que una vez secretado este activa a dichas células (64) se puede especular una más grande disfuncionalidad. Por otra parte, es muy probable que el exceso de TGFβ en los ratones MIF^{-/-} sea la causa de el aumento en la migración de estos hacia el sitio de infección, que es la cavidad peritoneal.

IX. CONCLUSIONES

En conjunto todos los datos obtenidos nos sugieren que:

- MIF participa de manera importante en el control de la enfermedad de Chagas experimental.
- La susceptibilidad establecida en los ratones MIF^{-/-} se debe a su incapacidad de producir citocinas pro-inflamatorias al inicio de la respuesta innata relacionadas con la resistencia a *T. cruzi* y con la incapacidad para iniciar un respuesta adaptativa de tipo humoral.
- Se afirma el papel pro-inflamatorio de MIF ya que reguló diferencialmente la producción de citocinas, siendo las anti-inflamatorias (al menos IL-4 e IL-10) las menos afectadas.
- Ante una respuesta Ag-específica, la carencia de MIF retrasa la producción de citocinas que inician mecanismos protectores por parte de células de bazo
- La ausencia de MIF retrasa el switch de anticuerpos específicos protectores contra *T. cruzi*.
- MIF posiblemente es necesario para activar células como los neutrófilos, manteniendo la expresión de TLR-2 y receptor de IFN γ .
- MIF, posiblemente, regula la expresión del receptor de IFN γ en células B.
- En ausencia de MIF se activa un mecanismo quimioatrayente de neutrófilos aún no descrito.

PERSPECTIVAS

Determinar la causa por la cual la ausencia de MIF tiene como consecuencia una baja producción de citocinas pro-inflamatorias, un retraso en producción de Ac's y el mantenimiento de receptores de membrana esenciales para la activación celular ante un estímulo patogénico es el siguiente paso para complementar la información y las preguntas que se plantean son:

¿Esta afectada la translocación de NF- κ B, la expresión ó fosforilación de moléculas importantes de señalización como MyD 88, IRAK y TRAF por eso la carencia de citocinas al inicio de la infección?

¿El receptor de IFN γ esta disminuido en la membrana de células B deficientes de MIF?

¿Enzimas como caspasa 1 no funcionan óptimamente en ausencia de MIF?

¿La expresión en membrana de TLR-4 disminuye sin MIF, solamente en macrófagos?

Finalmente, se observó que MIF es necesario para controlar la infección murina con *T. cruzi*, entonces, un punto interesante y aún no descrito es saber si el parásito induce la producción de MIF directamente en las células del sistema inmune ó no la induce como estrategia de evasión.

X REFERENCIAS

- 1.-**Abbas A. and Lichtman A.** (2003) Cellular and molecular Immunology, Fifth edition Saunders.
- 2.-**Aliberti J.C., Cardoso M.A., Martins G., Gazzinelli R., Vieira L. and Silva J.** (1996) IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live Trypomastigotes, *Infect. Immun.* 64, 1961-1967.
- 3.-**Almeida I.C. and Gazzinelli R.** (2001) Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses, *J. Leuk. Biol.* 70, 467-477.
- 4.- **Andrade Z.A.** (1999) Immunopathology of Chagas disease, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 suppl. 1 71-80.
- 5.-**Andrews N.** (2002) Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship, *J. Cel. Biol.* 158, 389-393
- 6.-**Aoki M.P., Guiñazu N.L., Pellegrini A.V., Gotoh T., Masih D.T. and Gea S.** (2004) Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes, *Am. J. Physiol. Cel. Physiol.* 286, C206-C212.
- 7.-**Bacher M., Metz C.N., Calandra T., Mayer K., Chesney J., Lohoff M., Gemsa D., Donnelly T. and Bucala R.** (1996) An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7849-7854.
- 8.-**Baumann R., Casaulta C., Simon D., Conus S., Yousefi S. and Simon H.** (2003) Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway, *FASEB J.* 17, 2221-2230.
- 9.-**Bernhagen J., Bacher M., Calandra T., Metz C.N., Doty S., Donnelly T. and Bucala R.** (1996) An essential role for Macrophage migration inhibitory factor in the Tuberculin Delayed-type Hypersensitivity Reaction, *J. Exp. Med.* 183, 277-282.
- 10.-**Bogdan C., Rollinghoff M. and Diefenbach A.** (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediaries in innate and specific immunity, *Curr. Opin. Immunol.* 12, 64-76.
- 11.-**Bozza M., Satoskar A., Lin G., Lu B., Humbles A., Gerard C. and David J.R.** (1999) Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene reveals its critical role in Sepsis, *J. Exp. Med.* 189, 341-346.
- 12.-**Bucala R.** (1996) MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response, *FASEB J.* 10, 1607-1613.
- 13.-**Burleigh B.A. and Andrews N.** (1998) Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*, *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 461-465.

14.-Calandra T., Jurgen B., Mitchell R. and Bucala R. (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor, *J. Exp. Med.* 179, 1895-1902.

15.-Calandra T and Bucala R. (1997) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) a glucocorticoid counter-regulator within the immune system, *Crit. Rev. Immunol* 17, 77-88.

16.-Calandra T., Spiegel L., Metz C.N. and Bucala R. (1998) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11383-11388.

17.-Calandra T., Echtenacher B., Le roy D. Pugin J., Metz C.N., Hultner L., Heumann D., Mannel D., Bucala R. and Glauser M. (2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor, *Nat. Med.* 6, 164-170.

18.-Calandra T. and Roger T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity, *Nat. Rev.* 3, 791-799.

19.-Campos M.A. (2001) Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite, *J. Immunol.* 167, 416-423.

20.- Campos M. A., Almeida I., Takeuchi O., Akira S., Valente E., Procopio D., Travassos L., Smith J., Golenbock D. and Gazzinelli R. (2004) Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88, *J. Immunol.* 172, 1711-1718.

21.- Cardillo F., Voltarelli J., Reed S. and Silva J. (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immun.* 64, 128-134.

22.- Castaños-Velez E., Maerlan S., Osorio L., Aberg F., Biberfeld P., Orn A. and Rottenberg M. (1998) *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect. Immun.* 66, 2960-2968.

23.-Chagas C. (1909) Nova tripanozomiase humana, estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1-62.

24.-Chaiyaroj S.C., Rutta A., Muenthaisong K., Watkins P., Nau ubol M. and Looareesuwan S. (2004) Reduced levels of transforming growth factor- β 1, IL-12 and increased Macrophage migration inhibitory factor are associated with severe malaria, *Acta Trop.* 89, 318-327.

25- Creagh E.M., Conroy H. and Martin S.J. (2003) Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity, *Immunol. Rev.* 193, 10-21.

26.- David J. (1966) Delayed hypersensitivity *in vitro* : its mediation by cell free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 72-77.

27.- Denkers E.Y. and Butcher B.A. (2005) Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans, *Trends Parasitol.* 21, 35-41.

28. -De Souza W. (2002) From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality, *Biomed Central* www.kinetoplastids.com/content/1/1/3, 1-21.

29. - Dinnarello C.A. and Fantuzzi G. (2003) Interleukin-18 and host defense against infection, *J. Infect. Dis.* 187 sup.2 , S370-S384.

30.-Donn R.P. and Ray D.W. (2004) Macrophage migration inhibitory factor : molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule, *J. Endocrinol.* 182, 1-9.

31.- Duleu S., Vincendeau P., Courtois P., Semballa S., Lagroye I., Dauloede S., Boucher JL., Wilson KT., Veyret B. and Gobert AP, (2004) Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J. Immunol.* 172, 6298-6303

32.-Ebrahim G.J. (2004) Eradication of American Trypanosomiasis (Chagas' Disease): An Achievable Goal? *J. Trop. Pediat.* 50, 320-321.

33.- Flawiá M.M., Tellez-Iñon M.T. and Torres H.N. (1997) Signal Transduction mechanisms in *Trypanosoma cruzi*, *Parasitol. Today* 13, 30-33.

34.-Fonseca C.T., Furniel J., De souza W. and Ulises T. (2002) Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells, *Cell Struct. Funct.* 27, 91-98.

35.- Giordanengo L., Guiñazu N., Stempin C., Fretes R., Cerbán F. and Gea S. (2002) Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite, *Eur. J. Immunol.* 32, 1003-1011.

36.- Gómez-García L., Alejandro-Aguilar R., Aranda-Fraustro A., López R. and Monteón V. (2005) Description of inflammation and cytokine profile at the inoculation site and in heart tissue of mice re-infected with *Trypanosoma cruzi* vector derived-metacyclic trypomastigotes, *Parasitol.* 130, 511-522.

37.-Guiñazú N., Pellegrini A., Giordanengo L., Auki M., Rivarola H., Cano R., Rodrigues M. and Gea S. (2004) Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice, *Microb. Infect.* 6, 1250-1258.

38.- Hall B., Tam W., Sen R. and Pereira M. (2000) Cell-specific activation of nuclear factor- κ B by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Mol. Biol. Cell* 11, 153-160.

39.-Hira E., Ono T., Kumar D., El-Assal O., Hishikawa Y., Yamanoi A. and Nagasue N. (2004) Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces

angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 103 , 588-598.

40.- Hunter C.A., Ellis-Neyes L., Slifer T., Kanaly S., Grunig G., Fort M., Rennick D. and Araujo Fausto. (1997) IL-10 is required to prevent Immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*, *J. Immunol.* 158, 3311-3316.

41.- Juttner S., Jurgen B., Metz C.N., Rollinghoff M., Bucala R. and Gessner A. (1998) Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF α . *J. Immunol.* 161, 2383-2390.

42.- Kleemann R., Hausser A., Gelger G., Mischke R., Burger-Kentischer A., Flieger O., Johanness F., Roger T., Calandra T., Kapurnlotu A., Grell M., Finkelmeler D., Brunner H. and Bernhagen J. (2000) Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through jab1, *Nat.* 408, 211-216.

43.-Koebernick H., Grode L., David J.R., Rohde W., Rolph M., Mittrucker H. and Kaufmann S. (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium* , *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 13681-13686.

44.- Krautz G.M., Kissinger J.C. and Krettli A.U. (2000) The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi* , *Parasitol. Today* 16, 31-34.

45 . - Kumar S. and Tarleton R. (2001) Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J. Immunol.* 166, 4596-4603.

46. - Lan H.Y., Bacher M., Yang N., Mu W., Nikolic-Paterson D., Metz C., Meinhardt A., Bucala R. and Atkins R. (1997) The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat, *J. Exp. Med.* 185, 1455-1465.

47.-Laird W. P., Zijgerveld., Linders K., Rudnicki M., Jaenisch R., and Berns A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure, *Nucl. Acid Res.* 19 , 4293.

48. - Li Y., Lu C., Xing G., Zhu Y. and He F. (2004) Macrophage migration inhibitory factor directly interacts with hepatopoietin and regulates the proliferation of hepatoma cell, *Exp. Cell Res.* 300, 379-387.

49.-Lieke T., Graefe S., Klauenberg U., Fleischer B. and Jacobs T. (2004) NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms, *Infect. Immun.* 72, 6817-6825.

50.-Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis A. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

51. - Martiney J.A., Sherry B., Metz C., Espinoza M., Ferrer A., Calandra T., Broxmeyer H. and Bucala R. (2000) Macrophage migration inhibitory factor release

by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia, *Infect. Immun.* 68, 2259-2267.

52.- Matsui Y., Okamoto H., Jia M., Akino M., Uede T., Kitabatake A. and Nishihira J. (2004) Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis, *J. Mol. Cel. Cardiol.* 37, 557-566.

53.- Meirelles M.N., Pereira M.C., Singer R.H., Soeiro M.N., Garzoni L.R., Silva D.T., Barbosa H.S., Araujo-Jorge T.C., Masuda M.O., Capella M.A., Lopes A.G. and Vermelho A.B. (1999) *Trypanosoma cruzi*- Cardiomyocytes: new contributions regarding a better understanding of this interaction, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 suppl. 1, 149-152.

54.-Michailowsky V., Silva N., Rocha C., Vieira L., Lannes-Vieira J. and Gazzinelli R. (2001) Pivotal role of the Interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection, *Am. J. Pathol.* 159, 1723-1733.

55. - Mitchell R.A., Liao H., Chesney J., Fingerle-Rowson G., Baugh J., David J. and Bucala R.(2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response, *Proc.Natl. Acad. Sci.* 99, 345-350.

56.-Mossman T.R. and Sad S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol. Today* 17, 138-146.

57.-Muller U., Kohler G., Mossman H., Schaub G., Alber G., Di Santo J., Brombacher F. and Holscher C. (2001) IL-12-Independent IFN γ production by T cells in experimental Chagas ' disease is mediated by IL-18. *J. Immunol.* 167, 3346-3353.

58. - Murakami H., Akbar S., Matsui H., Horike N. and Onji M. (2002) Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 504-510.

59.- Nakamaru Y., Oridate N., Nishihira J., Takagi D., Furuta Y. and Fukuda S. (2005) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) contributes to the development of allergic rhinitis, *Cytokine* www.elsevier.com/locate/issn/10434666

60.-Oliveira A.C., Peixoto J., de Arruda L., Campos M., Gazzinelli R., Golenbock D., Akira S., Previato J., Mendoca-Previato L., Nobrega A. and Bellio M. (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* Glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi.*, *J. Immunol.* 173, 5688-5696.

61.-Paul W.E. (2003) *Fundamental Immunology*, Fifth edition, Lippincott Williams and Wilkins

62.- Pyrrho A.S., Moraes J., Pecanha L.M. and Gattass C.R. (1998) *Trypanosoma cruzi* : IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice, *Parasitol. Res.* 84, 333-337

- 63.-Reibman J., Meixler S., Lee T., Gold L., Cronstein B., Haines K., Kolasinski S. and Weissmann G.** (1991) Transforming growth factor β 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 6805-6809.
- 64.- Riedemann N.C., Guo R., Gao H., Sun L., Hoesel M., Hollmann T., Wetsel R., Zetoune F. and Ward P.** (2004) Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils, J. Immunol. 173, 1355-1359.
- 65.- Rodriguez-Avila A., Dallagiovanna B., Yamada-Ogatta S., Monteiro-Goes V., Fragoso S., Krieger M. and Goldenberg S.** (2003) Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, Gen. Mol. Res. 2, 159-168.
- 66.- Rodriguez-Sosa M., Terrazas L.I., Marquez R. and Bojalil R.** (1999) Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. Parasite Immunol. 21, 177-185.
- 67.-Rodriguez-Sosa M., Rosas L., David J., Bojalil R., Satoskar A. and Terrazas L.I.** (2003) Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*, Infect. Immun. 71 1-8.
- 68.- Roger T., David J., Glauser M. and Calandra T.**(2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4, Nat. 414, 920-924.
- 69.- Ropert C.** (2002) Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Microb. Infect. 4 1015-1025.
- 70.- Rosengren E, Bucala R, Aman P., Jacobsson L., Odh G., Metz C. and Rorsman H.** (1996) The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. Mol. Med. 2, 143-149.
- 71.- Rossi A.G., Haslett C., Hirani N., Greening A., Rahman I., Metz C., Bucala R. and Donnelly S.** (1998) Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF) potential role in asthma, J. Clin. Invest. 101, 2869-2874.
- 72.-Sacks D. and Sher A.** (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa, Nat. Immunol. 3, 1041-1047.
- 73.- Satoskar A.R., Bozza M., Rodriguez-Sosa M., Lin G. and David J.** (2001) Migration-Inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection, Infect. Immun. 69, 906-911.
- 74. - Shimizu T., Abe R., Nishihira J., Shibaki A., Watanabe H., Nakayama T., Taniguchi N., Ishibashi T. and Shimizu H.** (2003) Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor-deficient mice, Eur. J. Immunol. 33 1478-1487.
- 75.- Silva J.S., Twardzik D., and Reed S.** (1991) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor β (TGF- β), J. Exp. Med. 174, 539-545.

76. - Sun H., Bernhagen J., Bucala R. and Lolis E. (1996) Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5191-5196.

77. - Tarleton R.L. and Zhang L. (1999) Chagas' disease etiology, autoimmunity or parasite persistence? , *Parasitol. Today* 15, 94-99.

78.- Tarleton R.L., Grusby M.J., and Zhang L. (2000) Increased susceptibility of Stat-4-deficient and enhanced resistance in Stat-6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*, *J. Immunol.* 165, 1520-1525.

79.- Torrico F., Heremans H., Rivera M. Marck E. Billiau A. and Carlier Y. (1991) Endogenous IFN γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J. Immunol* 146, 3626.

80. - Une C., Andersson J., Eloranta M., Sunnemark D., Harris A. and Orn A. (2000) Enhancement of natural killer (NK) cell toxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN γ) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*, *Clin. Exp. Immunol.* 121, 499-505.

81. - Une C. Andersson J. And Orn A. (2003) Role of IFN- α/β and IL-12 in the activation of natural killer cells and IFN γ production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* , *Clin. Exp. Immunol.* 134, 195-201.

82.-Villalta F. and Kierszenbaum F. (1983) Role of polymorphonuclear cells in chagas' disease: Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigotes) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils, *J. Immunol.* 131, 1504-1510.

83.-Villalta F., Zhang Y., Bibb K., Burns J. and Lima M. (1998) Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand up-regulates Trypanosome entry through the MAP kinase pathway, *Biochem. Biophys. Res. Communications* 249, 247-252.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

XI. APENDICE 1

Buffer de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para 10 Lts y pH 7.4

80 gr NaCl	(J.T. Baker)
11.6 gr Na ₂ HPO ₄	(J.T. Baker)
2 gr KH ₂ PO ₄	(J.T. Baker)
2 gr KCl	(ICN Biomedicals Inc.)

Buffer de lisis (Laird W. P. et. al. 1991 Simplified mammalian DNA isolation procedure, Nucleic Acids Research Vol. 19 Num15, 4293).

200 mM NaCl	(J.T. Baker)
5 mM de Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA)	(J.T. Baker)
0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS)	(J. T. Baker)
100 mM Tris HCl, pH 8.5	(ICN Biomedicals Inc.)

Se afora con agua destilada hasta 1Lt.

Solución hemolizante

Tris base 0.17 M	(ICN Biomedicals Inc.)
NH ₄ Cl 0.16 M	(J.T. Baker)

Se prepara para 300 ml.

Buffer TBE 10x

Tris base (890mM)	(Sigma Chemicals)
Ácido Bórico (890mM)	(J.T. Baker)
40 ml. de 0.5 M Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) disódico	(J.T. Baker)

Se ajusta todo a pH 8 y se afora a 500 ml. con agua destilada

Buffer de pegado (ELISA)

0.1 M de Na₂HPO₄ (J.T. Baker)
para 1 lt con agua destilada.

Solución de lavado (ELISA)

1000 mL de PBS más 0.5% de Tween 20 (Promega co.)

Solución de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS más 1% de Albumina serica bovina (ICN Biochemicals)

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biomedicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

Buffer para FACS

0.1% de azida de sodio NaN_3 (Sigma Chemicals), 1% de suero fetal bovino SFB (Gibco) en 1 lt PBS

Bromuro de Etidio

Stock 1000 X solución 0.5 mg/ml.

50 mg de Bromuro de etidio
100 ml de agua

Diluir 1:1000 para teñir geles y proteger de la luz.

APENDICE 2

Gen	Secuencias	Producto	T alineación	ciclos
MIF	(F) AgACCACgtgCtTAgCTgAg (R) gCATCgCTACCggTggATAA	200 pb	60°C	35
NEO	(F) ATTgAACAAgATggATTgCAC (R) CgTCCAgATCATCCTgATC	500 pb	60°C	35
IFN γ	(F)AgCggCTgaCTgAACTCAgATTgTAg (R)gTCACAgTTTTCAgCTgTATAggg	243 pb	56°C	30
RANTES	(F)gTg CCCACgTCAAaggAgTAT (R)gggAACCgTATACAgggTCA	260 pb	56°C	30
TLR-4	(F)TATCCACTgTAgCATTCTgATATACC (R)CTCTgTg TTg CTCAggATTCgAggC	480 pb	56°C	30
β ACTINA	(F) gTggCCgCTCTAggCACCAA (R)CTCTTTgATTgCACgCACgATTTC	536 pb	56°C	30
GAPDH	(F)TCggTgTgAACggATTTggC (R)CTCTTgCTCAgTgTCCTTgC	1035 pb	58°C	25