



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Determinación de los niveles sanguíneos de IFN- γ en la especie canina

(*Canis familiaris*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SARAÍ ADRIANA VÉLEZ RAMÍREZ

ASESOR: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

COASESORA: DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

“DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE IFN- γ EN LA ESPECIE CANINA(Canis familiaris)”.

Que presenta el pasante: **SARAI ADRIANA VELEZ RAMIREZ**

Con número de cuenta: **40700052-2** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Junio de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo	
VOCAL	M. en C. Raúl Arturo Mar Cruz	
SECRETARIO	M.V.Z. José Antonio Licea Vega	
1er SUPLENTE	Dr. Hugo Ramírez Alvarez	
2do SUPLENTE	Dra. María Leonor Quintero Mora	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

HHA/pm

DEDICATORIAS

Tengo la suerte de que me rodeen muchas personas extraordinarias en mi vida. Sin ellas, no me hubiera sido posible hacer lo que hago. Estoy profundamente agradecida con todos los que me han ayudado a dar forma a mis ideas y me han alentado a tener grandes sueños.

Mi familia siempre ha estado conmigo desde el primer día. Cuando no hallaba la forma de salir de mis problemas y me encontraba con muchas puertas cerradas, me ofreció una base de inspiración y un apoyo inolvidable. Ha sido para mí una suerte tener la familia que tengo.

A mi mamá, que construyó para nosotros un hogar lleno de amor, que nos acoge y nos da una seguridad que no puede ser encontrada en otro lugar. Una mujer realmente sorprendente, inteligente y sabia, que me ha guiado a lo largo de estos años y siempre ha estado conmigo para escucharme y darme su apoyo incondicional.

A mi papá, que siempre estuvo presente en los momentos importantes de mi vida y que con su ejemplo me mostró que a pesar de las circunstancias siempre hay que ser alegres. Mi padre, un hombre realmente admirable, que ha dedicado la mayor parte de su vida a darle todo a su familia, sin él no habría podido llegar tan lejos.

A mi hermano Daniel, por ser mi mejor amigo, mi cómplice y por estar siempre junto a mí a cada paso que doy ayudándome, dándome ánimos o simplemente escuchándome.

A mi hermano Aarón, que es un ser humano verdaderamente dotado de talento y del cual tengo una profunda admiración por todo lo que es y por todo lo que hace, es un gran honor ser hermana.

A Armando Vargas Monreal, por vivir junto a mí esta etapa de mi vida y por compartir conmigo momentos inolvidables.

A mi amiga Gabriela Juárez, cuyo entusiasmo y creatividad siempre me ha inspirado.

A mis amigas Ethel y Edith, que siendo de otra generación vivimos momentos muy divertidos, las dos son mujeres excepcionales, admiro su determinación y fuerza para salir adelante.

A mi amiga Ariadna, por su compañía y amistad durante toda la carrera.

A mi amiga Wendy, por su invaluable amistad y porque siempre ha estado cerca de mí, aun estando tan lejos.

A mi amiga Sandra López, porque siempre he admirado su dedicación y por estar conmigo en momentos difíciles y ayudarme a superarlos.

A mi amiga Sandra Pérez, por su valiosa amistad y por todo su apoyo.

Al Dr. Misael Rubén Oliver González, por haber sido mi profesor y motivarme a dar siempre lo mejor de mí misma y a ser mejor cada día, por haber sido mi jefe y enseñarme tantas cosas, pero por sobre todo le agradezco su amistad, el haberme escuchado y ser la única persona que creyó en mi palabra y nunca dudo de ella.

“A todos los compañeros de búsqueda, esos valientes que tienen el coraje de apartarse de la multitud y encontrar el camino que lleva a un lugar llamado autenticidad.”

Saraí Adriana Vélez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

1. A mis asesores el Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo y a la Dra. Gabriela Barcenas Morales, por su paciencia, dedicación y apoyo para la realización de este trabajo de tesis.
2. Se agradece a la Dra. Alma Virginia Lara Sagahón por su asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados.
3. Este trabajo de tesis fue parcialmente financiado por los siguiente proyectos del programa PAPIIT: “Caracterización y comparación molecular de cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas del perro y del hombre” Clave IN200310-3 y “Detección y evaluación de la actividad biológica neutralizante de autoanticuerpos contra mediadores químicos del sistema inmune involucrados en la predisposición a enfermedades infecciosas en humanos” Clave IN217312-3.
4. Un agradecimiento a los MVZ Armando Vargas Monreal, MVZ Luis Augusto Ferrer Campos, MVZ Sandra Pérez Blanco, MVZ María Rosa Marugan Olivella, MVZ Sandra López Ibáñez, MVZ Silvia Ferrer Campos y al MVZ Hugo Bernal Zepeda por su apoyo en la recolección de muestras.
5. Se agradece a la DCV Tania Alejandra Farías Huaracha por su apoyo en el diseño de las imágenes.
6. A los sinodales MC. Raúl Arturo Mar Cruz, MVZ. José Antonio Licea Vega, Dr. Hugo Ramírez Álvarez y a la Dra. María Leonor Quintero Mora por sus observaciones y comentarios que enriquecieron mi trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. LOS LINFOCITOS T	3
2.2. LAS CITOCINAS	5
2.2.1. PROPIEDADES GENERALES DE LAS CITOCINAS	7
2.2.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CITOCINAS	8
2.2.2.1. Citocinas implicadas en el desarrollo hematopoyético	8
2.2.2.2. Citocinas producidas en las respuestas inmunes innata.	9
2.2.2.3. Citocinas producidas en las respuestas inmunes adaptativas	9
2.3. EL IFN-γ	10
2.3.1. TRADUCCIÓN DE LA SEÑAL POR EL RECEPTOR DEL IFN-γ	12
2.3.2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL IFN-γ	12
2.4. PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL IFN-γ	15
3. JUSTIFICACIÓN	18

4. OBJETIVOS	19
4.1. OBJETIVO GENERAL	19
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	20
5.2. ESTIMULACIÓN CELULAR	20
5.3. TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE IFN-γ	20
5.3.1.PREPARACIÓN DE REACTIVOS	21
5.3.2.PROCEDIMIENTO	21
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
6. RESULTADOS	24
7. DISCUSIÓN	32
8. CONCLUSIONES	36
9. BIBLIOGRAFÍA	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Ag	Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
CD	Célula dendrítica
CD4	Molécula presente en la membrana de una subpoblación de linfocitos T
CD8	Molécula presente en la membrana de una subpoblación de linfocitos T
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPAs	Células Presentadoras de Antígeno
CSF	Factor estimulador de colonias
DA	Dermatitis atópica
DE	Desviación estándar
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
FNT-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
FNT-β	Factor de Necrosis Tumoral beta
FTC-β	Factor Transformador del Crecimiento Beta
GAF	Homodímero fosforilado de STAT1
GAS	Sitio activo de IFN Gamma
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos
IE	Índice de estimulación
IL	Interleucina
IFN	Interferón
IFNAR1	Heterodímero de Interferón alfa/beta 1
IFNAR2	Heterodímero de Interferón alfa/beta 2
IFNGR1	Receptor 1 del Interferón Gamma
IFNGR2	Receptor 2 del Interferón Gamma
IFNLR1	Receptor 1 de Interferón Lambda
IFN-α	Interferón Alfa
IFN-γ	Interferón Gamma
IFNλ	Interferón Lambda
IRF9	Factor regulador 9 del Interferón

ISGF3	Factor gen 3 de Interferón Gamma
ISREs	Elementos de respuesta del Interferón estimulado
JAK	Quinasas de Janus
LC	Leishmaniosis canina
M-CSF	Factor estimulador de colonias de monocitos
MPA	Mitógeno de la lectina de <i>Phytolacca americana</i>
NK	Células “Natural Killer”
NKT	Células T “Natural Killer”
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PPD	Derivado Purificado de Proteínas
RNI	Reactivos intermediarios de nitrógeno
RNS	Radicales de nitrógeno
ROS	Radicales de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RT-Q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
STAT1	Homodímero transductor de señal y activador de transcripción 1
STAT2	Homodímero transductor de señal y activador de transcripción 2
TCR	Receptor de antígeno de células T

1 RESUMEN

El interferón- gamma (IFN- γ) o interferón tipo II es una de las citocinas centrales en la inducción y desarrollo de la inmunidad adaptativa celular, en particular, la desarrollada por los linfocitos T_H1; una de las funciones centrales de esta citocina es coadyuvar en el combate de patógenos intracelulares (virus, bacterias, levaduras y protozoarios). El estudio, evaluación y cuantificación de las citocinas es un área de la Inmunología que ha venido mostrando un gran desarrollo sobre todo a nivel de modelos experimentales en el ratón y en el humano. En el campo de la Inmunología Veterinaria existen ya comercialmente disponibles estuches (kits) para evaluar citocinas en diferentes especies, en este caso en particular, IFN- γ canino. Con el propósito de adaptar la aplicación de uno de estos estuches a las condiciones del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en este trabajo se analizaron 60 muestras de perros (37 hembras y 23 machos) clínicamente sanos de diferentes edades (cachorros de 3 a 11 meses; adultos jóvenes 1 a 7 años; adultos seniles 8 años en adelante) y con el propósito de comparar la producción de IFN- γ por células sanguíneas estimuladas con el mitógeno de la lectina de *Phytolacca americana* (MPA); los resultados obtenidos no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) ni entre grupos de edad, ni entre sexos, aunque se observó una tendencia a una mayor producción de IFN- γ conforme el perro envejece.

Se concluye que es posible utilizar esta metodología en nuestro Laboratorio y a futuro aplicar el estudio del IFN- γ en diferentes escenarios de interés para la clínica canina como la evaluación de vacunas y el estudio de procesos infecciosos, cancerosos o alérgicos.

2 INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune se puede dividir en inmunidad innata e inmunidad específica o adaptativa. La inmunidad innata se caracteriza por ser inespecífica, espontánea y sin memoria. Las células que participan son los macrófagos, los polimorfonucleares, las células cebadas, las células dendríticas y las células NK (del Inglés “Natural Killer), su inicio es rápido (minutos a horas) y posee una discriminación de lo propio-no-propio perfecta.²³

En contraste la inmunidad adaptativa se caracteriza por ser específica, inducida y con memoria. Las principales células que participan son los linfocitos T, los linfocitos B y las células presentadoras de antígeno, su inicio es lento (días) y la discriminación de lo propio-no-propio es imperfecta.²⁵

Cuando una infección satura los mecanismos de defensa innata, el agente patógeno sigue multiplicándose y se acumula antígeno, esto desencadena la inmunidad adaptativa en la que intervienen dos tipos de linfocitos: **linfocitos T** y **linfocitos B**. Estos linfocitos adquirieron su nombre de acuerdo al órgano linfoide primario en el cual se identificó inicialmente su maduración.¹

Los linfocitos T se diferencian en el timo, un órgano que se encuentra activo tanto en mamíferos como en aves durante las primeras etapas de la vida extrauterina; conforme el animal crece el timo va involucionando y va siendo infiltrado por tejido graso.^{23, 25, 33}

En el caso de los linfocitos B primeramente se identificó que se diferenciaban en la Bolsa de Fabricio en aves, de ahí su nombre; posteriormente se descubrió que en el caso del

hombre, primates superiores y ratón se diferenciaban en la medula ósea y en el caso de rumiantes, cerdos, equinos y caninos se diferencian en las placas de Peyer del ileum.^{25, 33}

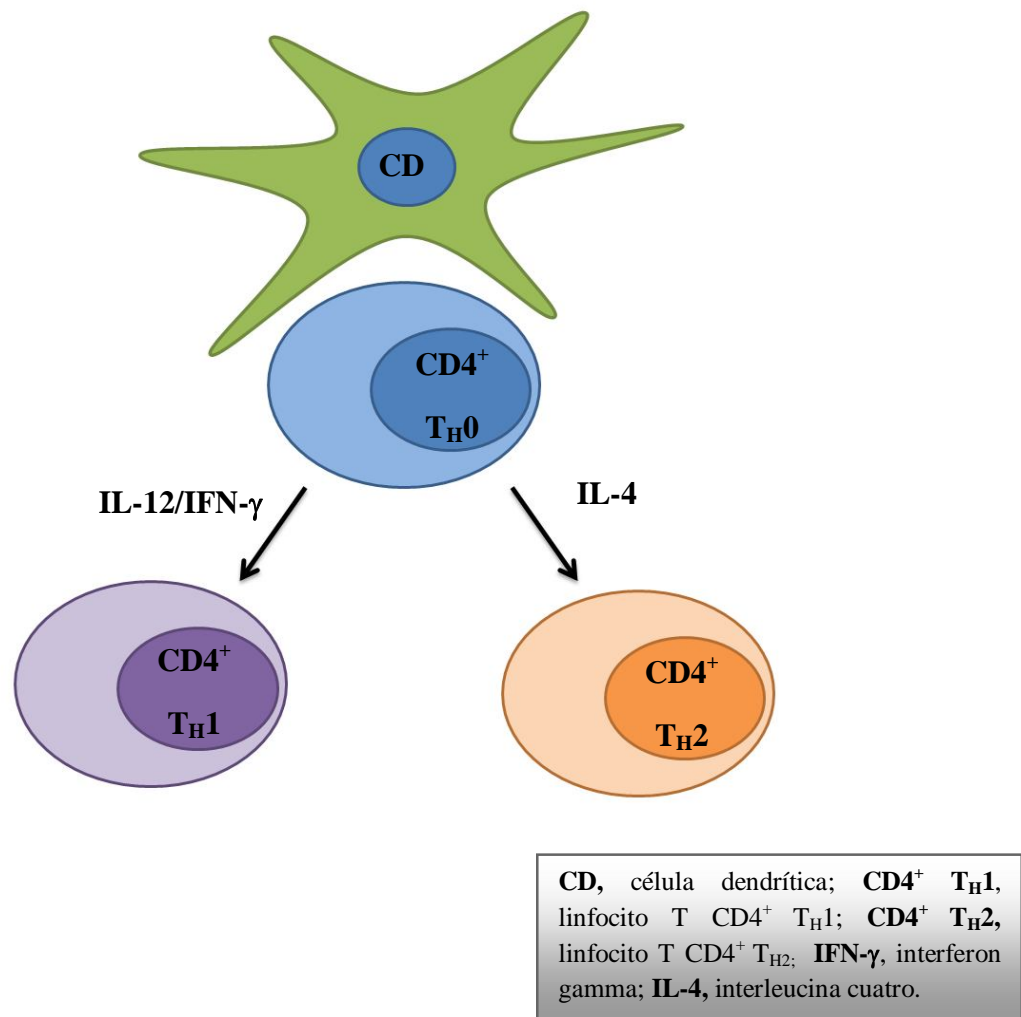
2.1 LOS LINFOCITOS T

Los linfocitos T se subdividen de acuerdo con la función y los marcadores de la superficie celular.²³ De acuerdo a la expresión de dos moléculas de superficie de la familia CD (del Inglés “*Cluster of differentiation*”) tenemos que los linfocitos que expresan CD4, pero no CD8, se designan CD4⁺, mientras que los linfocitos que expresan CD8, pero no CD4, se designan CD8⁺.⁵

Los linfocitos T CD8⁺ reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) clase I, y se diferencian en células T efectoras citotóxicas que reconocen y destruyen células infectadas. Los linfocitos T CD4⁺ tienen un repertorio más flexible de actividades efectoras. Tras el reconocimiento de péptidos antigénicos presentados por moléculas del CMH clase II los linfocitos T CD4⁺ indiferenciadas pueden diferenciarse en subgrupos efectores con diferentes funciones inmunitarias. Los principales subgrupos de linfocitos T CD4⁺ que se han descrito son los T_H1, T_H2, T_H17 y Treg. La primera función que se describió para estas células fue la de cooperación (del Inglés “*helper*”) en la producción de Ac (anticuerpos), y de ahí se introdujo la designación T_H.^{25, 38}

Los linfocitos T CD4⁺ T_H1 y T_H2 se distinguen por el conjunto de citocinas que producen y la respuesta inmunitaria que inducen.^{21, 24} Además de que su diferenciación esta regulada por las citocinas. Así, la presencia de IL-12 promueve la diferenciación hacia T_H1, mientras que la IL-4 condiciona el desarrollo T_H2 (Figura 1).

Figura 1: Diferenciación de las subpoblaciones T_{H1} y T_{H2} de los linfocitos T $CD4^+$.
Adaptado de Tizard, 2013.³³



Los linfocitos T_{H1} , en colaboración con los macrófagos, están implicados en la respuesta inmune celular, mientras que los T_{H2} promueven la respuesta inmune humoral. Para llevar a cabo su función, los linfocitos T_{H1} secretan $IL-2$, $IFN-\gamma$ y FNT (factor de necrosis tumoral) y se asocian con la inmunidad celular contra bacterias, levaduras y protozoarios facultativos intracelulares. Mientras que los T_{H2} producen $IL4$, $IL-5$, $IL-10$, $IL-13$, $IL-21$ e $IL-31$ y se asocian con inmunidad humoral y reacciones alérgicas.^{38, 12}

De igual manera los linfocitos T CD4⁺ T_H17 producen IL-17, IL-21 e IL-22 y se les ha asociado con la inmunidad contra bacterias extracelulares y reacciones autoinmunes y linfocitos T_{reg}, que producen factor de transformación del crecimiento β (FTC- β), IL-10 e IL-35, asociados con tolerancia a antígenos (Ags) propios y supresión de la respuesta inmunitaria.³⁸

Otra manera de dividir a los linfocitos T es en función del tipo de receptor de antígeno (TCR) que expresen. Existen dos tipos de receptor de acuerdo a la cadena peptídica de unión de antígeno que expresan, uno que expresa el heterodímero α/β y el otro el heterodímero γ/δ . En humanos, roedores y la mayoría de los mamíferos no rumiantes el 90% de sus linfocitos T expresan el receptor α/β . Mientras que en los rumiantes el 60% de sus linfocitos expresan el receptor γ/δ . Los linfocitos T que expresan las moléculas CD4 y/o CD8, expresan el tipo de receptor α/β ; mientras que linfocitos T que no expresan las moléculas CD expresan el receptor γ/δ , estos últimos se encuentran en la piel, en el epitelio intestinal y la sangre, tiene la capacidad para reconocer antígenos de manera directa sin una previa presentación por una molécula del CMH.³²

2.2 LAS CITOCINAS

Las células del sistema inmunitario secretan una variedad sorprendente de proteínas que regulan las respuestas inmunitarias al producir señales entre las células. Estas proteínas reguladoras reciben el nombre genérico de citocinas. Antiguamente las citocinas secretadas por los linfocitos se llamaban linfocinas, y las producidas por monocitos y macrófagos se denominan monocinas, pero en la actualidad ya no se aplica esta distinción, puesto que las citocinas rara vez son elaboradas por un solo tipo de célula.¹

La nomenclatura de las citocinas al principio se basó según su origen celular o el análisis biológico utilizado para identificarlas.

Las interleucinas (IL) son citocinas que regulan la interacción entre los linfocitos y otros leucocitos. Se les enumera en orden ascendente conforme se descubrieron.^{1, 15, 25}

Los interferones (IFNs) son glucoproteínas que en un inicio se creía que solamente participaban en respuesta a la infección de virus. Su nombre deriva del hecho de que interfieren con la síntesis de ARN y proteínas virales; actualmente se sabe que también participan en la inmunidad contra bacterias intracelulares facultativas y contra protozoarios intracelulares obligados.³

Los factores de necrosis tumoral son dos citocinas análogas, una derivada de los macrófagos y otra de las células T. Como indica su nombre, ambas ocasionan muerte celular en algunas células tumorales.²⁵

Algunas citocinas como G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), GM-CSF (factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos), M-CSF (factor estimulador de colonias de monocitos) y TGF- β , actúan como factores de crecimiento (o factor estimulador de colonias beta) controlando la producción de leucocitos mediante la regulación del desarrollo de células madre.^{1, 33}

Las quimiocinas son una familia de proteínas pequeñas con funciones importantes en la inflamación y en la atracción de leucocitos.⁴

2.2.1 PROPIEDADES GENERALES DE LAS CITOCINAS

Las citocinas no suelen almacenarse en forma de moléculas preformadas y su síntesis se inicia por la transcripción de nuevos genes debida a una activación celular. Esta activación transcripcional es transitoria y el ARNm que codifica la mayoría de las citocinas es inestable, de forma que la síntesis de las citocinas también es transitoria. Una vez sintetizada, se secreta rápidamente.⁴

Las acciones de las citocinas suelen ser pleiotropicas, lo cual se refiere a la capacidad de una citocina para actuar sobre diferentes tipos celulares, y también actúan de manera redundante lo cual se refiere a la propiedad de actuar en una sola célula blanco.^{1,15}

Otra propiedad de las citocinas es su capacidad para inducir la síntesis de otras, en donde una segunda o tercera citocina puede mediar los efectos biológicos de la primera. Dos citocinas pueden antagonizarse entre sí, provocar efectos aditivos o en algunos casos, producir un efecto mayor al previsto (sinergia).²

La mayoría de las citocinas actúan cerca de donde se producen, bien en la misma célula que la secreta (acción autocrina) o bien en una célula vecina (acción paracrina). Cuando se sintetizan en grandes cantidades, las citocinas pueden entrar en la circulación y actuar a distancia del lugar de síntesis (acción endócrina).¹⁵

Los receptores de las citocinas tienden a unirse a sus ligandos con una afinidad elevada. La estimulación de las células T y las células B por un antígeno dan lugar a una mayor expresión de receptores de citocinas. Por esta razón, durante una respuesta inmunitaria, los linfocitos específicos de un antígeno son los que responden de modo preferente a las citocinas secretadas. Este mecanismo mantiene la especificidad de las

respuestas inmunitarias, aunque las propias citocinas no sean específicas de un antígeno. La expresión de los receptores también está regulada por las propias citocinas, incluida la misma citocina que se une al receptor, lo que permite una amplificación positiva o una retroalimentación negativa.²

2.2.2 CLASIFICACION DE LAS CITOCINAS

La mayoría de las citocinas no poseen ninguna homología secuencial entre sí, algunas de ellas se han agrupado en familias en base a su estructura tridimensional. De acuerdo con la estructura secundaria de la molécula se han agrupado las citocinas según posean una conformación en alfa-hélice (IFN- α , , IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, G-CSF, M-CSF y GM-CSF), una estructura de láminas beta (IL-1- α , IL-1- β , FNT- α y FNT- β) o una estructura compuesta alfa-beta (IL-8 e IFN- γ).^{2,4}

Para su estudio las citocinas se clasifican en tres categorías de acuerdo con la función más relevante que realizan: 1) citocinas implicadas en el desarrollo hematopoyético, 2) citocinas implicadas en las respuestas inmunes innatas y, finalmente 3) citocinas generadas durante las respuestas inmunes adaptativas.¹

2.2.2.1 Citocinas implicadas en el desarrollo hematopoyético

Son producidas por células del estroma de la médula ósea o por linfocitos activados. Algunas de estas citocinas reciben el nombre genérico de factores estimuladores de colonias (CSF) por su capacidad para estimular la formación de colonias celulares en los cultivos de médula ósea. En esta se encuentran: GM-CSF, G-CSF M-CSF y algunas interleucinas como IL-3, IL-5, IL-7, IL-9 e IL-11.^{1,7}

2.2.2.2 Citocinas producidas en las respuestas inmunes innatas

En este grupo encontramos a IL-1, IL-6, FNT, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 y los interferones tipo I y tipo II. Se producen principalmente por leucocitos como parte de la respuesta inmune innata, tras el reconocimiento de los PAMPs (por sus siglas en Inglés *Pathogen-associated molecular patterns*) como el lipopolisacárido de las bacterias gram negativas, o el ARN, entre otros. Estas citocinas actúan principalmente para estimular las reacciones inflamatorias frente a microorganismos patógenos. Es importante señalar que estas citocinas también se pueden secretar durante la respuesta inmune adaptativa.^{1, 7, 4}

2.2.2.3 Citocinas producidas en las respuestas inmunes adaptativas

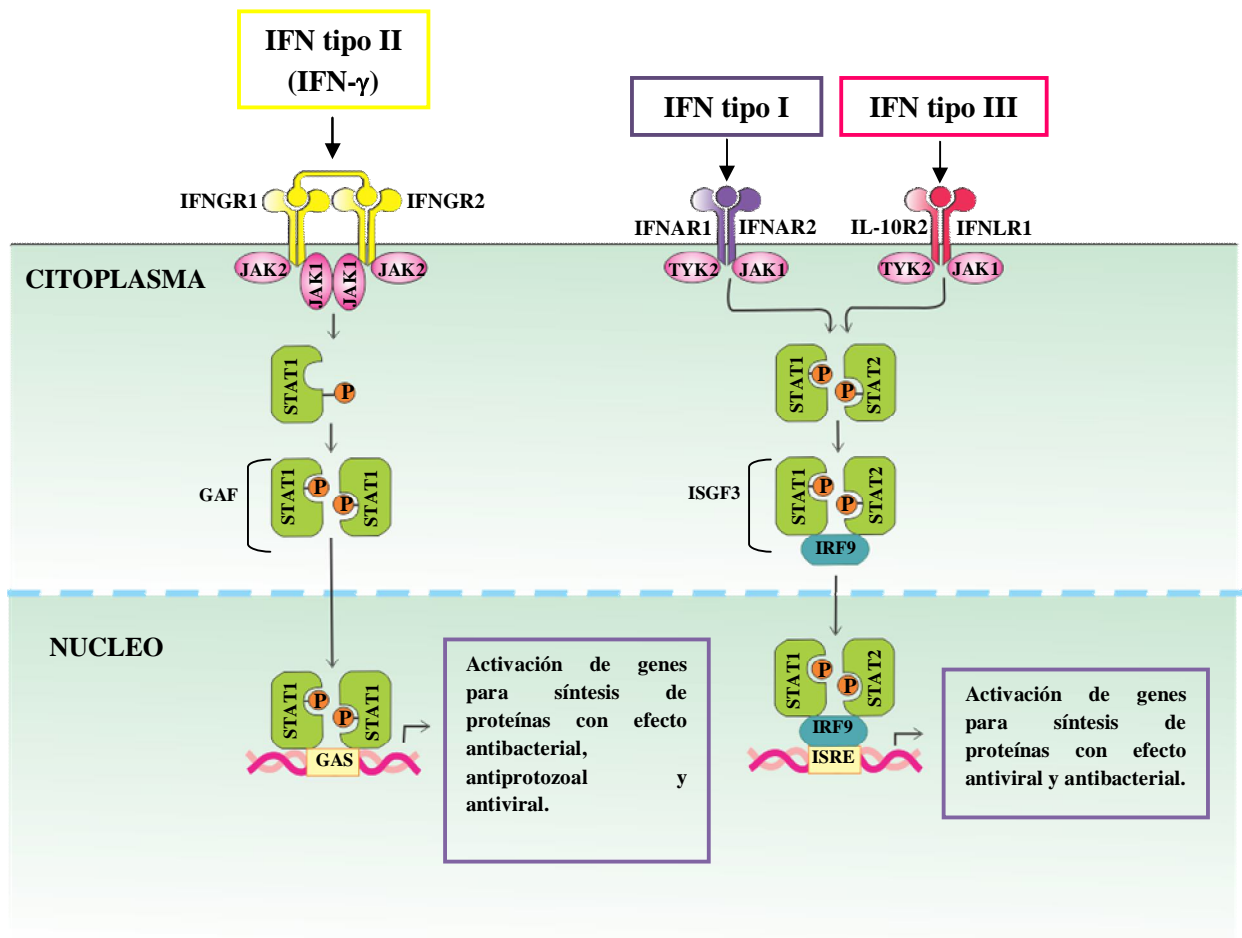
Se sintetizan por los linfocitos T activados en respuesta al reconocimiento específico de antígenos. Como se mencionó anteriormente, los linfocitos T se activan, proliferan y se diferencian hacia células efectoras específicas dependiendo de las citocinas que se encuentran en el medio. La presencia de IL-12 promueve la diferenciación hacia linfocitos T_H1 que participan en la respuesta inmune celular secretando IL-2, IFN- γ y TNF, mientras que la IL-4 condiciona el desarrollo de linfocitos T_H2, los cuales participan en la respuesta inmune humoral, produciendo IL4, IL-5, IL-10 e IL-13.^{1, 2}

Dentro de la respuesta inmune adaptativa encontramos también a los linfocitos T CD8⁺ que secretan algunas citocinas como IL-2, IL-16, IFN- γ y FNT- α .⁴ Sin embargo ejercen su función efectora mediante la secreción de dos proteínas denominadas perforinas y granzimas.²⁵

2.3 EL IFN- γ

Los interferones (IFNs) fueron originalmente descubiertos como agentes que interferían con la replicación viral. Inicialmente, fueron clasificados por el tipo de célula que los secretaba, pero ahora se clasifican en tipo I, tipo II y tipo III de acuerdo con la especificidad del receptor y la secuencia homóloga (Figura 2).²²

Figura 2: Actividad antimicrobiana inducida por los interferones (IFNs) I, II, y III. Adaptado de MacMicking y col., 2012.²²



El primer complejo receptor es un tetrámero compuesto por dos cadenas del receptor 1 del IFN (IFNGR1) y dos cadenas de IFNGR2 que involucran a los dímeros del IFN- γ . El segundo complejo es un heterodímero de IFN- α/β (IFNAR1) e IFNAR2 que une a los IFNs tipo I (IFN- α e IFN- β). Y el tercer complejo receptor está formado por el receptor 1 IFN λ (IFNLR1; también llamado IL-28R α) el cual une el IFN tipo III (IFN- λ).^{9, 22, 29}

El IFN- γ al cual nos referimos en esta tesis, participa en la inmunidad contra microorganismos patógenos intracelulares facultativos como bacterias (*Mycobacterium*, *Brucella*, *Lysteria*, *Salmonella*, entre otras), protozoarios (*Leishmania*, *Toxoplasma*), levaduras (*Criptococcus*) y virus; mediante la activación de ciertos mecanismos moleculares. Inicialmente se creía que el IFN- γ solamente era producido por los linfocitos T CD4⁺ (específicamente los T_H1), linfocitos T CD8⁺ y las células NK. Sin embargo, actualmente existe evidencia que otras células, como los linfocitos B, las células NKT y células presentadoras de antígeno profesionales (CPAs) secretan también IFN- γ para su propia activación y la de células adyacentes a ellas. El IFN- γ secretado por las células NK es muy importante en la defensa temprana del hospedador contra infecciones, mientras que los linfocitos T CD4⁺:T_H1 se convierte en la principal fuente de IFN- γ en la respuesta inmune adaptativa.^{3, 18}

Las células CPAs regulan este proceso por dos mecanismos distintos: por un lado, la secreción de IL-12 e IL-8 inducirá la producción de IFN- γ por las células NK, y por otro, la interacción del complejo mayor de histocompatibilidad clase II- antígeno con el TCR de los linfocitos T vírgenes hará que estos se diferencien a linfocitos T_H1 productores de IFN- γ .

Existen varias citocinas capaces de inhibir la producción de IFN- γ por las CPA como el IFN- α , el TGF- β , la IL-10 o las citocinas de tipo T_H2 como la IL-4 y la IL-13.²⁹

2.3.1 TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL POR EL RECEPTOR DEL IFN- γ

Una vez que el IFN- γ se une a su receptor la señal se transmite a través del homodímero transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1) en respuesta a IFN- γ o a través del heterodímero STAT1-STAT2 en respuesta a los IFNs tipo I y al IFN tipo III (Figura 2).²² Posterior a este reclutamiento, las moléculas de STAT son fosforiladas a través de la tirosina quinasa asociadas a receptores de la familia Janus (Quinasas de Janus). Los homodímeros fosforilados de STAT1 (conocido también como GAF) se traslocan al núcleo y se unen al sitio activo de IFN- γ (GAS) para promover elementos que inducen la expresión de los genes efectores antimicrobianos del IFN. En el caso de los IFNs tipo I y III, el dímero fosforilado STAT1-STAT2 forma un complejo con el factor regulador 9 del Interferón (IRF9) para estimular el factor gen 3 de IFN (ISGF3); este complejo también trasloca al núcleo, donde es unido a elementos de respuesta del IFN estimulado (ISREs) para promover la diferenciación de los genes efectores.^{9,29}

2.3.2 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL IFN- γ

El IFN- γ promueve la activación de macrófagos (Figura 3) mediante la inducción de una amplia gama de proteínas; en el caso de la inmunidad contra bacterias intracelulares facultativas las cuales inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma, la formación de intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno, escapando al citoplasma, entre otras; el IFN- γ reactiva los mecanismos moleculares que utiliza el macrófago para eliminar a la bacteria como es la producción de ROS (por sus siglas en Inglés *Reactive Oxygen Species*) que son productos del metabolismo del oxígeno que se obtienen a través de la reducción de

éste en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria como el superóxido (O_2^-), productos intermediarios como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH) los cuales producen un daño intracelular importante en el ADN, lípidos y proteínas de la bacteria. También los metabolitos derivados del nitrógeno, conocidos como RNS (por sus siglas en Inglés *Reactive Nitrogen Species*) participan en la eliminación de la bacteria intracelular a través del óxido nítrico (NO) y de la formación de reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI); a bajas concentraciones el NO actúa directamente sobre metales y otros radicales y a altas concentraciones produce oxidación severa y reacciones de nitrosilación con el oxígeno que resulta en la producción de varios congéneres. Tanto el NO como los RNI son agentes antimicrobianos efectivos interviniendo en la transducción de señales moleculares. Las bacterias que escapan al citosol son ubiquitinizadas, es decir, se les adhiere ubiquitina para que sean marcadas y capturadas por un fagosoma y posterior a ello se le une el lisosoma y activar los mecanismos antes descritos.^{9, 22, 29}

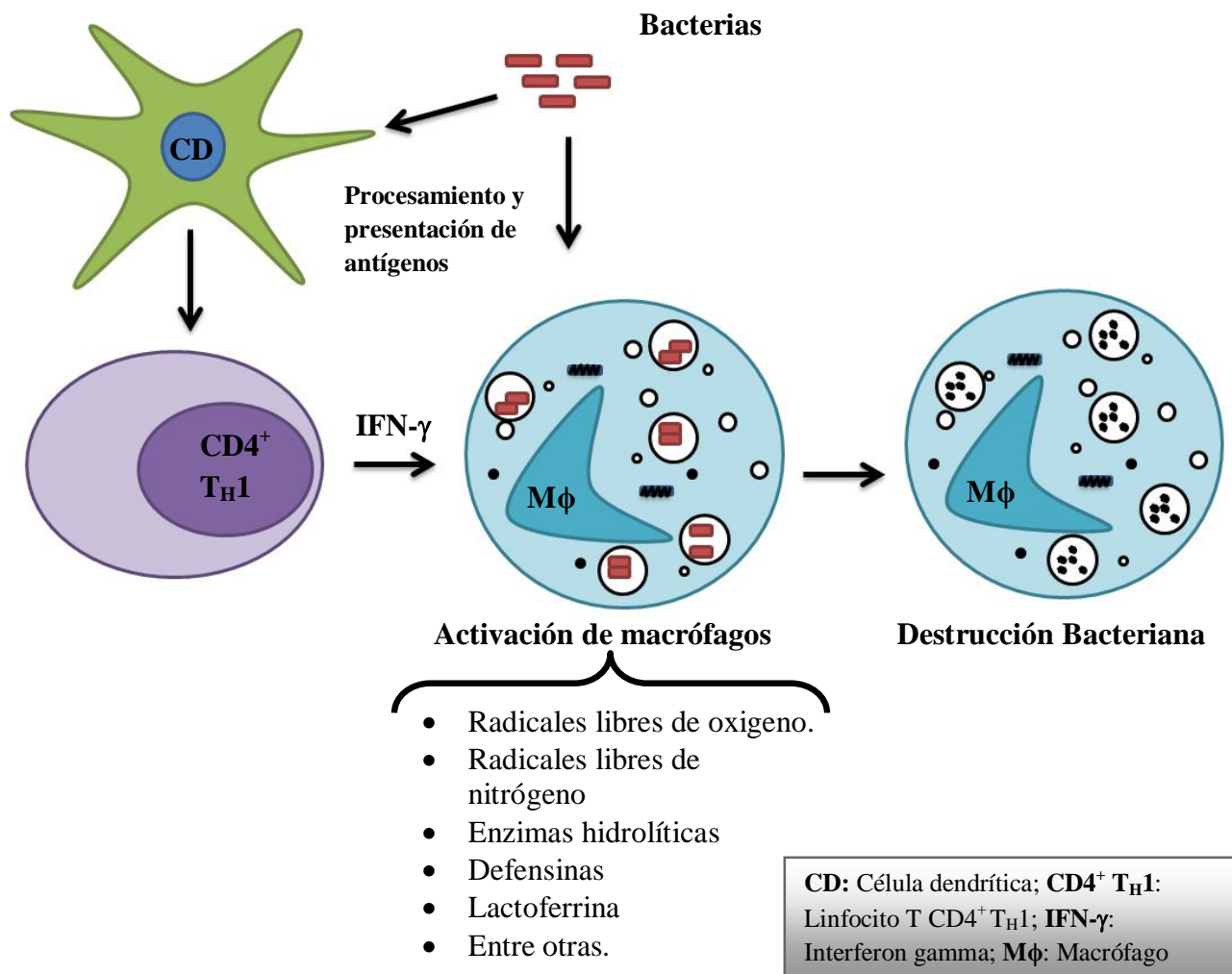
En el caso de algunos protozoarios como *Leishmania* y *Toxoplasma*, entre otros, dependen de la célula del hospedador para obtener aminoácidos, para esto es necesaria la formación de una vacuola. El IFN- γ participa en la inmunidad contra este tipo de parásitos mediante la producción de ciertas proteínas que participan en la disrupción de la vacuola donde habita el protozoario y algunas veces la necroptosis. Otro mecanismo es mediante la restricción de nutrientes esenciales para el parásito, mediante la extracción de Fe^+ y el Mn^- e introduce H^+ , de la misma manera como pasa con las bacterias, además de que induce la producción de NO el cual es altamente parasiticida.^{10, 26, 36}

En la inmunidad contra los virus el IFN- γ participa inhibiendo el denudamiento o liberación de su ácido nucleico, inhibiendo la transcripción reversa del ARN, así como la

transcripción y la transducción de proteínas, el ensamblaje viral y por último la liberación del virus.^{9, 22, 29}

Otra función adscrita al IFN- γ es la de aumentar la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I en células en las que esta expresión ha sido disminuida (es el caso de células cancerosas y células infectadas por virus). Como se sabe la expresión de antígenos de histocompatibilidad clase I es fundamental para la activación de linfocitos T citotóxicos que sería la respuesta más adecuada contra células malignas o infectadas por virus.¹⁸

Figura 3: Activación de macrófagos. Adaptado de Tizard, 2013.³³



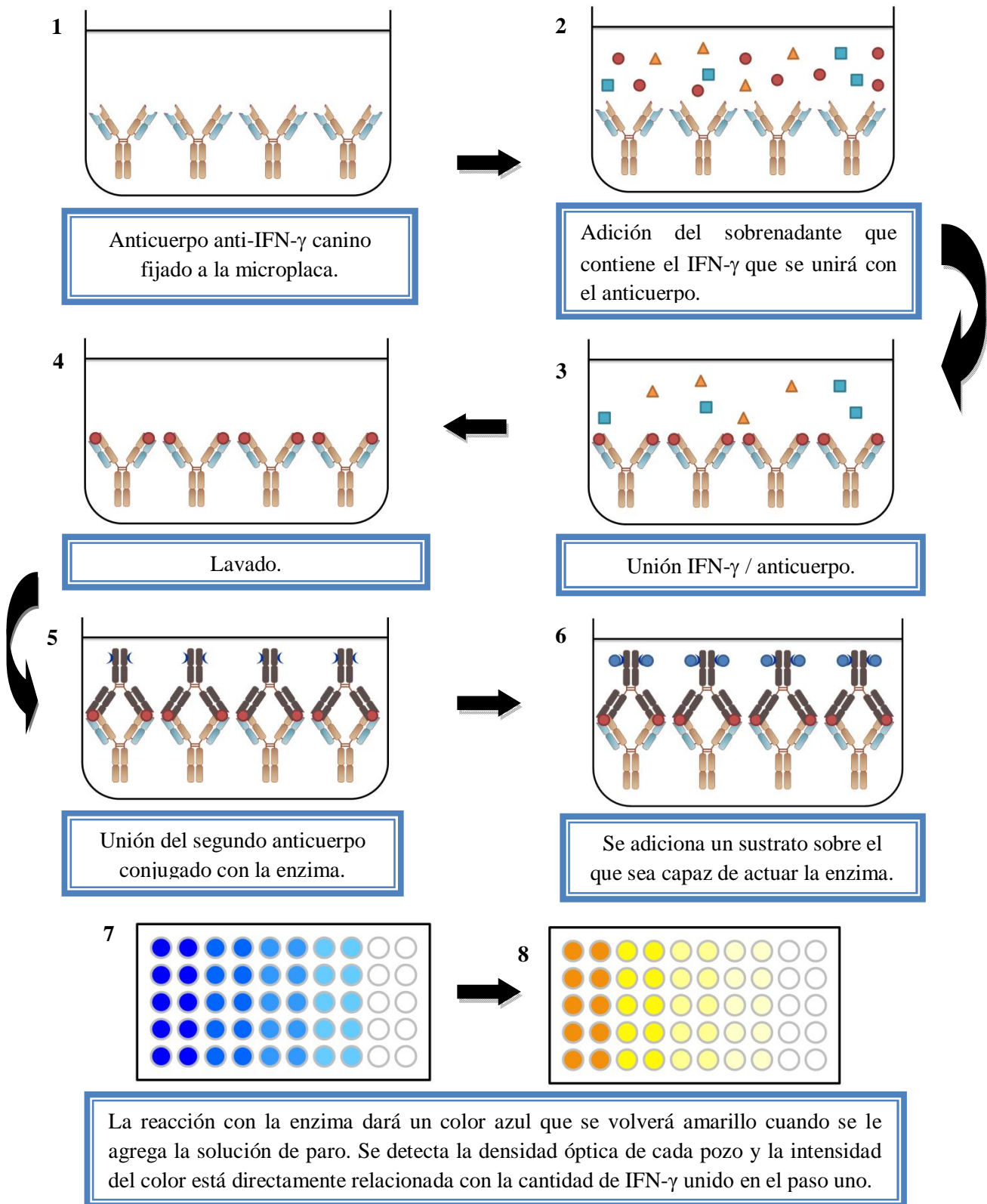
2.4 PRUEBAS DE DETECCIÓN DE IFN- γ

La RT-PCR (por sus siglas en Inglés *Reverse Transcriptase PCR*) se utiliza para detectar IFN- γ ; la cual es un paso previo para posteriormente llevar a cabo lo que implica la reacción en cadena de la polimerasa, un paso de transcripción reversa del ARNm de la citocina a ADN complementario (ADNc), este último se amplifica por PCR y el producto obtenido es visualizado por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio el cual emite luz fluorescente cuando se irradia con luz UV.^{10, 14} Una variante de esta prueba es la RT-Q-PCR (por sus siglas en Inglés *Real Time PCR*), se realiza el mismo procedimiento que en la RT-PCR pero se amplifica, y simultáneamente, se cuantifica el producto, adicionando una solución marcada con fluoroforo la cual estimulada a cierta longitud de onda permite medir la tasa de generación de los productos que se están estudiando.¹²

Actualmente, se utilizan inmunoensayos como el ELISA (por sus siglas en Inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para cuantificar la concentración de citocinas en suero, plasma o líquido sobrenadante de cultivo de linfocitos (Figura 4). Esta prueba consiste en fijar anticuerpos específicos para la citocina que se desea detectar, en este caso el IFN- γ a una microplaca multipozo. Cualquier IFN- γ que se encuentre presente en el suero, plasma o sobrenadante se une al anticuerpo inmovilizado. Posteriormente se realiza un lavado para remover cualquier sustancia no unida. Después se adiciona un segundo anticuerpo específico para el IFN- γ conjugado con una enzima. Se realiza un lavado para remover cualquier anticuerpo marcado con la enzima, no unido y se adiciona un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima. La reacción genera una coloración en el pozo y posteriormente se agrega la solución de paro. Para finalizar se lee la densidad óptica de

cada pozo. La intensidad del color está directamente relacionada con la cantidad de IFN- γ unido en el paso inicial.⁸ Esta prueba se está utilizando para diagnosticar tuberculosis en el ganado bovino (Bovigam®)³⁷ en aquellos casos donde la prueba de tuberculina se haya vuelto inútil; los animales infectados con *Mycobacterium bovis* tienen linfocitos circulantes sensibilizados a los antígenos microbianos, por lo que la estimulación con el antígeno PPD (por sus siglas en Inglés Purified Protein Derivatived) estimula a los linfocitos T para secretar IFN- γ el cual es detectado mediante esta prueba.^{26, 35, 36}

Figura 4: Presentación esquemática de la detección de IFN- γ mediante la prueba de ELISA. Adaptado de [Http://www.novateinbio.com/techinfo/protocols/Sandwich%20ELISA%20principio/Sandwich%20ELISA%20principio.pdf](http://www.novateinbio.com/techinfo/protocols/Sandwich%20ELISA%20principio/Sandwich%20ELISA%20principio.pdf)



3 JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito, el IFN- γ es una de muchas citocinas que intervienen en los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa (específica), y por tanto es de esperarse que paulatinamente se vayan incorporando en los análisis de laboratorio clínico la medición de los niveles de esta citocina como indicador del estado que guarda el sistema inmunitario de un paciente. Es en este contexto en el que se inserta el presente proyecto en el que se evaluaron los niveles de IFN- γ en el sobrenadante de sangre completa de perros clínicamente sanos estimulada con un mitógeno de la lectina de *Phytolacca americana* (MPA) (Pokeweed) con el propósito de empezar a establecer los niveles basales o fisiológicos utilizando un estuche disponible comercialmente, que ha sido empleado por investigadores en otros países.^{20, 29, 34}

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar y analizar los niveles de IFN- γ en 60 muestras de sangre completa de perros clínicamente sanos y de diferentes edades (cachorros, jóvenes y seniles).

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Recolección de muestras sanguíneas de perros clínicamente sanos y de diferentes edades (cachorros de 3 meses a 11 meses, adultos jóvenes de 12 meses a 7 años y adultos seniles de 8 años en adelante).
- Estandarización de la prueba de ELISA del estuche comercial Quantikine (R&D Systems, # CAIF00) para la determinación cuantitativa de la concentración del IFN- γ en el sobrenadante de células sanguíneas estimuladas con el mitógeno de la lectina de *Phytolacca americana* (MPA).
- Análisis e interpretación de los resultados.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se recolectaron 2 ml de sangre periférica de la vena cefálica empleando jeringas (de 3 ml con aguja 21x32 mm) con 30 µl de anticoagulante (Heparina 1000UI), de 60 perros clínicamente sanos de diferentes edades y razas, agrupándolos en cachorros (3 meses a 11 meses), adultos jóvenes (12 meses a 7 años) y adultos seniles (8 años en adelante). Posteriormente las muestras se colocaron en viales de polipropileno de 2.0 ml.

5.2 ESTIMULACIÓN CELULAR

Se empleó el mitógeno de la lectina de *Phytolacca americana* (MPA) (Pokeweed, Sigma, # L8777) a una concentración final de 10 µg/ml en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, # 22400-089).

Para la estimulación celular se emplearon tres microplacas de 96 pozos de poliestireno estéril a las cuales se les agregaron, por pozo y por duplicado, 50 µl de cada muestra sanguínea, 50 µl de MPA y 150 µl de medio RPMI. Como control negativo de cada muestra se agregaron 50 µl de células sanguíneas y 200 µl de medio RPMI. Las placas se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y los sobrenadantes se recolectaron 48 horas después, colocándolos en una placa de 96 pozos de poliestireno para su posterior análisis.

5.3 TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE IFN- γ

Para la determinación del IFN- γ canino se empleó el estuche comercial Quantikine (R&D Systems, # CAIF00), el cual se describe brevemente a continuación:

5.3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- a) Se reconstituyó el IFN- γ estándar liofilizado en 1.0 ml de agua inyectable.
- b) Se adicionaron 40 ml del buffer de lavado concentrado en agua inyectable para preparar 960 ml del buffer total de lavado.
- c) Se mezclaron los sustratos A y B al mismo tiempo en volúmenes iguales 15 minutos antes de ser usados y se protegieron de la luz.
- d) Se reconstituyó el IFN- γ estándar con 5.0 ml del diluyente calibrador RD6-12 y se dejó reposar por 5 minutos mezclando suavemente antes de hacer las diluciones.
- e) Se adicionaron 200 μ l (con la ayuda de una micropipeta) del diluyente calibrador RD6-12 en tubos de polipropileno. Se usó la solución estándar de IFN- γ para realizar diluciones dobles seriadas. El estándar de IFN- γ canino sin diluir sirvió como la concentración más alta (4000 pg/ml) y el diluyente calibrador RD6-12 se consideró como la concentración cero (0 pg/ml).

5.3.2 PROCEDIMIENTO

Se prepararon todos los reactivos, diluciones estándar, control y muestras como se indicó en la sección anterior. Posteriormente se adicionó 50 μ l del diluyente RD1-63 en cada pozo de la microplaca cubierta con el anticuerpo monoclonal de ratón específico para IFN- γ canino, y después, en diferentes pozos se agregó por duplicado 50 μ l de cada dilución del estándar IFN- γ canino, del control IFN- γ canino o del sobrenadante obtenido de la estimulación celular; gentilmente se mezcló la microplaca por 1 minuto. Se cubrió la placa con una película adherente y se incubó por dos horas a temperatura ambiente.

A continuación se decantó el contenido de la microplaca y se lavó con la solución amortiguadora de lavado (400 μ l/pozo); este paso se repitió cuatro veces para un total de

cinco lavados. Se removió cualquier remanente de la solución de lavado invirtiendo la microplaca sobre papel absorbente. Subsiguientemente se adicionó 100 µl del conjugado anti-IFN-γ biotinilado (anticuerpo monoclonal de ratón específico para IFN-γ canino) a cada pozo y se cubrió la microplaca con la película adhesiva y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Se volvió a decantar y se lavó como se indicó previamente.

Posteriormente se adicionaron 100 µl de estreptavidina peroxidada a cada pozo, se cubrió con la película adhesiva y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la microplaca como se indicó previamente. En seguida se adicionaron 100 µl de la solución sustrato A+B a cada pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, protegiéndola de la luz. Después se adicionó 100 µl de la solución de paro a cada pozo, se agitó gentilmente la placa para asegurar una mezcla completa.

Finalmente se determinó la densidad óptica de cada pozo utilizando un lector de ELISA Osys MR (Dynex Technologies) a 450 nm y 570 nm de longitud de onda. Siguiendo la recomendación del fabricante del estuche comercial se realizó una corrección de longitud de onda a 570nm, sustrayendo las lecturas de 570 nm de las lecturas a 450 nm. Esta sustracción corrigió las imperfecciones ópticas en la placa.

Para el cálculo de cada muestra se optó por el denominado índice de estimulación ampliamente empleado en las pruebas de transformación blastoide o blastogénesis utilizadas para la evaluación de la actividad de linfocitos T *in vitro* ²⁷. Este parámetro se calcula dividiendo el valor obtenido en las muestras estimuladas entre el valor obtenido en las muestras sin estímulo.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza de un experimento factorial con dos factores para ver el efecto del sexo y la edad sobre el índice de estimulación midiendo el IFN- γ . El factor edad tuvo tres niveles (cachorros, adultos y seniles) y el factor sexo con dos niveles (hembras y machos).

6 RESULTADOS

Se calculó el índice de estimulación (IE) en 60 muestras de sangre de caninos los resultados se presentan de la siguiente forma: en las tablas 1, 2 y 3 se presentan los resultados de los animales divididos por grupos de edad a saber cachorros, adultos jóvenes y adultos seniles. También se presentan los resultados de toda la población separada por sexos para las hembras en la tabla 4 y para los machos en la tabla 5.

En las figuras 5 y 6 se presentan los resultados arriba descritos en forma gráfica. En ambas gráficas se pueden observar que existe una enorme dispersión entre los datos, con una tendencia hacia los datos más altos y hay un traslape en las cajas lo cual refleja que no hay diferencia significativa entre los grupos de edad y en el sexo.

Al realizar el análisis de varianza tanto entre los grupos de diferente edad como entre machos y hembras no se observa una diferencia estadísticamente significativa ya que el valor fue de **$p > 0.05$** .

Tabla 1: Niveles de IFN- γ en sangre periférica de cachorros expresados como Índice de Estimulación (IE).

MUESTRA	EDAD	RAZA	SEXO	IE
56	5 meses	Pastor Alemán	Hembra	4.42
26	6 meses	Mestizo	Macho	5.13
24	5 meses	Boxer	Hembra	5.71
54	11 meses	Cobrador de Labrador	Hembra	8.42
39	3 meses	Bulldog Inglés	Macho	8.77
53	10 meses	Pekinés	Hembra	9.65
28	6 meses	Dogo de Burdeos	Hembra	10.04
52	10 meses	Yorkshire Terrier	Hembra	14.78
33	6 meses	Dogo de Burdeos	Hembra	20.35
27	4 meses	Dogo de Burdeos	Hembra	21.44
38	7 meses	Bulldog Inglés	Hembra	24.84
58	2 meses	Dogo de Burdeos	Macho	27.22
57	3 meses	Dogo de Burdeos	Macho	38.92
59	11 meses	Boston Terrier	Hembra	39.25
60	3 meses	Dogo de Burdeos	Hembra	39.42
34	6 meses	Dogo de Burdeos	Macho	42.85
55	3 meses	Dogo de Burdeos	Hembra	45.59
40	3 meses	Bulldog Inglés	Hembra	47.55
36	4 meses	Bulldog Inglés	Macho	49.55
37	4 meses	Bulldog Inglés	Macho	64.64
$\bar{X} \pm DE$				26.43 \pm 18.24

(\bar{X} : Promedio; **DE**: Desviación estándar)

Tabla 2: Niveles de IFN- γ en sangre periférica de adultos jóvenes expresados como Índice de Estimulación (IE).

MUESTRA	EDAD	RAZA	SEXO	IE
2	4 años	Dogo de Burdeos	Hembra	2.93
23	6 años	Yorkshire Terrier	Hembra	4.93
20	5 años	Poodle	Macho	8.14
30	4 años	Yorkshire Terrier	Macho	11.49
31	3 años	Dogo de Burdeos	Macho	11.84
26	5 años	Dogo de Burdeos	Hembra	13.67
32	3 años	Dogo de Burdeos	Macho	16.25
5	5 años	Schanuzer Miniatura	Hembra	16.39
13	4 años	West Highland Terrier	Hembra	18.31
35	3 años	Doberman	Macho	18.32
4	4 años	Beagle	Hembra	19.43
44	2 años	Bulldog Inglés	Hembra	21.07
43	2 años	Bulldog Inglés	Hembra	21.77
9	6 años	Cobrador Dorado	Hembra	24.46
6	5 años	Beagle	Macho	40.41
1	3 años	Mestizo	Hembra	51.62
45	2 años	Bulldog Inglés	Hembra	52.91
41	3 años	Boxer	Hembra	52.97
29	4 años	Yorkshire Terrier	Macho	57.68
42	3 años	Bulldog Inglés	Hembra	86.97
$\bar{X} \pm DE$				27.58 \pm 22.05

(\bar{X} : Promedio; **DE**: Desviación estándar)

Tabla 3: Niveles de IFN- γ en sangre periférica de adultos seniles expresados como Índice de Estimulación (IE).

MUESTRA	EDAD	RAZA	SEXO	IE
18	10 años	Schanuzer Miniatura	Hembra	1.96
46	8 años	Mestizo	Hembra	7.78
7	7 años	Beagle	Macho	9.73
14	14 años	Samoyedo	Hembra	16.11
11	14 años	Cocker Spaniel	Macho	16.33
22	8 años	Schanuzer Miniatura	Hembra	16.63
47	8 años	Mestizo	Hembra	17.29
48	12 años	Mestizo	Macho	17.70
17	13 años	Schanuzer Miniatura	Hembra	19.09
19	13 años	Cobrador de Labrador	Macho	25.47
51	13 años	Grifón de Bruselas	Macho	25.73
16	10 años	Schanuzer Miniatura	Hembra	26.09
49	8 años	Schanuzer Miniatura	Macho	36.94
15	13 años	Gigante de los Pirineos	Hembra	37.45
8	12 años	Mestizo	Macho	40.36
12	9 años	BullTerrier	Macho	45.47
50	13 años	Cocker Spaniel	Macho	56.78
21	12 años	Cocker Spaniel	Hembra	72.28
3	10 años	Schanuzer Miniatura	Hembra	86.15
10	12 años	Cocker Spaniel	Hembra	94.41
$\bar{X} \pm DE$				33.49 \pm 25.90

(\bar{X} : Promedio; **DE**: Desviación estándar)

Tabla 4: Niveles de IFN- γ en sangre periférica de hembras expresados como Índice de Estimulación (IE).

MUESTRA	EDAD	RAZA	IE
18	10 años	Schanuzer Miniatura	1.96
2	4 años	Dogo de Burdeos	2.93
56	5 meses	Pastor Alemán	4.42
23	6 años	Yorkshire Terrier	4.93
24	5 meses	Boxer	5.71
46	8 años	Mestizo	7.78
54	11 meses	Cobrador de Labrador	8.42
53	10 meses	Pekinés	9.65
28	6 meses	Dogo de Burdeos	10.04
26	5 años	Dogo de Burdeos	13.67
52	10 meses	Yorkshire Terrier	14.78
14	14 años	Samoyedo	16.11
5	5 años	Schanuzer Miniatura	16.39
22	8 años	Schanuzer Miniatura	16.63
47	8 años	Mestizo	17.29
13	4 años	West Highland Terrier	18.31
17	13 años	Schanuzer Miniatura	19.09
4	4 años	Beagle	19.43
33	6 meses	Dogo de Burdeos	20.35
44	2 años	Bulldog Inglés	21.07
27	4 meses	Dogo de Burdeos	21.44
43	2 años	Bulldog Inglés	21.77
9	6 años	Cobrador Dorado	24.46
38	7 meses	Bulldog Inglés	24.84
16	10 años	Schanuzer Miniatura	26.09
15	13 años	Gigantes de los Pirineos	37.45
59	11 meses	Boston Terrier	39.25
60	3 meses	Dogo de Burdeos	39.42
55	3 meses	Dogo de Burdeos	45.59
40	3 meses	Bulldog Inglés	47.55
1	3 años	Mestizo	51.62
45	2 años	Bulldog Inglés	52.91
41	3 años	Boxer	52.97
21	12 años	Cocker Spaniel	72.28
3	10 años	Schanuzer Miniatura	86.15
42	3 años	Bulldog Inglés	86.97
10	12 años	Cocker Spaniel	94.41
$\bar{X} \pm DE$			29.03 \pm 24.57

(\bar{X} : Promedio; **DE**: Desviación estándar)

Tabla 5: Niveles de IFN- γ en sangre periférica de machos expresados como Índice de Estimulación (IE).

MUESTRA	EDAD	RAZA	IE
25	5 meses	Mestizo	5.13
20	5 años	Poodle	8.14
39	3 meses	Bulldog Inglés	8.77
7	7 años	Beagle	9.73
30	4 años	Yorkshire Terrier	11.49
31	3 años	Dogo de Burdeo	11.84
32	3 años	Dogo de Burdeo	16.25
11	14 años	Cocker Spaniel	16.33
48	12 años	Mestizo	17.70
35	3 años	Doberman	18.32
19	13 años	Cobrador de Labrador	25.47
51	3 años	Grifón de Bruselas	25.73
58	2 meses	Dogo de Burdeos	27.22
49	8 años	Schanuzer Miniatura	36.94
57	3 meses	Dogo de Burdeos	38.92
8	12 años	Mestizo	40.36
6	5 años	Beagle	40.41
34	6 meses	Dogo de Burdeos	42.85
12	9 años	Bull Terrier	45.47
36	4 meses	Bulldog Inglés	49.55
50	13 años	Cocker Spaniel	56.78
29	4 años	Yorkshire Terrier	57.68
37	4 meses	Bulldog Inglés	64.64
$\bar{X} \pm DE$			29.38 \pm 18.02

(\bar{X} : Promedio; **DE**: Desviación estándar)

Figura 5: Comparación de los niveles IFN- γ en sangre periférica entre los grupos por edad (cachorros, adultos y adultos seniles) expresados como Índice de Estimulación (IE).

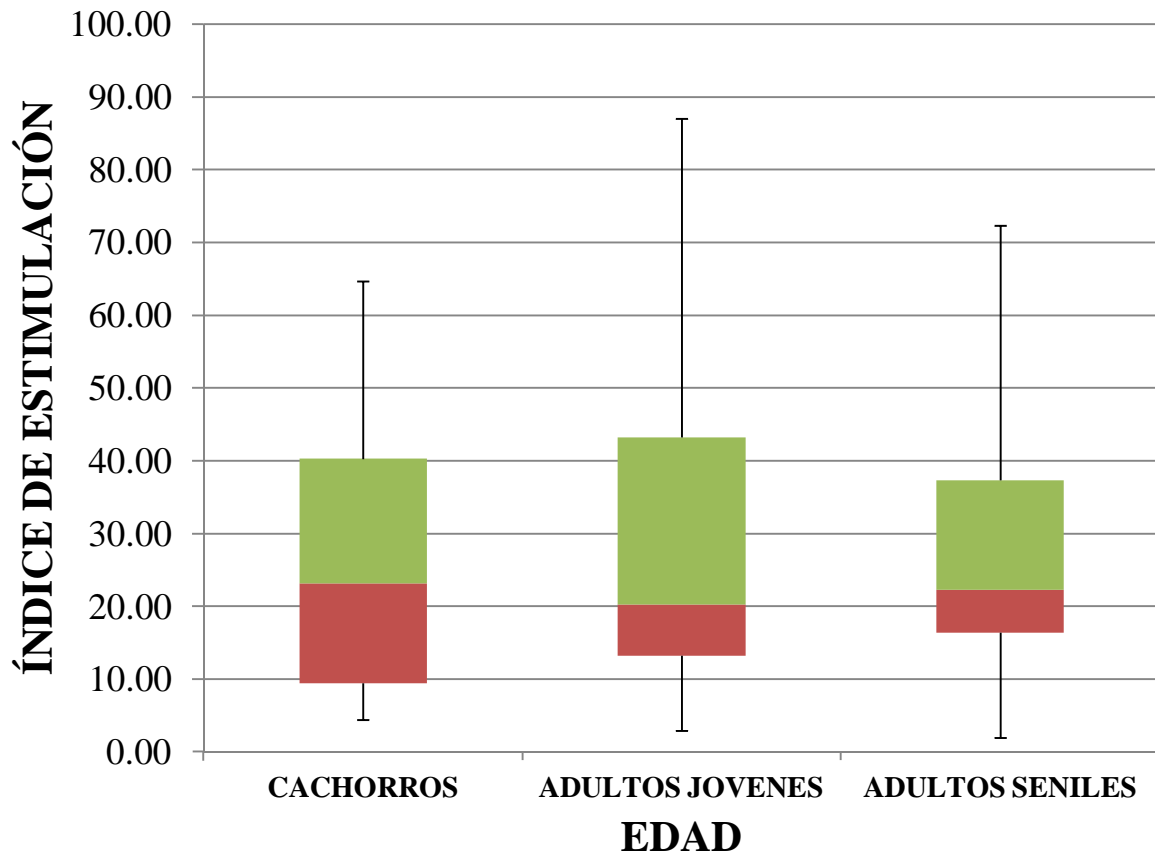
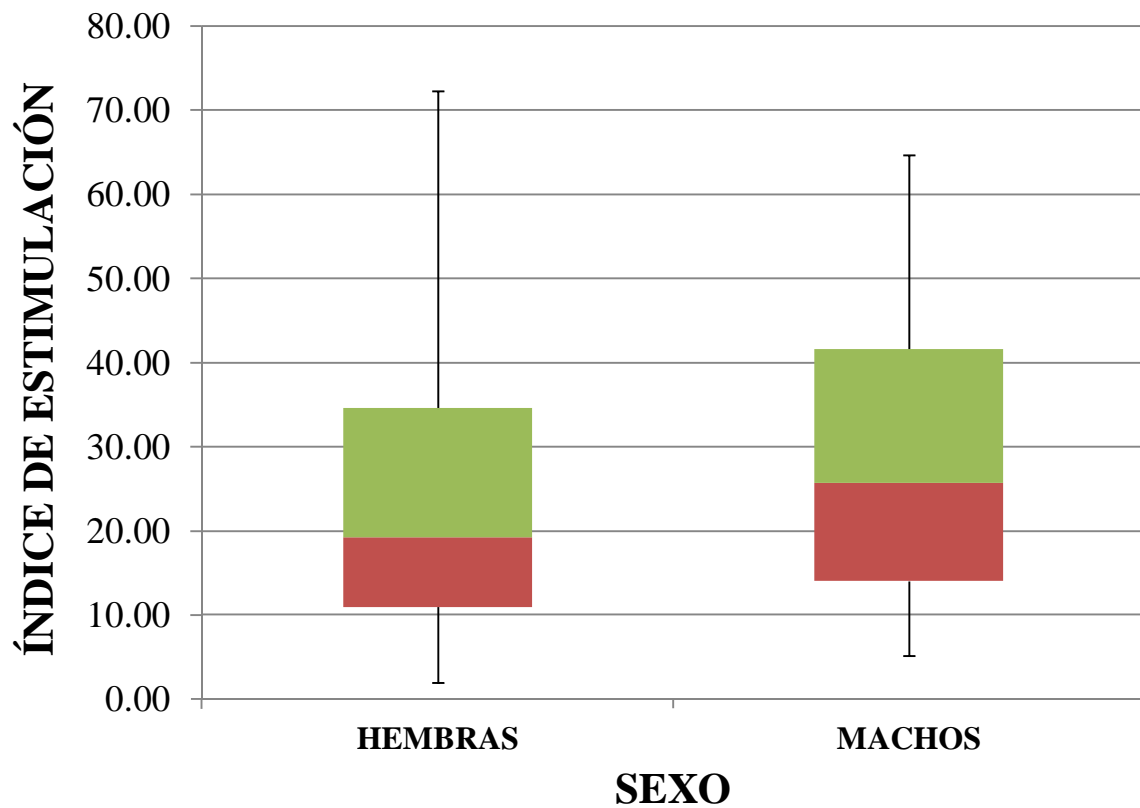


Figura 6: Comparación de los niveles IFN- γ en sangre periférica entre los grupos por sexo (hembras y machos) expresados como Índice de Estimulación (IE).



7 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se midieron los niveles de IFN- γ de perros clínicamente sanos de distintas razas, edades y sexo. No se obtuvo una diferencia estadística en los niveles de esta citocina entre los grupos de hembras y machos, ni en la comparación entre los distintos grupos de edad (cachorros, adultos jóvenes y adultos seniles), sin embargo existe una tendencia a una mayor producción de IFN- γ conforme el perro envejece, similar a lo que se obtuvo cuando se evaluó el balance T_H1/T_H2 en sangre periférica de perros de edades entre 0.5 a 11.8 años mediante el análisis de citometría de flujo con tinción intracelular de citocinas.¹² En ese trabajo el porcentaje de linfocitos T_H1 productores de IFN- γ se incrementó de manera significativa con la edad del perro, mientras que el porcentaje de linfocitos T_H2 productores de IL-4 aumentó también pero en menor medida en comparación con los linfocitos T_H1 .¹²

En otro estudio similar se estimuló sangre periférica canina con antígenos de Distemper Canino, *Malassezia pachydermatis* y *Toxocara canis*, además de incluir los mitógenos de la lectina de *Phytolacca americana* (MPA) (Pokeweed) y Concanavalina A, con el fin de entender como está orquestada la respuesta inmune a través de las citocinas producidas.³⁴ Para este propósito se recuperó el sobrenadante después de 4, 24, 48 y 72 horas de incubación y se evaluó la producción de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ y FNT- α usando el ensayo de ELISA de captura (similar al utilizado en el presente trabajo). El perfil de citocinas producidas *in vitro* en respuesta a estos patógenos no se vio claramente polarizado hacia T_H1 o T_H2 y más bien fue cambiando con el tiempo.³⁴ Sin embargo,

obtuvieron resultados similares, en el sentido de que la producción de IL-4 aumentaba con la edad del perro.^{12,34}

La evaluación de las citocinas ha tomado relevancia en los últimos años en el estudio de la respuesta inmune a distintas enfermedades. Una de las enfermedades en donde se ha estudiado ampliamente el IFN- γ es en la Leishmaniosis Canina (LC), producida por *Leishmania infantum/chagasi*; esta enfermedad tiene varias presentaciones y causa lesiones cutáneas, oculares, renales, viscerales, linfadenopatías, entre otras, con un desenlace fatal. Para combatir este patógeno el sistema inmune depende de la respuesta de los linfocitos T (T_{H1} y T_{H2}) y la producción de sus citocinas.^{16, 28} Se han realizado algunos estudios para evaluar el perfil de citocinas expresadas durante esta enfermedad, donde se evaluó la frecuencia y el nivel de expresión de las citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ y FNT- α en esplenocitos de 30 perros infectados naturalmente con *L. infantum/chagasi*, usando el método RT-PCR. Los resultados que obtuvieron sugieren que la LC se caracteriza por una producción mixta de citocinas T_{H1} y T_{H2}, con una acumulación predominante de IL-10 asociada con el aumento de la carga parasitaria y la progresión de la enfermedad además de estar directamente relacionada con el aumento de la presentación de los signos clínicos.¹⁶ Por el contrario, en otro estudio, se detectaron que los niveles altos de IFN- γ se asocian con el control de la enfermedad.⁶

En un estudio similar, se investigó la respuesta inmune temprana contra *L. infantum/chagasis*. Se realizó una técnica de estimulación *in vitro* que consiste en cocultivar sangre periférica de canino con macrófagos autólogos infectados; los resultados obtenidos mostraron que la expresión de IFN- γ e IL-4 está directamente relacionada a la carga parasitaria, a menor carga parasitaria menos expresión de estas dos citocinas.²⁸

La evaluación de la expresión de los niveles de citocinas ha sido esencial para entender la respuesta inmune inducida en el perro contra *Leishmania*, lo que en un futuro pueda ayudar a caracterizar los mecanismos y factores que intervienen en una respuesta protectora a la infección y, aún más, para establecer un posible tratamiento inmunomodulador.

El IFN- γ también se ha estudiado para evaluar la respuesta inmune en la Dermatitis Atópica (DA) que es una enfermedad dermatológica originada por un reacción de hipersensibilidad tipo 1 a antígenos ambientales; sus signos clínicos característicos son prurito, excoriación, eritema y alopecia, y se cree que los perros que la desarrollan tienen una predisposición genética.¹¹ En un estudio se evaluó la expresión del ARNm de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 en sangre periférica de perros con y sin DA mediante la técnica RT-PCR. Los resultados que obtuvieron sugieren que existe una tendencia a que los linfocitos de los perros atópicos expresen un patrón de citocinas T_H2.¹¹ En otro estudio similar, se evaluó la relación de IFN- γ /IL-4 en perros con DA antes y después de ser tratados con un antígeno de ácaro del polvo doméstico. Este estudio se realizó con sangre periférica de 10 perros con DA, usando la misma técnica que el estudio anterior, para evaluar los niveles de citocinas. En los perros atópicos se encontró que el ARNm de IFN- γ fue bajo lo que indica el perfil de citocinas fue polarizado hacia las T_H2. Después de la inmunoterapia con el antígeno del ácaro del polvo doméstico el nivel de IFN- γ fue significativamente más alto que antes, mientras que la de IL-4 no cambió, lo que sugiere que el tratamiento con este antígeno específico invierte la tendencia de la producción de citocinas T_H2 a T_H1.^{11, 30} En otro estudio, se trataron perros con DA con IFN- γ recombinante (KT-100) y un antihistamínico tópico (Difenhidramina: DH) durante cuatro semanas; los criterios de

evaluación clínica fueron prurito, excoriación, eritema y alopecia. KT-100 se administró por vía subcutánea una vez al día, tres veces por semana en días alternos y la DH se administró por vía tópica dos veces al día. El porcentaje de eficacia del KT-100 comparado con el DH fue mejor concluyendo que puede ser una alternativa eficaz para el tratamiento de esta enfermedad crónica.¹³

Los casos de Leishmaniosis y DA del perro ilustran una tendencia actual en el estudio y/o evaluación de la respuesta inmune a infecciones o padecimientos crónicos; es decir, estudiar esta respuesta a través del tipo de citocinas que el organismo produce. Como se ve en los ejemplos anteriores, el entendimiento de las citocinas producidas puede llevar al desarrollo de una estrategia de inmunoterapia. El presente trabajo no llegó tan lejos, simplemente pretendió adaptar la aplicación de un kit o estuche comercial para cuantificar el IFN- γ canino a las condiciones de un laboratorio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Aunque se estudiaron un total de 60 perros de diferentes razas, edades y sexos, no se encontró una diferencia significativa estadísticamente entre las variables. No obstante se cree que el hecho de haber adaptado la técnica y comentar estos resultados con algunos Médicos Veterinarios Zootecnistas que practican la clínica de pequeñas especies o con alumnos pasantes y/o de posgrado interesados en este tipo de investigación empieza a abrir las posibilidades para ampliar y profundizar el estudio de las citocinas caninas en diferentes escenarios clínicos o experimentales como se hace en otros países del mundo.

8 CONCLUSIONES

- a) Se detectó de manera exitosa el IFN- γ en sangre periférica de perros de distintas razas, edades y sexos con ayuda del estuche comercial Quantikine (R&D Systems, # CAIF00)
- b) No se obtuvieron diferencia estadísticamente significativas ($p > 0.05$) ni entre perros de diferentes edades, o diferente sexo.
- c) La metodología empleada podrá ser utilizada en diferentes escenarios de interés en la clínica canina, como son la evaluación de vacunas, o la respuesta inmune en infecciones, cáncer e hipersensibilidad.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. 5ta ed. Madrid: Elsevier, 2004.
2. Aguzzi A, Heikenwalder M. Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity*. 2005, 22: 145-54.
3. Bonjardim CA. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses—and viruses counteract IFN action. *Microbes and Infection*. 2005; 7: 569-578.
4. Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J. Aller. Clin. Immunol.* 2006; 117: 441-445.
5. Call ME, Wucherpfennig KW. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 101-25.
6. Carrillo E, Moreno J. Cytokines profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; 128: 67-70.
7. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Aller. Clin. Immunol.* 2010, 125: 53-72.
8. Díaz I, Mateu E. Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN-gamma, IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; 106: 107-12.
9. Farrar MA, Schreiber RD The molecular biology of interferón gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1993, 11:571-611.

- 10.** Halminen M, Sjöroos M, Mäkelä MJ, Waris M, Terho E, Lövgren T, Ilonen J. Simultaneous detection of IFN-gamma and IL-4 mRNAs using RT-PCR and time-resolved fluorometry. *Cytokine*. 1999; 11: 87-93.
- 11.** Hayashiya S, Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Hayasaki M, Nomura T, Une S, Nakaichi M, Taura Y. Expression of T helper1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2002; 49:27-31.
- 12.** Horiuchi Y, Nkajima Y, Nariai Y, Asanuma H, Kuwabara M, Ykawa M. Th1/Th2 Balance in canine peripheral Blood lymphocytes- A flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 118: 179-185.
- 13.** Iwasaki T, Hasegawa A. A randomized comparative clinical trial of recombinant canine interferon-gamma (KT-100) in atopic dogs using antihistamine as control. *Vet. Dermatol.* 2006; 17: 195-200.
- 14.** Kalantri Y, Hemvani N, Chitnis DS. Evaluation of real-time polymerase chain reaction, interferon-gamma, adenosine deaminase, and immunoglobulin A for the efficient diagnosis of pleural tuberculosis. *Int. J. Infect. Dis.* 2011; 15: 226-31.
- 15.** Kindt TJ, Goldsby RA, Osborn BA. Kuby, Immunology. 6th ed. EUA: Freeman, 2007.
- 16.** Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Analysis of the cytokines profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 115: 135-45.
- 17.** Lanier LL. Shades of grey- the blurring vie of innate and adaptative immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013, 13:73-74.

18. Lavani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. Clin. Microbiol. Infect. Disease. 2010; 28(4): 245-252.
19. Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. Nat. Immunol. 2011, 12:578-606.
20. Leslie M. Immunology uncaged. Science. 2010; 327:1573.
21. Liew F., Th1 and Th2 cells: a historical perspective. Nat. Rev. Immunol. 2002; 2:55-60.
22. MacMicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. Nat. Rev. Immunol. 2012; 12:367-382.
23. Miller JFAP. The golden anniversary of the thymus. Nat. Rev. Immunol. 2011; 11:489-495.
24. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 1986, 136:2348-2357.
25. Murphy K, Travers P, Walport M. Inmunobiologia de Janeway. 7ma ed. México: McGraw-Hill, 2008.
26. Parthasarathy S, Veerasami M, Appana G, Chandran D, Das D, Srinivasan VA. Use of ESAT-6-CFP-10 fusion protein in the bovine interferon-gamma ELISPOT assay for diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. J. Microb. Meth. 2012; 90: 298-304.
27. Ramayo, LG, Soba MG, Mundo SL. Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos *in vitro*. In Vet. 2005; 7: 63-70.
28. Rodríguez CA, Batista LF, Filho RS, Santos CS, Pinheiro CG, Almeida TF, Freitas LA, Veras PS. IFN-gamma expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi*

- promastigote stimulation in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; 127: 382-388.
- 29.** Schroder k, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leuk. Biol.* 2004; 75: 163-189.
- 30.** Shida M, Kadoya M, Park SJ, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shif in dogs with atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 102: 19-31.
- 31.** Smith PL, Lombardi G, Foster GR. Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol. Immunol.* 2005, 42: 869-77.
- 32.** Takamatsu, H.H, Denyer, M.S, Stirling C. Cox, S. Porcine γ/δ cells: possible roles on the innate and adaptative immune response following virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112:49-61.
- 33.** Tizard IR. Introducción a la inmunología veterinaria. 9na ed. Madrid: Elsevier, 2013.
- 34.** Valli JL, Williamson A, Sharif S, Rice J, Shewen PE. *In vitro* cytokine response of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 134: 218-229.
- 35.** Veerasami M, Moorthy L, Das D, Parthasarathy S, Chandran D, Lingala R, Srinivasan VA. Assessment of critical parameters in blood processing for the bovine interferon-gamma ELISPOT assay to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in India. *Vet. Ital.* 2011; 47: 25-34.

- 36.** Vordermeier M, Whelan AO. ELISPOT assays to enumerate bovine IFN- γ -secreting cells for the development of novel vaccines against bovine tuberculosis. *Meth. Mol. Biol.* 2012; 792:219-27.
- 37.** Wood PR, Jones SL. Bovigam: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2001; 81: 147-55.
- 38.** Zhu J, Yamane H, Pail We. Differentiation of Effector CD4 T cell Populations. *Ann. Rev. Immunol.* 2009; 28: 445-489.