

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL
PARA LOS GENES IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β Y β -ACTINA
EN RATONES INFECTADOS CON MALARIA”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARCELA ULLOA MARTINEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

DICIEMBRE DEL 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*... Si conociera todos los secretos y misterios
de la ciencia y no tengo amor, nada soy... el
amor todo lo espera, todo lo cree, todo lo
soporta... el amor nunca muere... (1Cor 13).*

DEDICATORIA

- ❖ A mi madre Regina Martínez Guadalupe, como muestra de mi profundo amor y agradecimiento por toda una vida de sacrificios y esfuerzos, por la confianza que deposito en mí.
- ❖ A mis hermanos Gloria y Adriana porque han sido parte de mi vida, especialmente a Marco Antonio y Claudia por todo su amor, apoyo y compañía en todo momento.
- ❖ A Andrés F. González Banda por estar conmigo en todo momento, porque con él he crecido en todos los aspectos y porque me ha enseñado que el amor todo lo puede y es el motor que todo lo impulsa.
- ❖ A la Dra. Martha Legorreta Herrera por todas sus enseñanzas y por la confianza depositada en mí para la realización del presente trabajo.
- ❖ A mis amigos de la carrera Cata, Miriam E, Favis, Vero, Lety, Lore, Miriam F, Héctor, Bris, Luisa, Mario, Sandra, Emmanuel, que han compartido esta etapa de su vida conmigo, y muy especialmente a Adriana por brindarme su apoyo y su amistad incondicional, a Osvaldo Daniel por su ayuda incondicional en todo momento y por su amistad.
- ❖ Sin el apoyo de todos ustedes este trabajo no hubiera podido concluirse
¡Muchas gracias!

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y al M. en C. José Luis Ventura Gallegos, ya que su apoyo contribuyó al desarrollo de este trabajo.

- ❖ A cada uno de mis sinodales: Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dra. Rosalva Rangel Corona, Dra. Ma. Isabel Soto Cruz, M. en C. Fernando Fco. Hernández Clemente, por sus valiosas aportaciones y el apoyo que demostraron en todo momento.

- ❖ Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología Molecular de la FES Zaragoza Campus II y en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán, donde se nos facilitó el uso del equipo de PCR en tiempo real.

- ❖ Para la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de los proyectos PAPIIT IN205703-3, IN214007-3 y CONACYT 52782.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1. GENERALIDADES DEL PALUDISMO	4
3.2. CICLO DE VIDA DE LOS PARÁSITOS	5
3.3. RESPUESTA HUMORAL EN MALARIA	7
3.4. RESPUESTA CELULAR EN MALARIA	7
3.5. CITOCINAS	8
3.5.1. INTERFERON GAMMA (IFN- γ)	9
3.5.2. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)	9
3.5.3. INTERLEUCINA 10 (IL-10)	10
3.5.4. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)	10
3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	11
3.6.1. GENERALIDADES	11
3.6.2. MEDICIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN	12
3.6.3. AGENTES INTERCALANTES	12
3.6.4. SONDAS DE HIBRIDACIÓN ESPECÍFICAS	13
3.6.5. EQUIPOS PARA PCR EN TIEMPO REAL	14
3.6.6. VENTAJAS DE PCR EN TIEMPO REAL	14
3.6.7. DESVENTAJAS DE PCR EN TIEMPO REAL	14
3.6.8. UTILIDAD	15
3.6.9. OPTIMIZACIÓN EN EL LABORATORIO	15
3.6.9.1. Oligonucleótidos	16
3.6.9.2. ADN blanco	16
3.6.9.3. Enzima ADN polimerasa <i>Taq</i>	16
3.6.9.4. Concentración de Magnesio y dNTP's	17
3.6.9.5. Número de ciclos	17
3.6.9.6. Temperatura de alineación	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. OBJETIVOS	20
5.1. OBJETIVO GENERAL	20
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	20
6. HIPÓTESIS	21
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	22
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	22
7.2. MATERIAL DE LABORATORIO	22
7.3. EQUIPO	22
7.4. REACTIVOS	23
7.5. MÉTODO	24
7.5.1. Infección de los animales	24
7.5.2. Extracción de RNA	25
7.5.3. Hidratación y cuantificación del RNA	25
7.5.4. Retrotranscripción	25
7.5.5. Amplificación de los genes utilizando PCR	26
7.5.6. Electroforesis de los productos de PCR	27

7.5.7. <i>Análisis de los productos de PCR</i>	27
7.6. DIAGRAMA DE FLUJO	28
8. RESULTADOS	29
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	38
10. CONCLUSIONES	42
11. ANEXOS	43
11.1. ABREVIATURAS	43
11.2. SOLUCIONES	44
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiones donde la malaria es endémica.....	4
Figura 2. Ciclo de vida de Plasmodium. ²⁶	6
Figura 3. Ciclaje utilizado para la amplificación de los genes en PCR tiempo real.....	29
Figura 4. TGF- β amplificado a diferentes ciclos.....	30
Figura 5. TGF- β amplificado con diferentes concentraciones de magnesio.....	30
Figura 6. TGF- β amplificado con diferentes temperaturas de alineación.....	31
Figura 7. β -actina amplificado con diferentes concentraciones de ADNc.....	32
Figura 8. IFN- γ contaminaciones.....	32
Figura 9. β -actina. Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.....	33
Figura 10. INF- γ . Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.....	34
Figura 11. TGF- β . Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.....	35
Figura 12. TNF- α . Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.....	36
Figura 13. IL-10. Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.....	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción para retrotranscripción.....	26
Tabla 2. Mezcla de reacción para la PCR.....	26
Tabla 3. Ciclaje para la PCR.....	27

1. RESUMEN

En este trabajo se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real para evaluar la expresión del RNAm que codifica para las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β y β -actina, en un modelo experimental de malaria murina. Para lo cual se utilizaron ratones singénicos CBA/Ca infectados con *Plasmodium chabaudi*, los cuales se prepararon a partir de estabilizados criopreservados en nitrógeno líquido. El día ocho postinfección los ratones se sacrificaron en una cámara de cloroformo y se les extrajo el bazo, a partir del cual se aisló RNAm que se cuantificó en el espectrofotómetro y se retrotranscribió en el Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf. El ADN complementario (ADNc) obtenido se utilizó como control positivo para calibrar el ensayo de PCR con los oligonucleótidos iniciadores específicos para cada uno de los genes (Invitrogen), se realizó electroforesis en gel de acrilamida al 10% para corroborar que la amplificación obtenida correspondiera al peso molecular del gen analizado, posteriormente se llevaron las condiciones al termociclador PCR tiempo real Applied Biosystem, los resultados se analizaron con ayuda del Software PCR tiempo real 7000 Sequence Detection System.

Se determinaron las concentraciones óptimas de: magnesio, oligonucleótidos, ADNc y temperaturas de alineación para cada uno de los genes estudiados. Bajo estas condiciones se obtuvieron gráficas que demuestran la amplificación de cada uno de los genes.

El análisis de las citocinas juega un papel importante para entender el desarrollo de la respuesta inmune en malaria, entre otras enfermedades, por tal motivo resulta de gran valor contar con técnicas que ayuden a detectar con mayor sensibilidad la expresión de esos genes. En este trabajo se calibró la técnica de PCR en tiempo real para la detección de los genes INF- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β y β -actina, lo que constituye una herramienta con alta sensibilidad para evaluar su la expresión y permitirá analizar con mayor detalle los mecanismos de inmunomodulación en malaria.

2. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa causante de un gran número de muertes en todo el mundo; la ocasiona un protozooario intracelular del género *Plasmodium*. La infección por *P. falciparum* continua siendo la más extendida y prevalente en el mundo. En México, predomina *P. vivax* que suele confinarse principalmente al sureste, en los estados de Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Oaxaca debido al clima tropical de la zona.^{1, 23}

Las citocinas juegan un papel importante en la infección con *Plasmodium* ya que tienen una gran variedad de funciones y son importantes en la respuesta inmune, tanto natural o innata, como en la adquirida. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que estimulan o inhiben la proliferación, diferenciación o la función de las células inmunitarias que suelen actuar de dos formas diferentes: autócrina (sobre la misma célula productora) o parácrina (sobre células cercanas).¹⁷

Durante una infección primaria con *P. chabaudi* se han logrado identificar patrones de citocinas que permiten caracterizar a la respuesta inmune durante los primeros 10 días como predominantemente Th1, también se ha observado la capacidad de activar macrófagos y de producir una respuesta inmune inflamatoria. Sin embargo, para que el parásito se pueda eliminar completamente se requiere la participación de la subpoblación de células T CD4+ tipo Th2, que predomina en las fases tardías de la infección.⁹

Por lo tanto es necesario contar con técnicas de detección sensibles para determinar los patrones de expresión de citocinas, con este propósito en este trabajo se calibró la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real para evaluar la expresión del RNAm que codifica para las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β y β -actina. Dicha técnica es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento en particular de éste se amplifica específicamente cuando se delimita por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra de forma exponencial a través de ciclos repetidos de diferentes periodos de tiempo y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtiene en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN, lo que posibilita así su fácil identificación.

Los resultados obtenidos se analizaron con la ayuda del software del equipo de PCR en tiempo real.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. GENERALIDADES DEL PALUDISMO

La malaria o paludismo es una enfermedad febril, con manifestaciones paroxísticas y periódicas, transmisible por mosquitos, se presenta en los trópicos y subtrópicos, su causa es la infección con protozoarios parásitos del género *Plasmodium*.²⁴

En México, el parásito que predomina es *P. vivax* que suele confinarse principalmente al sureste, en los estados de Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Oaxaca debido al clima tropical de la zona.¹

De las diversas especies de *Plasmodium*, solo cuatro de ellas infectan a los humanos: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. Todas ellas son transmisibles de una persona a otra por la hembra del mosquito *Anopheles* infectada. La forma grave de paludismo que sigue un ciclo febril de 48 horas (con paroxismos en los días 1 y 3 de cada ciclo) la ocasiona *P. falciparum* y se conoce como paludismo terciano maligno o paludismo falciparo, la forma más leve con ciclo semejante y que se debe a *P. vivax*, se llama paludismo terciano benigno o paludismo vivax. La enfermedad con ciclo febril de 72 horas que produce *P. malariae* se llama paludismo cuartano o paludismo palúdico. En 1922 se descubrió *P. ovale* y el nombre de la enfermedad que causa paludismo oval, no hace referencia a su forma cíclica.²³

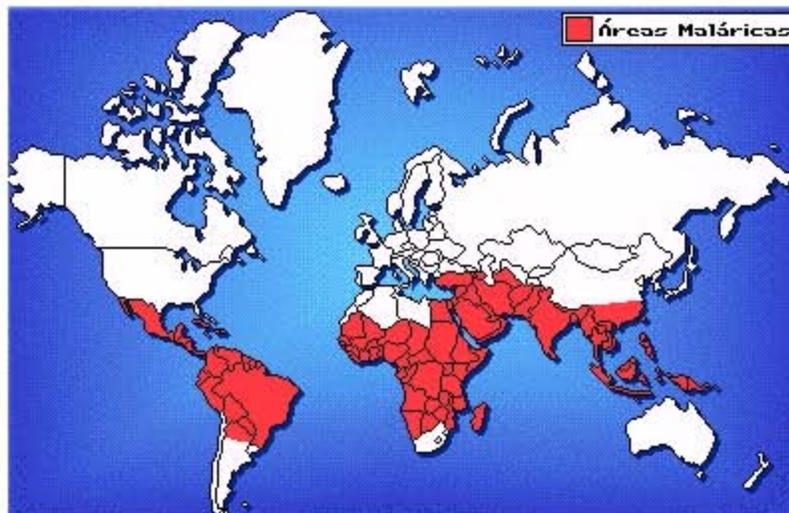


Figura 1. Regiones donde la malaria es endémica

3.2. CICLO DE VIDA DE LOS PARÁSITOS

La esporogonia o ciclo sexual se inicia cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* ingiere gametocitos masculinos y femeninos al alimentarse de la sangre de un humano infectado con paludismo. En el intestino del mosquito, los gametocitos maduran y se efectúa la fertilización. El cigoto resultante penetra la pared intestinal del mosquito, se aloja por debajo de la membrana basal y forma una vacuola que da lugar a un ooquiste. Dentro de esta estructura se forman miles de esporozoítos, después, al aumentar de tamaño este quiste se rompe y libera esporozoítos a la cavidad corporal del mosquito. Algunos penetran a las glándulas salivales, entonces el mosquito se vuelve infeccioso para los humanos. El tiempo necesario para que se complete el ciclo en los mosquitos varía de una a tres semanas, depende de la especie de insecto y del parásito, y también de la temperatura y la humedad ambientales.²¹

La esquizogonia o ciclo asexual ocurre en el humano y se inicia cuando el mosquito *Anopheles* infectado se alimenta de la sangre de otro individuo. El mosquito inyecta esporozoítos a los capilares subcutáneos del humano y éstos circulan en la sangre periférica. Después de una hora se unen a las células hepáticas (hepatocitos) y las invaden, proceso que se cree depende de un ligando presente en la capa proteica externa del esporozoíto. En las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* algunos de los esporozoítos entran a una etapa de latencia de inmediato tras la invasión celular. Los esporozoítos restantes inician esquizogonia exoeritrocítica, y cada uno produce de 2 000 a 40 000 células hijas o merozoítos. Una a dos semanas más tarde los hepatocitos infectados se rompen y se liberan merozoítos a la circulación general.²¹

La fase eritrocítica del paludismo se inicia con la unión de un merozoíto hepático liberado a un receptor específico en la superficie del eritrocito. Cuando se realiza la unión, el merozoíto forma una invaginación en la membrana celular y experimenta endocitosis lenta. El parásito intracelular tiene apariencia inicial de trofozoíto con forma anular, que aumenta de tamaño, se hace más activo y adquiere un borde irregular. En pocas horas se produce la división nuclear, que da lugar al esquizonte multinucleado. Después el citoplasma se condensa alrededor de cada núcleo del esquizonte para formar un grupo intraeritrocítico de 6 a 24 células hijas llamadas merozoítos. Después de aproximadamente 48 horas en el caso de *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y de 72 horas para *P. malariae* de la invasión inicial los eritrocitos infectados se rompen y liberan los merozoítos lo que ocasiona las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad. Las células hijas recién liberadas invaden a otros eritrocitos y la mayoría repite el ciclo asexual. Otras células hijas se transforman en formas sexuales o gametocitos. Estas últimas no producen lisis de eritrocitos y continúan su circulación vascular periférica hasta que son ingeridas por un mosquito adecuado. Los ciclos sexuales recurrentes continúan, y producen una cantidad cada vez mayor de eritrocitos afectados hasta que, al final, se desarrolla la inmunidad en el huésped que pone

fin al ciclo eritrocítico. Los esporozoítos hepáticos latentes de *P. vivax* y *P. ovale* sobreviven al ataque inmunológico del huésped y después de un periodo de latencia de meses a años pueden reanudar la multiplicación intrahepática. Esto conduce a una segunda liberación de merozoítos hepáticos y a que se inicie otro ciclo eritrocítico, fenómeno conocido como recaída²¹ (Figura 2).

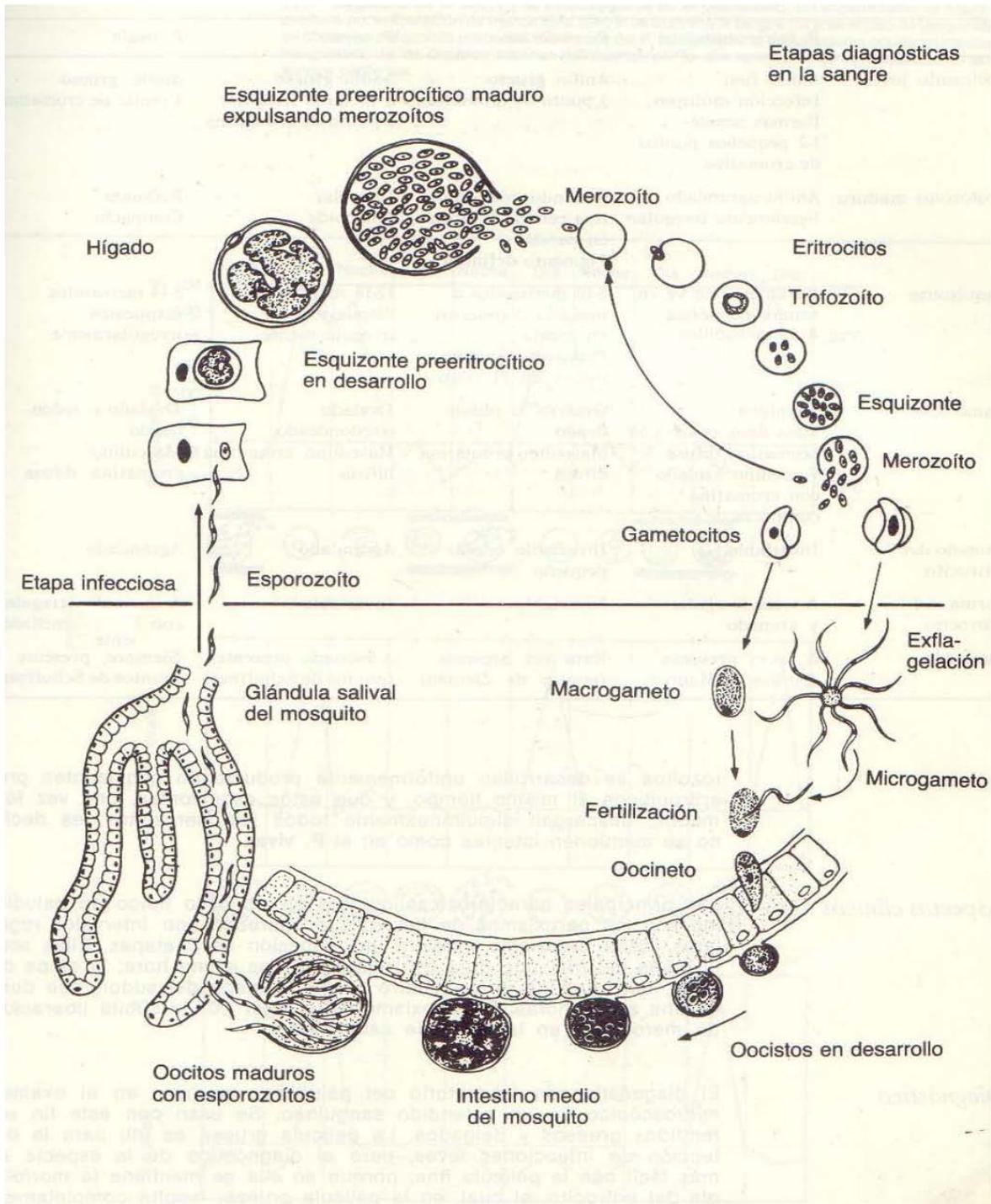


Figura 2. Ciclo de vida de Plasmodium.²⁶

3.3. RESPUESTA HUMORAL EN MALARIA

Los gametocitos son capaces de estimular una respuesta humoral específica, sin embargo, debido a que son intraeritrocíticos la respuesta se limita. Una vez que las membranas del eritrocito se rompen, las estructuras internas de los gametocitos son altamente inmunogénicas.⁴

La infección con plasmodio induce una intensa activación policlonal que se caracteriza por la producción de grandes cantidades de inmunoglobulinas de diferentes especificidades. Los antígenos derivados del parásito activan policlonalmente a los linfocitos T, los cuales producen factores que promueven la diferenciación de las células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Solo una pequeña porción del total de los anticuerpos producidos es específica para antígenos del plasmodio, mientras que la mayoría no reacciona con el parásito. Frecuentemente se generan autoanticuerpos que contribuyen a la severidad de la enfermedad. También, se desarrollan anticuerpos específicos los cuales se incrementan rápidamente y se pueden detectar a los pocos días después de que los parásitos aparecen en sangre, hay un aumento de IgG, IgM e IgA, mientras que IgD e IgE permanecen prácticamente sin cambio. En los humanos, la concentración de anticuerpos disminuye rápidamente después de la recuperación de la infección. Los anticuerpos específicos tienen un papel protector, de hecho, se ha logrado transferir protección con la administración de suero inmune a los pacientes infectados, lo cual les reduce los síntomas de la enfermedad.^{12, 6}

3.4. RESPUESTA CELULAR EN MALARIA

Cuando las células T cooperadoras de tipo 1 (Th1) se estimulan simultáneamente con: antígenos, citocinas de las células presentadoras de antígeno (APC) y por moléculas coestimuladoras de las APC, proliferan y producen otras citocinas que sostienen y expanden la respuesta inmune. Algunas de las moléculas producidas por las células Th1, como las quimiocinas, atraen a otras células linfoides al sitio de la reacción inmunitaria; otras citocinas como la interleucina-2 (IL-2), estimulan la proliferación de las células reclutadas; algunas como el interferón gamma (IFN- γ), activa macrófagos, y otras más como el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), son citolíticas.²⁰

Simultáneamente a la activación de las células Th1 mediadoras de la inmunidad celular, ocurre la activación de las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2). Las células Th2 responden a la estimulación antigénica y a las señales derivadas de las células presentadoras de antígeno, proliferan y producen nuevas citocinas, como IL-10.²⁰

Durante la etapa aguda de la infección con *P. vivax* se han detectado niveles elevados de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de interferón gamma (IFN- γ)

en el suero de los pacientes, este fenómeno coincide con la ruptura de células por parásitos asexuales en la etapa de esquizontes. Durante su desarrollo dentro del eritrocito, *Plasmodium* secreta al medio extracelular una clase particular de proteínas conocidas como exoantígenos o antígenos solubles. Muchas de estas proteínas se han identificado como moléculas clave, involucradas en procesos metabólicos y en la estimulación de la respuesta humoral y celular contra el parásito. La mayoría de los exoantígenos reportados en la literatura corresponden a etapas asexuales del parásito y son capaces de inducir proliferación de los linfocitos y la producción de IFN- γ .⁴

Todas las evidencias indican que los linfocitos $\gamma\delta$ + participan directamente en la eliminación del parásito, en colaboración con otras poblaciones celulares accesorias, y contribuyen, además, a la regulación de la respuesta inmune contra la infección mediante la producción de citocinas inflamatorias, como TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-8 y linfotóxina. El descubrimiento de los linfocitos $\gamma\delta$ + es relativamente reciente, se sabe que se encuentran en todos los organismos con sistema linfoide y que constituyen una población celular minoritaria, que constituyen del 1 al 5% del total de linfocitos circulantes en sangre, mientras que en tejidos como el epitelio y las mucosas, su número es más abundante, además existen varios subtipos que llevan a cabo funciones diferentes dependiendo del tejido en el que se encuentran.⁴

Durante una infección primaria con *P. chabaudi* en ratones, se han logrado identificar patrones de citocinas que permiten caracterizar a la respuesta inmune durante los primeros 10 días como predominantemente Th1, también se ha observado la capacidad de activar macrófagos y de producir una respuesta inmune inflamatoria. Sin embargo, para que el parásito se pueda eliminar completamente se requiere la participación de la subpoblación de células T CD4+ tipo Th2.⁹

3.5. CITOCINAS

Las citocinas constituyen un grupo de proteínas producidas por una gran variedad de células tanto linfoides como no linfoides, y tienen diversas funciones sobre diversos tipos celulares. Las fuentes celulares de las citocinas incluyen a los monocitos/macrófagos y a las células dendríticas, además de los linfocitos T y B; fibroblastos, neutrófilos, células endoteliales, células cebadas y otras. Los blancos celulares de las diversas citocinas incluyen, entre otros, a los monocitos y a los macrófagos, a los linfocitos T, a las células B, a los neutrófilos, a las células hematopoyéticas de las series linfoides y mieloides, a los fibroblastos, a las células cebadas y a los eosinófilos.²⁰

Las funciones de las citocinas incluyen la diferenciación, la proliferación y la activación de las “células blanco”, la expresión de receptores celulares para un gran número de ligandos y la inducción y secreción de una gran diversidad de

otros mediadores que incluyen a: las prostaglandinas, las interleucinas, los factores de crecimiento y de diferenciación, los factores estimulantes de colonias, las inmunoglobulinas y otros, así como la liberación de los mismos receptores solubles. En conjunto, las citocinas participan en la inducción, expresión y modulación de las respuestas inmunitarias y en el desarrollo y la regulación de las respuestas inflamatorias.²⁰

3.5.1. INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

Los interferones se describieron originalmente como agentes capaces de proteger a las células de la infección viral. Con base en su fuente celular, en sus propiedades biológicas generales y en su estructura génica, los interferones se han clasificado en dos categorías: el interferón tipo I que se induce como resultado de una infección viral; el interferón tipo II que se induce inmunológicamente a través del estímulo inflamatorio, se sintetiza exclusivamente por linfocitos T y por células asesinas naturales (NK), comúnmente se conoce como IFN- γ . La acción que ejercen los interferones se lleva a cabo mediante su interacción con receptores de alta afinidad.²²

El interferón gamma es la principal lincocina de las células Th1 se considera pluripotente, activa macrófagos, aumenta la expresión de moléculas del MHC clase II, incrementa la fagocitosis, induce la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y de metabolitos reactivos del oxígeno. Se sabe que el principal blanco del IFN- γ durante la infección con malaria son los monocitos-macrófagos y los neutrófilos ya que están asociados a la respuesta principal durante una primera infección por *Plasmodium*. Además en modelos murinos se ha demostrado que para controlar la infección se requiere tempranamente INF- γ .^{16, 17}

3.5.2. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) juega un papel importante en el desarrollo de la inmunidad y la patología en la infección por malaria, tanto en modelos experimentales como en humanos. Los niveles elevados de TNF- α en el bazo se correlacionan con la resistencia a la infección por *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Las citocinas involucradas en el desarrollo y regulación de la respuesta inflamatoria, incluyendo al TNF- α , pueden contribuir a la disminución de la infección aguda por *P. chabaudi*, *P. yoelii* y *P. vinckei*, debido a que inducen mediadores como el óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del oxígeno. Sin embargo, es posible que el TNF- α no sea una citocina crítica que proporcione una respuesta de protección temprana, ya que los ratones con una deficiencia en los receptores para TNF- α , son capaces de controlar y reducir la parasitemia.¹⁰

3.5.3. INTERLEUCINA 10 (IL-10)

La interleucina-10 (IL-10) se identificó inicialmente como un factor producido por clonas de las células Th2, estas células poseen la capacidad de inhibir la producción de citocinas por las células Th1, cuando éstas se estimulan con antígenos a través de la presentación por parte de macrófagos.²²

La IL-10 ejerce efectos principalmente inmunomoduladores e inmunosupresores, al afectar la pauta de producción de citocinas en células T cooperadoras, designadas Th1 y Th2. Aparte del efecto inhibitor que la IL-10 ejerce sobre las células T, esta citocina también tiene propiedades inmunomoduladoras y supresoras sobre células del linaje monocito-macrófago, como la disminución en la producción de los macrófagos de diversas citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-16, IL-1, IL-8. Asimismo, inhibe o estimula la producción de moléculas que participan en el metabolismo oxidativo en macrófagos, como el óxido nítrico.²²

Debido al efecto de la IL-10 sobre las células T cooperadoras, los macrófagos, las células B y los neutrófilos, resulta evidente que este factor puede tener importantes efectos reguladores y correguladores en el sistema inmune y que participa en procesos antiinflamatorios y antivirales.²²

Un estudio realizado en ratones IL-10^{-/-} (gene IL-10 inactivo) infectados con *P. chabaudi*, demuestra que la falta de IL-10 no tiene efectos significativos en el curso de una infección primaria o en la resistencia en una infección secundaria, lo cual sugiere que esta citocina no es crucial en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, sin embargo su ausencia ocasiona un incremento en la respuesta de las células T, lo cual genera una gran producción de IFN- γ . Por lo tanto, esta citocina juega un papel importante en la regulación de: la producción de TNF- α , IL-1 e IL-12 a partir de los macrófagos; y la proliferación de las células T y NK, y de este modo se modula la producción de IFN- γ .¹¹

3.5.4. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)

Los factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) son potentes reguladores del sistema inmune, de la proliferación y diferenciación celular y de la síntesis de la matriz celular, así como del desarrollo embrionario y del sistema de reparación celular y apoptosis. Los TGF- β pertenecen a una familia de proteínas que se caracterizó inicialmente por su capacidad de promover el crecimiento de las células normales y neoplásicas en agar. Son proteínas de 25kDa y contienen dos subunidades idénticas.²²

Diversas células pueden sintetizar esta citocina incluyendo: macrófagos, células T, células NK y linfocitos B, en concentraciones bajas actúa como citocina inflamatoria, teniendo la capacidad de reclutar monocitos, células T y neutrófilos al sitio de inflamación temprano; en concentraciones altas actúa como anti-

inflamatoria suprimiendo la producción de TNF- α y óxido nítrico (NO) en macrófagos, inhibe la producción IFN- γ y TNF- α de las células NK.¹⁷

Poco se sabe de la respuesta de TGF- β en malaria. En estudios realizados en ratones infectados con *Plasmodium* se observó que TGF- β suprime la producción de TNF- α y óxido nítrico a partir de los macrófagos, también suprime la producción de IFN- γ y TNF- α a partir de las células NK. Además juega un papel importante controlando el crecimiento del parásito ya que, en una respuesta temprana, las bajas concentraciones de TGF- β , promueven la inflamación, reclutan monocitos y macrófagos al sitio de lesión y los activan.¹⁵

3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL

3.6.1. GENERALIDADES

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("Polymerase chain reaction"), es una técnica que desarrolló Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico.²⁵

La técnica de PCR en tiempo real ha impulsado a la biología molecular permitiendo a los investigadores manipular el ADN de una manera más sencilla, haciendo más cómodos los procedimientos comunes. Esto es en parte por la rapidez, gran sensibilidad y la precisión de los productos de PCR que se pueden evaluar en el momento en que se van generando, esto permite que el investigador evalúe mejor la cantidad de ADN que se obtiene en cada ciclo de la amplificación de PCR. Los métodos en tiempo real actuales implican generalmente moléculas fluorescentes que evidencian la cantidad de ADN presente en cada ciclo de PCR.²⁵

El método utiliza un par de oligonucleótidos sintéticos también conocidos como primers, iniciadores o cebadores, cada uno hibrida a una hebra del ADN blanco de doble cadena, este par extiende una región que se puede reproducir exponencialmente. El primer hibridado actúa como un sustrato para la enzima ADN polimerasa (obtenida a partir de una bacteria llamada *Thermophilus aquaticus* o *Taq*), sintetiza una hebra complementaria mediante la adición secuencial de desoxirribonucleótidos.¹⁴

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes al realizar una PCR en tiempo real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos todavía no se

ha encontrado un método automático universal que se pueda utilizar con cualquier tipo de muestra.^{2, 25}

3.6.2. MEDICIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La técnica de PCR en tiempo real puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento durante la amplificación, mediante emisión de fluorescencia producida en la reacción, puesto que es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.²⁵

3.6.3. AGENTES INTERCALANTES

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble hélice. El más empleado en PCR en tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la técnica de PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas, lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de activarlas a temperaturas elevadas o que están unidas a anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando a la polimerasa y permitiendo su actividad. Asimismo, la mayoría de los equipos para PCR en tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados. Cada fragmento amplificado tiene una T_m (temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado) esta característica depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana.⁵

3.6.4. SONDAS DE HIBRIDACIÓN ESPECÍFICAS

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas Taqman, las sondas moleculares beacons y las sondas FRET.

1. Sondas de hidrólisis. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emiten fluorescencia cuando se excitan y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que eso ocurra, las moléculas donadora y la aceptora deben estar espacialmente próximas. Además el espectro de emisión de la primera se ha de traslapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador se absorbe por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermophilus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero se detecta por el lector.
2. Moléculas beacons, son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de la unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva a que el donador y el aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN blanco la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, entonces se puede detectar la fluorescencia emitida por el primero.
3. Sondas FRET. El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN blanco. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas hibridan, los dos fluorocromos están próximos. Cuando se excita el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo corresponde a un aumento de hibridación de las sondas, lo que conduce al aumento en la misma proporción de la fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su costo es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resultan más difíciles.⁵

3.6.5. EQUIPOS PARA PCR EN TIEMPO REAL

Los termocicladores para llevar a cabo la técnica de PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas de manera especial. Los más utilizados son los equipos fabricados por Applied Biosystems y Roche Diagnostics. Las diferencias más importantes entre estos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden amplificar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también son importantes. El disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de ADN blanco en la misma reacción (PCR múltiple) o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores.⁵

3.6.6. VENTAJAS DE PCR EN TIEMPO REAL

La primera ventaja es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Además gracias a la rapidez de los equipos, estos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas en tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presentes en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor que en los procedimientos convencionales. Los equipos para PCR en tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinaciones de mutaciones, PCR múltiple, etc.; mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.^{5, 19}

3.6.7. DESVENTAJAS DE PCR EN TIEMPO REAL

Debido a la elevada sensibilidad del método, el riesgo de contaminación cruzada entre muestras es considerable. La fuente de contaminación más común son los fragmentos de ADN amplificados previamente en el laboratorio. Que pueden contaminar reactivos, superficies y materiales y producir resultados falsos positivos. Para disminuir el riesgo de contaminación hay que tomar y respetar rigurosamente una serie de precauciones de diversa índole, que incluyen una distribución del laboratorio en distintas áreas de trabajo, la adopción de tediosos hábitos de trabajo que minimizan el riesgo, el uso de material especial o el empleo

de sistemas anticontaminación, como la irradiación de superficies y reactivos con luz ultravioleta.⁵

Una de las limitaciones en el ensayo que no es inherente al método es el error humano, ya que una adecuada interpretación de los datos obtenidos con ayuda del software del equipo es indispensable para obtener conclusiones verdaderas.²⁵

3.6.8. UTILIDAD

La amplificación de un segmento de ADN mediante esta técnica se utiliza en muchos laboratorios y tiene múltiples aplicaciones en diferentes campos de la biomedicina, dentro de las cuales podemos mencionar las siguientes: en el diagnóstico de enfermedades hereditarias y de algunas cromosopatías comunes; en el campo de la inmunología se emplea para determinar asociaciones entre el MHC y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes; en el campo de la oncología para probar mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de antioncogenes, para detectar arreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásicos, y para la detección de virus y secuencias oncogénicas. En la microbiología la PCR se ha utilizado en el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos, parásitos y virus, particularmente aquellos microorganismos difíciles de detectar por el análisis microbiológico directo y cultivo, como es el caso de *Mycobacterias*. En la medicina legal la PCR ha enriquecido enormemente el análisis de las pruebas de paternidad y la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de ADN altamente variables o polimórficas.^{5, 19}

La técnica de PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta importante para detectar la expresión de diversos genes de interés. El estudio de la expresión del ARN mensajero que codifica para ciertas citocinas se utiliza ampliamente en la investigación inmunológica para detectar la respuesta inmune.¹⁹

En los campos de la biología molecular, la ingeniería genética y la biotecnología, la técnica de PCR se utiliza para la clonación molecular de genes y su secuenciación, para generar mutagénesis dirigida a secuencias génicas, para facilitar manipulaciones en el ADN encaminadas a la producción de proteínas recombinantes, y para el análisis y cuantificación de la expresión génica. Finalmente, los campos de la biotecnología animal y vegetal también se han beneficiado con esta metodología, lo que ha contribuido a aumentar el arsenal de poderosas herramientas para el mejoramiento de plantas y animales.^{5, 19}

3.6.9. OPTIMIZACIÓN EN EL LABORATORIO

Los protocolos han evolucionado desde la introducción de la PCR a la fecha, favoreciéndose no sólo el aumento de la especificidad y la sensibilidad de la

reacción, sino también la eficiencia, el aumento en el tamaño de los productos amplificados y el incremento en la versatilidad de las aplicaciones a nivel de diagnóstico y de investigación. Esto se ha logrado a través del control de parámetros críticos como tiempo, temperatura y número de ciclos de amplificación. A su vez, la estandarización de las concentraciones de reactivos (oligonucleótidos, ion magnesio, ADN blanco y dNTP's) permite disminuir la formación de amplificaciones inespecíficas y por incorporación errónea de nucleótidos, aumentando por consecuencia su fidelidad. También permite eliminar falsos positivos.²

Es común que en estos casos, al iniciar la estandarización de la PCR, surjan dificultades tales como obtener niveles no detectables del producto amplificado, productos inespecíficos, o la formación de dímeros de oligonucleótidos que compiten con el ADN blanco en la amplificación. En estas circunstancias es necesario variar cada uno de los parámetros hasta obtener condiciones óptimas para la reacción. Los parámetros a estandarizar se describen a continuación:

3.6.9.1. Oligonucleótidos

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Al ser éste uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad de la PCR, su elección y diseño debe ser muy cuidadoso. Idealmente, en cada 100µL de la reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 µM. el uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos.^{2, 19}

3.6.9.2. ADN blanco

La PCR es tan sensible que la amplificación puede hacerse teóricamente a partir de una sola molécula de ADN. Los genes de una sola copia en el genoma se pueden amplificar fácilmente. La concentración de ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente 10⁵ copias de ADN blanco, esto es, de 300 ng a 1 µg de ADN genómico humano.^{2, 8}

3.6.9.3. Enzima ADN polimerasa *Taq*

La enzima ADN polimerasa termoestable que más se utiliza para la PCR es la ADN polimerasa *Taq* (se aisló a partir de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, que habita en aguas termales). Esta enzima tiene actividad de ADN polimerasa, de exonucleasa 3' a 5' y de exonucleasa de 5' a 3'. Su índice de error de

incorporación es de 1 a 4×10^{-4} bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 3000 pb.^{2, 19}

3.6.9.4. Concentración de Magnesio y dNTP's

La concentración de iones magnesio es también importante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, dando como resultado productos indeseables, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos. El ion Mg^{2+} se utiliza como cofactor para la actividad enzimática de la mayoría de las ADN polimerasas. Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final de $MgCl_2$ entre 0.5 y 2.5 mM.^{2, 8}

Al igual que el $MgCl_2$, las concentraciones mínimas necesarias de dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP's también debe optimarse. Concentraciones entre 20 y 200 μ M proporcionan resultados óptimos, se debe igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's en concentraciones equimolares.^{2, 8}

3.6.9.5. Número de ciclos

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del ADN en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo; sin embargo, en la práctica después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de "meseta" se debe al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos ADN blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno. Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción o la cantidad de la enzima, aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice al obtenerse los niveles máximos de amplificación en una reacción que presente comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad de ADN inicial.^{2, 8}

Las temperaturas de desnaturalización (92 a 98°C) y extensión (70 a 74°C) son generalmente estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineación, la cual está determinada principalmente por la temperatura media de fusión (T_m) de los oligonucleótidos.²

3.6.9.6. Temperatura de alineación.

Los oligonucleótidos se aparean a una determinada temperatura de alineación por complementariedad al ADN blanco. El alto grado de complementariedad entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y del ADN blanco permite utilizar altas temperaturas de alineamiento, lo que favorece la especificidad de la reacción.^{2, 8}

Cuando la temperatura de alineación es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del ADN blanco y que también se extiendan, toda vez que la polimerasa *Taq* posee actividad aún a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 a 65°C se reducen grandemente los sucesos de apareamiento inespecífico.²

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa que causa un gran número de muertes en todo el mundo, los intentos por erradicar la enfermedad han fallado, se ha descrito el desarrollo de resistencia del vector a los insecticidas y por otra parte el parásito también ha desarrollado resistencia a los medicamentos. Por lo tanto, es indispensable la investigación sobre los mecanismos de la respuesta inmunológica, los cuales ayudan al organismo a eliminar al parásito. Durante la infección por *Plasmodium* se activan diferentes tipos de células lo que conduce a la producción de citocinas. Estas moléculas tienen una gran variedad de funciones y resultan importantes en la respuesta inmune, tanto natural o innata como adquirida, se trata de proteínas de bajo peso molecular que estimulan o inhiben la proliferación, diferenciación o la función de las células inmunitarias que suelen actuar de dos formas diferentes: autócrina (sobre la misma célula productora) o parácrina (sobre células cercanas). Las citocinas se sintetizan en cantidades muy pequeñas por lo que su detección requiere el empleo de técnicas extremadamente sensibles como la de PCR en tiempo real.

Esta técnica se ha convertido en una herramienta importante para detectar la expresión de diversos genes de interés, por tal motivo en este proyecto se estandariza dicha técnica para que posteriormente se pueda utilizar en diferentes estudios que involucren la expresión del ARN mensajero que codifica para las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-10 y TGF- β , las cuales son importantes en la investigación de su participación en la respuesta inmune que presenta el organismo en una infección por *Plasmodium*, así como conocer detalladamente la relación huésped-parásito, todo esto con el fin de desarrollar nuevos y más eficaces tratamientos contra la malaria.

Puesto que el análisis de los mecanismos de respuesta inmunológica en el humano por cuestiones tanto técnicas como éticas está muy restringido, el empleo de modelos murinos es una herramienta útil para estudiar estos fenómenos, aunando a que ambos sistemas inmunológicos son sumamente parecidos y que se cuenta con la secuenciación de prácticamente todos los genes del ratón. En este trabajo se utilizará un modelo murino de malaria para obtener los controles positivos y calibrar la técnica de RT-PCR en tiempo real para las citocinas: TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-10.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para evaluar la expresión del ARNm que codifica para las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β , en ratones CBA/Ca infectados con *Plasmodium chabaudi*.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para las citocinas INF- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β de ratón.
- Determinar que tipo de reactivos y las concentraciones que son óptimas para la amplificación en PCR tiempo real.
- Realizar el análisis de los resultados de la amplificación utilizando el software del equipo de PCR en tiempo real.

6. HIPÓTESIS

Los hallazgos preliminares de nuestro grupo de investigación utilizando la técnica de RT-PCR semicuantitativa indican que los genes que codifican para las citocinas: INF- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β , se modifican ligeramente durante la infección en ratones con *Plasmodium chabaudi* AS.^{13, 18} Por lo tanto si se utilizan como controles positivos a estos ratones y se realizan diversos ensayos para determinar las concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en la PCR a tiempo real, se podrá estandarizar esta técnica, de este modo se contará con una herramienta sumamente útil para el estudio sobre la expresión de esas citocinas.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratones CBA/Ca machos de 8 semanas de edad, mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos.
- Eritrocitos parasitados de ratón con la cepa *Plasmodium chabaudi* AS y criopreservados (conservados a muy bajas temperaturas con lo cual toda activada biológica queda efectivamente detenida) en nitrógeno líquido.

7.2. MATERIAL DE LABORATORIO.

- Portaobjetos
- Tijeras de disección
- Guantes de hule de látex
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Gradillas para tubos Falcon
- Gradillas para tubos eppendorf
- Tela organza.
- Gorros y botas para áreas estériles
- Tubos Falcon: 15mL, 50mL, nuevos y estériles.
- Cajas petri de 10 cm de diámetro, de plástico, nuevas y estériles.
- Tubos Eppendorf: 1.5mL, 250mL, nuevas y estériles.
- Puntas para micropipetas: 1.5 μ L, 2.5 μ L, 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, nuevas, con filtro, libres de nucleasas y estériles
- Placas para PCR en tiempo real.

7.3. EQUIPO

- Balanza analítica, Scientech
- Campana de flujo laminar, Veco
- Congelador Nieto
- Espectrofotómetro UV, WPA
- Microcentrífuga, Eppendorf 5415C
- Micropipetas Eppendorf: 2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L.
- Micropipeta Multicanal WGilson 8 x 200 μ L.
- Micropipetas Gilson: p20, p200, p1000.
- Microscopio óptico, Carl Zeiss Estándar 25
- Refrigerador MayTag
- Tanque de nitrógeno líquido, 34XT, Taylor-Wharton
- Vortex Genie 2, Daigger
- Impresora, Deskjet 680C, Hewlett Packard

- Ultracongelador REVCO, Legaci Refrigeration System
- Autoclave, Tuttnauer Brinkmann 2540M
- Termociclador PCR tiempo real, Applied Biosystem
- Termociclador Mastercycler gradient, Eppendorf
- Software PCR tiempo real, 7000 Sequence Detection System

7.4. REACTIVOS

- Agua desionizada, Hidropura.
- Agua DEPC
- Agua bidestilada milipore
- Albúmina sérica bovina, Sigma.
- Alcohol isoamilico
- Amortiguador para retrotranscripción 5X (5X first strand buffer), Gibco BRL.
- Azul de bromofenol, Sigma
- Bis acrilamida, Sigma.
- Bromuro de etidio
- Cloroformo, Burdick-Jackson.
- Cloruro de magnesio, Sigma.
- Cloruro de magnesio 50mM, Invitrogen
- Colorante de Giemsa, Sigma.
- Dietilpirocarbonato, Sigma.
- dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Pharmacia.
- dTT
- Ditioeritritol (dTT), Gibco BRL.
- EDTA, Sigma.
- Etanol absoluto, Merck.
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), USB/Amersham.
- Fosfato de sodio monobásico (Na_2HPO_4), USB/Amersham.
- Gelatina sigma.
- Glicerol, Sigma
- Heparina de sodio, Sigma
- Inhibidor de RNA'sa, Gibco BRL
- Isopropanol
- Marcador de peso molecular
- 2-mercaptoetanol, Sigma
- Metanol, JT Baker
- Mezcla de reacción para PCR, Invitrogen
- Oligo dT
- Persulfato de amonio, Sigma
- Retrotranscriptasa MMLV-RT
- Sacarosa, Sigma
- Sarcosil, Sigma

- SDS (Dodecilsulfato de sodio), Sigma
- Taq polimerasa (AmpliTaq DNA polimerase), Perkin Elmer
- TEMED, Sigma
- Tripure
- Oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de los genes (Invitrogen):

a) IL-10

(5' a 3'): (DNA) – CGG TTC TGG ACA ACA TAC TGC TAA C[FAM] G

(5' a 3'): (DNA) – TGG ARC ATT TCC GAT AAG GCT TG

b) β -actina

(5' a 3'): (DNA) – CGG GTC AGG TAG TCT GTC AGG TCC [JOE] G

(5' a 3'): (DNA) – CTA TGC TCT CCC TCA CGC CAT C

c) IFN- γ

(5' a 3'): (DNA) – CGG TGA GAA GAT GTT CCA TGC CAC [FAM] G

(5' a 3'): (DNA) – TCT CCT TCA GGA CAA TGT CAA ACA

d) TNF- α

(5' a 3'): (DNA) – CGG CTG TCT TTG AGA TCC ATG C [FAM] G

(5' a 3'): (DNA) – CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGT G

e) TGF- β

(5' a 3'): (DNA) – CGG GAA ATA CAC CAC CAG TCC [FAM] G

(5' a 3'): (DNA) – AGG CTG ACA CCC GTC ACT TG

7.5. MÉTODO

Se utilizó un modelo experimental de malaria murina (ratones singénicos CBA/Ca infectados con parásitos de la cepa *Plasmodium chabaudi*, los cuales se prepararon a partir de estabilizados criopreservados en nitrógeno líquido).

El día ocho postinfección los ratones se sacrificaron y se les extrajo el bazo, a partir del cual se aisló el ARNm para retrotranscribir, el ADNc obtenido se utilizó como control positivo para calibrar el ensayo de PCR en tiempo real de los genes IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β y β -actina.

7.5.1. Infección de los animales

Los ratones se infectaron intravenosamente con 5×10^4 eritrocitos parasitados de *Plasmodium chabaudi*. Diariamente se tomaron muestras de sangre de la cola de los ratones para evaluar la parasitemia en frotis teñidos con Giemsa.

7.5.2. Extracción de RNA.

- El día 8 post infección se sacrificaron a los ratones en una cámara de cloroformo
- Se disectó el bazo.
- El tejido se maceró haciéndolo pasar por una tela de nylon empleando PBS libre de calcio y magnesio.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min.
- Se eliminó el sobrenadante.
- A la suspensión de tejido obtenida, se adicionaron 500µL de reactivo de Tripure y se agitó vigorosamente.
- En un tubo eppendorf se colocaron 500µL de lisado y se adicionaron 100µL de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), se agitó en Vortex por 10 min.
- Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min.
- La fase acuosa se transfirió a otro tubo evitando la interfase.
- Se adicionó un volumen igual de isopropanol previamente enfriado a -20°C.
- Se centrifugaron los tubos a 14000 rmp durante 15 min.
- Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de etanol al 80% en agua DEPC enfriado previamente a -20°C.
- Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 15 min.
- Se desechó el sobrenadante.
- Se dejó secar el botón a temperatura ambiente.

7.5.3. Hidratación y cuantificación del RNA

- Las muestras se hidrataron con 20 µl de agua DEPC al 0.1 % estéril.
- Se agitó durante 5 min.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 seg.
- Se colocaron en un tubo eppendorf 1µl de RNA y se adicionaron 199 µL de agua bidestilada milipore (dilución 1:200).
- Se leyó la absorbancia de la solución de RNA a 260 nm.
- Se determinó la concentración del RNA por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Absorbancia}_{260 \text{ nm}} \times \frac{40\mu\text{g}}{1000\mu\text{L}} \times \text{Dilución.}$$

7.5.4. Retrotranscripción

- Se retrotranscribieron 1.5 µg de ARN
- En un tubo eppendorf se adicionó: agua DEPC, el Oligo dT y el RNA de acuerdo a los cálculos realizados.
- Se incubó a 65° C por 10 minutos, se utilizó el termociclador.
- Se colocó en hielo durante 5 min. y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 seg.
- Se colocó en hielo y se llevó a 10 µL con la mezcla de reacción:

Reactivo	1 Rx (μ L)
<i>Amortiguador de retrotranscripción 5X</i>	4.0
<i>0.1mM de dTT</i>	2.0
<i>Enzima M-MLVRT</i>	1.0
<i>Inhibidor de RNAsa</i>	0.1
<i>Agua DEPC</i>	1.0
TOTAL	10.1

Tabla 1. Mezcla de reacción para retrotranscripción.

- Se incubó a 37° C durante 1 hora en el termociclador.
- Se incubó a 95° C por 5 min.
- Se colocó en hielo durante 5 min. y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 seg.
- Se adicionaron 50 μ l de agua DEPC fuera de la campana, se agitó con vortex y se guardó en el congelador (-20° C) hasta su uso.

7.5.5. Amplificación de los genes utilizando PCR

- Se prepararon mezclas de reacción para cada gene.
- Se preparó la mezcla de reacción considerando que el volumen final en un tubo fue de 10 μ L.
- Durante la adición de todos los reactivos, los tubos se mantuvieron en hielo y la mezcla se preparó en la campana de flujo laminar.
- Se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de magnesio y cantidades de agua, dependiendo del gen:

stock	1 Rx (μ L)	[Rx]
<i>Agua</i>	Variable	-
<i>Mezcla de Rx</i>	5,00	-
<i>50mM MgCl2</i>	Variable	Variable
<i>10μM oligo R</i>	0,20	200nM
<i>10μM oligo F</i>	0,20	200nM
<i>ADNc 1:10</i>	1,00	
TOTAL	10,00	

Tabla 2. Mezcla de reacción para la PCR.

- Posteriormente fuera de la campana se adicionó 1 μ L de ADNc a cada tubo, exceptuando los controles negativos, a los cuales se les adicionó 1 μ L de agua destilada para llevar a un volumen total de 10 μ L.
- Una vez colocadas las muestras en la placa para PCR en tiempo real, se taparon adecuadamente y se siguió el siguiente programa:

CICLAJE		
	Temperatura	Tiempo
1	50°C	2 minutos
2	95°C	2 minutos
3	95°C	30 segundos
4	60°C	45 segundos
5	72°C	45 segundos
6	repetir del punto 3 al 5, 45 veces	

Tabla 3. Ciclaje para la PCR.

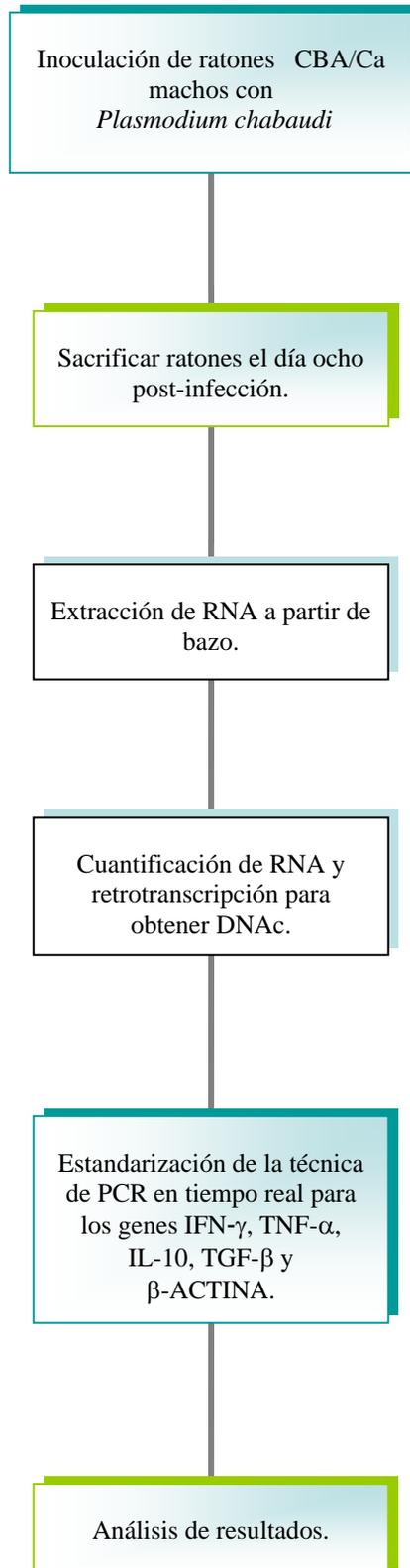
7.5.6. Electroforesis de los productos de PCR

- Se prepararon geles de acrilamida al 10% en TBE 1X.
- Se adicionó a cada muestra de producto de PCR 5µL de amortiguador de carga y se mezcló.
- De la mezcla anterior se colocaron 15µL en cada pozo del gel, se utilizó un pozo por muestra.
- Se colocó en un pozo de los extremos 10µL de marcador de peso molecular.
- Se corrió la electroforesis a 170 volts por 2 horas en TBE 10X.
- Una vez terminada la electroforesis, se tiñeron los geles con bromuro de etidio durante 5 minutos. Se utilizaron 20µL de una solución 10mg/mL en 200mL de TBE1X.
- Se destiñeron en agua destilada durante 5 minutos.
- Se colocó el gel en el equipo analizador de geles para observar el resultado.

7.5.7. Análisis de los productos de PCR

Todos los productos de PCR que se obtienen se analizan con ayuda del software del equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystem, 7000 Sequence Detection System, además para cada amplificación obtenida se realiza una electroforesis. De este modo se asegura que la amplificación obtenida corresponde al peso molecular del gen que se esta analizando.

7.6. DIAGRAMA DE FLUJO



8. RESULTADOS

Se realizaron varios ensayos para determinar las condiciones adecuadas para la amplificación de cada gen. Se utilizó el bazo que se extrajo de ratones CBA/Ca machos en el día 8 después de la infección con *Plasmodium chabaudi*, a partir del cual se obtuvo ARNm para retrotranscribirlo y obtener el ADN complementario (ADNc), que se utilizó como control positivo, puesto que en experimentos anteriores se detectó que esos genes se sobreexpresaban en el día 8 postinfección, por lo que se trabajó con esa muestra positiva para la estandarizar la técnica de PCR en tiempo real.

Se amplificó simultáneamente el gen constitutivo β -actina y cada uno de los genes a evaluar, todos los ensayos se realizaron por triplicado, tres controles positivos, con ADNc, y tres controles negativos, sin ADNc.

Además de obtener resultados por medio del software del equipo de PCR en tiempo real, se realizaron electroforesis en gel de acrilamida al 10% para corroborar que la amplificación obtenida correspondiera al peso molecular del gen analizado. Ambos resultados se compararon y de este modo se obtuvieron las condiciones adecuadas para cada gen.

También se realizaron al mismo tiempo pruebas con los reactivos de la marca Invitrogen y con los reactivos preparados en el laboratorio para determinar con cuales se obtenían mejores resultados, sin embargo con los reactivos preparados en el laboratorio no se obtuvieron resultados adecuados dado que carecían del colorante de referencia ROX, el cual estabiliza la señal de fluorescencia que detecta el equipo, por tal motivo se optó por continuar la estandarización con los reactivos de la marca comercial Invitrogen.

El ciclaje fue el mismo para todos los genes:

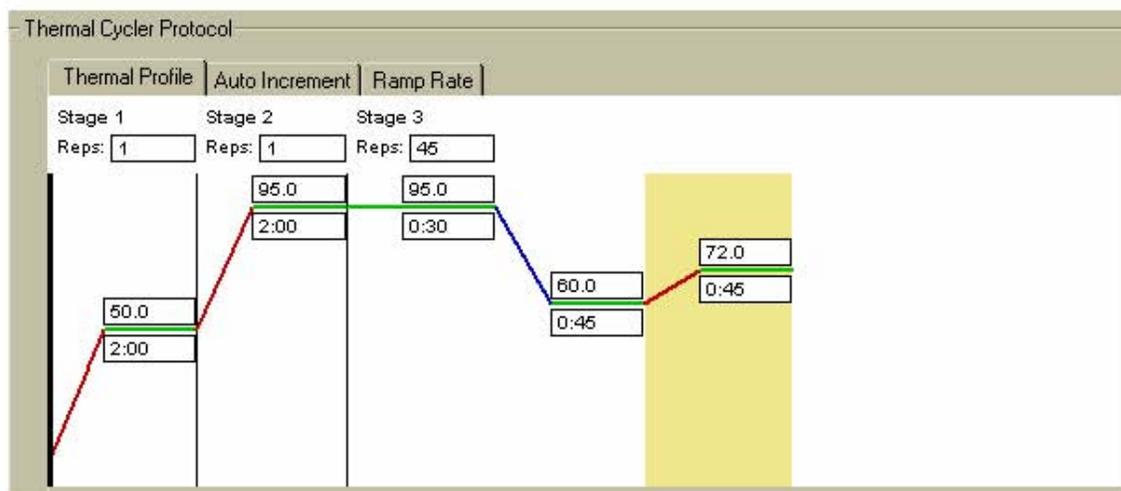


Figura 1. Ciclaje utilizado para la amplificación de los genes en PCR tiempo real.

Antes de utilizar el equipo de PCR en tiempo real, se realizaron diversas pruebas utilizando el termociclador Mastercycler gradient:

Lo primero que calibramos para cada par de primers fue el número de ciclos, la figura 4 corresponde a la amplificación de TGF- β utilizando la misma mezcla de reacción y control positivo, únicamente se varió el número de ciclos, de esa forma se estableció que en el termociclador Mastercycler 38 ciclos nos producían una señal intensa y única. De la misma forma se realizaron amplificaciones para cada uno de los genes que se calibraron.

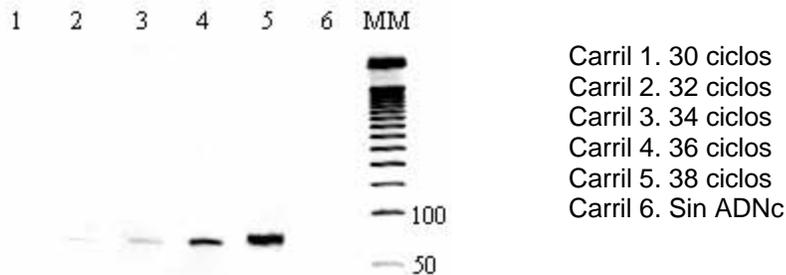


Figura 2. TGF- β amplificado a diferentes ciclos.

Corrimiento electroforético en un gel de acrilamida al 10% de los productos de amplificación por PCR del gene TGF- β a con un número diferente de ciclos en cada carril.

Dado que la concentración de magnesio es importante para la eficiencia y especificidad de la reacción de PCR, calibramos la concentración de magnesio para cada uno de los primers. En la figura 5 se muestran los resultados de la amplificación de TGF- β a diferentes concentraciones de magnesio, la mejor banda se observo a una concentración de 2.5mM.



Figura 3. TGF- β amplificado con diferentes concentraciones de magnesio.

Corrimiento electroforético en un gel de acrilamida al 10% de los amplicones del gene TGF- β a diferentes concentraciones de magnesio en cada carril.

Otra variable que modifica la especificidad de la reacción es la temperatura de alineación, por lo que calibramos esta temperatura utilizando la misma mezcla de reacción pero empleando el termociclador Mastercycler de gradiente de temperatura. Lo programamos para amplificar cada muestra a diferentes temperaturas. La figura 6 es representativa del experimento para calibrar la temperatura de alineación para el gen TGF- β la mejor amplificación se observó a 59°C. Es importante indicar que este tipo de ensayo se realizó para cada gene.

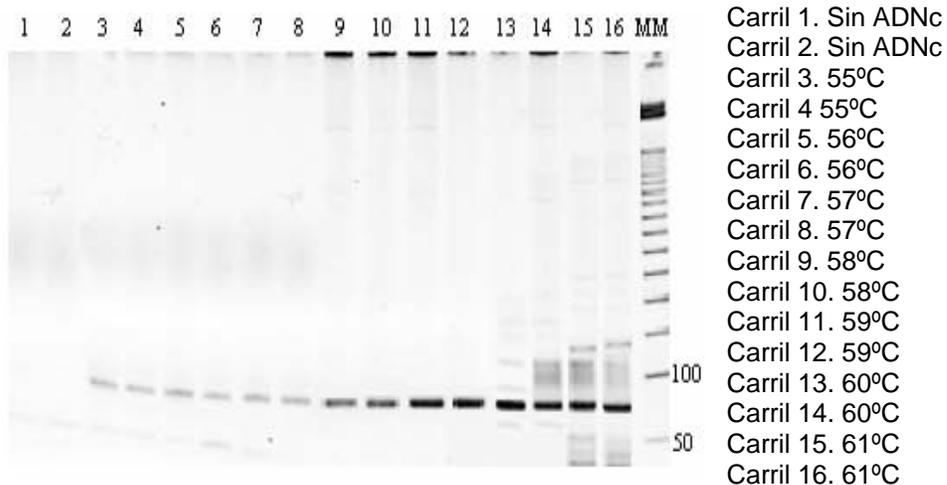


Figura 4. TGF- β amplificado con diferentes temperaturas de alineación. Corrimiento electroforético en un gel de acrilamida al 10% de los de los productos de amplificación del gene TGF- β a diferentes temperaturas de alineación, la determinación se realizó por duplicado para cada temperatura.

La concentración de ADN es otra variable que puede influir tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción de PCR, por lo que decidimos determinar la concentración de ADNc óptima para iniciar la amplificación de los diferentes juegos de primers, la figura 7 es un gel representativo para evaluar la concentración inicial de ADNc en la reacción de PCR para β -actina, se determinó que la mejor concentración correspondió a 2ng.

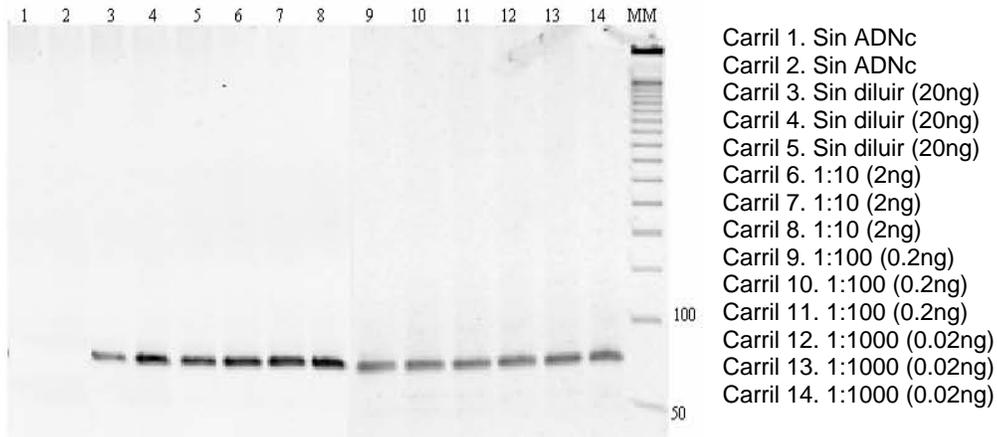


Figura 5. β -actina amplificado con diferentes concentraciones de ADNc.
 Corrimiento electroforético en un gel de acrilamida al 10% de los de los productos de amplificación del gene β -actina a diferentes concentraciones de ADNc, la determinación se realizó por duplicado para cada concentración.

El principal problema que se presentó fue el de las contaminaciones, una de las ventajas de la técnica es su alta sensibilidad, lo que en ocasiones se convierte en su principal desventaja, de ahí que establecer las fuentes de contaminación y eliminarlas fue un problema difícil de resolver. La figura 8 muestra uno de los geles en donde las contaminaciones generaron resultados completamente incorrectos, con diversas bandas inespecíficas.

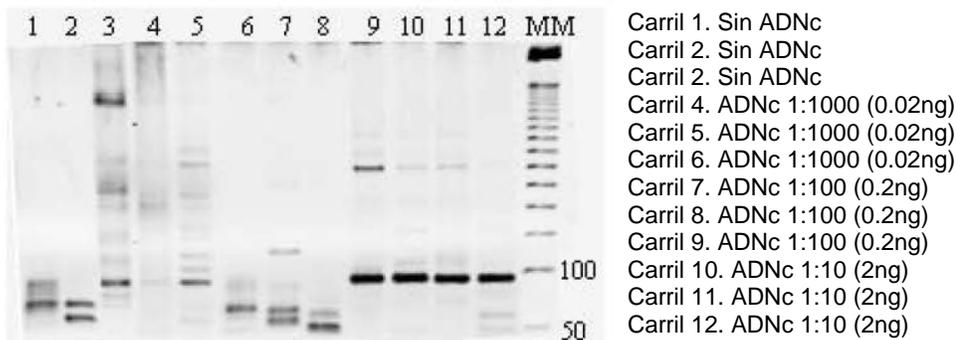


Figura 6. IFN- γ contaminaciones.

Corrimiento electroforético en un gel de acrilamida al 10% de los de los productos de amplificación del gene IFN- γ , los controles negativos mostraron amplificaciones inespecíficas, también se realizó la amplificación a diferentes concentraciones de ADNc .

Para eliminar las contaminaciones recurrimos a medidas extremas de limpieza, y en su caso utilizamos reactivos nuevos o irradiados con luz ultravioleta lo que nos permitió obtener resultados confiables.

Después de obtener las condiciones óptimas antes mencionadas, se realizó la amplificación en el equipo de PCR en tiempo real. El software del equipo graficó Delta Rn (ΔR_n) contra el número de ciclos. Donde Rn (Normalized reporter) es la fluorescencia que detecta el equipo en el transcurso de la reacción; ΔR_n es la magnitud de la señal generada y detectada por el equipo teniendo en cuenta la fluorescencia inicial. $\Delta R_n = R_n - \text{fluorescencia inicial}$

La línea roja denominada “threshold cycle (C_T)” ayuda a visualizar el número de ciclo en el cual la fluorescencia rebasa el umbral inicial.

β -actina

Este gen constitutivo se amplificó simultáneamente con los demás genes estudiados. Las mejores condiciones obtenidas fueron las correspondientes a una concentración de 3mM de $MgCl_2$, 200nM para la concentración de cada primer y la dilución 1:10 de ADNc equivalente a 2ng. Cabe mencionar que el ADNc para β -actina podría ser el de cualquier muestra dado que se expresa en todas las células.



Figura 7. β -actina. Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.

Se generó ADNc a partir de la retrotranscripción de ARNm del bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi*, como se describe en materiales y métodos. Para la retrotranscripción se utilizaron 1.5 μ g de RNA, el ADNc así obtenido se diluyó 1:10 lo que correspondió a 2ng. La concentración de magnesio fue de 3mM, y 200nM para cada primer. Para las condiciones de ciclaje ver el texto.

Interferón gamma (INF- γ)

Para INF- γ las mejores condiciones obtenidas fueron las correspondientes a una concentración de 2mM de MgCl₂, 200nM para la concentración de cada primer y la dilución 1:10 de ADNc correspondiente a 2 ng.

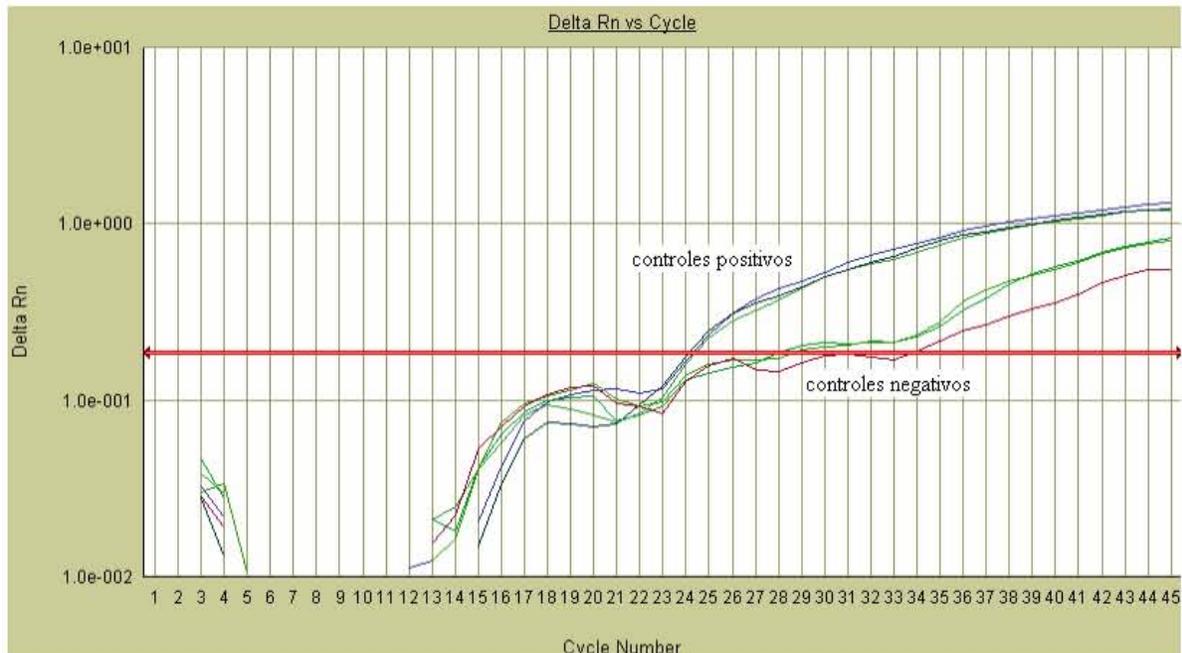


Figura 8. INF- γ . Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.

Se generó ADNc a partir de la retrotranscripción de ARNm del bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi*, como se describe en materiales y métodos. Para la retrotranscripción se utilizaron 1.5 μ g de RNA, el ADNc así obtenido se diluyó 1:10 lo que correspondió a 2ng. La concentración de magnesio fue de 2mM, y 200nM para cada primer. Para las condiciones de ciclaje ver el texto.

Factor transformante de tumores beta (TGF- β)

Para TGF- β las mejores condiciones obtenidas fueron las correspondientes a una concentración de 2.5mM de MgCl₂, 200nM para la concentración de cada primer y la dilución 1:10 de ADNc.

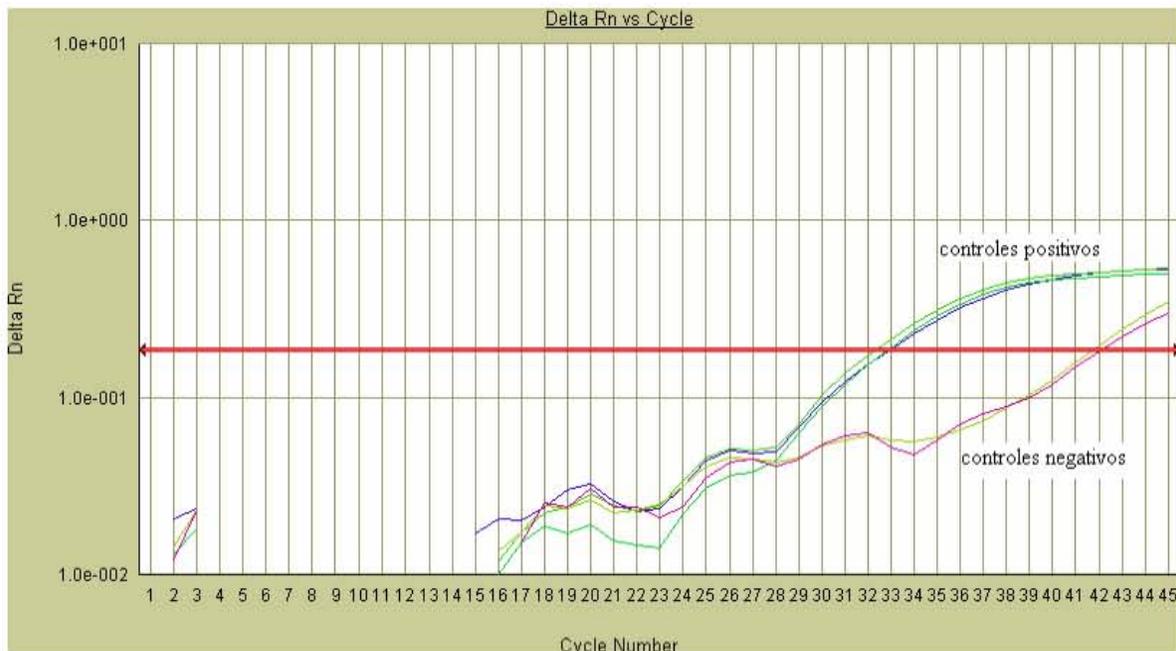


Figura 9. TGF- β . Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.

Se generó ADNc a partir de la retrotranscripción de ARNm del bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi*, como se describe en materiales y métodos. Para la retrotranscripción se utilizaron 1.5 μ g de ARN, el ADNc así obtenido se diluyó 1:10 lo que correspondió a 2ng. La concentración de magnesio fue de 2.5mM, y 200nM para cada primer. Para las condiciones de ciclaje ver el texto.

Factor de necrosis tumoral (TNF- α)

Para TNF- α las mejores condiciones fueron las correspondientes a una concentración de 3mM de MgCl₂, 200nM para la concentración de cada primer y la dilución 1:10 de ADNc.



Figura 10. TNF- α . Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.

Se generó ADNc a partir de la retrotranscripción de ARNm del bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi*, como se describe en materiales y métodos. Para la retrotranscripción se utilizaron 1.5 μ g de ARN, el ADNc así obtenido se diluyó 1:10 lo que correspondió a 2ng. La concentración de magnesio fue de 3mM, y 200nM para cada primer. Para las condiciones de ciclaje ver el texto.

Interleucina diez (IL-10)

Para IL-10 las mejores condiciones fueron las correspondientes a una concentración de 3mM de MgCl₂, 200nM para la concentración de cada primer y ADNc sin diluir.

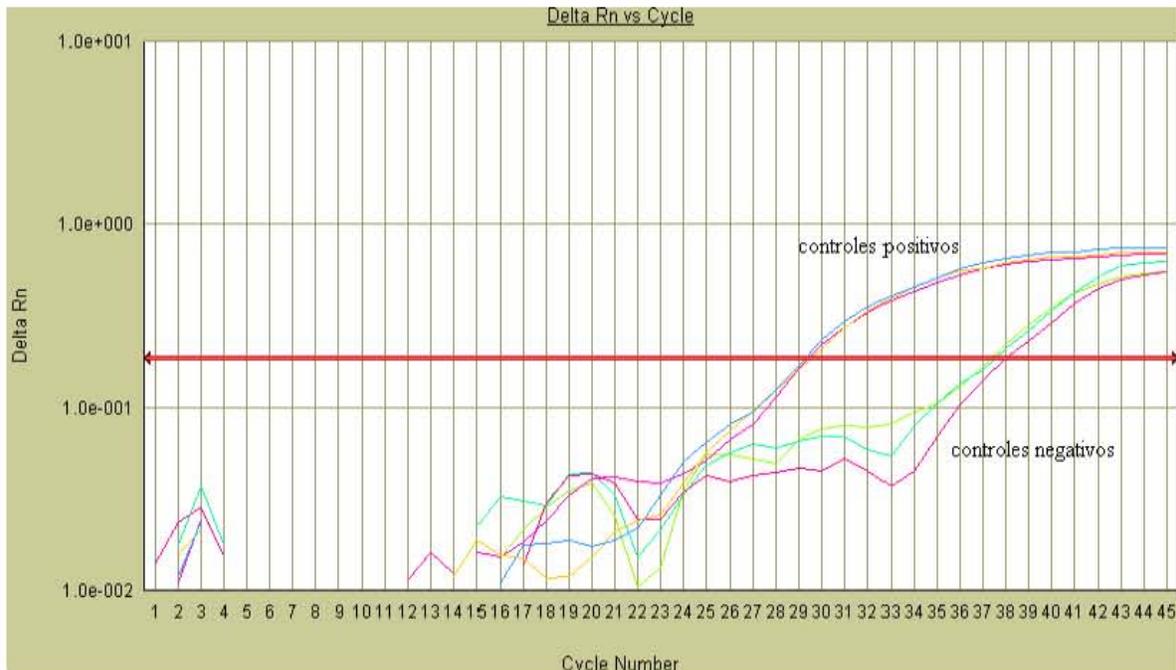


Figura 11. IL-10. Resultados de la amplificación en PCR tiempo real.

Se generó ADNc a partir de la retrotranscripción de ARNm del bazo de ratones CBA/Ca infectados con *P. chabaudi*, como se describe en materiales y métodos. Para la retrotranscripción se utilizaron 1.5µg de ARN, el ADNc así obtenido correspondió a 20ng. La concentración de magnesio fue de 3mM, y 200nM para cada primer. Para las condiciones de ciclaje ver el texto.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La técnica de PCR en tiempo real es un método muy sensible por tal motivo para la estandarización se llevaron a cabo diferentes ensayos. Las condiciones de reacción y las concentraciones de los reactivos juegan un papel muy importante para llevar a cabo una amplificación adecuada, evitando la presencia indeseada de dímeros o contaminantes.

En primera instancia para iniciar la calibración se utilizaron los reactivos elaborados en el laboratorio y los reactivos comerciales Invitrogen simultáneamente, considerando como condiciones base las que recomendaba Invitrogen; el equipo que se utilizó fue el termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf.

Debido que las temperaturas de desnaturalización y extensión son estándares para todas las reacciones, la temperatura que tiene el efecto crítico en la especificidad es la de alineación, por tal motivo y tomando en cuenta los resultados obtenidos, se realizaron pruebas para cada una de las citocinas modificando la temperatura de alineación hasta encontrar la que nos proporcionara una mejor amplificación. Como se muestra en la figura 6, bajas temperaturas de alineación ocasionan una amplificación pobre, además existe una mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del ADN blanco y se amplifiquen, por el contrario a lo esperado, altas temperaturas también pueden causar amplificaciones inespecíficas, esto se observó como bandas adicionales a la esperada.

Una vez que se estableció la temperatura de alineación se procedió de la misma forma con la concentración de magnesio, en la figura 5 se observa que dicha concentración es determinante en la especificidad de la reacción debido a que concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad lo que se observa como bandas adicionales a la esperada, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, aunque al mismo tiempo disminuye la eficiencia en la amplificación.

El número de ciclos influye en la amplificación, teóricamente y en condiciones óptimas el nivel de amplificación del ADN en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo, sin embargo, en la práctica no siempre sucede así, después de determinado número de ciclos la amplificación se detiene gradualmente, entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria (meseta) debida al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos de ADN presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno. En la figura 4 se observa que en los ciclos 30, 32 y 34 la amplificación es pobre, en los ciclo 36 y 38 se observa una mejor amplificación aunque en el ciclo 38 empiezan a generarse amplificaciones inespecíficas lo que se observa como pequeños barrido por encima y por debajo de la banda deseada.

La concentración de ADN blanco utilizada es importante, a pesar de que la PCR es tan sensible y la amplificación puede hacerse a partir de una sola molécula de ADN, es necesario determinar una concentración adecuada para obtener amplificaciones eficientes. En la figura 7 se observan los efectos de diferentes concentraciones de ADN, un exceso de ADNc puede llevar a amplificaciones inespecíficas esto se observa en los carriles 3, 4 y 5 como un pequeño barrido por debajo y por arriba de la banda deseada, en contraste bajas concentraciones de ADN ocasionan una amplificación insuficiente como se observa en los carriles del 9 al 14, las mejores concentraciones nos generaron bandas como en los carriles 6, 7 y 8.

Un problema que siempre estuvo latente fue el de la contaminación debido a la alta sensibilidad de la PCR y por la presencia de ADN diferente al que se quiere analizar y sobre todo los productos de amplificaciones anteriores. Para eliminar las contaminaciones se emplearon diferentes estrategias que fueron desde preparar nuevamente los reactivos, limpiar con reactivos especiales (ADN-off) todas las zonas de trabajo, esterilización de las micropipetas, utilizar puntas con filtro e irradiación ultravioleta. Con lo anterior logramos eliminar los restos de ADN y productos de PCR de otros ensayos. Se irradiaron todos los materiales que se utilizaron. En el caso de los reactivos, el magnesio y los oligonucleótidos sin etiqueta fluorescente, no sufren alteraciones al ser expuestos a la radiación UV por lo que también se irradiaron.³. Además se tomaron las medidas necesarias en cuanto al uso de material limpio y en su caso estéril, libre de nucleasas, área de trabajo limpia, uso de campana de flujo laminar y guantes. Todos los reactivos se manejaron de tal forma que se pudieran evitar contaminaciones ya que de llegar a contaminarse tendrían que ser desechados en su totalidad (para el caso de los que no pueden ser tratados con luz UV). A pesar de las medidas tomadas, eventualmente se observaron contaminaciones, como se muestra en la figura 8 donde se aprecian amplificaciones inespecíficas, diferentes bandas por arriba y por debajo de la deseada; finalmente se optó por trabajar con puntas con filtro, nuevas, estériles y libres de nucleasas. Después de varias pruebas finalmente se pudo eliminar la contaminación, sin embargo, las medidas preventivas se siguieron utilizando para evitar posteriores problemas.

Una vez obtenidas las concentraciones de magnesio, ADNc, temperatura de alineación y número de ciclos adecuados para cada una de las citocinas, el siguiente paso fue llevarlo al equipo de PCR en tiempo real. En dicho equipo se puede trabajar con 96 muestras simultáneamente, sin embargo, el número de ciclos y la temperatura de alineamiento deben ser las mismas, por lo que se realizaron nuevamente pruebas con diferentes temperaturas y número de ciclos.

En este punto se decidió trabajar con los reactivos de la marca Invitrogen debido a que se observó una mejor amplificación, menos bandas inespecíficas en el gel de acrilamida y gráficas con menos variaciones en el software del equipo. Esto podría deberse a que el reactivo contiene ADN-uracil glicosilasa (UDG por su nombre en Inglés uracil-ADN glycosylase) el cual se utiliza para evitar la

amplificación de productos contaminantes; ³ también contiene un colorante de referencia denominado ROX²⁷, el cual sirve para normalizar las señal de fluorescencia que capta el equipo. Debido principalmente a estos dos componentes del reactivo, resulto más conveniente usarlo, en comparación con los reactivos preparados en laboratorio.

En la figura 9 que corresponde a la amplificación para β -actina, se observa la diferencia existente entre los controles positivos y los negativos, en los primeros inicia la amplificación en el ciclo 19, en los segundos se observa hasta el ciclo 26, esta diferencia nos ayuda a diferenciar adecuadamente entre ambos, también nos puede ayudar a interpretar la presencia de contaminantes.

En la figura 10, que corresponde a la amplificación para IFN- γ , se observa en el ciclo 23 que los controles positivos se separan de los negativos, de este modo se puede determinar la diferencia entre ambos. También se observa que la forma en como se amplifica cada una de las 3 muestras de los controles positivo es uniforme, esto es otra forma de identificarlos y de diferenciarlos de los controles negativos o de posibles contaminaciones que puedan estar presentes.

En la figura 11 que muestra la amplificación para TGF- β , se observa que en el ciclo 28 se separan los controles positivos de los negativos, las gráficas uniformes de los primeros se distinguen perfectamente de los segundos. Esto permite identificar una amplificación positiva de una que no lo es.

En la figura 12 se representa la amplificación para TNF- α , desde el ciclo 24 se observa la separación de los controles positivos y los negativos de este modo es posible identificar y poder deducir si se esta amplificando el gen deseado o se trata de alguna contaminación.

En la figura 13 que muestra la amplificación para IL-10, se observa que en el ciclo 25 comienzan a separarse los controles positivos de los negativos, quedando de manifiesto la línea que corresponde a cada uno y al mismo tiempo nos proporciona la certeza de poder distinguirlos e identificar falsos positivos o contaminaciones.

Es importante realizar las pruebas por triplicado para tener la certeza de que los resultados que se están obteniendo son confiables y se trata de verdaderos falsos y verdaderos positivos, teniendo en consideración que es muy fácil y frecuente tener contaminaciones por productos de PCR trabajados anteriormente o por residuos de muestras de ADN que se hayan trabajado en el mismo lugar.

Una vez que se obtuvieron estos parámetros, se realizaron varios ensayos para verificar la reproducibilidad de la amplificación, con ello pudimos observar que contamos con una estandarización que permite reproducir los resultados en casa ensayo, lo cual es muy importante para trabajos futuros con una técnica sensible y rápida en un solo equipo para detectar genes de interés.

Es importante señalar que para realizar un análisis cuantitativo se debe utilizar el software del equipo, para lo cual se puede elaborar una curva estándar utilizando diferentes diluciones de ADNc para el gen constitutivo, o bien mediante formulas aritméticas ya deducidas, de este modo se puede cuantificar la cantidad que se expresa de cada citocina. En todo caso estos análisis no se encuentran dentro de los objetivos de este trabajo.

10. CONCLUSIONES

El análisis de las citocinas juega un papel importante para entender el desarrollo de la respuesta inmune en malaria, entre otras enfermedades, por tal motivo resulta de gran valor contar con técnicas que ayuden a mejorar su estudio, como es el caso de la técnica de PCR en tiempo real.

En la actualidad se ha incrementado el uso del método de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión del ARNm que codifica para diversas citocinas, las cuales a menudo se encuentran en cantidad muy pequeña. Este método es extremadamente útil debido a su gran sensibilidad y rapidez. En este trabajo se logro estandarizar esta técnica para las diferentes citocinas con lo cual se podrán obtener grandes beneficios gracias a su rendimiento y a la obtención de resultados confiables.

Esta técnica es hoy en día una herramienta muy valiosa para la investigación científica, el conocimiento que se generará a partir de su uso permitirá entender y explicar mejor el funcionamiento de la célula tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y por ende controlar las causas que la trastornan. En nuestro caso su estandarización permitirá tener una técnica sensible y rápida para detectar los genes de interés en trabajos futuros.

11. ANEXOS

11.1. ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
dNTP's	Desoxirribonucleotidos trifosfato
dTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltones
Mg ⁺²	Ion magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
M-MLVRT	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina Molones
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
NK	Asesina natural (Natural killer)
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
NO	Oxido nítrico
Oligo	Oligonucleotido
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción PCR
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Th	Célula T cooperadora (auxiliar)
TBE	Tris – ácido bórico – EDTA
TEMED	N,N,N',N', Tetrametiletildiamina
TGF	Factor de crecimiento transformante
Tm	Temperatura media de fusión
TNF	Factor de necrosis tumoral
μ g	Micro gramo
μ M	Micro molar
μ L	Micro litro

11.2. SOLUCIONES

a) Acrilamida-Bisacrilamida al 30%

La acrilamida es neurotóxica por lo cual se debe usar guantes y cubre bocas para su manipulación.

Acrilamida	29,0 g
Bisacrilamida	1,0 g
Agua bidestilada cbp	100 mL

b) Agua DEPC 0.1%

Se debe dejar actuar el DEPC durante 4-12 horas y remover el DEPC por esterilización. Distribuir en frascos de 250mL

Dietilpirocarbonato	1,0 g
Agua bidestilada cbp	1000 mL

c) Amortiguador de carga 5X

Se guarda a temperatura ambiente.

Reactivo	conc. final
TRIS pH 8	50 mM
EDTA pH 8	75 mM
SDS	0,5% P/V
Sacarosa	30% P/V
Ficol	10,0% P/V
Azul de bromofenol	0,12% P/V
Xilencianol	0,12% P/V

d) PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)

Realizar en alícuotas de 250mL y esterilizar.

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
NA ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Agua millipore cpb	1000 mL

e) APS (Persulfato de amonio) al 10%

Realizar alícuotas de 500µL y guardar en el congelador a -20°C.

Persulfato de amonio	10,0 g
Agua bidestilada cbp	100 mL

f) TBE (Amortiguador Tris-Ácido bórico-EDTA) 10X

Calentar la solución para disolver los reactivos más rápido.

Tris 1M	121,10 g
Ácido bórico 1M	61,83 g
EDTA 50mM	14,61 g
Agua bidestilada cbp	1000 mL

g) Gel de acrilamida al 10%

Agua bidestilada	2,24 mL
TBE 10X	1,00 mL
Acril/bisacrilamida 30%	1,68 mL
APS 10%	10 µL
TEMED	6 µL

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 2ª ed. México: MacGraw-Hill Interamericana, 1995: 73.
2. Barrera SH, Ortiz LR, Rojas MA y Reséndiz PD. Reacción en cadena de la polimerasa. Ciencia y desarrollo. 1993. 18: 50-60.
3. Borst A, Box ATA, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23: 289-299.
4. Contreras-Ochoa C. Ramsey JM. Gametocitos de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, etapas relegadas en el desarrollo de vacunas. Salud Pública en México. 2004; 46 (1): 64-70.
5. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas, microbiología clínica. 2004; 22(5): 299-305.
6. Clark WR. The experimental of modern immunology. Singapur: Chong Offset Printing Pte. 1994: 374-375.
7. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R and Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR : applications to quantify cytokine gene expression. Methods. 2001; 25: 386-401.
8. Innis M. Gelfand D. PCR protocols. A guide to methods and applications. USA: Academic Press, Inc., 1990: 3-12.
9. Langhorne J. The immune response to the blood stages of *Plasmodium* in animal models. Immunol Letters. 1994; 41: 99-102.
10. Li C. Langhorne J. Tumor necrosis factor alpha p55 receptor is important for development of memory responses to blood-stage malaria infection. 2000; 68(10): 5724-5730.
11. Li C, Corraliza I, Lanhorne J. A defect in interleukin-10 leads enhanced malaria disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. Infection and Immunity. 1999; 67(9): 4435-4442.
12. Legorreta-Herrera M, Sánchez-Cruz P. La respuesta inmune humoral contra el *Plasmodium*: agente etiológico de la malaria. Vertientes. 1(2): 45-52, 1998.
13. Legorreta-Herrera M, Ventura-Ayala ML, Licona-Chavez RN, Soto-Cruz I, Hernandez-Clemente FF. Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity. Parasite Immunol. 2004; 26:7-17.
14. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002; 30(6): 1292-1305.
15. Omer FM, Riley EM. Transforming growth factor β production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. J Exp Med. 1998; 188(1): 39-48.
16. Phillips RC, Mathers KE, Taylor-Robinson AW. T cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of different pathways of protection. Res Immunol. 1994; 145: 405-411.

17. Ramos-Avila A. Efecto de la cloroquina sobre la regulación por apoptosis de la respuesta inmune en malaria. Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México D.F. 2005.
18. Ramos-Avila A, Ventura-Gallegos JL, Zentella-Dehesa A, Machuca-Rodríguez C, Moreno-Altamirano MM, Narvaez V, Legorreta-Herrera M. Immunomodulatory role of chloroquine and pyrimethamine in *Plasmodium yoelii* 17XL infected mice. Scand J Immunol. 2007 65:54-62.
19. Rodríguez SI, Barrera SH. La reacción de cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 2004; 7:323-335.
20. Rojas-Espinosa O. Inmunología de memoria. 2ª Ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2001: 101-111.
21. Ryan KJ, Ray CG. Microbiología Médica. 4ª ed. México: MacGraw-Hill Interamericana, 2005: 783-794.
22. Soto-Cruz I, Cáceres-C J, Mendoza-Rincón JF, Weiss B. Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares. México: Plaza y Valdés Editores, 1999: 226-228, 256-260, 264-270.
23. Stuart WT. Microbiología. 5ª ed. México: MacGraw-Hill Interamericana, 2000: 464-470.
24. Tay-Zavala J. Microbiología y parasitología médicas. 3ª ed. México: Mendez Editores S.A. de C.V., 2003: 490-501.
25. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Advan. Physiol. Edu. 2005; 29: 151-59.
26. Zaman V. Atlas color de parasitología clínica. 2ª ed. México: Editorial Médica Panamericana, 1988: 93-96.
27. www.invitrogen.com