



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL VIRUS EPSTEIN BARR EN
NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD A ANTÍGENO AVIARIO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A
ISELA YANETH PABLO ANDRADE



MÉXICO, D. F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLÍS

VOCAL: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

SECRETARIO: Q.F.B MARIANA TÉLLEZ ARAIZA

1er. SUPLENTE: Q.F.B CRISTINA DEL CARMEN GIL CRUZ

2° SUPLENTE: Q.F.B GUSTAVO OLVERA GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

ISMAEL COSIO VILLEGAS

**Q.F.B MARIANA TÉLLEZ ARAIZA
ASESOR DEL TEMA**

**ISELA YANETH PABLO ANDRADE
SUSTENTANTE**

Agradecimientos

A mis padres Heraclio y Carmen por ser mi ejemplo de vida, amor y respeto. Por el apoyo incondicional para lograr esta gran meta.

A mis hermanos Marcela y Carlos por su cariño y aliento.

A Julio por su amor.

A la UNAM y todos los catedráticos, por formarme como profesionista.

A los miembros del jurado Dr. Jorge, Dr. Enrique y Mariana, por haberme apoyado y asesorado en la culminación de este proyecto.

ABREVIATURAS

A	Adenina
AA	Antígeno aviario
ADN	Ácido desoxirribonucleico
C	Citosina
CA	Contactos asintomáticos
cbp	Cuanto baste para
CD4+	Cluster of differentiation 4 (marcador de diferenciación 4)
CD8+	Cluster of differentiation 8 (marcador de diferenciación 8)
CI	Complejo inmune
CMN	Células mononucleares
CO ₂	Dióxido de carbono
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP's	Desoxinucleótido trifosfato
seg	Segundos
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
G	Guanina
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
FR	Factor reumatoide
H ₂ O	Agua
HLA	Antígeno leucocitario humano
IgA	Inmunoglobulina A

IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
K_2HPO_4	Fosfato dibásico de potasio
KCl	Cloruro de potasio
L	Litros
LPS	Lipopolisacarido
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
min	Minutos
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófago 2
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MP	Marcador de peso
Na_2HPO_4	Fosfato dibásico de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NH	Neumonitis por hipersensibilidad
NHAA	Neumonitis por hipersensibilidad a antígeno aviario
nm	Nanómetros
°C	Celsius
PAS	Persulfato de amonio
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pH	Potencial de hidrogeno
PHA	Fitohemaglutinina
RI	Respuesta inmune
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SR	Saccaropholyspora rektivirgula
T	Timina
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tris-boratos-EDTA
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
Th1	Célula T cooperadora
UV	Ultravioleta
V	Volts
VEB	Virus Epstein Barr
μL	microlitros

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. MARCO TEÓRICO	3
1. Neumonitis por hipersensibilidad a antígeno aviario (NHAA)	3
1.1 Antígenos responsables o etiológicos	4
1.2 Inmunopatogénesis	5
1.21 Anticuerpos	5
1.2.2 Linfocitos	6
1.3 Factores de susceptibilidad para el desarrollo de NH	8
1.4 Factores virales en NH	9
2. Virus Epstein Barr (VEB) y posible asociación con NHAA	11
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	14
V. METODOLOGÍA	15
5.1 Esquema de trabajo	15
5.2 Pacientes y controles	17
5.3 Obtención de células mononucleares (CMN)	17
5.4 Transformación de linfocitos B con VEB	17

5.5 Curva de detección para el amplificado VEB por PCR punto final	18
5.6 Extracción de ADN	18
5.7 Cuantificación y pureza de ADN	19
5.8 Amplificación de GAPDH	19
5.9 Amplificación de VEB	20
5.10 Revelación de los productos amplificados	20
5.10.1 Geles de agarosa	20
5.10.2 Geles de acrilamida	21
5.9.3 Tinción de plata	21
VI. RESULTADOS	22
VII. DISCUSIÓN	30
VIII. CONCLUSIONES	37
ANEXO I. CUENTA CELULAR	38
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	40
ANEXO II. REACTIVOS Y SOLUCIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	46

INTRODUCCIÓN.

La neumonitis por hipersensibilidad secundaria a la exposición de antígeno aviario (NHAA) es una patología frecuente dentro del grupo conocido como enfermedades intersticiales pulmonares y caracterizada por una respuesta inmune (RI) específica a distintos componentes orgánicos de diferentes aves, principalmente pichones, pericos australianos, canarios, entre otras. La enfermedad de más prevalencia en México es la originada por la exposición a palomas.

En el desarrollo de la enfermedad se han descrito algunas anormalidades inmunológicas e histopatológicas como son hipergammaglobulinemia, presencia de complejos inmunes circulantes, factor reumatoide así como el infiltrado inflamatorio pulmonar constituido por macrófagos, células multinucleadas, células plasmáticas, linfocitos T y B.

En la NHAA parecen estar involucrados factores genéticos y ambientales y se ha mencionado la posibilidad de que algunas infecciones de tipo viral se asocien a la fisiopatogenia de la NH, que pueda promover o participar en el desarrollo clínico de la enfermedad, por lo que en este estudio se propone al virus Epstein Barr (VEB) como posible contribuyente de las alteraciones de la respuesta inmune y cambios histopatológicos de la enfermedad.

Entre los datos más importantes que caracterizan al VEB, y que podrían explicar la asociación con la fisiopatogenia de la NH son:

- Es un herpesvirus que infecta a gran porcentaje de la población humana.
- Se ha reportado que el VEB infecta y se replica en el tracto respiratorio inferior, sitio en el que se desarrolla la NHAA.
- Este virus es considerado como un activador policlonal de células B, y esto es una característica que puede ocurrir en pacientes con NHAA.
- El VEB induce la producción de factor reumatoide, y esta alteración es frecuente en NHAA, además de que se ha reportado que estos autoanticuerpos inducen la activación del VEB en las células B infectadas por este virus.

En este estudio se buscó la presencia del virus Epstein Barr por el método de PCR, en células mononucleares (CMN) de pacientes con NHAA y contactos asintomáticos (CA) que nos permitirá tener indicio de sí en conjunto con la exposición a Ag's exógenos derivados de las aves, la infección por VEB pueda ser un factor de predisposición y/o de susceptibilidad para el desarrollo de una mayor alteración de la respuesta inmune de la NHAA.

I. MARCO TEORICO

1. NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD A ANTÍGENO AVIARIO (NHAA).

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) o alveolitis alérgica extrínseca constituye un grupo heterogéneo de desórdenes inflamatorios caracterizados por un daño que afecta principalmente el tejido intersticial pulmonar, y el cual aparece después de la exposición a diversos antígenos extrínsecos [1].

La entidad clínica debida a la exposición a antígenos aviarios (AA) se ha denominado también enfermedad del criador de aves, y es diferente a otro tipo de trastornos generados por otros antígenos, como el pulmón de granjero, que es causado por actinomicetos termofílicos como *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR). Por lo anterior, se ha establecido que estas enfermedades son de tipo ocupacional o ambiental.

Estudios en biopsias pulmonares y líquido de lavado broncoalveolar y otras muestras biológicas de pacientes con NHAA han confirmado depósitos intersticiales de inmunoglobulinas, complemento, y antígenos aviarios (AA) en forma aislada ó formando parte de complejos inmunes, y ocasionalmente se acompaña de broncoalveolitis obstructiva. Los hallazgos característicos consisten en intensos infiltrados inflamatorios de células mononucleares en los alvéolos y espacios intersticiales compuestos de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes. A medida que la enfermedad

progresas, los infiltrados de células mononucleares son acompañados de granulomas, y varios grados de fibrosis intersticial [2].

1.1 ANTÍGENOS RESPONSABLES O ETIÓLOGICOS

Las fuentes de antígenos que causan la NH son diversas. En particular la NHAA es causada por la inhalación de antígenos orgánicos de origen aviario (pichones, pericos australianos, canarios y otras aves), la enfermedad más común en México se presenta por la exposición a palomas [3,5].

Los antígenos definidos por los anticuerpos séricos de pacientes con la enfermedad del criador de aves o con antecedentes de exposición aviar se han identificado y aislado de los sueros de palomas, mucosa intestinal, excremento y del polvo de descamación del plumaje, sugiriendo así a estos componentes como Ag con propiedades fuertemente inmunogénicas [6].

La albúmina y las gammaglobulinas aviarias se han demostrado como antígenos en los sueros aviarios. Sin embargo, en los últimos años la atención se ha centrado principalmente en el material antigénico derivado de las secreciones de la mucosa intestinal de paloma, tales como IgA y mucina intestinal de paloma, las cuales a su vez pueden encontrarse en las heces o depositadas en las plumas de las aves.

Dentro de esta amplia variedad de antígenos, también se ha descrito a los polvos finos que se generan de la descamación de las plumas que consisten en aplanadas células epidérmicas escamosas queratinizadas de las aves, que son fácilmente depositados en las manos y prendas de vestir durante la

manipulación de las aves, la exposición sostenida e inhalación de estos polvos inducen los mecanismos inmunológicos implicados en la patogenia de la NHAA [7,8].

1.2 INMUNOPATOGENESIS

El desarrollo de la enfermedad depende del tipo, intensidad y duración de la exposición al antígeno, así como de la susceptibilidad del hospedero y la respuesta inmunológica que se origine a partir de ello. Es así que el desarrollo clínico de la enfermedad esta clasificado como forma aguda, subaguda y crónica.

La patogenia de la NH es una reacción de hipersensibilidad contra los antígenos inhalados con la implicación de ambos componentes efectores de la respuesta inmune, es decir la parte humoral y la celular [9].

1.2.1 Anticuerpos

La alta producción de anticuerpos anti-Ag aviarios (AAA) IgG, IgA e IgM han sido encontrados en pruebas de precipitación, lo cual indica la exposición intensa al AA. Dichos anticuerpos participan en los diferentes mecanismos que favorecen la lesión tisular sin embargo, también se ha descrito la presencia de AAA en algunos individuos que han estado en contacto con aves y que no desarrollan la enfermedad.

Niveles elevados de estos isotopos de anticuerpos acompañados de otros signos y síntomas parecen ser útiles para el diagnostico diferencial de NHAA de otros trastornos intersticiales pulmonares. De hecho, AAA IgG positivos y altos niveles de IgA parecen separar a individuos con la enfermedad del criador de aves de contactos asintomáticos [9,10].

Los anticuerpos participan en la formación de complejos inmunes (CI) y distintos trabajos demuestran que los CI pueden mediar la reacción de hipersensibilidad y contribuir a la patogénesis de la enfermedad aguda.

Por otra parte, es importante señalar que se han descrito inmunoglobulinas con actividad de factor reumatoide (FR) las cuales son autoanticuerpos dirigidos hacia la fracción Fc de IgG y que participan en los procesos patológicos de la inflamación, la producción elevada de estos autoanticuerpos de isotopos IgM, IgG e IgA es frecuente en el 30-50% de los pacientes con NHAA[19].

1.2.2 Linfocitos

Los linfocitos activados llegan a localizarse en la submucosa de las vías respiratorias y en los espacios intersticiales y alveolares del parénquima pulmonar en respuesta a la inflamación inducida por los antígenos. En la patogénesis de la NHAA, estos mecanismos inmunofisiológicos inducen la sensibilización inicial de las personas a antígenos aviarios, sin embargo la

inmunopatogenia de NH en particular involucra la inmunidad celular en el que los macrófagos y linfocitos T desempeñan un papel central.

Estudios realizados han mostrado células T CD4+ en lavados bronquioalveolares poco después de la exposición a los antígenos, pero en la mayoría de los pacientes con NH las células T CD8+ predominan más tarde [4], aunque las vías de inducción o la modulación de estos en la lesión pulmonar en hipersensibilidad no se conocen con precisión. En la enfermedad se puede incrementar la secreción de citocinas pro-inflamatorias que promueven la adhesión y la quimiotaxis de linfocitos T adicionales. Además, los linfocitos T cooperadores o células T CD4 + son necesarios para activar a los linfocitos B y a células T mediadoras de las reacciones inmunes [27].

Las citocinas proinflamatorias derivadas de células T CD4 + reclutan y activan a monocitos y linfocitos y prolongan la respuesta inflamatoria en el pulmón. Estas reacciones inmunes inducen la formación de granulomas y activan a los macrófagos para elaborar los factores de crecimiento que estimulan la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena que resulta en fibrosis intersticial que caracterizan a la fase subaguda y crónica de la NH [2].

Por otra parte, la unión de los anticuerpos y AA forman complejos inmunes los cuales pueden iniciar la cascada del complemento [11], y el C5 resultante promueve la activación de macrófagos tanto alveolares e intersticiales quienes a la vez secretan quimiocinas y citocinas que primero atraen a los neutrófilos y horas después atraen y activan a los linfocitos T y a monocitos quienes posteriormente inducirán la NH subaguda y crónica.

1.3 FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD PARA EL DESARROLLO DE NH

La NH es una enfermedad multifactorial a la que también se le atañen factores ambientales y de susceptibilidad genética de los individuos (tabla 1).

Constitución del individuo	Ambientales
Edad	Exposición a varios antígenos
Haplotipos HLA	Concentraciones de antígeno
Citocinas	Polvo (tamaño de partícula)
Polimorfismo	Infecciones virales
	LPS bacteriano y glucanos de hongos

Tabla 1. Algunos factores constitucionales y ambientales que pueden afectar la susceptibilidad al antígeno y al desarrollo de la NH. Tomado de McSharry C 2002.

Estos factores, entre otros, pueden estar involucrados en la patogenia, la NH es una enfermedad que guarda una estrecha asociación con la inhalación de antígenos en el ambiente por lo que la combinación de la susceptibilidad a la exposición del antígeno aviario más la inhalación de partículas orgánicas dispersas en el aire que se respira podrían actuar como coadyuvante o en forma sinérgica para desencadenar el cuadro de inflamación que se observa en los pacientes con NH. Se ha asumido que esto obedece a diferencias individuales que hace que algunas personas sean más susceptibles que otras.

Otro factor que afecta es el tabaquismo, ya que la producción de anticuerpos a los antígenos inhalados se inhibe en fumadores y es reversible en los ex-fumadores, por lo que se ha propuesto que la aparición de NH es menos común en pacientes con historia de tabaquismo [4,12,13].

1.4 FACTORES VIRALES EN NH

Una de las primeras investigaciones en infecciones virales asociadas a NH implicó un modelo experimental en ratones retados con el virus Sendai, en el cual se observó que este producía cambios considerables en la patología de la enfermedad que se caracteriza en una respuesta inflamatoria más severa secundaria a la exposición a *Saccharopolyspora rectivirgula*(SR) [14].

Un estudio posterior del mismo grupo de investigadores [14] demostró que una infección con virus sincitial respiratorio (VSR) en ratones, previa a la adquisición de NH inducida también por SR, podía expresar una mayor respuesta inflamatoria granulomatosa en comparación a ratones expuestos a solo a SR es decir, la infección por VSR acentúa la respuesta Th1 a SR.

También se han identificado mediante PCR la presencia de virus respiratorios comunes en lavados broncoalveolares obtenidas de pacientes con NH aguda, dentro de los cuales se muestra la mayor prevalencia del virus de la influenza A con respecto a otros como adenovirus, coronavirus y parainfluenza tipo 3.

Estas infecciones están presentes en las vías respiratorias bajas, sitio en el que ocurre la reacción de hipersensibilidad en los pacientes con NH [15].

Todas estas observaciones sugieren que es posible que una infección viral pueda contribuir al desarrollo de la enfermedad. Los individuos infectados pueden desarrollar manifestaciones clínicas más intensas de NH, debido al incremento en la inflamación mediada principalmente por la activación de los macrófagos alveolares y por lo tanto la aceleración en la formación del granuloma.

Se ha señalado también que una infección viral en las aves puede ser un factor mediante el cual se puede adquirir la enfermedad ya que se ha detectado partículas virales del circovirus aviario en sangre, macrófagos, contenidos intestinales así como en otro tipo de excretas y secreciones de las aves, que pueden explicar la hipersensibilidad originada en los pacientes con NHAA, debido a esto el circovirus aviario puede comportarse como un tipo de Ag de tipo viral que puede comportarse como un factor desencadenante o participar en el mecanismo patogénico de la NHAA [16].

2. VIRUS EPSTEIN BARR Y POSIBLE ASOCIACIÓN CON NHAA

El virus Epstein Barr (VEB) es un herpesvirus linfotrópico que infecta a gran parte de la población, este permanece latente en las células B quienes son su principal blanco de infección durante toda la vida después de la primoinfección [17].

La forma de transmisión del VEB es la infección inicial de las células epiteliales de la orofaringe y posteriormente los linfocitos B del tejido linfoide adyacente.

El VEB es un herpesvirus ubicuo que se ha asociado con un número de enfermedades. Estas incluyen la enfermedad linfoproliferativa de células B, el linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin, y carcinoma nasofaríngeo. Aunque normalmente este virus se asocia con infección de las vías respiratorias superiores y linfocitos B, el VEB también infecta y se replica en el tracto respiratorio inferior, sitio donde se desarrolla la hipersensibilidad en pacientes con NHAA [18].

La existencia de datos indirectos ó circunstanciales que pueden explicar la posible participación del VEB en la NHAA son, entre otros, la presencia de hipergammaglobulinemia(excepción de IgE) y factor reumatoide (FR) en la NHAA, ya que se ha reportado que el FR puede estimular a las células B infectadas por VEB e inducir la activación del virus [24], lo que sugiere una persistente estimulación de la respuesta inmune contra el VEB y la posible potencialización de la manifestación clínica de NHAA.

Las observaciones clínicas y experimentales han señalado que la presencia de FR puede jugar un papel significativo en la inmunoregulación de la NHAA, particularmente durante la respuesta humoral y contribuir en el desarrollo de la enfermedad a través de diferentes mecanismos patogénicos entre ellos la formación de complejos inmunes [18].

Existe una interesante asociación entre el FR y el desarrollo de diversas patologías de origen infeccioso e inmunológicas, entre estas las enfermedades pulmonares inflamatorias como la NH, en la que un proceso infeccioso originado por el VEB puede ser participe de los mecanismos inmunopatológicos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NH es una enfermedad multifactorial y compleja en términos de su etiología y fisiopatogenia, además del gran número de antígenos derivados de las aves se ha estudiado poco la contribución de agentes de tipo viral cuyos mecanismos inmunológicos pueden asociarse para conllevar un daño pulmonar más intenso en la NH, esto puede ser favorecida por el proceso infeccioso del VEB.

Algunos datos que pueden sugerir la participación del VEB en la NHAA son la presencia hipergammaglobulinemia y factor reumatoide (FR) en NHAA, alteraciones que también han sido reportadas en patologías asociadas a infecciones por el VEB. Además se ha propuesto que el VEB induce la producción de FR y este a su vez puede inducir la activación del VEB en células B infectadas por este virus, originando así una RI persistente y una potencialización en los mecanismos inmunológicos para el desarrollo de NHAA.

Con base a estas observaciones el presente estudio pretende obtener evidencia de si la existencia de una infección por VEB en pacientes con NHAA y CA, puede ser un factor de susceptibilidad para una mayor manifestación clínica de la enfermedad.

III. HIPÓTESIS

La infección por el virus Epstein Barr constituye un factor de predisposición y/o de susceptibilidad para el desarrollo de una mayor manifestación clínica en la neumonitis por hipersensibilidad a antígeno aviario.

IV.OBJETIVO GENERAL

Establecer si la infección por el virus Epstein Barr puede estar asociada con una potencialización en los mecanismos inmunológicos implicados en la patogenia de la neumonitis por hipersensibilidad a antígeno aviario

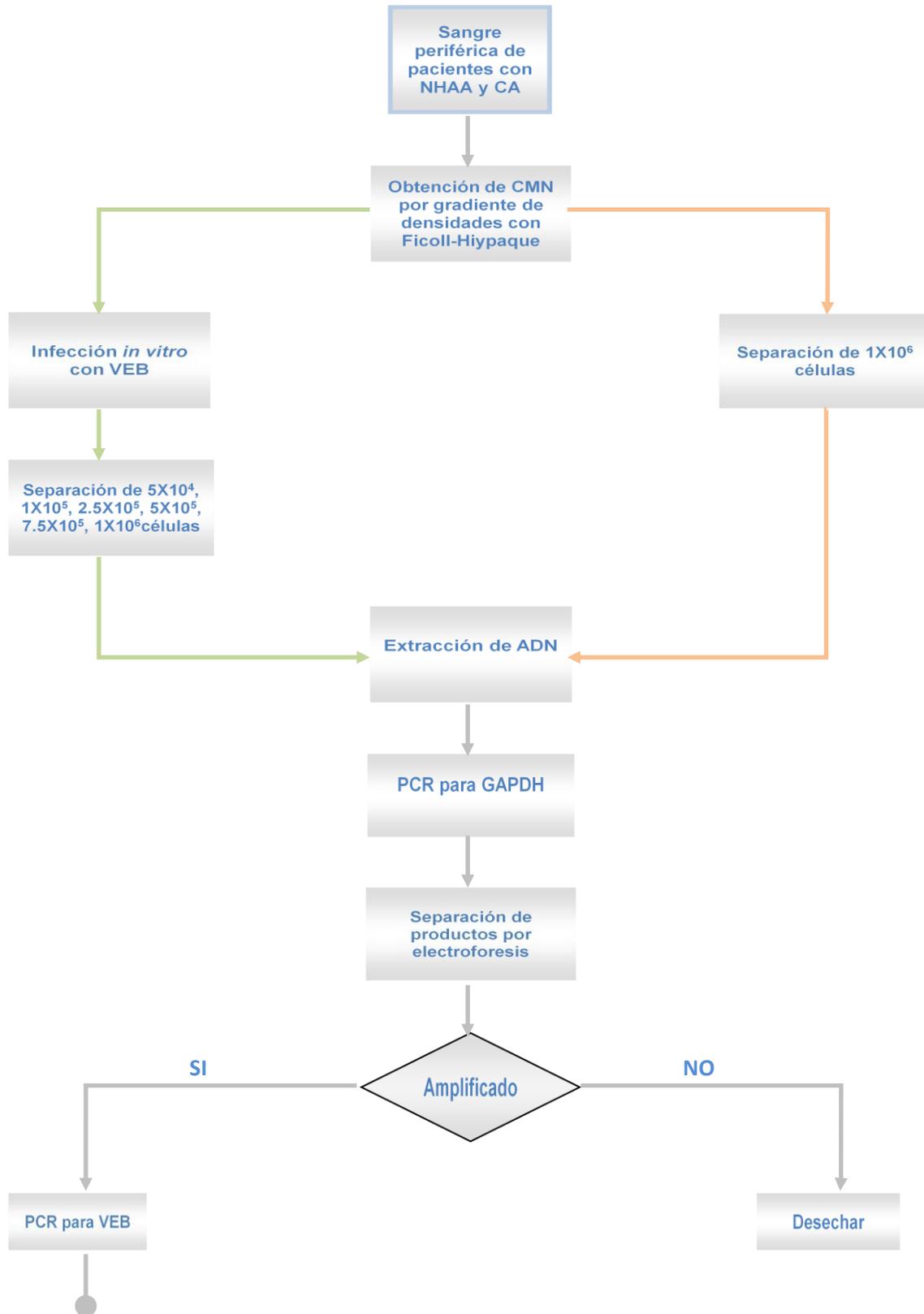
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

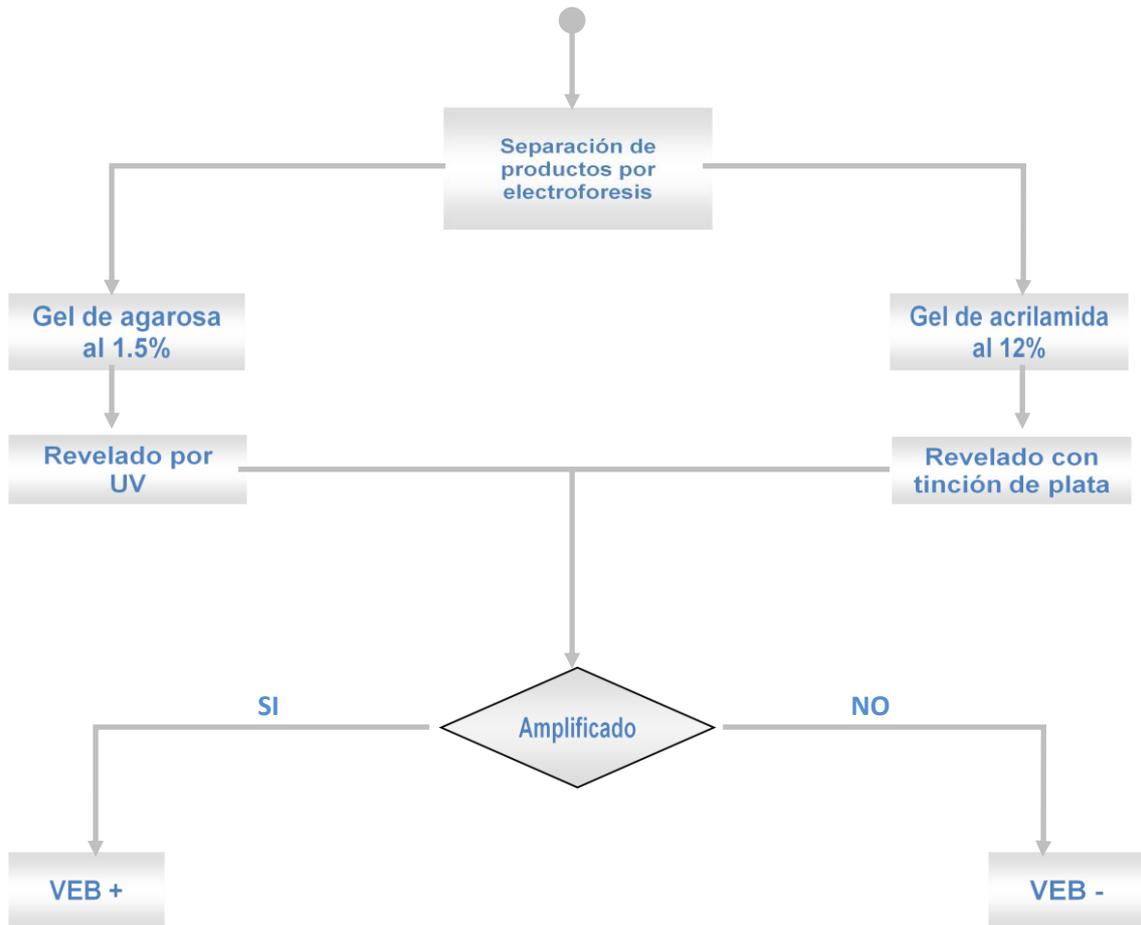
Evaluar la presencia del virus Epstein Barr en CMN de pacientes con NHAA y contactos asintomáticos (CA) mediante PCR punto final.

Establecer las condiciones experimentales para la determinación del virus Epstein Barr.

V. METODOLOGÍA

5.1 ESQUEMA DE TRABAJO





Proceso para el análisis de muestras de pacientes con NHAA y CA

Proceso para la realización de la curva de detección del VEB

Proceso general

5.2 PACIENTES Y CONTROLES

Se estudiaron dos grupos de 20 sujetos cada uno. El primero, pacientes con NHAA y el segundo, contactos asintomáticos (CA) quienes presentaron un antecedente de contacto similar a aves al igual que los pacientes con NHAA.

5.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN)

Fueron recolectados 4ml de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA, a partir de las cuales se separaron las CMN por el método de gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (lymphoprep densidad 1.077 g/ml), las CMN obtenidas fueron lavadas con PBS 1X pH 7.2 estéril centrifugando a 1100 rpm durante 10 minutos (2 veces). Se realizó un conteo para obtener 1×10^6 células a las cuales posteriormente se les extrajo ADN. Las células restantes fueron designadas para la transformación con VEB.

5.4 TRANSFORMACIÓN DE LINFOCITOS B CON VEB

La fracción designada de CMN para la transformación de linfocitos B con VEB fue resuspendida en 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco,USA), penicilina/estreptomicina al 1% y glutamina 4 mM, al cual se le agrego 500 μ l de un sobrenadante de VEB previamente obtenido de células Marmoset (clona B95-8), se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ a las 24 horas se adicionó fitohemaglutinina (PHA) (Sigma, USA) 1:100 (en RPMI). Los linfocitos transformados por VEB fueron cultivados en medio RPMI 1640 realizando cambios continuos hasta los 30 días que fueron

recolectados, posteriormente fueron lavados con PBS 1X centrifugando a 1200 rpm 5 min (2 veces) y se realizó cuenta celular para la obtención de 1×10^6 células /ml para su posterior extracción de ADN.

5.5 CURVA DE DETECCIÓN PARA EL AMPLIFICADO VEB POR PCR

PUNTO FINAL.

Se realizó PCR con diferentes concentraciones celulares con el fin de conocer la cantidad mínima necesaria para obtener el amplificado deseado para el virus, para lo cual se realizó cuenta celular en cámara de Neubauer de linfocitos B infectados por VEB para obtener las siguientes cantidades: 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 7.5×10^5 1×10^6 células.

Dichas cantidades fueron transferidas a un tubo eppendorf y centrifugadas a 1100 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y al botón celular se le realizó extracción de ADN para posteriormente realizar el amplificado primeramente del constitutivo Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y después para VEB.

5.6 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN de los grupos de estudio se realizó por el método de lisis salina. Esta se llevó a cabo homogenizando el pellet de células en 1ml de solución salina el cual se centrifugó a 14 000 rpm por 2 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 570 µl de NaCl 5.0 Mm y se agregó 40 µl de SDS 10%, se agitó por 5 min , se adicionó 200 µl de NaCl

saturado, se mezcló y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min , se recuperó la fase líquida a la cual se le adicionó 600 µl de una mezcla de cloroformo- alcohol etílico 49:1, se agitó durante 2 min y se centrifugó durante 8 min a 14 000 rpm, posteriormente la fase acuosa se recupera en etanol absoluto frío que se incubó durante toda la noche a -30 °C. El ADN es recuperado en etanol al 70% se centrifugó por 8 min a 14 000 rpm y se dejó secar a temperatura ambiente, el ADN obtenido se resuspende en 50 µl de H₂O libre de DNasa y RNasa.

5.7 CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE ADN

La cuantificación y determinación de la pureza del ADN se realizó por método espectrofotométrico con este objetivo se hizo una dilución 1:1000 de cada muestra de la cual fue tomado 1ml para llevar a cabo la lectura de absorbancias 260nm y 280 nm en el espectrofotómetro. Se considera ADN de óptima pureza cuando la relación entre las absorbancias es ≥ 1.8 .

La concentración fue determinada en µg/ml y se utilizaron 5 µg para los amplificadores.

5.8 AMPLIFICACIÓN PARA GAPDH

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada con oligonucleótidos de 984 pb, sentido 5' –TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT – 3' y antisentido 5' – CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC – 3', la reacción se llevo a cabo con Taq ADN polimerasa (invitrogen 10342-020)

MgCl₂ 50 mM, dNTP's 10mM, 0.5 µl de los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente, 1 µl de ADN y agua libre de DNasa y RNasa cbp una reacción de 25 µl. El proceso de amplificación consiste en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C y 35 ciclos posteriores de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 45 seg y una extensión final de 72°C por 5 min.

5.9 AMPLIFICACIÓN PARA VEB

La presencia o ausencia del VEB se determinó usando oligonucleótidos específicos para VEB de 326 pb, sentido 5'- AGC AGT GGC CAG CTC ATA TG - 3' y antisentido 5'- TTG ACG GTC ATG CCA AGG CA - 3'. La reacción se llevó a cabo con Taq ADN polimerasa (invitrogen 10342-020) MgCl₂ 50 mM, dNTP's 10mM, 0.2 µl de los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente, 3 µl de ADN y agua libre de DNasa y RNasa cbp una reacción de 20 µl. La amplificación consistió en una fase de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y 35 ciclos posteriores de 95°C durante 45 seg, 60°C por 45 seg 72°C por 1min y una extensión final de 72°C por 5 min.

5.10 REVELADO DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

5.10.1 Geles de agarosa

Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X a 90 V por 40 minutos, mediante syber green (Quiagen 204056) el revelado se hizo a través de un transluminador de luz

UV. Considerando como resultados positivos a las muestras en las que se observó la banda correspondiente al peso del amplificado 984 pb para GAPDH y de 326 pb para VEB.

5.10.2 Geles de acrilamida.

Se realizaron geles de acrilamida al 12% en TBE 1X a 100V por 90 min para las muestras que se observaron negativas en geles de agarosa para EBV. Los geles se revelaron mediante tinción de plata.

5.10.3 Tinción de plata

Tras la separación electroforética en los geles de acrilamida al 12% de los amplificados correspondientes a las cantidades celulares de 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 7.5×10^5 y 1×10^6 linfocitos B transformados con VEB, el gel fue lavado con agua desionizada durante 1 min, posteriormente se tiñe con el Kit Bio Rad-Silver Stain (161-0443) basado en la reacción con Nitrato de plata.

VI. RESULTADOS

Una vez extraído el ADN de las células (linfocitos B) de ambos grupos de estudio (NHAA y CA) se determinó su concentración y pureza según lo descrito en el apartado 5.7 del capítulo de metodología, los parámetros aceptables de pureza indican que el método de extracción del ADN por el método de lisis salina fue eficiente.

El amplificado para el gen constitutivo GAPDH fue realizado a las muestras de ADN de los CA y pacientes con NHAA así como para las diferentes cantidades celulares separadas correspondientes a la curva de detección del VEB por PCR, esto se hizo con el fin de corroborar la integridad de las muestras de ADN que posteriormente se utilizarían para la PCR con el gen VEB.

El 100% de las muestras fueron GAPDH positivo, el cual fue utilizado como un control ya que la expresión de este gen es constitutivo de toda célula y emite certeza de la funcionalidad y estabilidad del ADN obtenido

Curva de detección para el amplificado de VEB por PCR punto final.

Para conocer la cantidad de células necesarias para la obtención de ADN necesario para el amplificado de VEB se trabajó con 3 muestras diferentes cada una con las siguientes cantidades: 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 7.5×10^5 y 1×10^6 de células infectadas por el VEB, las cuales fueron cosechadas a los 30 días del inicio de su cultivo, cada una de las muestras se realizó por triplicado.

Llevada a cabo la extracción de ADN de cada una de las alícuotas correspondientes a dichas cantidades celulares, el ADN fue corrido electroforéticamente con el fin de conocer la cantidad mínima de células con las cuales se puede visualizar el ADN en geles de agarosa al 1.5% (tabla 1, figura 1).

TABLA 1

ADN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS PARA LA CURVA DE DETECCIÓN PARA EL AMPLIFICADO VEB EN GEL DE AGAROSA AL 1.5%

Muestras		Cantidad de linfocitos B infectados por el VEB					
		50 000	100 000	250 000	500 000	750 000	1000 000
BB40	1	-	-	+	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	+
	3	-	-	-	-	+	+
BB72	1	-	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	+
	3	-	-	+	+	+	+
BB102	1	-	-	+	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	+
	3	-	-	-	+	+	+

(+) visualización del ADN; (-) no visualización del ADN.

A todas estas muestras, se les realizó amplificado para GAPDH, al resultar todas positivas para este gen se prosiguió el amplificado para el VEB, estos también fueron corridos en electroforesis con syber green en geles de agarosa al 1.5% y visualizados en transluminador de UV (tabla 2, figura 1).

Los amplificados VEB+ se muestran desde el ADN obtenido de 1×10^5 células hasta el millón, aunque la tendencia señala que a partir de 5×10^5 se asegura la positividad del amplificado para el gen VEB, sin embargo se trabajó con 1 millón de CMN debido a que a partir de esta cantidad es totalmente fiable el amplificado de VEB.

TABLA 2

AMPLIFICADO DEL VEB PARA LAS MUESTRAS DE LA CURVA DE
DETECCIÓN EN GEL DE AGAROSA AL 1.5%

Muestras		Cantidad de linfocitos B infectados por el VEB					
		50 000	100 000	250 000	500 000	750 000	1000 000
BB40	1	-	-	+	+	+	+
	2	-	-	+	+	+	+
	3	-	-	+	-	-	+
BB72	1	-	+	+	+	+	+
	2	-	-	+	+	+	+
	3	-	+	-	-	+	+
BB102	1	-	-	-	-	+	+
	2	-	-	-	+	+	+
	3	-	-	-	+	+	+

(+) amplificación; (-) no amplificación.

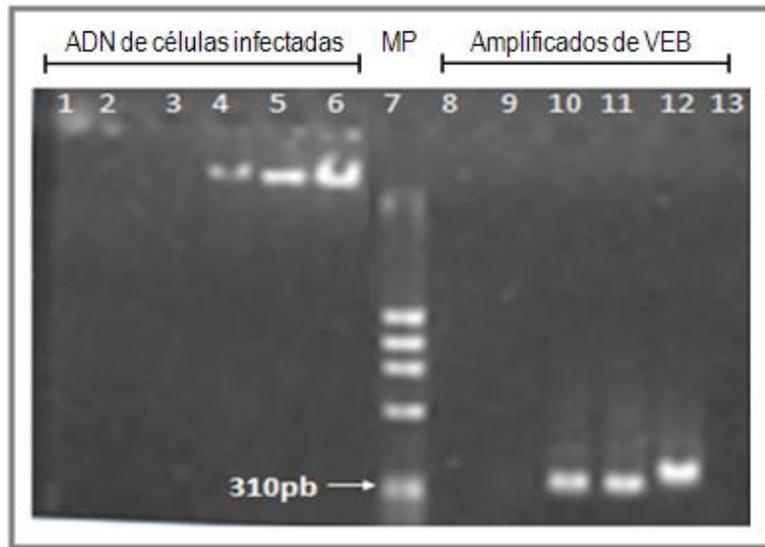


FIGURA 1. Gel de agarosa 1.5% ADN y amplificadores VEB+ de la curva de detección por PCR de la muestra BB40; carril 1-6 ADN obtenido de las células infectadas por VEB de 5×10^4 a 1×10^6 , carril 8-12 amplificado de PCR para el VEB de 1×10^5 a 1×10^6 , carril 7 MP ϕ X174 RF DNA/Hae III Fragments (Gibco).

Con el fin de obtener un dato adicional que nos permita corroborar nuestros resultados de las muestras amplificadas para VEB+ correspondientes a la curva de detección de VEB se realizó una corrida adicional en geles de acrilamida revelados con tinción de plata (figura 2) la cual se caracteriza por ser un método de 2-5 veces más sensible con respecto a la realizada con syber green en geles de agarosa.

La comparación entre ambos revelados no mostraron diferencias cualitativamente, por lo tanto los resultados se reportan negativos para VEB.

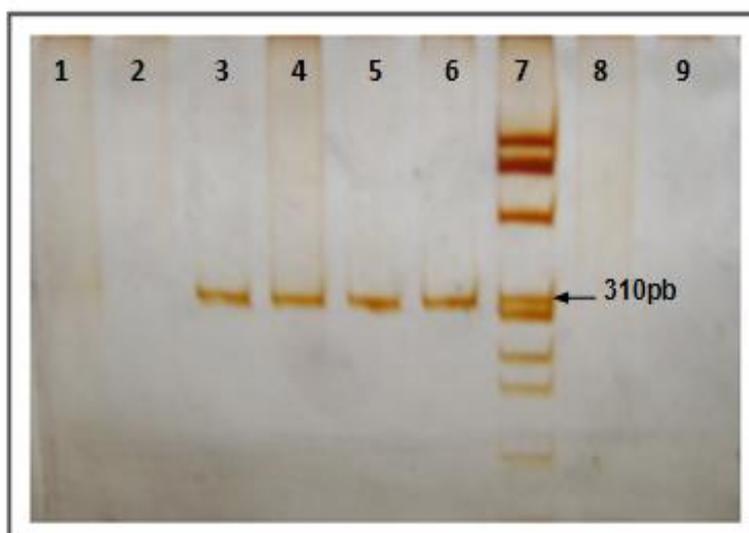


FIGURA 2 .Gel de acrilamida 12% de la curva de detección; carril 1-6 VEB de 5×10^4 a 1×10^6 , carril 7 MP ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Gibco).

Al respecto, en las tablas 3 a 5 se muestran los resultados conjuntos de ADN y amplificado para VEB para cada una de las muestras.

TABLA 3.

RELACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS DE LA MUESTRA BB40 CON RESPECTO AL ADN EXTRAÍDO Y PCR PARA VEB

	Muestras	ADN+	PCR VEB+
	# linfocitos infectadas con VEB	(n)*	(n)*
BB40	50 000	0/3	0/3
	100 000	0/3	0/3
	250 000	1/3	3/3
	500 000	2/3	2/3
	750 000	3/3	2/3
	1000 000	3/3	3/3

*numero de positivos/total de muestras estudiadas

TABLA 4.

RELACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS DE LA MUESTRA BB72 CON RESPECTO AL ADN EXTRAÍDO Y PCR PARA EBV

	Muestras	ADN+	PCR VEB+
	# linfocitos infectadas con VEB	(n)*	(n)*
BB72	50 000	0/3	0/3
	100 000	0/3	2/3
	250 000	1/3	2/3
	500 000	3/3	2/3
	750 000	3/3	3/3
	1000 000	3/3	3/3

*numero de positivos/total de muestras estudiadas

TABLA 5.

RELACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS DE LA MUESTRA BB102 CON RESPECTO AL ADN EXTRAÍDO Y PCR PARA VEB

	Muestras	ADN+	PCR VEB+
	# linfocitos infectadas con VEB	(n)*	(n)*
BB102	50 000	0/3	0/3
	100 000	0/3	0/3
	250 000	1/3	0/3
	500 000	3/3	2/3
	750 000	3/3	3/3
	1000 000	3/3	2/3

*numero de positivos/total de muestras estudiadas

Muestras de CA y pacientes NHAA

Llevada a cabo la curva de detección de VEB se tomó la cantidad de 1 millón de CMN de los pacientes con NHAA y CA, a las cuales se les extrajo el ADN para realizar PCR.

De igual manera se aplicó el criterio de que las muestras al ser positivas para el gen constitutivo GAPDH serían procesadas posteriormente para la amplificación del gen VEB.

El revelado de ambos amplificados realizados por electroforesis con la adición del fluorocromo syber green en geles de agarosa al 1.5% se muestra en la figura 3.

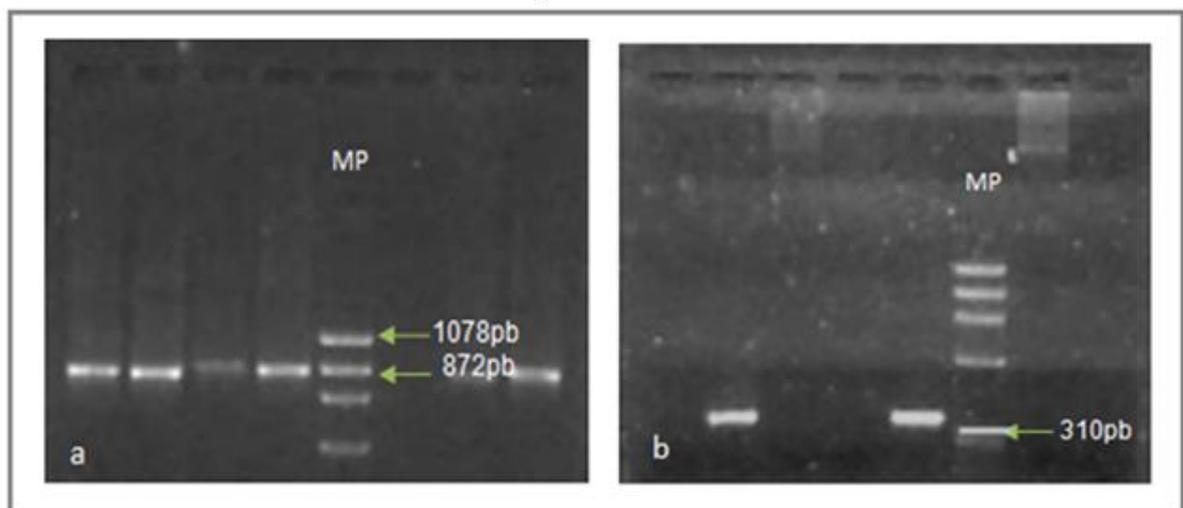


FIGURA 3. Análisis de electroforesis en gel de agarosa 1.5%, a) amplificado del gen GAPDH de 984pb y, b) amplificado de un control positivo para el VEB de 326pb, MP: ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Gibco).



Llevada a cabo el revelado de los productos de PCR para VEB, se obtuvo que:

- 20/20 muestras de CA fueron negativas para VEB

- 20/20 muestras de pacientes con NHAA fueron negativas para VEB

VII. DISCUSIÓN

La NHAA es una enfermedad intersticial pulmonar inducida por la inhalación de productos orgánicos derivados del plumaje y excretas de aves, y la interacción entre estos antígenos y el hospedero parecen ser influenciados por distintos tipos de factores, tales como los genéticos y ambientales entre otros. Este trabajo fue realizado considerando que en el desarrollo de la enfermedad se han señalado algunas infecciones virales lo cual sugiere que los virus pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la NH.

De los virus respiratorios comunes, el más frecuentemente detectado por el método de PCR en pacientes con NH ha sido el virus de la influenza A, otro estudio anterior había demostrado en modelos murinos que la infección por virus sincitial respiratorio (VSR) producía un aumento de IL-8 lo equivalente a MIP -2 en humanos, estas observaciones sugirieron que la infección viral por VSR eleva la respuesta de neutrófilos y la aceleración en la formación de granulomas [15].

Recientemente se ha documentado la posible infección por circovirus aviario, este ha sido propuesto como posible agente causal de la NH ya que se ha detectado a este virus en los órganos respiratorios de las aves, la transmisión del ave al humano originada por la manipulación de las aves puede involucrar el desarrollo de la enfermedad [16]. Aunque se ha considerado poco probable

la transmisión de microorganismos del ave al mamífero, un estudio reciente sustenta esta posibilidad [20].

El presente estudio se realizó debido a que el VEB es un microorganismo que afecta frecuentemente a la población humana y al infectar epitelios y/o mucosas y haberse detectado en tejido pulmonar, incluso en el contexto de algunas patologías como fibrosis pulmonar, lo hacen un candidato para ser estudiado en NH. Diferentes trabajos han reportado las distintas anormalidades en la respuesta inmunológica e histopatológica que también podrían ser originados por una infección del VEB, por lo tanto se estipula que en conjunto la NHAA con una infección por VEB podrían inducir un mayor daño pulmonar.

La evaluación serológica de la enfermedad muestra que los AAA y FR participan en los diferentes mecanismos que favorecen la lesión tisular, tales como formación de complejos inmunes (CI), activación de complemento y otros efectos que colaboran en la amplificación del proceso inflamatorio y la citotoxicidad celular [11].

En este trabajo se propuso la participación VEB en la NHAA considerando las siguientes observaciones. En NH se ha descrito la presencia frecuente de hipergammaglobulinemia a excepción de IgE, e incluso el incremento predominante de IgM sobre las demás inmunoglobulinas, así como la presencia de complejos inmunes circulantes, y factor reumatoide (FR) positivo [10,19],

anormalidades que también han sido reportadas en enfermedades causadas por el VEB ó asociadas al contacto con este agente infeccioso [21,22].

La presencia de niveles elevados de inmunoglobulinas y la ocurrencia frecuente de FR en pacientes con NHAA señalan la existencia de una respuesta significativa por parte de las células B, las cuales a su vez son inducidas por linfocitos T activados y a los que se les asocia por desempeñar un papel central en la patogénesis de la NHAA.

Se ha señalado también que VEB puede originar una activación de células B por lo que se ha sugerido a este herpesvirus como cofactor de estimulación y un activador policlonal de linfocitos B. Al respecto, una posibilidad interesante es que el FR, pueda incrementar la presencia del VEB en NH, ya que se ha descrito que este tipo de anticuerpos pueden reactivar al VEB latente [23], involucrando así a este agente viral en la patogenia de la enfermedad debido a que se ha estudiado la posibilidad de que la respuesta inflamatoria se incremente, explicados por la activación de factores quimiotácticos, quienes además de reclutar a neutrófilos y linfocitos pueden favorecer la formación de granulomas.

Algunas investigaciones han señalado que la presencia de FR positivo en NH se manifiesta en alveolitis fibrosante, por otro lado el FR es un autoanticuerpo encontrado en la mayoría de los pacientes con reacciones autoinmunes en

donde se ha estudiado al VEB como posible factor desencadenante y etiológico, y entre las explicaciones para esta asociación es que este virus comparte similitud con algunas sustancias proteicas propias del organismo humano [21].

Al iniciar este trabajo también consideramos factible que una vez iniciada la NH, algunos eventos intercurrentes como la infección por VEB pudiera contribuir a las distintas anormalidades serológicas que caracterizan a la enfermedad como la aparición de valores altos de IgM durante la fase aguda, y la fluctuación de otras inmunoglobulinas durante su evolución clínica. Dado a que nuestros resultados de PCR fueron negativos no fue posible estudiar esta propuesta.

Nuestro estudio también fue realizado debido a que en la NH se ha demostrado una prominente respuesta celular la cual ha sido caracterizada por infiltrados inflamatorios constituido por macrófagos, células multinucleadas, linfocitos T y B y células plasmáticas en el tejido pulmonar, el cual es similar a los cambios histológicos observados en los trastornos respiratorios secundarios al síndrome de Sjögren y hepatitis crónica, en los cuales se ha sugerido tanto al VEB y el virus de la Hepatitis C, como posibles agentes etiológicos.

En lo que concierne al VEB este tiene la característica de ser un virus ubicuo del cual se han reportado evidencias en células epiteliales de pulmón mediante inmunohistoquímica y PCR, así como también ha sido asociado con

infecciones de vías respiratorias altas y replicación en el tracto respiratorio bajo [18] sitio donde se desarrolla la NHAA , estos hallazgos sugieren una posibilidad de estudiar a este agente en pacientes con NHAA con el fin de investigar si este tipo de infección puede contribuir al desarrollo de la enfermedad, pues se ha mencionado en la literatura que algunas infecciones de tipo viral en particular logran involucrarse en la patogenia.

Debido a que no se encontraron resultados VEB+ en individuos con NHAA y CA, no se pudo evaluar si los pacientes con esta patología presentaron algunas anomalías histopatológicas que podrían ser explicados por la infección de dicho virus, ó sí el contacto previo con este microorganismo en el grupo control podría asociarse con algún tipo de trastorno en la RI.

En este trabajo se utilizó PCR la cual se caracteriza por ser una técnica sensible y específica, la cual nos permitió determinar la ausencia del VEB en las CMN de los pacientes con NHAA y los CA.

Considerando la probabilidad de que en nuestro estudio los linfocitos infectados con este virus sean muy limitados e incida en los resultados negativos se diseñó una curva de detección de VEB en base a la cantidad de células B infectadas por el VEB a partir de la cual se obtendría la cantidad necesaria de ADN para la amplificación del gen VEB.

Las cantidades propuestas fueron 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 7.5×10^5 y 1×10^6 células en base a que se ha reportado que se requiere de al menos

1×10^6 células para obtener una amplificación óptima. Al respecto, en nuestro estudio se demostró que al usar 5×10^5 células transformadas con VEB fue posible obtener ADN íntegro y que la PCR fue positiva para el VEB a partir del ADN obtenido de 2.5×10^5 células infectadas con el virus. Por lo anterior, al usar 1×10^6 CMN totales de las muestras de sangre periféricas de los pacientes con NHAA y CA tuvimos la certeza de trabajar con una cantidad apropiada de ADN total, aunque es posible que la sensibilidad de la PCR convencional sea insuficiente para obtener el amplificado del VEB. Al revisar la literatura en este contexto, se ha estimado que la cantidad aproximada de linfocitos totales por ml de sangre periférica en el humano es de 1,831,000 de los cuales aproximadamente el 13% corresponde a linfocitos B que tienen el receptor CD21 a través del cual pueden ser infectados por el VEB [24], por lo que podemos considerar que la cantidad de células totales infectadas por VEB en las muestras estudiadas haya repercutido en la obtención de resultados presentados en este trabajo.

VIII. CONCLUSIONES

No se detectó la presencia del VEB en CMN de pacientes con NHAA y CA por una baja sensibilidad del método de PCR, por lo que aún no se puede sugerir la existencia de infección por VEB ni su posible participación en el desarrollo patogénico de la NHAA, sin embargo actualmente se realiza un trabajo para determinar la presencia del VEB mediante PCR en tiempo real que nos permita discernir si no existe infección en los grupos de estudio y donde la cantidad de células infectadas por el virus no sea una limitante.

ANEXO I

CUENTA CÉLULAR DE LINFOCITOS B

Las cámaras de recuento se utilizan para determinar el número de células o partículas por unidad de volumen. La cámara de Neubauer es una cámara de conteo que se adapta al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Esta consiste en un portaobjetos cuya porción central está dividida en tres bandas perpendiculares al eje longitudinal de la cámara. De ellas, las dos laterales se hallan sobreelevadas 0.1 mm con respecto a la central, y en esta última hay grabado un retículo cuadrangular, el cual se constituye a su vez por 4 cuadros grandes (L) de 1mmx1mm subdivididos en 16 cuadrados pequeños. De manera que al superponer el cubreobjetos que deja un espacio de 0.1mm multiplicado por la longitud de 1mm² que corresponde a cada uno de los cuadros L se puede calcular el número de células en 0.1mm³.

Utilizando las conversiones se obtiene 1ml=1cm³=1000mm³ por lo tanto
0.1mm³=1*10⁻⁴ mL = 0.1μL

Por lo que al aplicar la formula: No células/mL= L /4*10⁴ *D

Donde: L = numero total de células en los 4 cuadrantes (L)

D= factor de dilución

10⁴ = factor de corrección de la cámara Neubauer

En dicho conteo puede utilizarse el colorante supravital azul tripàn el cual teñirá las células no viables, observándose así a las viables como incoloras [25].

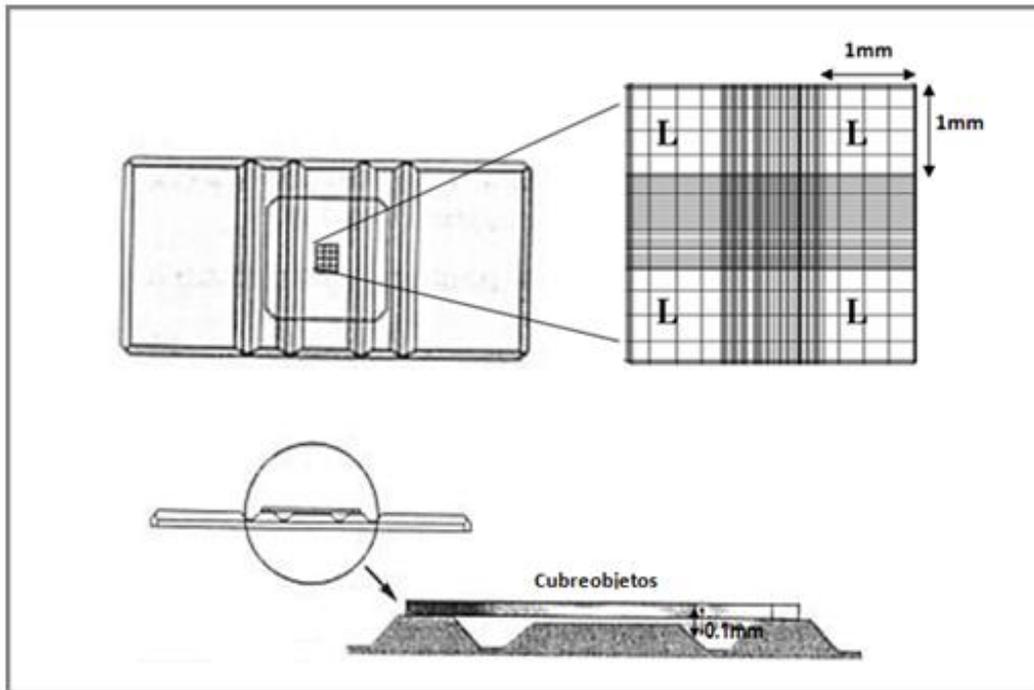


FIGURA DE CAMARA DE NEUBAUER

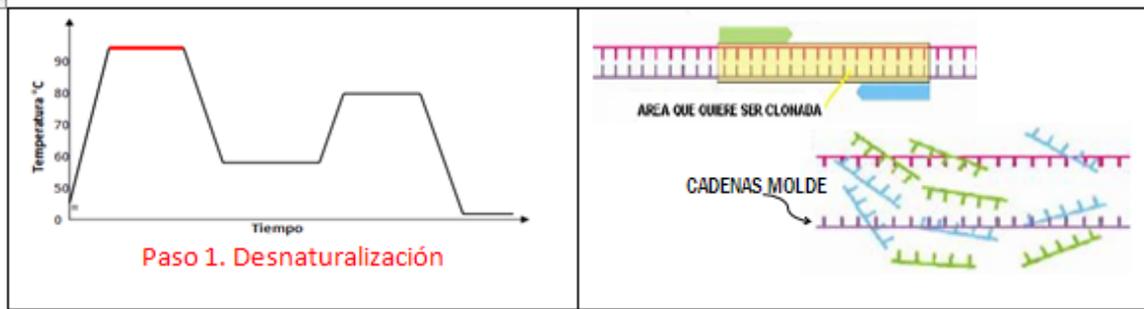
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés, es una técnica *in vitro*, rápida, sensible y específica que permite replicar de 100 a 10^7 copias de un ADN en particular a partir de pequeñas cantidades de una muestra. Esta técnica de biología molecular consiste en el uso de secuencias cortas de nucleótidos específicos de la región que se desea amplificar, los cuales sirven para flanquear en el ADN molde la secuencia de interés.

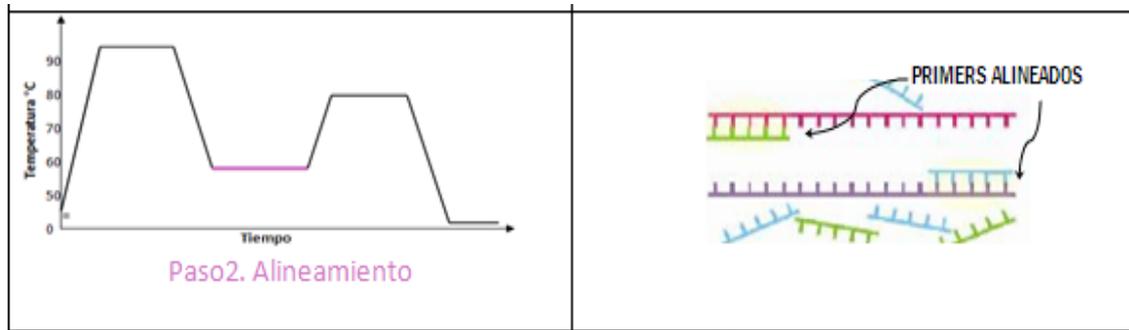
Los oligonucleótidos a su vez son reconocidos por la ADN polimerasa, una enzima que cataliza la reacción. La más común es la Taq polimerasa ya que es termoestable y permite estabilidad y eficiencia en la técnica. Dicha polimerasa utiliza como sustrato desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) a partir de los cuales se iniciara la polimerización de nuevo ADN.

Otros componentes adicionales a la mezcla de reacción son los iones Mg^{++} agregados comúnmente como $MgCl_2$ y una solución tampón que mantiene un pH adecuado los cuales actúan como cofactores para un buen funcionamiento de la ADN polimerasa.

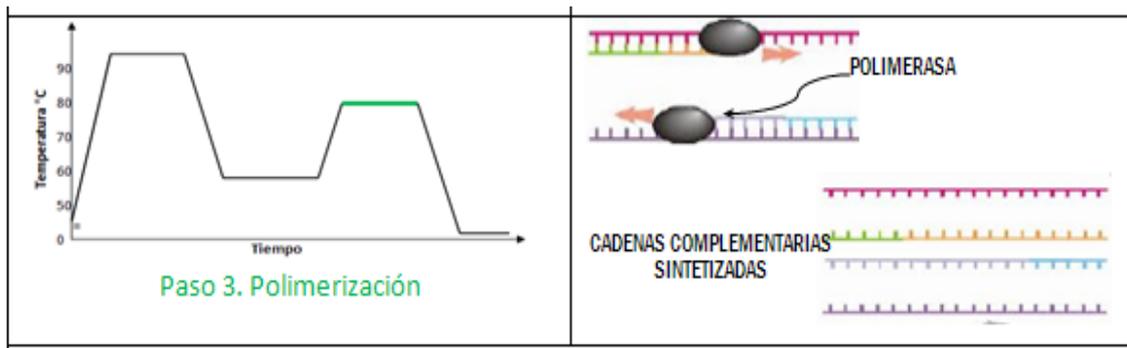
La PCR convencional consta de un primer paso de calentamiento en donde se asegura la desnaturalización del ADN molde y por consiguiente la separación de las dos hebras de las cuales está constituida, así cada hebra actuará como molde para fabricar su complementaria.



Un segundo paso consiste en la disminución de la temperatura donde los oligonucleótidos específicos llamados también primer o cebadores se alinean a la secuencia complementaria del ADN molde que será amplificado.

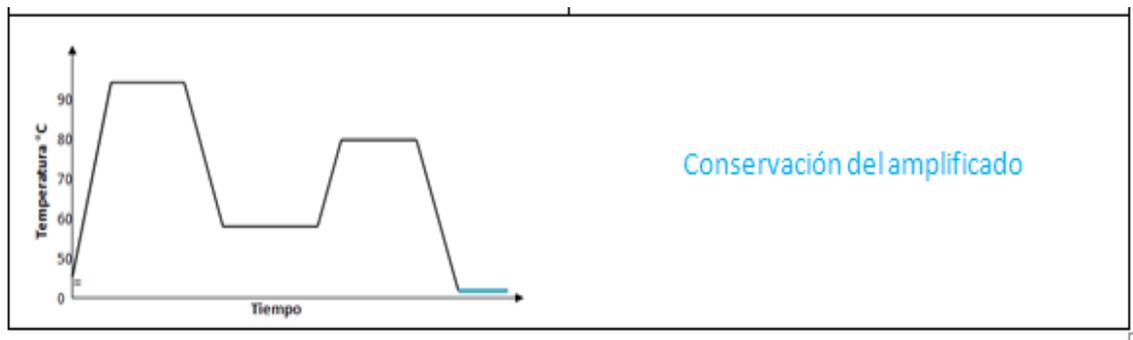


Un último paso será la polimerización del ADN complementario partiendo del ADN molde con la agregación de nucleótidos por la Taq polimerasa, esto ocurre al aumentar nuevamente la temperatura a la que la polimerasa es óptimamente activa.



Estos tres pasos de desnaturalización, alineamiento y polimerización son repetidos numerosas ocasiones a manera de ciclos dependiendo de la cantidad que se desee amplificar considerando que esta se lleva a cabo de manera exponencial.

Una vez completados los ciclos se finaliza con un decremento a 4°C de temperatura la cual convendrá para su conservación.



Las aplicaciones de esta técnica son de gran aporte al conocimiento y manipulación del material genético, dentro de sus aplicaciones se tienen análisis microbiológicos, genéticos, de diagnóstico y secuenciación de ADN genómico entre otros [26].

ANEXO II

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- **AGUA DEPC**

Dietil pirocarbonato	1mL
Agua desionizada	c.b.p 1L
Agitar y esterilizar (tres veces)	

- **PBS 1X**

KCL	0.2g
K ₂ HPO ₄	0.12g
NaCl	8.0g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	21.6g
Agua desionizada	c.b.p 1L
Disolver y ajustar a pH 7.2	

- **TAE 1x**

Tris base	4.84g
Acido acético glacial	1.142mL
EDTA 0.5 M	2ml
Agua desionizada	c.b.p 1L
Disolver y ajustar a pH 8	

- **TBE 10X**

Tris base	54g
Acido bórico	27.5g
EDTA 0.5 M	20ml
Agua desionizada	c.b.p 1L
Disolver y ajustar a pH 8	

- **BUFFER DE CARGA**

Azul de bromofenol	0.025g
Xilencianol FF	0.025g
Glicerol	3mL
Agua desionizada	c.b.p 10mL

- **GEL DE ACRILAMIDA 12%**

TBE 10X	0.5mL
Acrilamida-Bisacrilamida	2.36mL
TEMED	15 μ L
PAS	50 μ L
Agua desionizada	2.14mL

BIBLIOGRAFÍA

1. Schuyler M. Hypersensitivity pneumonitis. In: Fishman AP Pulmonary diseases and disorders, Mc Graw Hill, 3th edn, 1998; 1085–1097.
2. Kaltreider HB. Hypersensitivity pneumonitis. West J Med, 1993; 159: 570-578.
3. Lacasse Y, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis, Orphanet Journal of Rare Diseases, 2006:1-25.
4. McSharry C, Anderson K, Bourke SJ, Boyd G. Takes your breath away—the immunology of allergic alveolitis. Clin Exp Immunol, 2002;128:3–9.
5. Carrillo J.G, Sansores R.H, Castrejón A. Neumonitis por hipersensibilidad en la ciudad de México. Salud Pública de México, 2000, 42 (3): 201-207.
6. Todd A, Coan RM, Allen A, Pigeon breeders' lung: pigeon intestinal mucin, an antigen distinct from pigeon IgA, Clin Exp Immunol, 1991; 85: 453–458.
7. Hisauchi-Kojima K, Sumi Y, Miyashita Y. Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for cellular immunity in pigeon breeder's disease. J Allergy Clin Immunol. 1999; 103:1158–1165.

8. Banham SW, McKenzie H, McSharry C. Antibody against a pigeon bloom extract: a further antigen in pigeon fancier's lung. *Clin Allergy*, 1982; 12: 173–8.
9. Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108(5):661–670.
10. Martínez E, Aguilar DE, Novelo RV. IgM antiavian antibodies in sera from patients with pigeon breeder's disease. *J Clin Lab Anal*, 2000; 14:201–207.
11. Yoshizawa Y, Nomura A, Ohdama S. The significance of complement activation in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis: Sequential changes of complement components and chemotactic activities in bronchoalveolar lavage fluids. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1988; 87:417-423.
12. Selman M, Terán L, Mendoza A. Increase of HLA-DR7 in pigeon breeder's lung in a Mexican population. *Clin Immunol Immunopathol*, 1987; 44(1):63.
13. McSharry C, Banham SW, Boyd G. Effect of cigarette smoking on the antibody response to inhaled antigens and the prevalence of extrinsic allergic alveolitis among pigeon breeders. *Clin Allergy* 1985; 1 : (4) :87–94.

14. Gudmundsson G, Monick MM, Hunninghake GW. Viral infection modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol.* 1999; 162:7397.
15. Dakhama A, Hegele RG, Laflamme G. Common respiratory viruses in lower airways of patients with acute hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999 ;159(4): 1316-1322.
16. Bougiouklis PA. Avian circoviruses of the genus *Circovirus*: A potential trigger in Pigeon breeder's lung (PBL)/Bird fancier's lung (BFL). *Medical hypotheses.* 2007; 68(2):320-3.
17. Yenamandra SP, Klein G, Kashuba E. Nuclear receptors AND their role in epstein barr virus induced B cell transformation. *Exp Oncol.* 2009; 31(2):67-73.
18. Stewart JP, Egan JJ, Ross AJ. The detection of Epstein-Barr virus DNA in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159 (4 I): 1336-1341.
19. Tellez M, Aguilar DE, Novelo RV. IgM, IgG and IgA rheumatoid factors in pigeon Hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Lab Anal*, 2007;21(3):15-321.
20. Mori Y, Sugiyama M, Takayama M. Avian-to-mammal transmission of an avian rotavirus: Analysis of its pathogenicity in a heterologous mouse model. *Virology*, 2001; 1:63-70.

21. Costenbader KH, Karlson E. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(1):204002E
22. Griffiths DJ: Rheumatoid arthritis: a viral aetiology? *Hosp Med.* 2000, 61:378-379.
23. Yang L, Hakoda M, Iwabuchi K. Rheumatoid factors induce signaling from B cells, leading to Epstein-Barr virus and B-cell activation. *Journal of Virology*, 2004; 78 (18): 9918-9923
24. Jabs WJ, Paulesen M, Wagner HJ. Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) receptor CD21 on peripheral B lymphocytes of long-term EBV⁻ adults. *Clin Exp Immunol*, 1999; 116(3): 468-473.
25. Turallas, J.M. Métodos de recuento celular sanguíneo. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Ed Salvat, Barcelona España, 1987.
26. Luque, Herraéz. Biología Molecular e ingeniería Genética, Ed. Harcourt, 2001. España 187-196.
27. Rabinovich AG. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Ed médica panamericana. Buenos Aires, 2004 545-553.