



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"DETECCION DE POSIBLES REARREGLOS DEL
RECEPTOR PARA ANTIGENO DE LA CELULA T
(RCT) Y DE LAS CADENAS PESADAS DE LAS
INMUNOGLOBULINAS (JH) EN PACIENTES
CON PRURIGO ACTINICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

GABRIELA GONZALEZ RODRIGUEZ

ASESOR: DR. GUILLERMO ALFARO MARTINEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1999

ESIS CON
LA DE ORIGEN

221635



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

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

" Detección de posibles rearrreglos del receptor para antígeno de la célula T (RCT) y de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (J_H) en pacientes con Prúrigo Actínico ".

que presenta la pasante: Gabriela González Rodríguez
 con número de cuenta: 9056979-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

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

A T E N T A M E N T E .
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de Diciembre de 1991

PRESIDENTE	<u>Dr. Ricardo Santiago Díaz</u>	
VOCAL	<u>Dr. Marco A. Vega López</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Guillermo Alfaro Martínez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.enC. Victor M. Zendejas Huittón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.V.Z. Angel Germán Martínez</u>	

Este trabajo se realizó en la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, SS y en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Guillermo Alfaro Martínez.

A Rodolfo (Bebé) por su ayuda
ternura, apoyo, paciencia, compañía,
alegría y amor; gracias por ser tan
maravilloso.

A mi pequeña y hermosa hija: Melissa,
por su amor, sus sonrisas y su linda
mirada que me impulsan a llegar a
esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Alfaro, por su asesoría y apoyo para la realización del presente trabajo.

A mi gran amigo Wilox, por sus enseñanzas, asesoría y paciencia.

A mi gran amiga Gabox, por la transcripción de este trabajo.

A mi "chunche", porque sin él no hubiera podido lograr muchos experimentos.

A todos aquellos familiares, amigos, compañeros y Profesores, que de alguna manera contribuyeron para la realización y conclusión de este trabajo.

GRACIAS

*Se agradece la participación de los doctores:
Luciano Domínguez, Ma. Teresa Hojyo y Elisa Vega,
del Servicio de Dermatología del Hospital General
“Dr. Manuel Gea González”, SS.*

INDICE

INTRODUCCION

I.	Prúrigo Actínico	1
	a) Definición	
	b) Características clínicas	
	c) Características histopatológicas	
	d) Diagnóstico diferencial	
	e) Tratamiento	
II.	Fotobiología	9
III.	Ontogenia de células T	17
	* Receptor para Antígeno de la Célula T (RCT)	
	a) Generalidades	
	b) Organización Genética	
	c) Rearreglos Genéticos	
	d) Regulación de la recombinación genética	
	e) Exclusión Alélica	
	f) Generación del repertorio de RCT	
	g) Moléculas asociadas	
IV.	Ontogenia de las células B	30
	* Inmunoglobulinas (Ig)	
	a) Generalidades	
	b) Organización genética	

- c) Rearreglos genéticos
- d) Regulación de la recombinación genética
- e) Exclusión alélica
- f) Generación del repertorio de Ig

JUSTIFICACION DEL TRABAJO	44
OBJETIVO	44
HIPOTESIS	44
METODOS	
Muestras y controles	45
Procedimiento General	45
I. Preparación de DNA genómico a partir de tejidos y líneas celulares	48
II. Preparación de DNA de plásmido	50
III. Restricción, electroforesis y transferencia del DNA de controles y muestras de PA	60
IV. Marcado de DNA de doble cadena utilizando el fragmento "Klenow" de la DNA Polimerasa I de <i>E. coli</i>	62
V. Separación de DNA marcado radiactivamente de precursores no incorporados mediante cromatografía en columna	63
VI. Hibridación y autorradiografía	64
PREPARACION DE SOLUCIONES	68
RESULTADOS	
I. Recolección de muestras	78
II. Hallazgos clínicos	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
C	Región Constante
CL	Células de Langerhans
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
D	Región de Diversidad
DAC	Dermatitis Actínica Crónica
DNA	Acido Deoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido Etilen Diaminotetra Acético
ELAM	Molécula de Adhesión de Células Endoteliales
EL	Erupción Polimorfa Lumínica
Fig.	Figura
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos
ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
J	Región de unión

JH	<i>Región de unión de las cadenas pesadas</i>
kD	<i>Kilodalton</i>
Kpb	<i>Kilopares de bases</i>
LFA	<i>Antígeno Asociado a la Función Linfocitaria</i>
PA	<i>Prúrigo Actínico</i>
PBS	<i>Solución Amortiguadora Salina de Fosfatos</i>
PEG	<i>Polietilenglicol</i>
RAG	<i>Genes Activadores de la Recombinación</i>
RCT	<i>Receptor para Antígeno de la Célula T</i>
RNA	<i>Acido Ribonucleico</i>
SDS	<i>Dodecil Sulfato de Sodio</i>
SSC	<i>Citrato de Sodio Salino</i>
SSPE	<i>Solución Salina de Fosfatos-EDTA</i>
TdT	<i>Deoxirribonucleotidil Transferasa Terminal</i>
TE	<i>Solución Amortiguadora de Tris-EDTA</i>
TNF α	<i>Factor de Necrosis Tumoral-alfa</i>
TPE	<i>Solución Amortiguadora de Tris-Fosfato-EDTA</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
VLA	<i>Activación muy tardía</i>

I. Prúrigo Actínico

a) Definición

El Prúrigo Actínico (PA) es una fotodermatosis que afecta principalmente poblaciones de piel morena en Norte, Centro y Sudamérica. Es una enfermedad poco común y se observa principalmente en personas que viven en poblaciones situadas arriba de los 1000 m sobre el nivel del mar (1-4).

El PA ha recibido diversas denominaciones las cuales se enlistan en la Tabla 1 (1,2,5). Afecta a ambos sexos con predominio del femenino en proporción 2:1 a 4:1. Los signos y síntomas del PA aparecen tempranamente, alrededor de los 6 a 8 años de edad (1, 6, 7).

La luz ultravioleta (UV) es reconocida, hasta el momento, como el factor etiológico en el desarrollo del PA, debido al incremento de casos en verano, así como la presencia de lesiones en personas especialmente sensibles a la irradiación. Los principales tipos de luz UV asociados a la enfermedad son de tipo A y B (1, 5, 6, 8).

Por otro lado, existen antecedentes genéticos de los pacientes, que relacionan el haplotipo del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) denominado HLA en el humano, con cierta susceptibilidad a la enfermedad. Recientemente, se han determinado los haplotipos en diferentes series de pacientes con PA pertenecientes a distintos grupos étnicos como los descritos en Canadá, en donde se encuentra una frecuencia incrementada de los antígenos HLA-A24 y HLA-Cw4 (9, 10).

En otros estudios se ha reportado una asociación significativa entre la frecuencia tanto de la expresión del antígeno Cw4 como de la enfermedad en los indios Chimila, en Colombia (11). En

TABLA 1. - DENOMINACIONES DEL PRURIGO ACTINICO

Autor(es)	Denominación	Año
William	"Eczema Solare"	1798
Hutchinson	"Summer Prurigo"	1878
Haxthausen	Erupción Lumínica Polimorfa Crónica	1919
Rash	Erupción Lumínica Polimorfa Crónica	1926
Lamb	Dermatitis Solar	1950
Escalona E.	Dermatitis Solar	1954
González O. y Varela G.	Actinodermatitis	1957
Cordero F.	Síndrome Cutáneo Guatemalensis	1960
López González	Prúrigo Solar	1961
Everett J.	"Light sensitive eruption in American Indians"	1961
Londoño F.	Prúrigo Actínico	1966
Birt y Davis	"Photodermatitis in North American Indians"	1971
Saúl A.	Dermatitis Solar	1972
Corrales H.	Dermatitis Polimorfa por luz	1973
Hojyo y Domínguez	Erupción Polimorfa Lumínica, Tipo Prúrigo	1975
Flores O.	Prúrigo Solar de Altiplanicie	1975

México se ha reportado un estudio similar encontrándose una asociación con los antígenos HLA-DQB y HLA-DR4 (12). Estos hallazgos sugieren que existe una correlación entre la expresión de ciertas moléculas del CPH con la susceptibilidad a desarrollar PA.

En 1991 se comenzaron a realizar estudios con la finalidad de establecer algún factor hereditario relacionado (6, 7, 13). Inicialmente se propuso un mecanismo autosómico dominante, con una frecuencia familiar que varía del 3 al 15 % (5, 13). Estudios recientes realizados con pacientes mexicanos han permitido establecer que, cuando menos en la serie incluída de 28 pacientes, el antecedente familiar fué positivo en el 14 %, lo que concuerda con lo reportado previamente. Además, se encontró que el familiar más frecuentemente afectado era la madre (44 %), seguido de los hermanos (18 %) y del padre (14 %) (13).

En la población indígena Chimila de Colombia se ha reportado una alta frecuencia de la enfermedad (8 %); sin embargo no se pudo establecer claramente la existencia de un factor hereditario (14).

Características clínicas

Las lesiones se presentan en las regiones del cuerpo expuestas al sol, tales como las mejillas, dorso de la nariz, frente, pabellones auriculares, región del escote, caras externas de brazos y antebrazos, dorso de las manos y piernas (Fig. 1) (6).

Las lesiones son polimórficas e hiperpigmentadas; incluyen máculas y pápulas que pueden unirse para formar placas, costras, y finalmente liquenificación. Se presenta prurito intenso en todos los casos. El número, extensión y morfología de las lesiones varían de acuerdo a la etapa de la enfermedad, intensidad de exposición solar y tratamientos previos (7). Es muy frecuente el ataqué:



Figura 1.- Topografía y morfología del Prurigo Actínico (6).

a la mucosa de los labios, originando una queilitis que se observa hasta en el 85 % de los casos, y pocas veces ha llegado a ser la única manifestación de la enfermedad. Las lesiones afectan principalmente el labio inferior y se caracterizan por edema, escamas, fisuras verticales y secundariamente ulceración. La conjuntiva presenta lesiones en más del 45 % de los casos. La evolución del PA es crónica, con periodos de mejoría después del tratamiento, y persiste durante toda la vida (6, 7).

c) Características histopatológicas

En las lesiones de piel se presenta hiperqueratosis, acantosis y engrosamiento de la lámina basal. En la dermis se observa un infiltrado perivascular compuesto principalmente de linfocitos, que pueden llegar a formar conglomerados (1, 15).

En las lesiones de labios se observa hiperqueratosis con paraqueratosis, acantosis, espongirosis, y vacuolización de la capa basal. Puede presentarse ulceración del epitelio. Un hallazgo constante es la presencia de un infiltrado linfocitario denso que puede disponerse en forma difusa o llegar a formar nódulos (Fig. 2) (15).

En biopsias de conjuntiva, se aprecia hiperplasia del epitelio alternando con áreas de atrofia, con vacuolización de las células de la capa basal. También se presenta infiltrado linfocitario denso arreglado en un patrón folicular (1, 15).

El análisis histopatológico también revela la presencia de abundantes eosinófilos en biopsias de lesiones tanto de labio como de conjuntiva (15).



Figura 2.- Corte histológico de una lesión de labio.
Presencia de folículos linfoides (15).

d) Diagnóstico diferencial

El PA se ha descrito principalmente entre nativos americanos; sin embargo, en algunos países de otros continentes se considera como una variante de otras dermatosis ocasionadas por hipersensibilidad a la luz solar, y no como una entidad diferente. Para realizar el diagnóstico diferencial se toman en cuenta las siguientes dermatosis (Tabla 2):

- Erupción Polimorfa Lumínica (EPL)
- Dermatitis Actínica Crónica (DAC)

La Erupción Polimorfa Lumínica (EPL), es una enfermedad común que tiene una distribución mundial, afecta a todos los grupos, presenta variación estacional, y se caracteriza por tener periodos de remisión. Comúnmente se observan vesículas, mientras que en el PA no están presentes. Otra de las fotodermatosis tomadas en cuenta para el diagnóstico diferencial del PA, es la Dermatitis Actínica Crónica (DAC) la cual es una entidad muy frecuente en hombres mayores de 50 años, los pacientes usualmente responden a medicamentos sistémicos como azatioprina y ciclosporina principalmente, mientras que los pacientes con PA no responden a tal tratamiento (1-4).

e) Tratamiento

El tratamiento está dirigido a bloquear la radiación UV, principalmente de tipo A y B. Este tratamiento se basa en el uso de bloqueadores solares como son pantallas y filtros, incluso, muchas veces es necesario que el paciente permanezca en un lugar aislado de la exposición solar (5)

TABLA 2.- DIAGNOSTICO DIFERENCIAL (1, 3, 8, 16)

ENTIDAD*	SEXO	EDAD	HISTOLOGIA	TRATAMIENTO
EPL	En hombres y mujeres	Adultos jóvenes	Infiltrado linfocitario	Azatioprina
DAC	Principalmente en hombres	Mayores de 50 años	Infiltrado linfocitario mínimo	Azatioprina Ciclosporina
PA	Principalmente en mujeres	Niñez	Infiltrado linfocitario en todos los casos	Talidomida

* EPL: Erupción Polimorfa Lumínica; DAC: Dermatitis Actínica Crónica; PA: Prúnigo Actínico.

Los pacientes responden a agentes tópicos y antihistamínicos orales, pero por el prurito constante muchas veces son intolerantes al tratamiento (17, 18).

Actualmente el tratamiento de elección es la Talidomida, reportándose mejoría en piel, labio y conjuntiva en la mayoría de los casos (5, 19, 20). Anteriormente este medicamento se utilizó por su efecto sedante para el tratamiento de las molestias que presentaban los pacientes con reacciones leprosas agudas; por esta razón se propuso su uso en pacientes con PA observándose no sólo la disminución del prurito, sino también la mejoría generalizada del paciente, incluyendo la desaparición de las lesiones.

El mecanismo de acción de éste medicamento no está completamente esclarecido, sin embargo se propone una acción inmunosupresora, antiinflamatoria, así como su efecto inhibitorio en la expresión del Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNFalfa) (21, 22).

Con base a la importancia del papel que tiene la luz UV en el desarrollo del PA, a continuación se mencionan los efectos de ésta y la reacción de fotosensibilidad en piel normal.

II. Fotobiología

La radiación UV es una pequeña parte del espectro de radiación electromagnética y comprende 3 longitudes de onda: UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm), y UVA (320-400 nm) (Tabla 3) (23). La composición final de radiación UV incidente sobre la Tierra es principalmente del 90 % o más de UVA y 10 % o menos de UVB (16, 17, 23).

La reacción de fotosensibilidad se refiere a cualquier alteración en la piel inducida por la absorción de energía radiante (fotón), que se relaciona con la frecuencia y longitud de onda (16, 23).

TABLA 3. - RADIACION NO IONIZANTE (23)

RANGO (nm)	RADIACION
< 1	Rayos X (ionizante)
200-290	UVC
290-320	UVB
320-400	UVA
400-800	Visible
800-100,000	Infrarrojo
> 100,000	Ondas de Radio

El primer paso en una reacción fotoquímica es la absorción de un fotón por una molécula llamada cromóforo. La epidermis y la dermis contienen cromóforos con un espectro de absorción dentro de las regiones de UV y visible.

Estos cromóforos incluyen DNA, RNA y proteínas. A mayor longitud de onda, la profundidad de transmisión es mayor y por lo tanto el poder de penetración es $UVA > UVB > UVC$.

De esta manera, los efectos de la UVC y UVB ocurren principalmente en la epidermis, mientras que UVA tiene mayor efecto sobre células y estructuras dérmicas (Fig. 3).

Cuando esta radiación llega a la piel, una porción de la luz es reemitida, una porción es absorbida, y una porción es transmitida a la siguiente capa (Fig. 4). Después de que la energía radiante es absorbida, el cromóforo adquiere un estado de excitación de vida media corta, seguido por un cambio químico que da lugar a un fotoproducto (23, 24).

Los fotoproductos inician una serie compleja de respuestas bioquímicas tales como la generación de flujos iónicos, iniciación en la replicación del DNA, e inducción o inactivación de reacciones enzimáticas. Estas respuestas ocasionan cambios celulares variables tales como proliferación, mutagénesis y pérdida de marcadores de superficie celular (Fig.5) (24, 25).

En general, los ácidos nucleicos y las proteínas son los cromóforos más importantes para la UVB. La absorción de UVB por el DNA conduce a la producción de dímeros de Timina, en donde dos moléculas de Timina adyacentes resultan unidas covalentemente por un anillo de ciclobutano. Los dímeros de Timina detienen la replicación del DNA. Estos dímeros de Timina pueden ser reparados por diferentes mecanismos como la fotorreactivación enzimática, en donde el anillo de ciclobutano es escindido liberando dos restos de Timina (25).

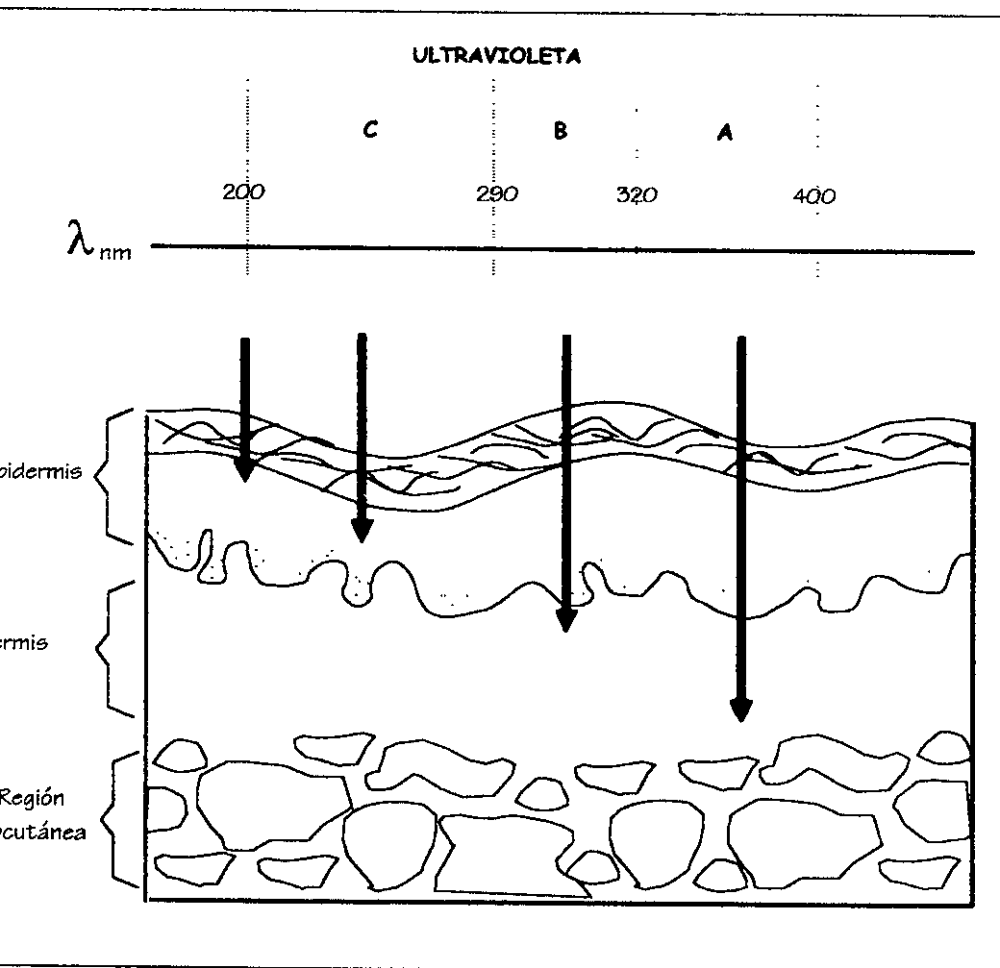


Figura 3.- Penetración de la luz UV en la piel (16).

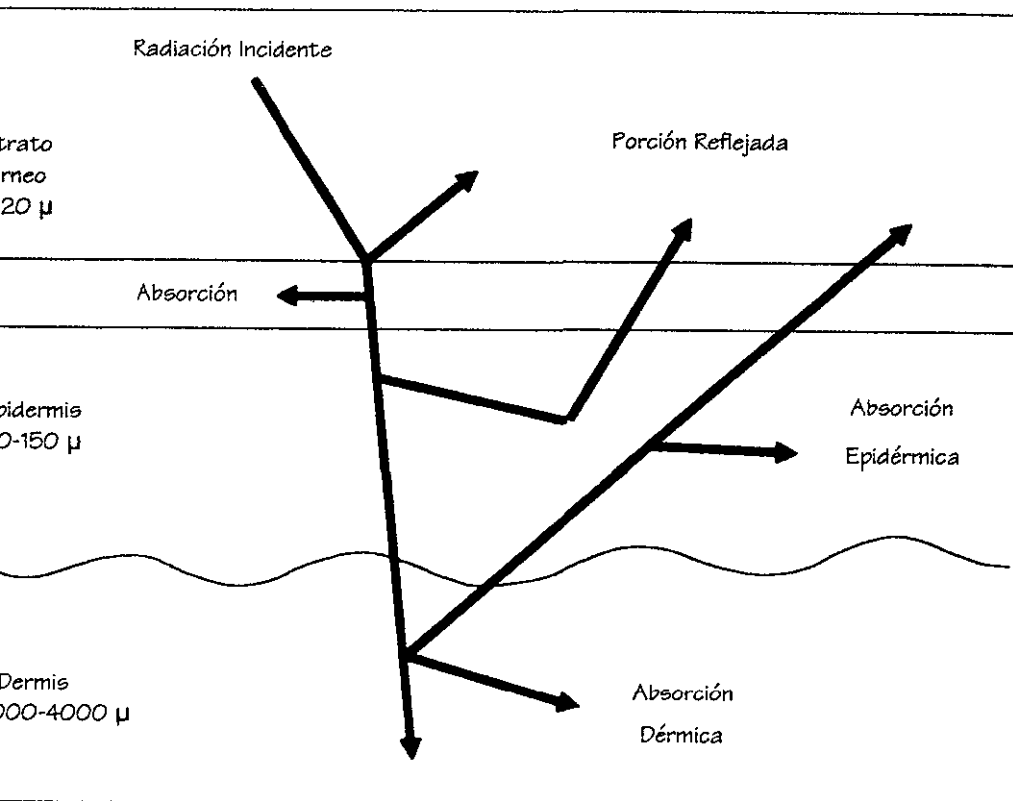


Figura 4.- Interacción de la luz UV con la piel (16).

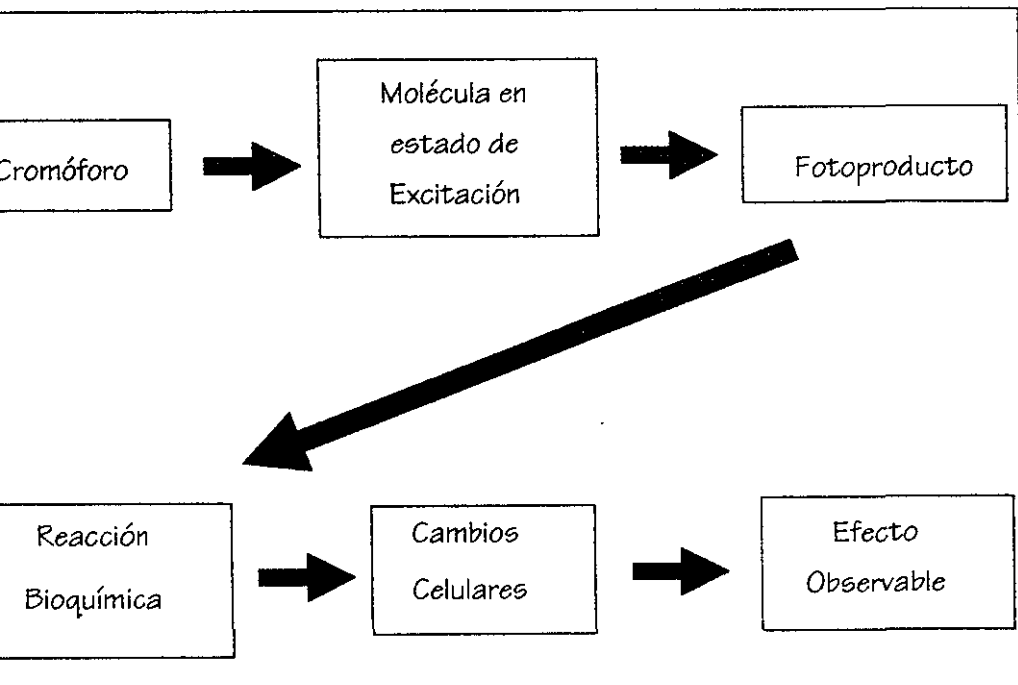


Figura 5.- Respuesta biológica en la piel, inducida por UV (16).

La sensibilidad entre los individuos varía en base al tipo de piel. Las respuestas a la radiación UV, en piel normal, son las siguientes (16-18, 23):

- a) Pigmentación
- b) Inflamación
- c) Carcinogénesis
- d) Cambios Inmunológicos

) Pigmentación

Como respuesta a la radiación UVA, se incrementa la pigmentación de la piel, evidente casi inmediatamente después a la irradiación (23).

) Inflamación

La inflamación es causada principalmente por la UVB, ésta reacción se presenta después de 1 a 6 horas de exposición. La respuesta primaria es un eritema y edema, pero a grandes dosis puede conducir a la formación de vesículas y síntomas sistémicos. En epidermis hay vasodilatación, infiltración celular y edema (16, 17, 23, 24).

) Carcinogénesis

Como se mencionó anteriormente, la incidencia de la luz UV conduce a la formación de dímeros de Timina, los cuales al no ser reparados dan lugar a la transformación celular y eventualmente a la formación de tumores (17, 23).

) Cambios inmunológicos inducidos por la luz UV

La exposición de la piel a la radiación UV tiene importantes consecuencias inmunológicas locales y sistémicas. Se ha demostrado *in vivo* que células de Langerhans (CL), las cuales son células presentadoras de antígeno, expuestas a UVB o UVA presentan cambios morfológicos y funcionales así como la disminución en la expresión del Ag CD1a (16). Las CL pueden perder marcadores de superficie, emigrar, morir o permanecer en la epidermis (26). Las células epidérmicas tratadas con UV tienen una presentación de Ag deficiente como se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (24, 27, 28). En modelos experimentales murinos se ha sugerido que la UVB probablemente interfiere con la capacidad de presentación de Ag de las CL. El mecanismo preciso de esta alteración no ha sido bien dilucidado (27).

Los queratinocitos son una fuente importante de citocinas tales como la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y el Factor estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF) (24, 29, 30).

Estudios recientes sugieren que la irradiación de queratinocitos con luz UV estimula la producción de IL-1 (24, 29), IL-3 (31), IL-6 (32-36) y TNFalfa (37). Se ha propuesto que en piel irradiada por UV, estas moléculas están involucradas en reacciones inflamatorias sistémicas tales como la fiebre, así como en la respuesta inflamatoria local (38).

Por otra parte, al irradiar células endoteliales con UVB *in vitro*, aumenta la expresión de algunas moléculas de superficie celular involucradas en la adhesión de leucocitos, tales como la molécula de adhesión de células endoteliales-1 (ELAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (30).

La alteración en la expresión de todas estas moléculas (citocinas, moléculas de adhesión,

etc.) puede ser responsable no sólo de las diferencias en la naturaleza de la infiltración leucocitaria en respuestas inflamatorias, sino también conducir a la modificación de la respuesta inmune cuando menos en forma local (30).

Por lo tanto, la respuesta inmune parece tener un papel importante en la patogenia de las lesiones del PA, por lo que es de especial interés revisar algunos de los aspectos básicos de la misma para entender mejor la naturaleza de los infiltrados linfocitarios.

II. ONTOGENIA DE CELULAS T (39, 40)

La maduración de la célula T se lleva a cabo principalmente en el timo, y consta de tres etapas relacionadas (Fig. 6):

- 1) Migración y Proliferación
- 2) Diferenciación
- 3) Selección

1) Migración y Proliferación

Los precursores de las células T, originados en la médula ósea, migran hacia la corteza del timo en donde se llevarán a cabo la proliferación y la selección celular. De la corteza, los timocitos (células T inmaduras) migran hacia la médula tímica, esta migración es facilitada por el contacto establecido entre el timocito y células epiteliales tímicas, macrófagos, células dendríticas y células nodriza. Al alcanzar su maduración, las células T migran a órganos periféricos.

Durante el proceso de maduración, participan diferentes moléculas producidas por las células estromales del timo, tales como hormonas tímicas y citocinas (IL-7)

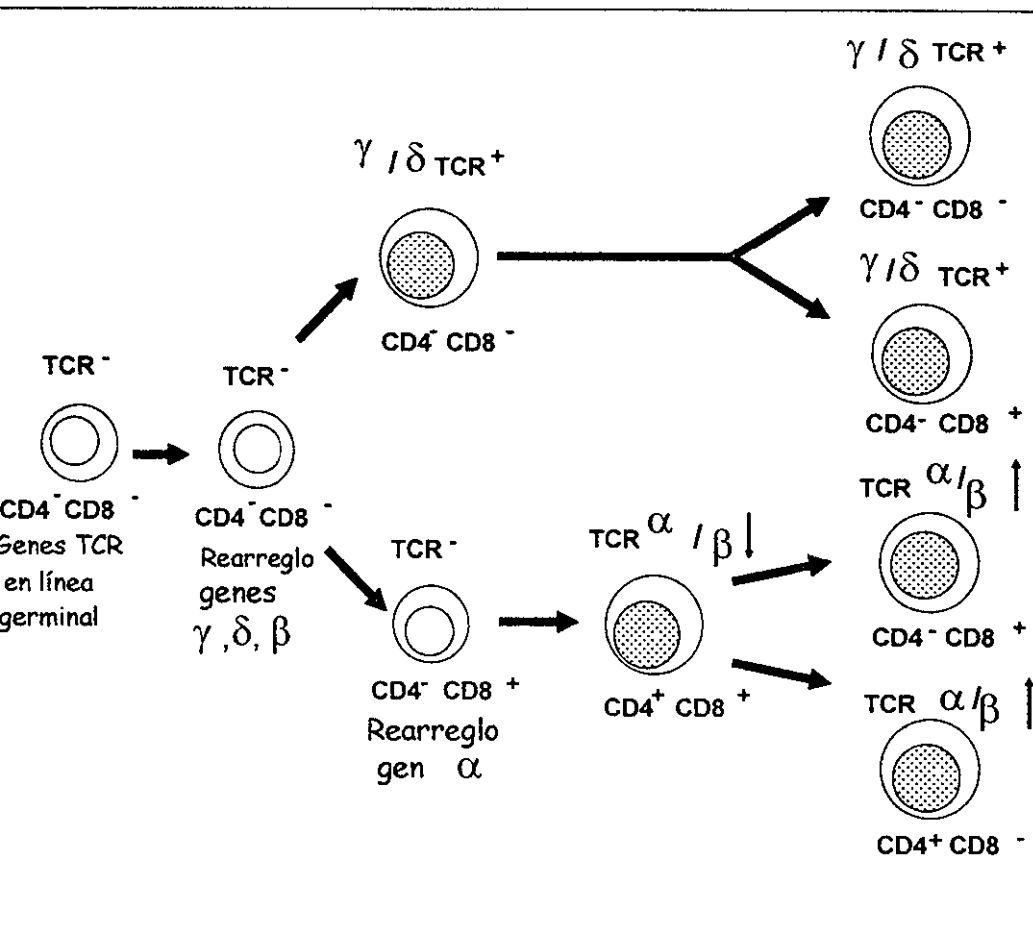


Figura 6.- Ontogenia de las células T (39).

2) Diferenciación

El proceso de diferenciación de las células T tiene como objetivo definir su fenotipo con base a la expresión de moléculas involucradas en el reconocimiento de antígenos (Ag), y posterior activación:

- Expresión del Receptor para Ag de la Célula T (RCT)
- CD4
- CD8

Las moléculas accesorias CD4 y CD8, son marcadores asociados con la función de la célula T (cooperadora y citolítica, respectivamente). La expresión del RCT depende de una serie de rearrreglos genéticos que ocurren durante la maduración celular, estos eventos se revisan más adelante.

3) Selección

Es el proceso que genera el repertorio de células T maduras en periferia. Los timocitos deben expresar RCT antes de la selección. Hay dos tipos de selección:

- Selección positiva. Consiste en la eliminación de células T cuyo RCT no muestra afinidad a moléculas de CPH propias. Sólo sobreviven células T unidas a CPH propio con péptidos extraños o propios. Cualquier célula T en desarrollo es seleccionada cuando su fenotipo se define y su RCT está restringido por CPH. Es decir, cuando el RCT está restringido por CPH clase I, la célula es CD8⁺. Y cuando el RCT está restringido por CPH clase II, la célula es CD4⁺.

- Selección negativa. Consiste en la eliminación de clones de células T cuyos RCT reconocen a antígenos peptídicos propios asociados a CPH propios, o bien, las clones se inactivan (anergia clonal). La eliminación clonal se da mediante la apoptosis (muerte celular programada).

* Receptor para antígeno de las células T (RCT)

a) Generalidades

Las células T reconocen péptidos antigénicos unidos a moléculas del CPH en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Este reconocimiento se lleva a cabo mediante un complejo que se encuentra en la membrana o superficie de la propia célula T llamado receptor para antígeno de la célula T. Existen 2 tipos de RCT:

- RCT alfa/beta
- RCT gama/delta

Ambos están compuestos de 2 cadenas polipeptídicas que se encuentran unidas mediante un enlace disulfuro. Estas cadenas son glicoproteínas y constan de un dominio extracelular variable (V) que constituye el sitio de unión al antígeno y tiene un enlace disulfuro intra-cadena. Para el caso de las cadenas alfa y gama el dominio V está codificado por segmentos genéticos Variables (V), y de Unión (J); y para el caso de las cadenas beta y delta por segmentos genéticos V, de Diversidad (D) y J.

Así mismo, las 2 cadenas también tienen un dominio extracelular constante (C), codificado por segmentos genéticos constantes C, y también tiene un enlace disulfuro intra-cadena; además de estos dominios (V y C), ambas cadenas tienen una región de conexión en la que se encuentra un

enlace disulfuro intercadena, una región transmembranal y colas citoplasmáticas (Fig. 7).

Existen diferencias entre el RCT alfa/beta y gama/delta en cuanto a la expresión de éstos en las células T, así como en el tipo de antígeno que reconocen. El RCT alfa/beta se expresa en la mayoría de las células T, mientras que el RCT gama/delta se expresa en un porcentaje mucho menor (39, 40).

b) Organización genética

Los genes que codifican para las diferentes cadenas de los RCT están organizados por diferentes segmentos (Tabla 4), la posición de éstos se muestra en la Figura 8 (39, 40).

c) Rearreglos genéticos

Los segmentos genéticos del RCT llevan a cabo un proceso de recombinaciones durante la ontogenia de las células T, para dar lugar a genes que se expresarán en la membrana celular como cadenas polipeptídicas (39-41).

• RCT alfa/beta

El primer locus que se rearregla es el de la cadena beta, y el proceso es el siguiente: Un segmento D se une a un segmento J, la unión DJ se une a un segmento V dando lugar a la unión V/DJ. Las secuencias intermedias son eliminadas. Posteriormente ocurre la transcripción en donde la unión VDJ se une a un segmento C, y el RNA mensajero se traduce para formar un polipéptido que es glicosilado y dar lugar a la cadena beta (Fig. 9).

El rearreglo del locus de la cadena alfa se estimula por el rearreglo funcional del locus de la

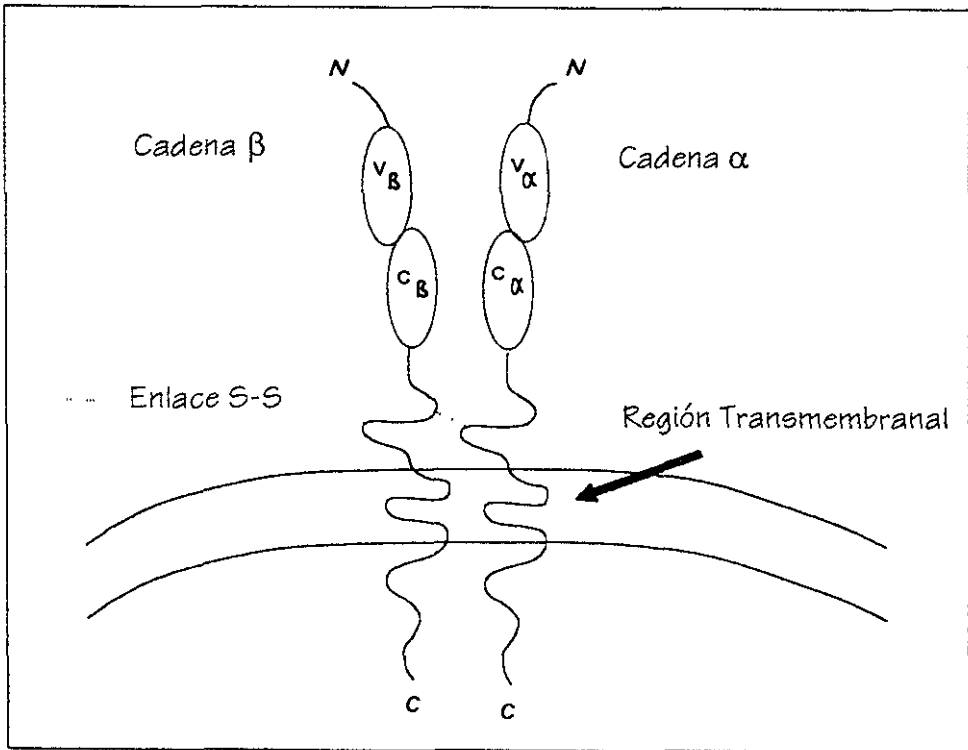


Figura 7.- Receptor para antígeno de la célula T (RCT).

V y C se refieren a los dominios Variables y Constantes

N y C a los extremos amino y carboxiterminal (39).

TABLA 4.- SEGMENTOS GENETICOS DE LAS CADENAS DE LOS DOS TIPOS DE RCT (39, 40)

CADENA	CROMOSOMA	V	D	J.	C
α	14	75	-	70	1
β	7	75	2	12	2
γ	7	14	-	5	2
δ	14	4	3	3	1

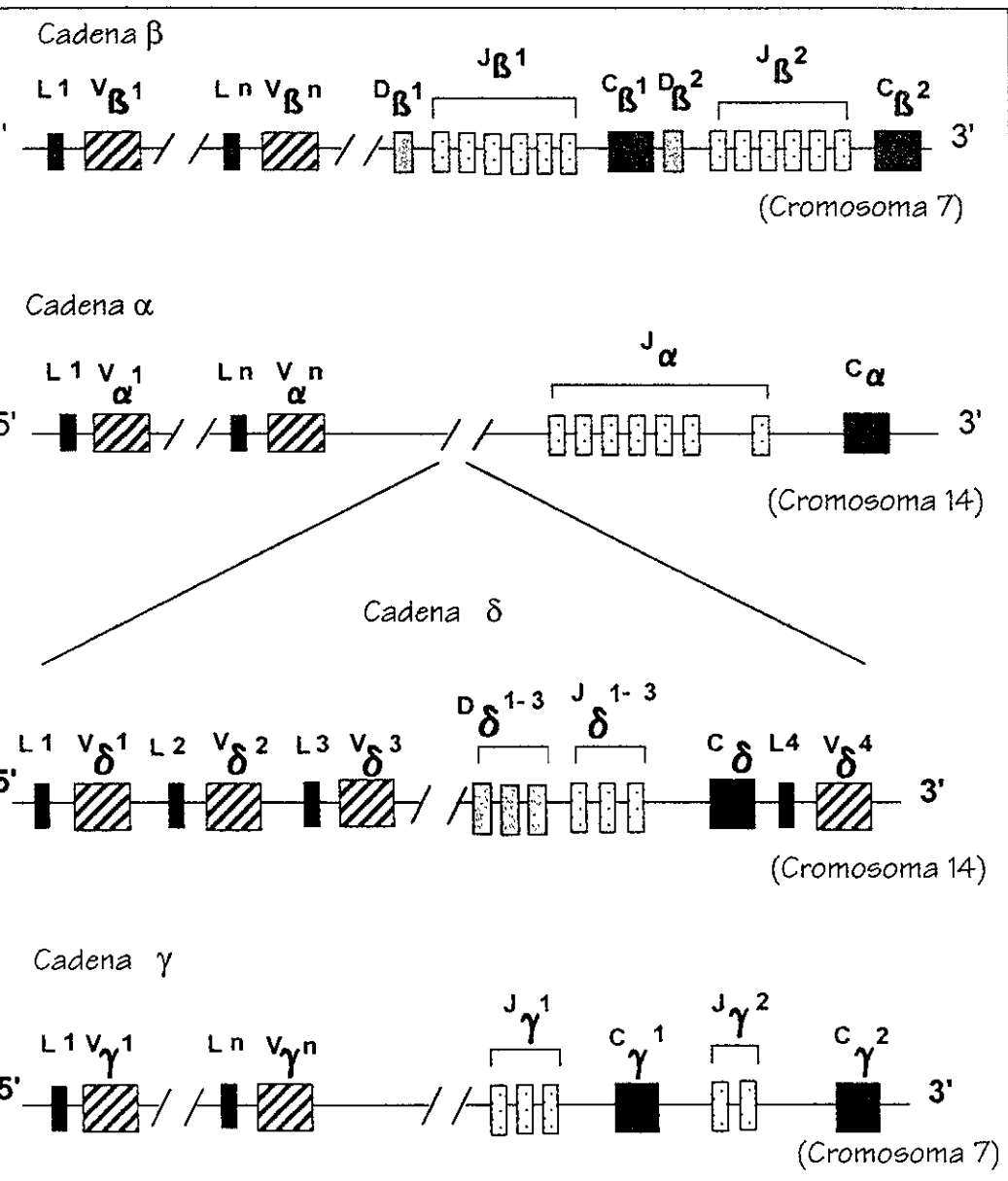


Figura 8.- Organización genómica de la línea germinal del RCT (39, 40)

LINEA GERMINAL DEL DNA

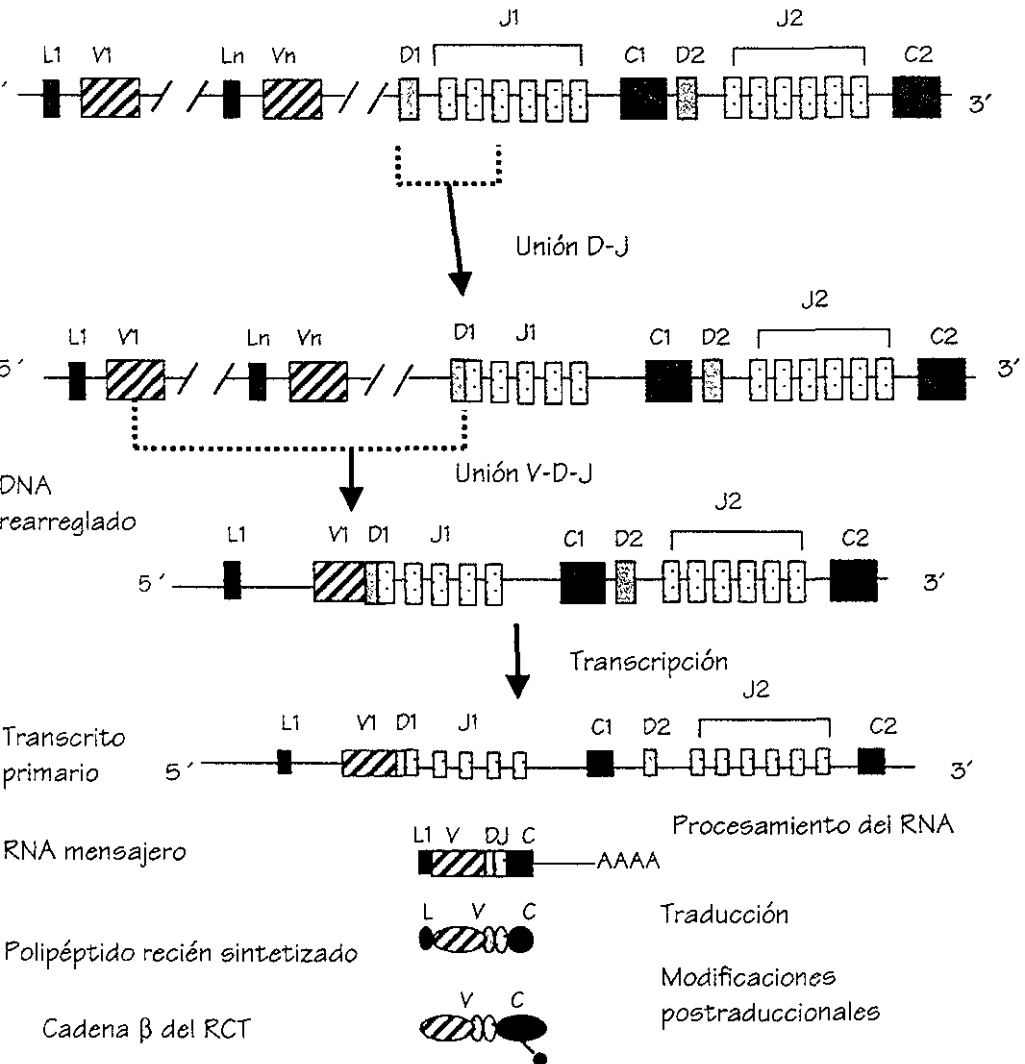


Figura 9.-

Secuencia del rearreglo de genes, transcripción y síntesis de la cadena β del RCT. V es la región variable, D de diversidad, J de unión y C es la región constante (40).

cadena beta; y el proceso es similar (39-41).

- RCT gama/delta

El rearreglo para éste tipo de receptor es muy similar al del RCT alfa/beta. Dado que el locus de la cadena delta se encuentra dentro del locus de la cadena alfa, los rearreglos funcionales de alfa eliminan al locus de la cadena delta (40).

Regulación de la recombinación genética

El proceso de rearreglo involucra el reconocimiento de las secuencias señal de recombinación, el rompimiento de la doble cadena entre los elementos que van a ser unidos y las secuencias heptámero, pérdida y adición de nucleótidos a las uniones, y ligación para completar el proceso de unión (41).

Las uniones de los segmentos genéticos están mediados por diversos factores tales como factores que activan la recombinación, y la enzima TdT (que adiciona nucleótidos), para dar lugar al producto de la recombinación V(D)J.

Secuencias señal de reconocimiento

Los segmentos genéticos V, D, y J tienen a sus lados secuencias que definen el sitio de rearreglo. Es decir, en la posición 3' al segmento V, en ambos lados del segmento D, y en posición 5' al segmento J.

Estas secuencias señal son secuencias conservadas durante la evolución, y son heptámeros mononucleares que están separados por una secuencia espaciadora de 12 o 23 pares de bases (pb)

Las secuencias señal son los únicos elementos de reconocimiento necesarios para la recombinación (42).

Genes Activadores de la Recombinación

En todas las especies estudiadas, los genes activadores de la recombinación, llamados RAG-1 y RAG-2 constituyen una unidad genética importante. La expresión de ambos genes genera la actividad de recombinación. Se piensa que una enzima llamada recombinasa V(D)J dirige los eventos de rearrreglo tanto en las células T como en las células B. Existen estudios en líneas celulares que sugieren que probablemente estos genes regulan la expresión genética de la recombinasa V(D)J, codificando componentes linfoide-específicos de la enzima. La actividad de la recombinasa se ha detectado sólo en linfocitos inmaduros (41-43).

Deoxirribonucleotidil Transferasa Terminal (TdT)

La TdT es una enzima que se expresa principalmente en células linfoides jóvenes, y su función es adicionar deoxinucleótidos a extremos de DNA, principalmente residuos G. Estas secuencias se conocen como regiones N (39, 43).

3) Exclusión alélica

Cuando se rearrregla de manera funcional un alelo de la cadena beta, y que se expresa en la membrana de la célula T, se inhibe el rearrreglo en el otro alelo, este fenómeno se conoce como exclusión alélica. Una vez que se ha formado el rearrreglo funcional de la cadena beta, se estimula el rearrreglo de la cadena alfa. Si el rearrreglo de la cadena beta en ambos alelos no es productivo, entonces la

célula morirá (Fig. 10) (40).

F) Generación del repertorio del RCT

Para generar la diversidad del RCT requerida para el reconocimiento de un amplio espectro de determinantes antigénicos, las células T utilizan una estrategia combinatoria de rearreglo de DNA. Este repertorio se forma mediante diferentes mecanismos:

- **Combinación al azar V(D)J**

El potencial de diversidad generado por ésta combinación de unión es igual al número de segmentos V, multiplicado por el número de segmentos D y J (39, 44).

- **Secuencias variables de unión**

1) La unión de los segmentos genéticos puede ser imprecisa, dando lugar a rearreglos funcionales. Es decir, el extremo 3' de un segmento, y el 5' de otro segmento, al perderse algunos nucleótidos, se unirán produciendo diferentes secuencias, las cuales a su vez serán traducidas dando lugar a diferentes aminoácidos o bien, fuera del marco de lectura (44).

2) Existe la inserción de nucleótidos que no provienen de la secuencia germinal, dando lugar a la región N. Esta adición la realiza la enzima TdT (39, 40).

3) Los segmentos D pueden ser leídos en tres marcos de lectura diferentes (44).

- **Dos tipos de cadenas**

El hecho de combinar dos cadenas diferentes para formar el heterodímero, contribuye a aumentar la diversidad generada (44).

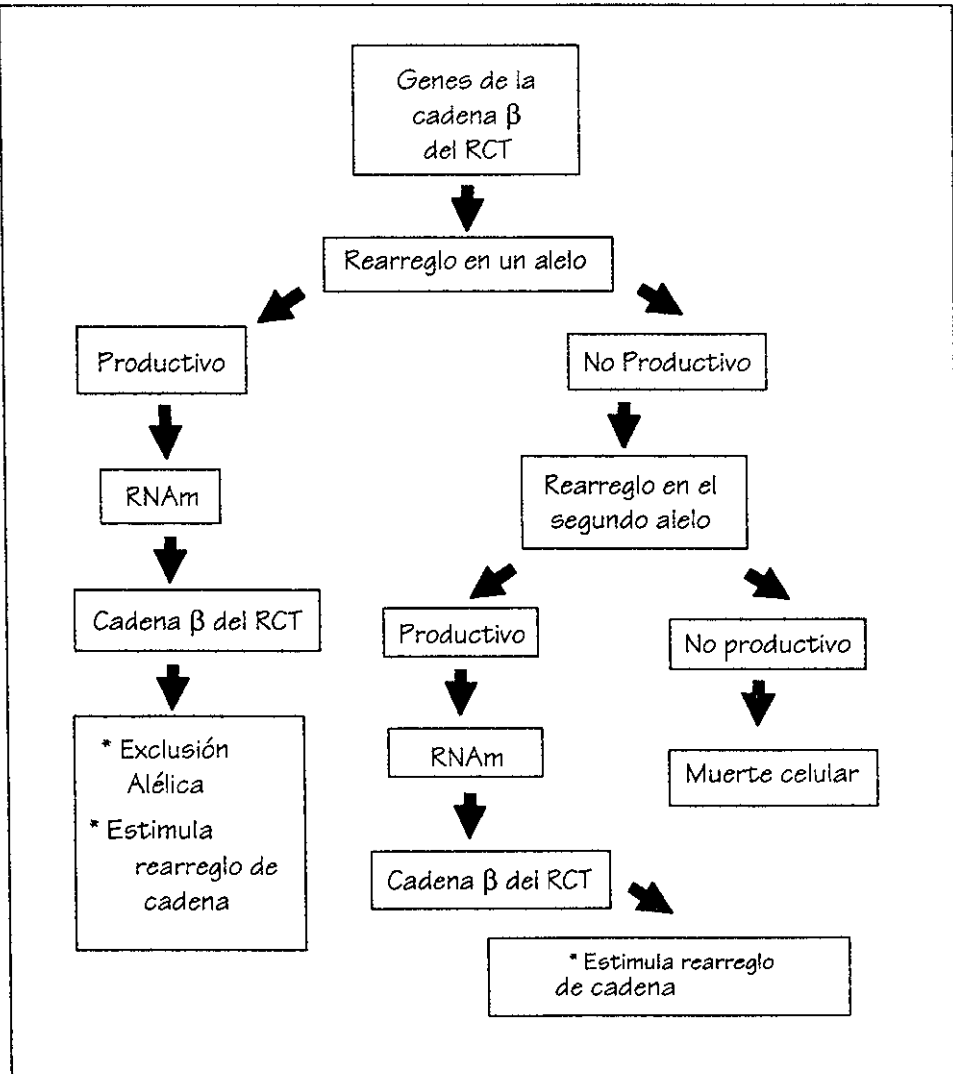


Figura 10.- Orden del rearreglo y expresión de los genes de la cadena β de RCT (39,40).

g) Moléculas asociadas

Tanto la expresión en la superficie celular de moléculas de RCT como su función en la activación de las células T, son dependientes de otras proteínas que están asociadas al heterodímero RCT. Todas estas proteínas juntas, forman el complejo RCT.

Tres miembros del complejo son llamadas proteínas CD3, e incluye una cadena gama (γ) glicosilada de 25 a 28 kD, una cadena delta (δ) glicosilada de 20 kD, y una cadena epsilon (ϵ) no glicosilada de 20 kD. Estas 3 cadenas existen como monómeros en el complejo RCT. Además, el 90 % de los complejos RCT contienen un homodímero de cadenas zeta (ζ) no glicosiladas de 16 kD; y el 10 % restante contienen un heterodímero de una cadena zeta con una cadena eta (η) no glicosilada de 22 kD. De esta manera el complejo RCT más común es $\alpha\beta:\gamma\delta\epsilon\zeta_2$ (39, 40).

IV. ONTOGENIA DE CELULAS B (39,40)

Durante la maduración, la célula B proporciona funciones de reconocimiento y funciones efectoras por medio de las inmunoglobulinas de membrana y secretadas, respectivamente. Las células B provienen de una célula madre que está comprometida en la línea de células B, y se encuentra en la médula ósea.

Cuando la célula contiene cadenas pesadas μ citoplasmáticas, se dice que se encuentra en el estado pre-B, y está en médula ósea. En esta fase la célula no responde al antígeno.

Una célula B inmadura es aquella que produce además cadenas ligeras, y expresa IgM de membrana. En éste estadio, la célula no prolifera ni se diferencia. Cuando la célula sale de médula ósea a la circulación, continúa madurando.

La célula B madura expresa IgM e IgD y ambas inmunoglobulinas tienen idéntica especificidad antigénica.

La célula B activa es aquella que ha sido estimulada por el antígeno. Prolifera y se diferencia. En esta fase aumenta la secreción de inmunoglobulinas y disminuye la expresión en la membrana. Algunas de las células activadas cambian de isotipo (explicado más adelante). La afinidad de la inmunoglobulina de membrana y secretada aumenta tras la estimulación antigénica. Parte de la progenie celular son células de memoria (Fig. 11) (39, 40).

Inmunoglobulinas (Igs)

1) Generalidades

La célula B reconoce al antígeno mediante una estructura de membrana llamada inmunoglobulina, lo que constituye la fase de reconocimiento de la inmunidad humoral. Las inmunoglobulinas pueden ser también secretadas por una célula B que se diferencia a célula plasmática después del estímulo antigénico. Las Igs secretadas unidas al antígeno dan lugar a la fase efectora.

Las Igs están formadas de 2 cadenas polipeptídicas ligeras idénticas kappa (κ) o lambda (λ), y 2 cadenas polipeptídicas pesadas idénticas. El patrón básico de asociación de cadenas se ha definido como la unión de una cadena ligera a una cadena pesada y a su vez, cada cadena pesada está unida a otra cadena pesada. La asociación entre cadenas pesadas y ligeras implica enlaces disulfuro entre el extremo carboxiterminal de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. La posición exacta de la cisteína de la cadena pesada que participa en la formación del enlace

Independiente de Ag

Dependiente de Ag

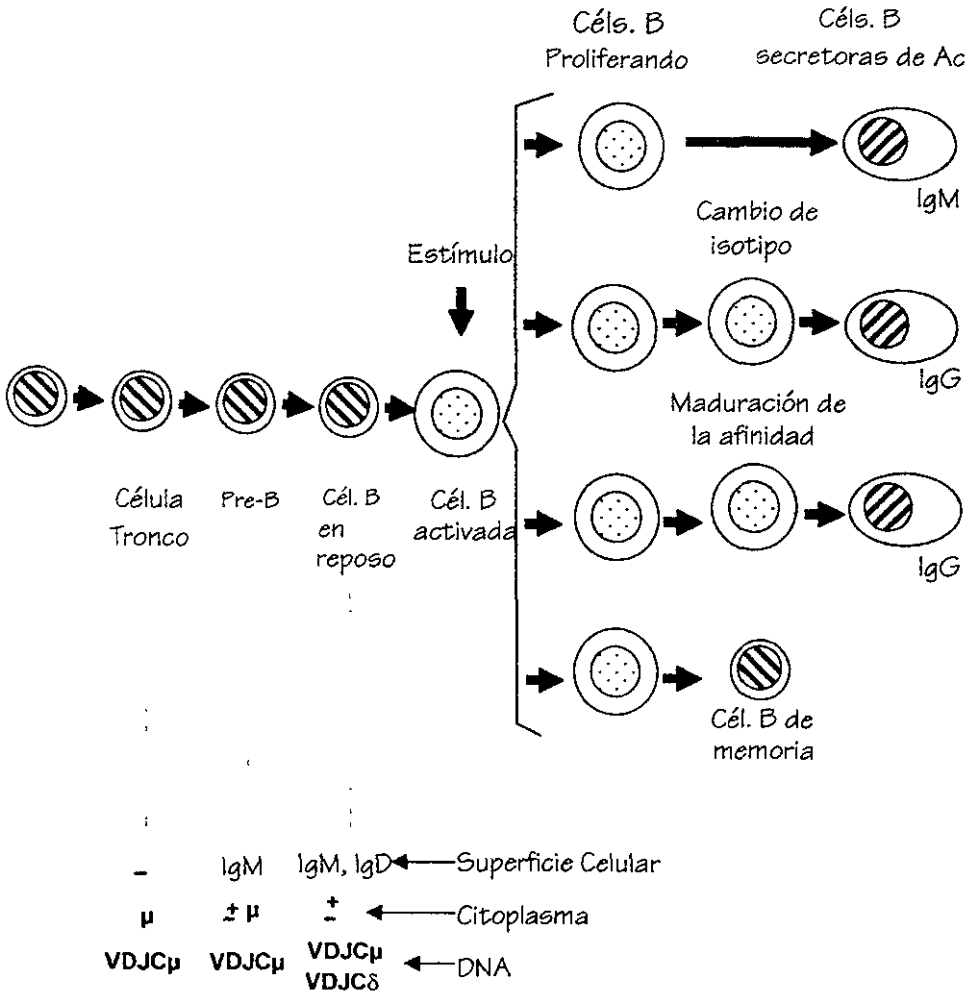


Figura 11.- Ontogenia de la célula B (39, 40).

sulfuro varía con el isotipo.

Las Igs se dividen en clases o isotipos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Las cadenas pesadas y ligeras constan de una región extracelular variable (V) que tiene un enlace disulfuro intra-cadena, modificada por segmentos genéticos V(D)J según el caso. La región variable constituye el sitio de unión al antígeno. Las cadenas pesadas tienen además 3 regiones constantes (C) extracelulares y cada una tiene un enlace disulfuro intra-cadena, una región transmembranal y una región citoplasmática (en el caso de Ig de superficie). Las cadenas ligeras solamente tienen 1 región constante (Fig. 12) (39, 44).

Organización genética

En el ser humano, el locus de la cadena pesada se encuentra en el cromosoma 14, y consiste de segmentos genéticos V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante). Los segmentos C de la cadena pesada definen el isotipo de la Ig. El locus de la cadena ligera kappa está en el cromosoma 2 y consta de segmentos V, J y C. Y el locus de la cadena ligera lambda se encuentra en el cromosoma 22 y consiste de segmentos V, J y C (Fig. 13) (Tabla 5) (39, 45).

Rearreglos genéticos

De manera similar a los genes del RCT, los segmentos genéticos se unen para dar lugar a la molécula de Ig, éstos rearrreglos ocurren durante la ontogenia de la célula B y siguen una secuencia precisa.

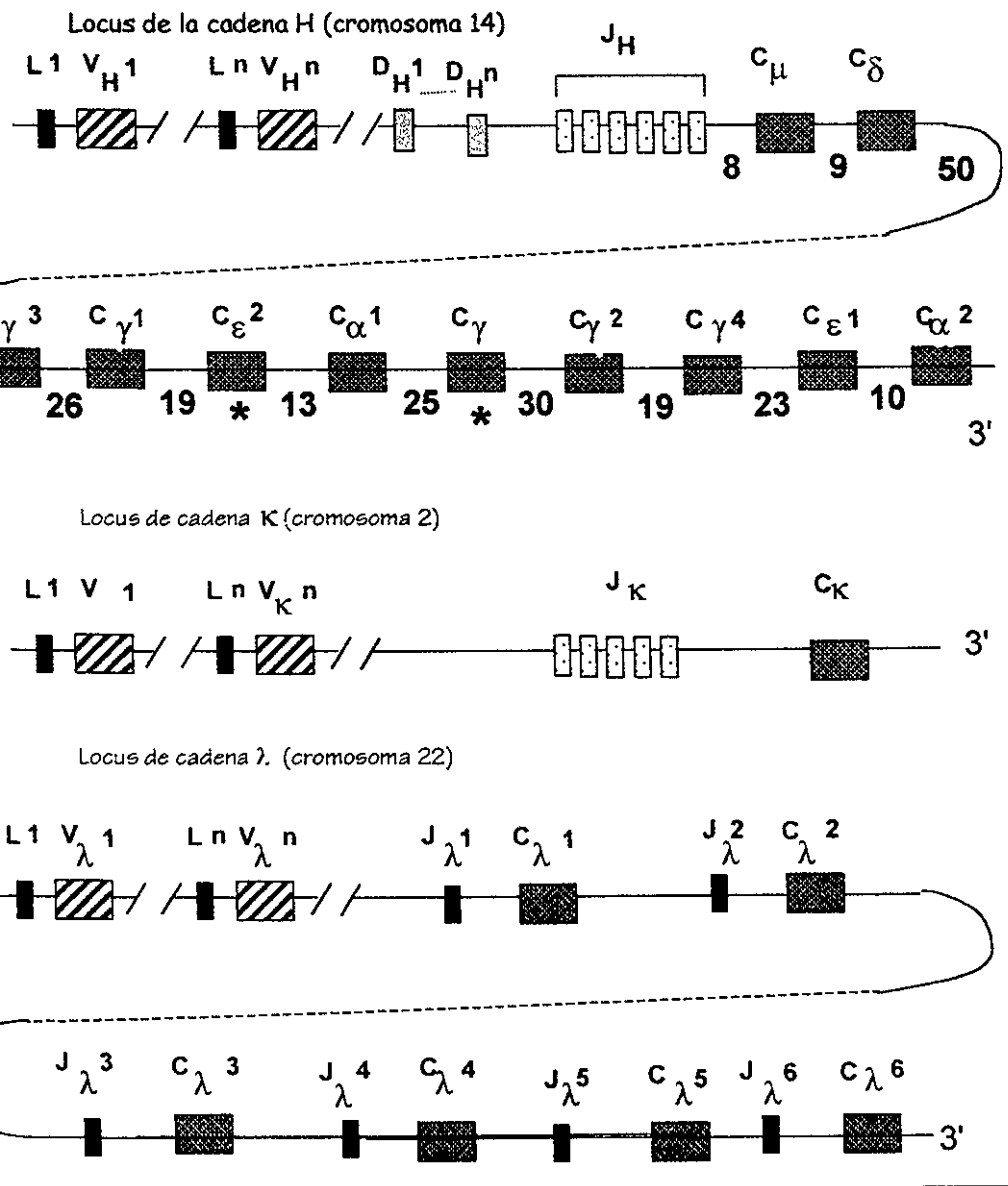


Figura 13.- Organización de los genes de Ig del humano en la línea germinal.

* Indican pseudogenes (40).

TABLA 5.- SEGMENTOS GENETICOS DE CADENAS LIGERAS Y PESADAS DE Ig (39, 45)

CADENA	CROMOSOMA	V	D	J	C
κ	2	100	-	5	1
λ	22	100	-	6	6
Pesada	14	200	20	6	11

- **Cadena pesada**

En el locus de la cadena pesada se lleva a cabo el primer rearreglo, e implica la unión VDJ
 vándose a cabo el mismo proceso que en el RCT, hasta la producción de la proteína (Fig. 14).

- **Cadena ligera**

El rearreglo de la cadena ligera se estimula por el rearreglo funcional de la cadena pesada. El
 mecanismo inicia con la unión VJ y posterior formación de la proteína, ésta cadena ligera se
 ensambla con la cadena pesada para formar la Ig (Fig. 15).

Regulación de la recombinación genética

Los rearreglos genéticos de Igs se producen por un mecanismo de formación de asas y su
 eliminación entre los segmentos genéticos, seguido de la unión de dichos segmentos. Al igual que el
 RCT, el mecanismo de recombinación está mediado por diferentes factores tales como las
 secuencias señal de reconocimiento, genes activadores de la recombinación y la enzima TdT (43,
 5).

Exclusión alélica

La primer cadena pesada que se forma es la cadena μ . Cuando el rearreglo es funcional en el
 primer alelo, se inhibe el rearreglo en el segundo alelo. Si el rearreglo en el primer alelo no es
 funcional, entonces se estimula el proceso en el segundo alelo. Si los dos alelos se rearreglan de
 manera no funcional, la célula probablemente morirá (Fig. 16).

La producción de la cadena μ puede estimular el rearreglo genético de la cadena ligera, el

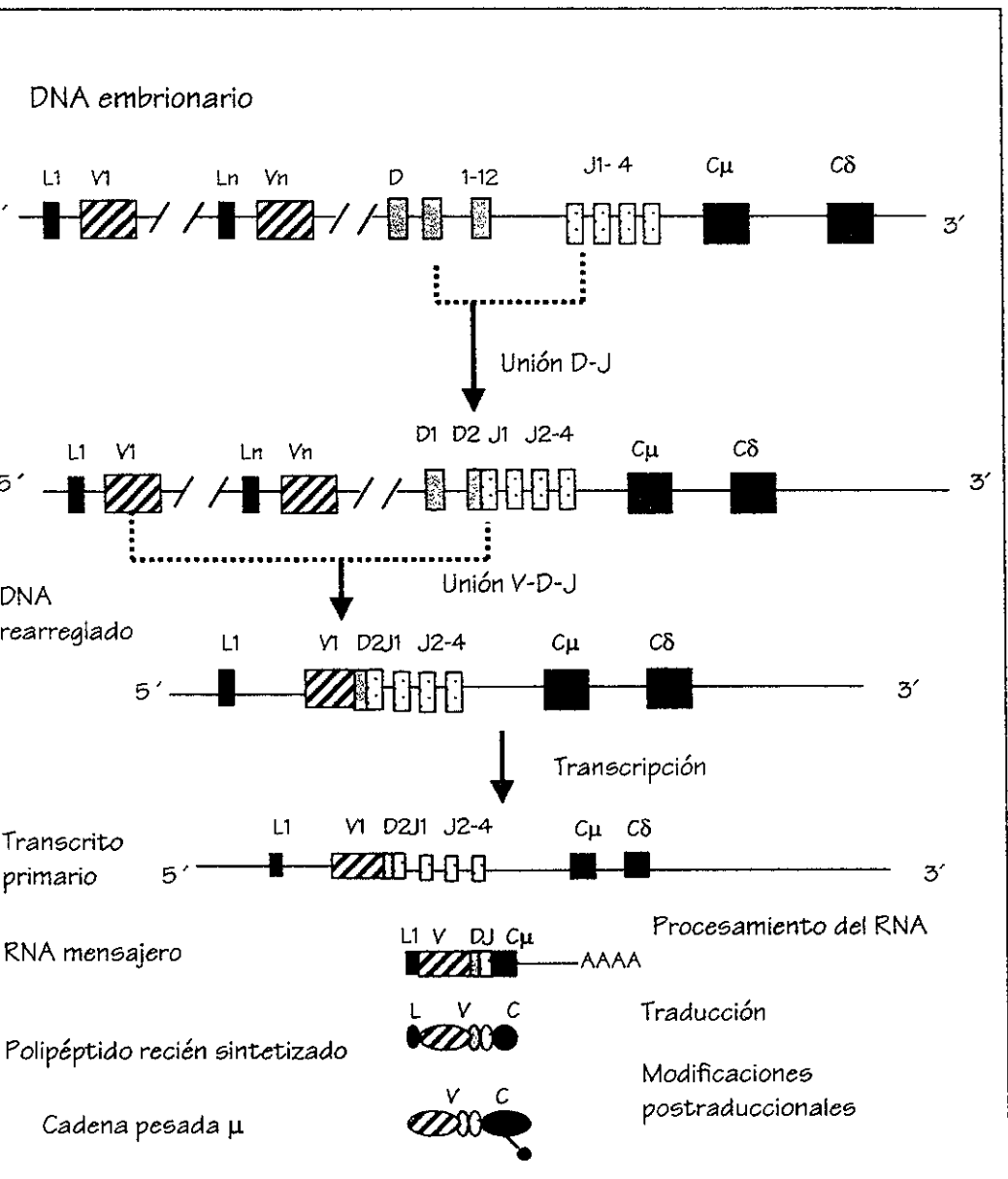


Figura 14.- Secuencia del rearrreglo de genes, transcripción y síntesis de la cadena pesada μ de Ig. V corresponde a los segmentos genéticos de la región variable, D de diversidad, J de unión y C de la región constante (40).

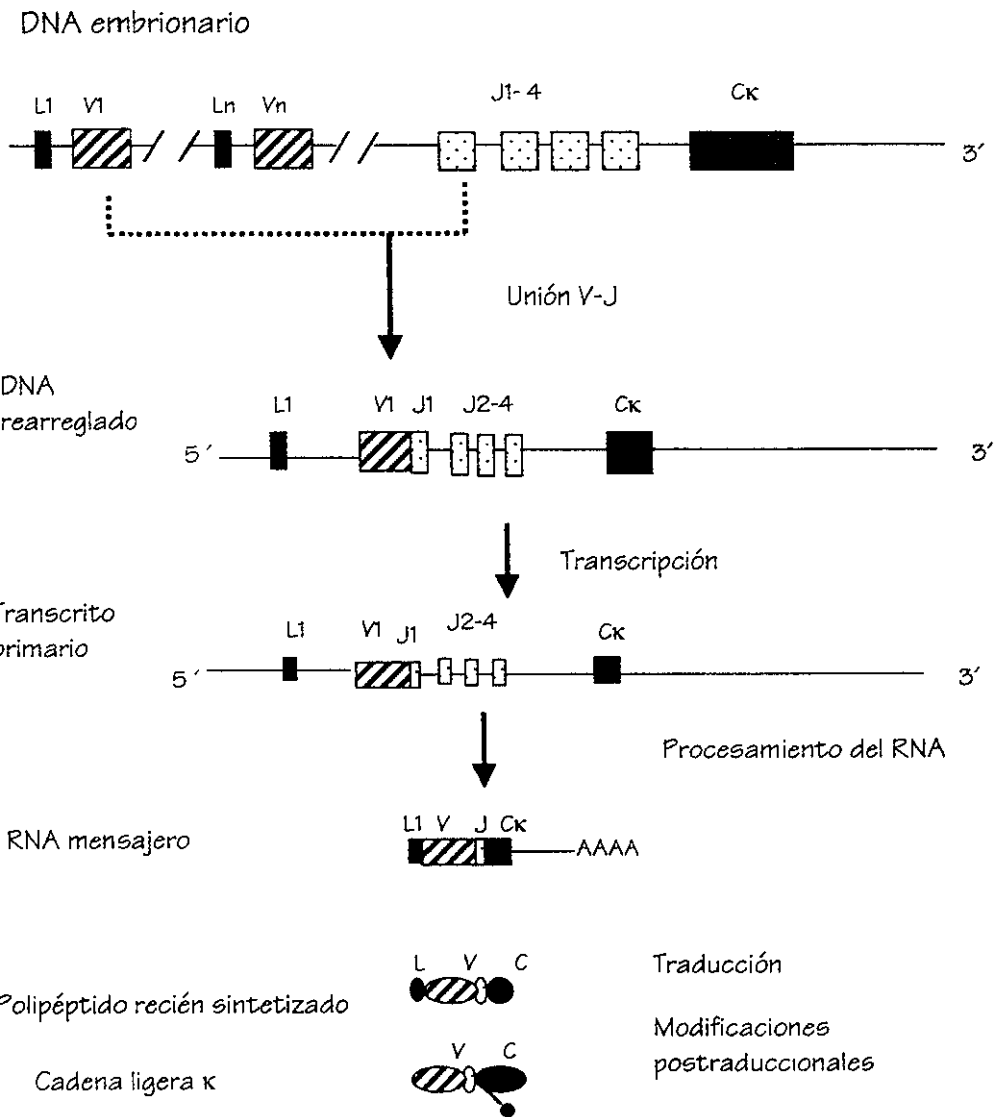


Figura 15.- Secuencia del rearreglo de genes, transcripción y síntesis de la cadena ligera κ de Ig (40).

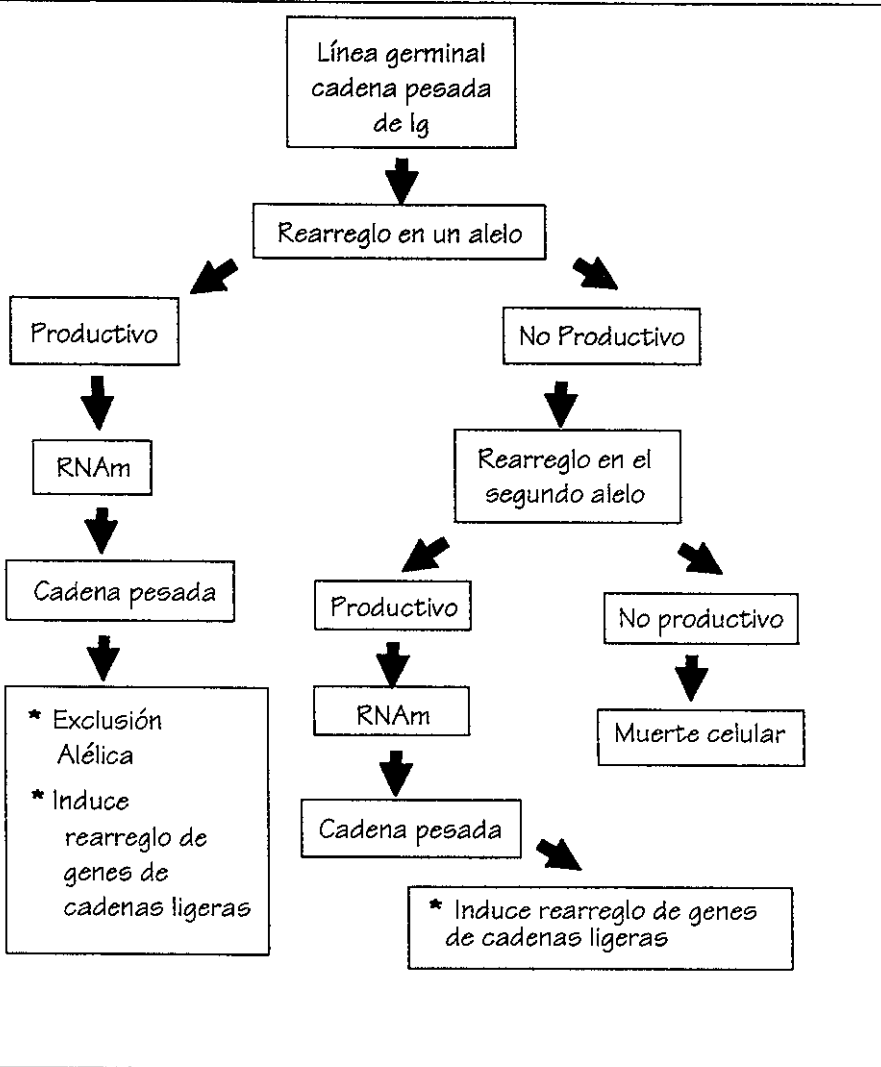


Figura 16.- Orden del rearrreglo y expresión de los genes de la cadena pesada de las Ig (39, 40).

al se produce primero en el locus de la cadena κ .

Si el rearreglo es funcional, entonces se inhibe o bloquea el rearreglo en el locus de λ . Si el rearreglo en los 2 alelos de las cadenas ligeras (κ o λ) no es funcional, la célula probablemente morirá (Fig. 17) (40, 45).

Generación del repertorio de Igs

Al igual que los linfocitos T, los linfocitos B utilizan una estrategia combinatoria para los rearreglos genéticos (44). El repertorio de Igs se produce mediante diferentes mecanismos:

Combinación al azar V(D)J (39, 44)

Secuencias variables de unión (44)

1) Unión imprecisa

2) Adición de nucleótidos

Combinación de las cadenas pesadas y ligeras (40)

Hipermutación somática:

Se lleva a cabo en los genes de la región variable de las células B que han sido activadas. Estas mutaciones pueden alterar la afinidad de unión al antígeno (maduración de la afinidad) en la molécula de Ig. Estas mutaciones son más frecuentes en una respuesta inmune secundaria; además las células B que tienen mayor afinidad por un antígeno van a ser seleccionadas por el mismo en forma más eficiente. Las células que sufren cambio de isotipo, así como las células de memoria, presentan mutaciones más numerosas. Dado que las mutaciones son al azar, en algunas

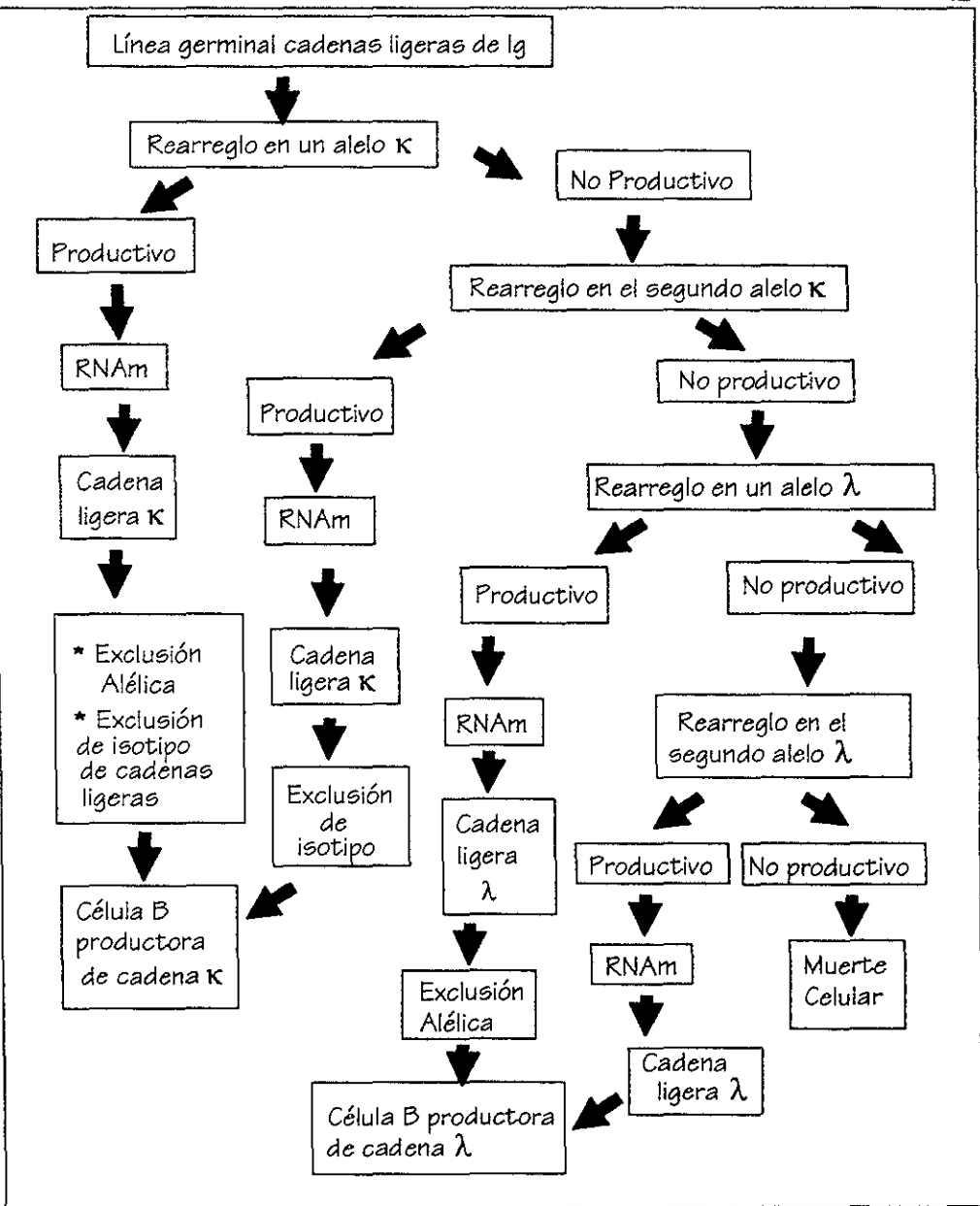


Figura 17.- Orden del rearreglo y expresión de los genes de la cadena ligera de Ig (39, 40).

Las células B se perderá la afinidad de unión al antígeno. Algunas de estas células no responderán al antígeno y morirán, mientras que otras adquieren afinidad por un antígeno diferente (40, 45).

Cambio de Isotipo:

Tras la estimulación antigénica, algunas de las células B maduras sufren un proceso de cambio de clase de la cadena pesada, lo que permite a la progenie producir Igs con cadenas pesadas de diferentes clases, como gama, alfa o epsilon. El mecanismo de cambio de isotipo es un proceso llamado recombinación de cambio, en el que el segmento genético VDJ rearrreglado se combina con un segmento genético de la región C situado en posición 3', eliminándose el DNA intermedio. De este modo, si los genes de C μ y C δ eran eliminados, el VDJ rearrreglado se uniría al siguiente complejo C, originando cadenas pesadas gama; la posterior eliminación de los siguientes segmentos genéticos de clase daría lugar a la producción de diferentes cadenas pesadas. Estas recombinaciones del DNA ocurren en o cerca de secuencias de nucleótidos llamadas regiones de cambio.

El cambio de isotipo no es un proceso aleatorio, sino que está regulado por las células T cooperadoras y sus citocinas (40, 46).

JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Una de las formas para empezar a esclarecer la patogenia de las lesiones en PA, es conocer la naturaleza de los infiltrados linfocitarios de las mismas con base a la presencia o ausencia de poblaciones clonales de linfocitos T o B.

OBJETIVO

Para conocer más sobre los mecanismos inmunes implicados en la enfermedad, en este trabajo se planteó el objetivo de utilizar métodos de genética molecular para establecer la presencia o ausencia de clonas de linfocitos y su estirpe celular en los infiltrados linfocitarios de muestras de lesiones en pacientes con PA.

Con base a lo anterior, se han detectado los genes que codifican tanto para la cadena beta del receptor para antígeno de la célula T (RCT beta), como los genes que codifican para la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

HIPOTESIS

Si dentro de las lesiones desarrolladas en pacientes con PA existen poblaciones clonales de células T y/o B, entonces se detectarán rearrreglos genéticos para el RCT y/o los genes que codifican para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

MÉTODOS

Muestras y controles

Se obtuvieron biopsias de labio inferior de 11 pacientes con Prurigo Actínico (PA). De dos de los pacientes fué posible obtener además biopsia de conjuntiva. Los tejidos fueron almacenados inmediatamente a -70°C hasta su procesamiento.

Los controles utilizados fueron los siguientes: tejido no linfoide (testículo y riñón). Una línea celular de estirpe T (Hut-102), y otra de estirpe B (OCY-L43). Estas líneas presentan rearrreglos genómicos para RCT y para la región J de las cadenas pesadas de las Ig (JH) respectivamente.

Procedimiento general

Una de las formas para localizar secuencias particulares en el DNA genómico es la técnica de transferencia descrita por Southern en 1975 (47).

Cada muestra de DNA genómico es fragmentada con una enzima de restricción; los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en geles de agarosa. El DNA es desnaturalizado *in situ* y transferido del gel a un soporte sólido (usualmente filtros de nitrocelulosa o membranas de nylon).

Las posiciones de los fragmentos de DNA son preservados durante su transferencia al filtro. El DNA unido al filtro es hibridado con DNA o RNA marcado radiactivamente (sondas

radiactivas que contienen secuencias de interés, clonadas en vectores y mantenidas en cepas bacterianas). Mediante autorradiografía se localizan las posiciones de los fragmentos homólogos a la sonda (Fig. 1B).

El método es lo suficientemente sensible para detectar menos de 0.1 pg de DNA homólogo a la sonda que ha sido marcada radiactivamente con ^{32}P dATP a una actividad específica alta.

A continuación se describen en forma particular las técnicas que comprende el análisis tipo Southern (47-49), para lo cual se ha dividido en las siguientes fases o etapas:

Preparación de DNA genómico a partir de tejidos y líneas celulares

Preparación de DNA de plásmido

Restricción, electroforesis y transferencia del DNA de controles y muestras de PA.

Marcado de DNA de doble cadena utilizando el fragmento Klenow¹ de la DNA Polimerasa I de *E. coli*

Separación de DNA marcado radiactivamente de precursores no incorporados mediante cromatografía en columna

Hibridación y autorradiografía

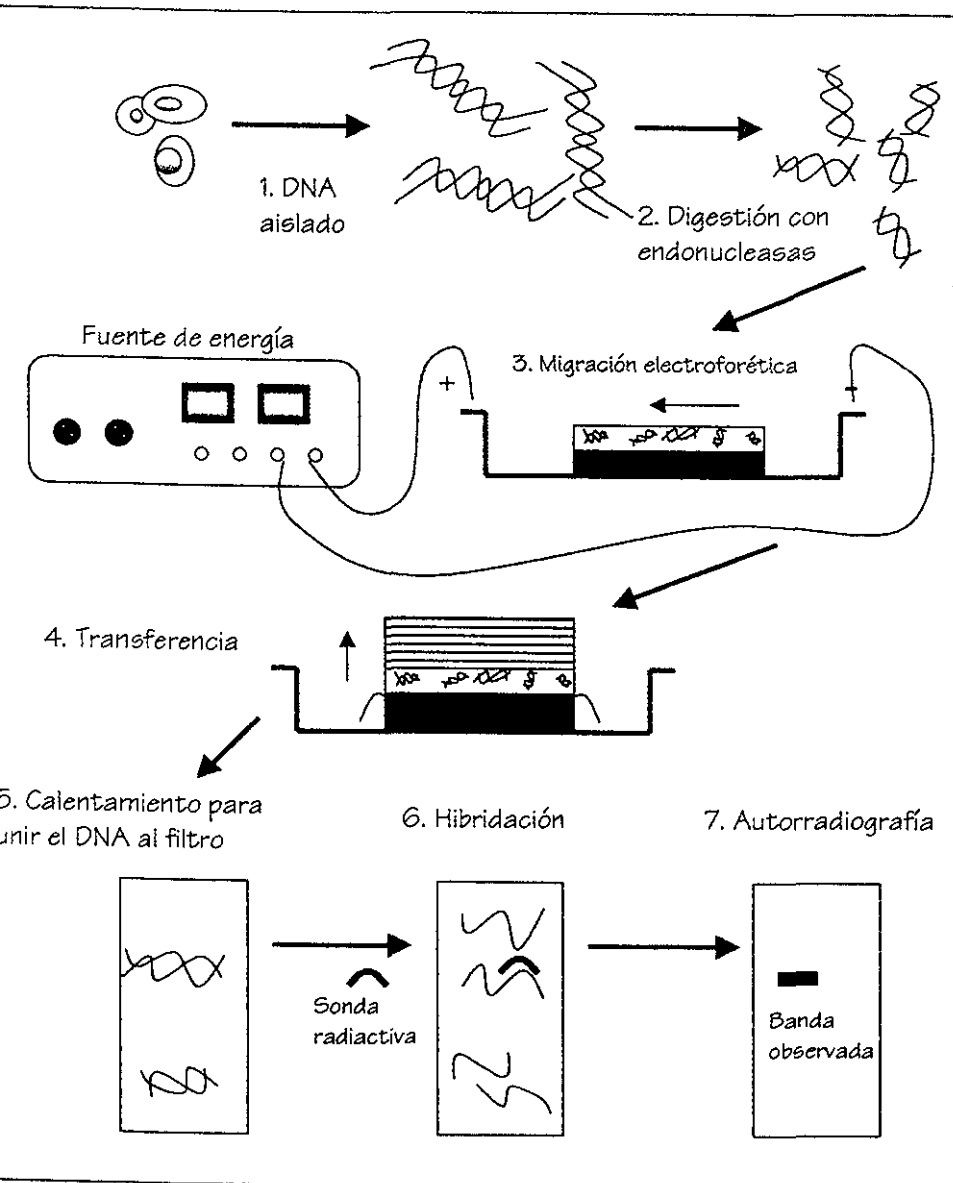


Figura 18.- Esquema de la estrategia utilizada para el análisis genético de secuencias por hibridación tipo Southern (40, 47)

Preparación de DNA genómico a partir de tejidos y líneas celulares (48, 49)

La aplicación de técnicas de genética molecular al análisis del genoma depende en gran parte de la capacidad para preparar DNA de alto peso molecular. El método de obtención consiste en 2 partes: una técnica para lisis de las células y solubilizar el DNA, seguido de técnicas químicas o enzimáticas para remover proteínas contaminantes, RNA y otras macromoléculas.

El método se describe a continuación:

- 1.- Las muestras de tejido fueron congeladas inmediatamente a -70°C .
- 2.- Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 10 % de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales y antibióticos. Se incubaron en una atmósfera con CO_2 al 5 % y a una temperatura de 37°C . Las células en suspensión fueron recuperadas centrifugando a $600 \times g$, durante 10 minutos y se realizaron dos lavados con solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS, "Preparación de Soluciones").
- 3.- Tanto el tejido como las células se resuspendieron en solución amortiguadora de lisis (1.2 ml por cada 100 mg de tejido; 1 ml para un cultivo de células en botellas de 250 ml, "Preparación de Soluciones"). Se añadió proteinasa K a una concentración final de $50 \mu\text{g/ml}$ ("Preparación de Soluciones"). El tejido procesado fue incubado en esta solución de lisis y proteinasa K para degradar la mayor cantidad de proteínas celulares.
- 4.- Se realizaron tres extracciones orgánicas, volumen a volumen: la primera extracción con fenol saturado con triis, la segunda con fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (1:1), y la tercera con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) ("Preparación de Soluciones").
- 5.- El DNA fue recuperado por precipitación con alcohol etílico absoluto frío a 20°C (2.5

volúmenes), y resuspendido en solución amortiguadora de Tris y EDTA (TE, "Preparación de Soluciones").

Las muestras de DNA se cuantificaron espectrofotométricamente a 260 nm en dilución 1:50. El criterio de pureza fué establecido con base a criterios espectrofotométricos.

Si la muestra es pura (p.ej. sin cantidades significativas de contaminantes tales como proteínas, fenol, agarosa u otros ácidos nucleicos), es posible la cuantificación espectrofotométrica de la cantidad de irradiación UV absorbida por las bases. Para realizar esta cuantificación, es necesario realizar lecturas a longitudes de onda de 260nm y 280nm. La lectura a 260nm permite calcular la concentración del ácido nucleico en la muestra. Una Densidad Optica (DO) de 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para DNA de doble cadena. El cociente entre las lecturas a 260nm y 280nm (DO_{260}/DO_{280}) provee una estimación de la pureza del ácido nucleico. Preparaciones puras de DNA tienen una proporción DO_{260}/DO_{280} alrededor de 1.8 . Para calcular la concentración de las muestras en µg/µl se tomó en cuenta el factor de dilución, la lectura a 260nm y la correlación antes mencionada para DNA de doble cadena (50 µg/ml) (48), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{dilución} \times \text{lectura D.O.}_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g}/\text{ml}}{1000}$$

Para obtener los µg totales fué necesario tomar en cuenta el volumen de TE en el cual había sido resuspendida la muestra.

I. Preparación de DNA de plásmido (48, 49)

En los experimentos realizados para la detección de secuencias tanto de genes que codifican para la cadena beta del receptor para antígeno de la célula T (RCT beta) como para la cadena pesada de las inmunoglobulinas (JH), se utilizaron los siguientes plásmidos:

TCRB-Hu.- Este plásmido contiene la región constante 2 de la cadena beta (Cbeta2) del receptor para antígeno de la célula T. Este segmento de 770 pb fué aislado de la línea celular Jurkat (Fig. 19) (50), y es capaz de unirse en forma específica tanto a la región constante 2 como a la 1 (Cbeta1 y Cbeta2). Se encuentra clonado en el sitio PstI del vector pBR322. Este plásmido contiene la secuencia que codifica para la resistencia a tetraciclina.

pHuJH(6KbBam-Hd3).- Este plásmido contiene la región J de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (JH). Esta región fue aislada de una biblioteca genómica de linfocitos humanos y es capaz de unirse en forma específica a la región J de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Se encuentra donado en los sitios BamHI e HindIII del vector pBR322. Codifica para resistencia a ampicilina transformando una cepa de *E. coli* C600. El inserto mide 6 Kpb (miles de pares de bases) de longitud (Fig. 20) (51).

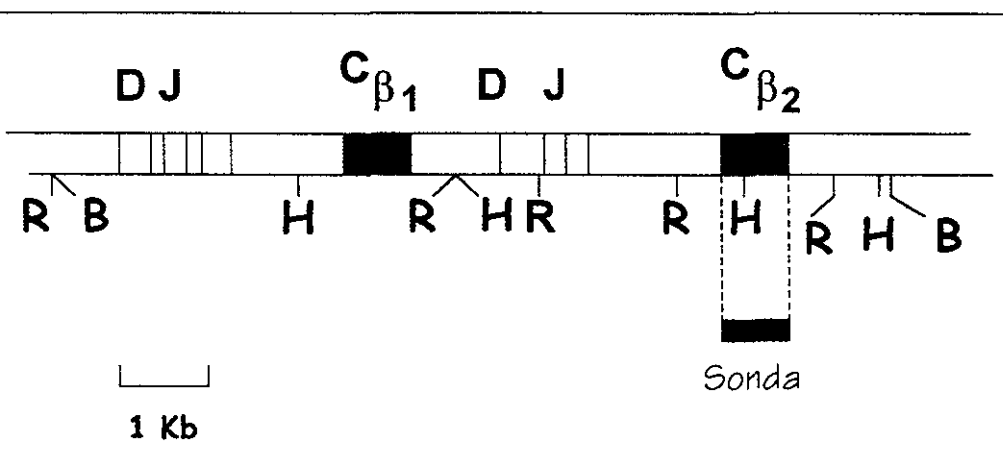


Figura 19.- Esquema del RCT β humano que muestra los sitios de corte para algunas enzimas de restricción (50). R: EcoRI; B: BamHI; H: HindIII.

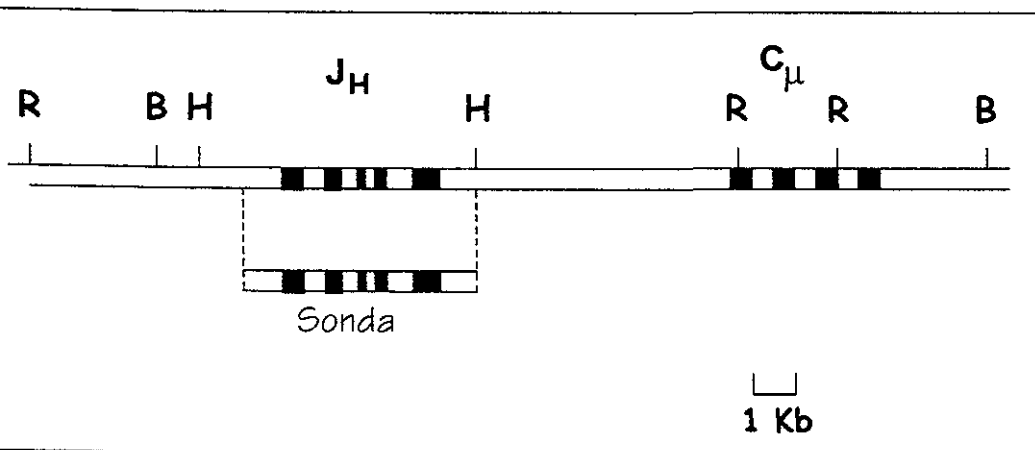


Figura 20.- Esquema de las cadenas pesadas de las Ig en donde se muestran los sitios de corte para algunas enzimas de restricción (51). R: Eco RI; B: BamHI; H: HindIII.

a) Transformación bacteriana

La mayoría de los métodos de transformación están basados en las observaciones de Mandel e Higa en 1970 (52), quienes demostraron que bacterias tratadas con soluciones de cloruro de calcio, podían ser transfectadas con DNA de bacteriófago lambda. El mismo método fue utilizado subsecuentemente para transformar bacterias con DNA de plásmido, y DNA cromosomal de *E. coli*.

Las células de *E. coli* son crecidas en fase logarítmica. Estas se concentran por centrifugación y son resuspendidas en una solución que contiene cloruro de calcio. La exposición a iones de calcio induce la permeabilización de la membrana permitiendo el paso de moléculas al interior de la célula, por lo que se presenta un estado de competencia. El DNA de plásmido es mezclado con las células para entrar en contacto con ellas. La mezcla de DNA y células se somete a un choque térmico, el cual permite que el DNA entre a las células eficientemente. Las células son crecidas en medio selectivo que contiene el antibiótico adecuado, el cual permite el crecimiento de aquellas bacterias que han incorporado el DNA de plásmido (48, 49).

* Preparación de células competentes (48)

- 1.- Se crecieron bacterias *E. coli* (cepa C600) en un tubo que contenía medio BHI estéril sin antibiótico ("Preparación de Soluciones"), a 37 °C durante toda la noche.
- 2.- Se tomaron 300 µl del tubo anterior y se sembraron en 30 ml de medio BHI estéril.
- 3.- Se incubó con agitación lenta a 37 °C durante 2 horas con 15 minutos exactos. Se

realizaron lecturas a diferentes tiempos en un fotocolorímetro (a una longitud de onda de 550 nm) hasta que el cultivo alcanzó una D.O.=0.5 (aproximadamente una densidad de 5×10^7 células por mililitro).

- 4.- Se incubó en hielo durante 10 minutos, y posteriormente se centrifugó a 600 xg/10 min, el sobrenadante se desechó.
- 5.- Se adicionaron 15 ml CaCl_2 50mM - Tris 10mM pH=8.0 ("Preparación de Soluciones"), y se incubó en hielo durante 15 minutos.
- 6.- Se centrifugó a 600 xg/10 min, y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de CaCl_2 -Tris y la suspensión se distribuyó en alícuotas de 200 μl .
- 7.- Se incubó a 4 °C toda la noche.

* Transformación de las células competentes (48, 49)

- 8.- El DNA del plásmido se adicionó en una cantidad de 40 a 150 ng por 200 μl de células competentes.
- 9.- Se incubó en hielo durante 30 minutos, al término de este tiempo se incubó a 42 °C durante 2 minutos exactos.
- 10.- Se adicionaron 500 μl de medio BHI estéril sin antibiótico y se incubó a 37 °C durante 1 hora.
- 11.- 100 μl de éste tubo se sembraron en una caja con medio BHI con el antibiótico adecuado. Se incluyeron controles sin antibiótico, con antibiótico diferente al utilizado, y con un plásmido diferente con antecedentes de óptima transformación.

b) Aislamiento y purificación de DNA de plásmido (48, 49)

Los plásmidos utilizados fueron aislados y purificados mediante la siguiente estrategia:

- 1.- En 25 ml de medio de cultivo BHI se agregó la cantidad necesaria de antibiótico para el cual las bacterias transformadas son resistentes:

pHuJH : Ampicilina resistente, 35-50 $\mu\text{g/ml}$

pTCRB-Hu: Tetraciclina resistente, 15-30 $\mu\text{g/ml}$

("Preparación de Soluciones")

- 2.- Se sembró la cepa que contenía el plásmido y se incubó toda la noche a 37 °C.
- 3.- Esta suspensión de bacterias se centrifugó a 2200 $\times\text{g}/10$ min y se desechó el sobrenadante.
- 4.- Se adicionaron 5 ml de NaCl 10mM ("Preparación de Soluciones"), y se centrifugó nuevamente a 2200 $\times\text{g}/10$ min. Se desechó el sobrenadante.
- 5.- La pastilla se resuspendió en 0.6 ml de Solución I (Tris 1M pH 8.0, EDTA 0.25M, "Preparación de soluciones"); y se incubó en hielo durante 20 minutos.
- 6.- Se adicionaron 1.2 ml de Solución II (NaOH 0.2M, SDS 1 %, "Preparación de Soluciones"); se mezcló y se incubó en hielo durante 10 minutos.
- 7.- Se agregaron 0.75 ml de Acetato de potasio 3M pH 4.8, se mezcló y se incubó en hielo 20 minutos. ("Preparación de Soluciones").
- 8.- Posteriormente se centrifugó a 10000 $\times\text{g}/15$ min y se recuperó el sobrenadante.

- 9.- Se adicionó ribonucleasa (RNAasa) al sobrenadante a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la cual se trató previamente con calor en un baño maría hasta ebullición durante 10 minutos, y se colocó inmediatamente en hielo para utilizarla posteriormente ("Preparación de Soluciones).
- 10.- Se incubó a 37 °C durante 1 hora
- 11.- Se realizaron tres extracciones orgánicas volumen a volumen: la primera con Fenol saturado con Tris, la segunda con Fenol:Cloroformo-Alcohol Isoamílico, y la tercera con Cloroformo-Alcohol Isoamílico.
- 12.- En cada extracción se centrifugó a 800 $\text{xg}/10$ min, recuperando la fase acuosa en donde se encontraba el DNA.
- 13.- Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el DNA, a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 14.- Se centrifugó durante a 3000 $\text{xg}/15$ min. La pastilla se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar.
- 15.- La pastilla seca se resuspendió en 160 μl de TE pH 7.5 y se adicionaron 40 μl de NaCl 4M y 200 μl de Polietilenglicol 8000 (PEG 8000) al 13 % .
- 16.- Se incubó en hielo durante 1 hora, y se centrifugó a 8000 xg durante 10 minutos.
- 17.- El sobrenadante se eliminó, la pastilla se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar.
- 18.- Se resuspendió en 50 μl de TE pH 7.5 y se almacenó a 4 °C para uso posterior.

c) Aislamiento y purificación del inserto (48, 49)

El DNA de plásmido fue fragmentado con enzimas de restricción con el propósito de obtener el fragmento clonado (inserto) del gen en estudio. Para lo cual se utilizaron las enzimas correspondientes con las cuales se aisló el inserto del vector como se muestra en la Tabla 6.

- 1.- Se adicionó 1 U de enzima (Amersham, tipo II) por cada μg de DNA y la solución amortiguadora correspondiente, como se recomienda por el fabricante.
- 2.- Se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche.
- 3.- Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de una alícuota pequeña (aproximadamente $1/10$ del volumen) para verificar si la enzima fragmentó al DNA de plásmido separando al inserto del vector (digestión completa).

Una vez que se observó el inserto en el gel, se procedió a la purificación del mismo para que quedara libre de sales, proteínas, y del propio vector. Esto se llevó a cabo mediante un método que consiste en la unión del DNA a una matriz de sílica y posteriormente ser recuperado en una solución amortiguadora (equipo "Gene Clean", Bio101) (53). A continuación se describe dicho método:

- 4 - En el gel se cortó la banda correspondiente al inserto, se pesó y se adicionaron 3 volúmenes de NaI (solución saturada, incluida en el equipo), incubándose a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos

TABLA 6. - SITIOS DE CLONACION

Vector	Plásmido	Sitios de clonación	Tamaño vector	Tamaño inserto	Ref.
pBR322	TCR β -Hu	PstI-PstI	4.3Kpb	0.77 Kpb	50
pBR322	HuJH	BamHI-HindIII	4.3Kpb	6.0 Kpb	51

- 5.- Se adicionó la matriz de sílica ("Glassmilk") en proporción de 1 μ l por cada μ g de DNA. Se incubó en hielo.
- 6.- Se agitó constantemente durante 5 minutos, se centrifugó a 8000 xg/5 seg y se eliminó el sobrenadante.
- 7.- La pastilla se lavó 3 veces con 500 μ l de solución de lavado (NaCl, etanol, agua; proporcionada en el juego de reactivos). Se centrifugó a 8000 xg/5 seg y se desechó el sobrenadante.
- 8.- Se disolvió la pastilla en TE pH 7.5 en un volumen igual al de la matriz de sílica.
- 9.- Se incubó a 45-55 °C durante 2 a 3 minutos y se centrifugó a 8000 xg/30 seg.
- 10.- Se recuperó el sobrenadante el cual contenía al DNA, y se almacenó a 4 °C.

III. Restricción, electroforesis y transferencia del DNA de controles y muestras de PA (48, 49)

a) Digestión con enzimas de restricción y electroforesis

- 1.- Se utilizaron 10 μ g de muestra de DNA para digerir con 30 U de enzima de restricción (BamHI, EcoRI o HindIII; y sus correspondientes soluciones amortiguadoras, "Preparación de Soluciones"). Se incubó a 37 °C toda la noche.
- 2.- Las muestras para la electroforesis se prepararon agregando colorante ("Preparación de Soluciones") a una concentración final de 10 % v/v.

- 3.- Se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 0.8 %, con una solución amortiguadora de TPE ("Preparación de Soluciones"). Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes: 20 V, temperatura ambiente, durante toda la noche.
- 4.- El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio ("Preparación de Soluciones") se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (242 nm) para verificar el desplazamiento de las muestras con referencia a un marcador de peso molecular,

El marcador de peso molecular utilizado fue DNA del fago lambda digerido con la enzima HindIII. Las bandas observadas corresponden a los siguientes pesos moleculares expresados en Kpb: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, 0.5

b) Transferencia

Las muestras contenidas en el gel de agarosa fueron transferidas a un filtro de nitrocelulosa con soporte de nylon (Hybond C-extra, Amersham) de la siguiente manera:

- 1.- El gel se colocó en solución desnaturizante, ("Preparación de Soluciones"). Se agitó lentamente por lapso de 1 hora a temperatura ambiente.
- 2.- La solución desnaturizante fué desechada, y el gel se lavó 3 veces con agua desionizada.
- 3.- El gel se colocó en solución neutralizante ("Preparación de Soluciones"), y se agitó lentamente 1 hora a temperatura ambiente.

4.- La solución neutralizante se eliminó y el gel se lavó 3 veces con agua desionizada.

5.- La transferencia se realizó por capilaridad con la solución amortiguadora de transferencia (SSC 10X, "Preparación de Soluciones"), mediante un puente de papel Whatman 1MM en el que se colocó el gel y el filtro de nitrocelulosa (Ver Fig. 18).

6.- Los filtros de nitrocelulosa fueron de 0.45 μ de diámetro del poro.

El puente de papel Whatman permitió que la solución salina estableciera un flujo de abajo hacia arriba desplazando al DNA que se encontraba en el gel de agarosa hacia el filtro de nitrocelulosa, en el cual se adhirió con base a su carga negativa.

7.- Se transfirió durante 24 horas. Al término de este tiempo, el filtro de nitrocelulosa se horneó a 80 °C por 2 horas. De esta manera el filtro quedó listo para llevar a cabo la hibridación tipo Southern.

V. **Marcado de DNA de doble cadena utilizando el fragmento "Klenow" de la DNA Polimerasa I de *E. coli* (48, 49)**

Para marcar radiactivamente el inserto aislado del vector de clonación se utiliza una reacción enzimática la cual involucra el uso de un fragmento de la DNA polimerasa I de *E. coli*. A este fragmento se le ha denominado fragmento "Klenow". Este fragmento, de 76,000 D de peso

molecular, representa el 70 % de la DNA polimerasa de *E. coli*, la cual retiene la actividad de exonucleasa 3' → 5', perdiendo solo la actividad de exonucleasa 5' → 3'.

Esta enzima se utiliza en combinación con secuencias de 6 nucleótidos los cuales se unen inespecíficamente en diferentes regiones del inserto, para obtener DNA uniformemente marcado con una alta actividad específica.

1.- El inserto previamente purificado se incubó en la siguiente mezcla de reacción:

30 a 100 ng de DNA de interés

1 a 5 µg de hexanucleótidos (pequeñas secuencias de nucleótidos las cuales al ser homólogas a secuencias en el DNA templado, servirán como iniciadores para el fragmento "Klenow" de la DNA pol I)

Agua desionizada estéril para un volumen final de 14 µl

2.- Se incubó a ebullición durante 3 min, colocando inmediatamente en hielo durante 5 minutos.

3.- Se añadió la siguiente mezcla de reacción:

2.5 µl de una solución 0.5 mM de una mezcla de deoxinucleótidos (dGTP, dCTP, dTTP), excepto el nucleótido marcado radiactivamente (dATP).

2.5 µl de solución amortiguadora para la enzima concentrada 10 veces (10X)

5 µl de α -³²PdATP 3000 Ci/mmol (50 µCi)

1 µl de enzima (3 - 8 U)

4.- Se mezcló, y se incubó a temperatura ambiente de 16 a 18 horas.

5.- La reacción se detuvo añadiendo 2 µl de EDTA 0.25 M. Se adicionaron 100 µl de TE.

6.- El DNA marcado se separó de los precursores no incorporados mediante una cromatografía en una columna (de 1 ml aproximadamente de volumen) de Sephadex G-50 como se describe a continuación:

V. Separación de DNA marcado radiactivamente de precursores no incorporados mediante cromatografía en columna (48, 49)

- 1.- Se colocó una cama de lana de vidrio en el fondo de una jeringa de 1 ml.
- 2.- Se llenó la jeringa con una suspensión de Sephadex G-50-300 (Sigma, "Preparación de Soluciones"), hasta la parte superior.
- 3.- Se colocó en tubo de ensayo (de preferencia Corex) de 15 ml y se empacó la columna centrifugando a 300 xg durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Se desechó la solución amortiguadora recibida en el tubo de ensayo y se colocó un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml sin tapa de tal manera que la punta de la jeringa se encontraba dentro de este tubo.
- 5.- Se colocó la muestra radiactiva ya diluída con TE en la columna de Sephadex.
- 6.- Se centrifugó a 300 xg/ 5 min a temperatura ambiente, recuperando el DNA marcado radiactivamente en el tubo para microcentrífuga.
- 7.- Con ayuda de un contador Geiger se calculó el porcentaje de incorporación (se acepta que una buena incorporación es del 65 al 80 %).

- El inserto marcado radiactivamente se utilizó para experimentos de hibridación.

I. Hibridación y autorradiografía (47-49)

Los experimentos de hibridación se realizaron a 42 °C en una solución que contenía formamida al 50 %, siendo ésta una condición de hibridación menos severa para los filtros en comparación con la hibridación a 68 °C en solución acuosa. Aunque la presencia de formamida reduce la cinética de hibridación, no se han reportado desventajas o problemas para la obtención de resultados. Por otro lado, se utilizan frecuentemente diferentes tipos de agentes para bloquear la hibridación inespecífica de la sonda a la superficie del filtro. Dentro de estos agentes bloqueadores podemos mencionar a la solución de Denhardt ("Preparación de Soluciones"), la heparina y la leche en polvo descremada. Estos agentes son utilizados en combinación con DNA desnaturalizado de esperma de salmón y detergentes como el SDS ("Preparación de Soluciones"). Con esta combinación se logra eliminar eficientemente la hibridación inespecífica. Además, para optimizar el alineamiento de la sonda con su blanco, las hibridaciones se llevan a cabo en soluciones de fuerza iónica alta (SSC 6X o SSPE 5X, "Preparación de Soluciones"). Cuando se utiliza formamida se prefiere usar SSPE 5X, debido a su gran efectividad como amortiguador. Después de llevada a cabo la hibridación, se utilizaron condiciones estrictas de lavado utilizando una combinación de temperatura y concentración de sal. Estas condiciones usualmente se determinan en forma empírica (48).

a) Prehibridación

- 1.- El filtro de nitrocelulosa obtenido en la transferencia tipo Southern se sumergió en una solución de SSC 6X durante 2 minutos.
- 2.- Posteriormente, el filtro se colocó en una bolsa en la cual se adicionó la solución de prehibridación (0.2 ml por cada cm^2 de filtro).

La solución de prehibridación consiste en lo siguiente:

50 % de Formamida

SSPE 5X

Solución de Denhardt 5X

0.5 % de SDS

DNA de Salmón (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

H₂O estéril

("Preparación de Soluciones")

- 3.- Se selló completamente la bolsa y se eliminaron las burbujas de aire presentes. Se incubó a 42 °C toda la noche.

b) Hibridación

- 1.- Al término de la incubación, se eliminó una parte de la solución de prehibridación de tal manera que quedaron 0.05 ml por cada cm^2 del filtro.

- 2.- Se adicionó EDTA a una concentración final de 3 mM ("Preparación de Soluciones").
- 3.- Se agregó la sonda radiactiva y se mezcló. Se incubó a 42 °C de 24 a 48 h.

c) Autorradiografía

- 1.- Se desechó la solución que contenía la bolsa al término del tiempo de incubación.
- 2.- El filtro de nitrocelulosa se lavó 2 veces durante 15 minutos a temperatura ambiente con una mezcla de SSC 2X y SDS 0.1 %.
- 3.- Se efectuaron 2 lavados más con SSC 0.1X y SDS 0.1 % de 30 minutos cada uno a 55 °C.
- 4.- El filtro de nitrocelulosa se colocó en plástico autoadherible cuidando de no dejar secar completamente.

NOTA: Los siguientes pasos se realizaron en un cuarto oscuro.

- 5.- En un casete para placas de rayos X, se colocó una placa de radiografía y sobre ésta el filtro de nitrocelulosa.
- 6.- Se incubó de 3 a 5 días a -70 °C. Al término del tiempo de exposición la placa se reveló. Los resultados de las muestras se analizaron comparando con los controles. La presencia de bandas adicionales sugieren un rearrreglo genético (Fig. 21).

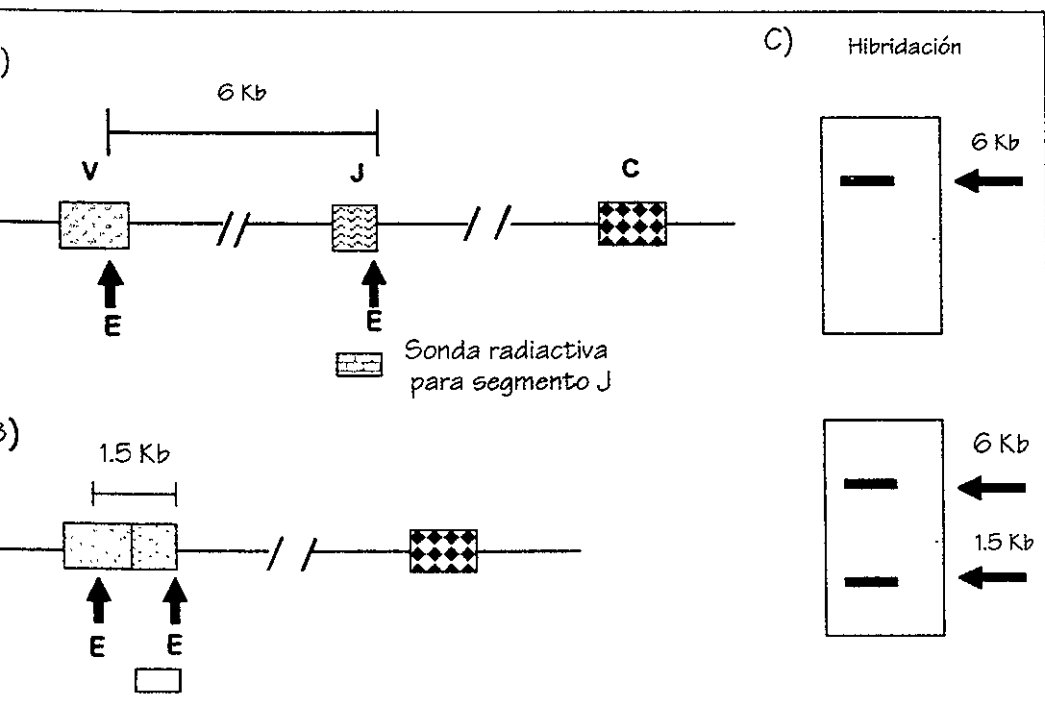


Figura 21.- Ejemplo de la detección de rearrreglos (40). A) Versión germinal de los segmentos V y J. E: Enzima de restricción. B) Versión hipotética de un rearrreglo genético. C) En la hibridación se muestra el patrón de bandas detectadas.

PREPARACION DE SOLUCIONES (48, 49)**ACETATO DE POTASIO (5 M)**

Se preparó una solución de acetato de potasio 5 M, se pesaron 58.88 g de acetato de potasio y se disolvieron en 120 ml de agua bidestilada.

ACETATO DE SODIO (3 M)

Se preparó una solución 3M de Acetato de sodio, se pesaron 408.1 g de Acetato de Sodio y se disolvieron en 800 ml de agua bidestilada. Se ajustó a pH 5.2 con ácido acético glacial, se ajustó a 1 L y se esterilizó en autoclave.

ACETATO DE SODIO (5 M), POTASIO (3 M)

Se preparó una solución 5 M acetato, 3 M potasio de la siguiente manera:

120 ml de acetato de potasio 5M

11.5 ml Acido acético glacial

20 ml agua bidestilada

Se ajustó a pH 4.8, se aforó a 160 ml , se esterilizó en autoclave.

ACIDO ETILEN-DIAMINOTETRA-ACETICO (EDTA 0.5 M, pH 8.0)

Se pesaron 168.1 g de EDTA dihidratado y se disolvieron en 800 ml de agua bidestilada, se agregaron algunas lentejas de hidróxido de sodio para alcalinizar un poco el medio y facilitar la disolución del EDTA, se ajustó a pH 8.0, se aforó a 1 L y se esterilizó en autoclave.

AMPICILINA (10 mg/ml)

Se preparó una solución de Ampicilina a una concentración de 10 mg/ml en agua bidestilada, se esterilizó por filtración y se almacenó en alícuotas a - 20 °C. Concentración de trabajo: 35-50 µg/ml.

BROMURO DE ETIDIO (10 mg/ml)

Se preparó una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml.

Se pesó 1 g de bromuro de etidio y se disolvió en 100 ml de agua bidestilada, se agitó durante varias horas hasta su disolución. Se envasó en frasco ámbar y se almacenó a 4 °C.

CITRATO DE SODIO SALINO (SSC 20X, pH 7.0)

Para 3 L se pesaron 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio, se disolvieron en 2.4 L de agua bidestilada. Se ajustó a pH 7.0, se aforó a 3 L y se esterilizó en autoclave.

CLOROFORMO:ALCOHOL ISOAMÍLICO

Se preparó una solución con 24 volúmenes de cloroformo por cada volumen de alcohol isoamílico.

CLORURO DE CALCIO-TRIS (CLORURO DE CALCIO 50 mM; TRIS-Cl pH 8.0 10 mM)

Se preparó una solución de cloruro de calcio 50 mM, Tris-Cl pH 8.0 10 mM en agua bidestilada. Se esterilizó en autoclave

CLORURO DE MAGNESIO (1 M)

Se preparó una solución de cloruro de magnesio a una concentración 1 M, se pesaron 203.3 g de cloruro de magnesio hexahidratado, se disolvieron en 800 ml de agua bidestilada, se aforó a 1 L y se esterilizó en autoclave.

CLORURO DE SODIO 5 M

Se preparó una solución 5 M de cloruro de sodio, se pesaron 292.2 g de cloruro de sodio y se disolvieron en 800 ml de agua bidestilada aforando a 1 L.

COLORANTE PARA MUESTRAS

La preparación del colorante para muestras se realizó de la siguiente manera:

Xilen Cianol	0.25 %
Azul de Bromofenol	0.25 %
Glicerol	50 %
Tris pH 8.5	0.1 M
EDTA pH 8.0	0.06 M

Todo disuelto en agua

DNA DESNATURALIZADO DE ESPERMA DE SALMON (10 mg/ml)

Se pesaron 100 mg de DNA de esperma de salmón (Sigma, tipo III de la sal de sodio). Se agitó de 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Se rompió por pasaje en jeringa con aguja delgada

varias veces. Se llevó a ebullición durante 10 minutos en baño maría y se almacenó en alícuotas a -20°C . Antes de utilizarse, se llevó a ebullición de 5 a 10 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo.

DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS pH 7.2)

Se preparó una solución de SDS al 10 %, se pesaron 10 g de SDS y se agregaron 90 ml de agua bidestilada. Se calentó a 68°C para disolver, se ajustó a pH 7.2 y se aforó a 100 ml.

FENOL SATURADO CON TRIS-Cl pH 8.0

Se utilizó fenol ultrapuro redestilado (grado biología molecular). El fenol se calentó hasta disolverse, se añadieron 500 ml de Tris base 50 mM y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se dejó en reposo hasta separación de fases y se eliminó la fase acuosa (fase superior). Se añadieron 500 ml de Tris-Cl pH 8.0 50 mM, se mezcló y se separaron las fases; se eliminó la fase acuosa y se repitió hasta lograr un pH 8.0.

Posteriormente se añadieron 250 ml de TE (ver más adelante) y se almacenó a 4°C protegido de la luz (p. ej. en un frasco ámbar).

FORMAMIDA (DESIONIZADA)

Por cada 50 ml de Formamida se agregaron 5 g de resina de intercambio iónico (Bio-Rad AG501-XB). Se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se filtró y almacenó a -20°C .

MEDIO DE CULTIVO INFUSION CEREBRO-CORAZON (BHI)

Se pesaron 37 g de medio de cultivo (BIOXON) y se disolvieron en un litro de agua bidestilada, se esterilizó en autoclave. Para medio de cultivo sólido se pesaron 15 g de agar bacteriológico (BACTO-AGAR, DIFCO) por cada litro de medio de cultivo, se esterilizó en autoclave, se dejó enfriar a 50 °C, se añadió el antibiótico adecuado, y se distribuyó en placas de petri estériles. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C.

PROTEINASA K

Se preparó una solución de Proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml en agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20 °C, la concentración de trabajo es de 50 µg/ml, su temperatura de reacción es de 37 a 50 °C.

RIBONUCLEASA (LIBRE DE DESOXIRIBONUCLEASA)

Se disolvió ribonucleasa pancreática (RNAsa A) a una concentración de 10 mg/ml en Tris-Cl 10 mM (pH 7.5) y NaCl 15 mM. Se calentó a ebullición en un baño maría durante 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se guardó en alícuotas a -20 °C. Concentración de trabajo: 50 µg/ml.

SEPHADEX G-50

Se añadieron 30 g de Sephadex G-50 (SIGMA) a 500 ml de TE pH 8.0 y se dejó a temperatura ambiente toda la noche. El sobrenadante se decantó y se reemplazó con un volumen igual de TE pH 8.0. Se almacenó a 4 °C en botella de tapón de rosca.

SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA DE FOSFATOS, pH 7.2 (PBS)

Se añadieron aproximadamente 500 ml de agua bidestilada a un vaso de precipitados de 2

L y se pesaron:

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Se mezcló hasta disolver y se añadió agua bidestilada hasta 900 ml, se mezcló de nuevo y se ajustó a pH 7.2, se aforó a 1 L y se esterilizó en autoclave.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE LISIS

Se preparó una solución en agua bidestilada con las siguientes concentraciones:

NaCl	100 mM
Tris pH 8.0	10 mM
Acido etilen-diamino	
tetra-acético (EDTA)	25 mM
Dodecil Sulfato de Sodio	0.5 %

Se esterilizó en autoclave.

SOLUCION AMORTIGUADORA PARA ELECTROFORESIS DE TRIS-FOSFATO-EDTA (TPE 10 X, pH 7.6-7.8)

Se preparó una solución de Tris-fosfato 0.08 M y EDTA 2 mM, 10 veces concentrada, de la siguiente manera:

Se pesaron 108 g de Tris base, se agregaron 800 ml de agua bidestilada, y se añadieron 15.5 ml de ácido fosfórico al 85 % y 80 ml de EDTA 0.25 M pH 8.0. Se ajustó a un pH entre 7.6 y 7.8, se aforó a un litro y se esterilizó en autoclave.

SOLUCION DESNATURALIZANTE (CLORURO DE SODIO 1.5 M; HIDROXIDO DE SODIO 0.5 M)

La solución desnaturalizante se preparó de la siguiente forma:

Para 3 L, se pesaron 262.98 g de cloruro de sodio, 60 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en 2.5 L de agua bidestilada, se aforó a 3 L y se esterilizó en autoclave.

SOLUCION DE DENHARDT (50 X)

Se pesaron 5 g de Ficoll tipo 400, 5 g de polivinilpirrolidona y 5 g de albúmina sérica bovina. Se disolvieron en 500 ml de agua bidestilada, se esterilizó por filtración y se almacenó en alícuotas a -20 °C.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIS-EDTA, pH 7.5 y pH 8.0 (TE)

Se preparó una solución:

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Se ajustó a pH 7.5, o bien a pH 8.0. Se esterilizó en autoclave

SOLUCION NEUTRALIZANTE pH 7.4 (Tris 1 M, NaCl 1.5 M)

Para 3 L se pesaron 363.3 g de Tris y 262.98 g de NaCl, se disolvieron en 2.8 L, se ajustó a pH de 7.4 y se esterilizó en autoclave.

SOLUCION SALINA DE FOSFATOS-EDTA (SSPE 20 X)

Se preparó una solución en agua bidestilada que contenía:

NaCl 3.6 M

NaH₂PO₄·H₂O 200 mM

EDTA 20 mM

Se ajustó a pH 7.4, se aforó a un litro y se esterilizó en autoclave.

SOLUCIONES PARA AISLAMIENTO DE PLASMIDOS POR LISIS ALCALINA**SOLUCION I:**

Glucosa 50 mM

Tris-Cl 25 mM (pH 8.0)

EDTA 10 mM (pH 8.0)

Se añadió lisozima en el momento de utilizarse.

SOLUCION II:

NaOH 0.2 N

SDS 1%

SOLUCION III:

Acetato de potasio 5M 60 ml

Acido acético glacial 11.5 ml

Agua bidestilada 28.5 ml

La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

SOLUCION AMORTIGUADORA PARA LA ENZIMA "KLENOW" (10 X)

Tris-Cl (pH 7.6) 0.125 M

MgCl₂ 0.025 M

TETRACICLINA

Se preparó una solución de tetraciclina a una concentración de 12.5 mg/ml disuelta en etanol-agua (50 % v/v). Se esterilizó por filtración y se almacenó a -20 °C en oscuridad.

Concentración de trabajo: 15-30 µg/ml.

RESULTADOS

I. **Recolección de muestras**

Se incluyeron 11 pacientes del servicio de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" de la Secretaría de Salud. De estos 11 pacientes se obtuvieron biopsias de labio y de dos pacientes fué posible obtener además biopsia de conjuntiva. Todos los pacientes fueron diagnosticados con PA, utilizando los criterios convencionales. Las muestras fueron enumeradas de acuerdo a la fecha de recepción y fueron almacenadas inmediatamente a -70°C hasta su procesamiento.

II. **Hallazgos Clínicos**

En la Tabla 7 se presentan algunos datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio. Los 11 pacientes presentaban prurito, pápulas eritematosas, placas liquerificadas, costras, y edema en regiones corporales expuestas al sol. En general, los pacientes provenían de diferentes sitios de origen: D.F., Edo. de México, Veracruz y Guerrero. Todos los pacientes fueron tratados con talidomida y se obtuvo una respuesta favorable en todos los casos. Solo uno de los pacientes reportó familiares con PA.

III. **Aislamiento y purificación de DNA genómico**

Tanto de los controles como de las muestras de PA fué posible aislar y purificar DNA de

TABLA 7.- DATOS CLINICOS DE 11 PACIENTES CON PRURIGO ACTINICO

No.*	Edad	Sexo	Inicio**	Muestra	Origen
PA1	23	F	15	Labio	D.F.
PA2	23	F	8	Labio	Guerrero
PA3	9	F	8	Labio	Veracruz
PA3C					Conjuntiva
PA4	18	F	10	Labio	D.F.
PA5	24	F	23	Labio	Edo.Mex.
PA6	16	M	10	Labio	Veracruz
PA7	32	F	2	Labio	Guerrero
PA8	11	F	8	Labio	D.F.
PA8C					Conjuntiva
PA9	25	F	18	Labio	D.F.
PA10	19	M	15	Labio	D.F.
PA11	15	F	5	Labio	Edo.Mex.

* De los pacientes 3 y 8, se obtuvieron muestras de labio y muestras de conjuntiva (C); F: Femenino; M: Masculino

** Edad en la que el paciente presentó la enfermedad por primera vez.

alto peso molecular suficiente al menos para un análisis tipo Southern (Tabla 8). La recuperación de DNA dependió directamente del tamaño de la muestra. En todos los casos se obtuvieron muestras de alto grado de pureza de acuerdo a los criterios espectrofotométricos (ver Métodos).

IV. Hallazgos Genéticos

El criterio para establecer la presencia de rearrreglos se basó en la comparación de las muestras de PA respecto a las muestras controles.

De todas las muestras se obtuvieron resultados del análisis genético al realizar la detección de la subunidad beta del RCT (Tabla 9). En el control no linfoide se observó un patrón de restricción correspondiente a la versión germinal de este gen (una banda de 12.0 Kpb y una banda de 4.0 Kpb al realizar la digestión con la enzima EcoRI, Figura 22); mientras que en la línea celular HuT102 de estirpe T el análisis reveló bandas adicionales correspondientes al rearrreglo. Dos de las 13 muestras analizadas (PA9 y PA11, Fig. 23 A) mostraron rearrreglo genético al menos con 2 enzimas de restricción. Estos resultados sugirieron la presencia de poblaciones clonales de células de estirpe T.

Las bandas obtenidas fueron de baja intensidad indicando la presencia de una población relativamente pequeña de células T. Para confirmar la presencia de estas bandas, las autorradiografías fueron colocadas en un analizador de imágenes, utilizando el programa AMBIS versión 4.3. Los rearrreglos fueron confirmados en ambos casos (Fig. 23 B).

En la Tabla 10 se resumen los hallazgos genéticos de hibridación con la sonda que detecta la región J de las cadenas pesadas de Ig. En forma similar a la hibridación con RCT beta, el control no

TABLA 8.- MUESTRAS DE DNA OBTENIDAS A PARTIR DE CONTROLES Y DE PACIENTES CON PRURIGO ACTINICO

No.	DO _{260nm} ¹	DO _{280nm} ¹	DO ₂₆₀ /DO ₂₈₀ ²	µg/ml ³	µg Totales ⁴
CONTROLES					
Testículo	0.122	0.065	1.87	1.22	244
Riñón	0.196	0.107	1.83	0.98	1960
HuT102	0.060	0.033	1.8	0.15	150
OCY-L43	0.058	0.032	1.81	0.58	232
MUESTRAS					
PA1	0.019	0.011	1.73	0.19	76
PA2	0.023	0.012	1.92	0.23	115
PA3C	0.053	0.029	1.82	0.132	13.2
PA3	0.136	0.073	1.86	0.34	21.2
PA4	0.061	0.035	1.74	0.61	305
PA5	0.077	0.044	1.75	0.77	115
PA6	0.075	0.044	1.7	0.375	375
PA7	0.044	0.026	1.7	0.11	55
PABC	0.047	0.027	1.7	0.11	22
PA8	0.027	0.015	1.8	0.07	20
PA9	0.036	0.019	1.89	0.09	22
PA10	0.126	0.068	1.8	0.315	350
PA11	0.069	0.04	1.72	0.345	69

¹. Lecturas a 260 y 280nm. ² Relacion entre las lecturas como criterio de pureza; ³: Concentracion de la muestra y ⁴ Cantidad total de DNA purificado.

TABLA 9.- HALLAZGOS GENETICOS EN CONTROLES Y EN 11 PACIENTES CON PRURIGO ACTINICO. RECEPTOR PARA ANTIGENO DE LA CELULA T

No.	RCT- β		
	BamHI	EcoRI	HindIII
CONTROLES			
Testículo	G	G	G
Riñón	G	G	G
HuT102	R	R	R
OCY-L43	G	G	G
MUESTRAS			
PA1	G	G	G
PA2	G	G	G
PA3	G	ND	G
PA3C	G	ND	ND
PA4	G	G	G
PA5	G	G	G
PA6	G	G	G
PA7	G	G	G
PA8C	G	G	ND
PA8	G	G	ND
PA9	R	R	ND
PA10	G	G	G
PA11	R	R	R

C: Conjuntiva; G: Germinal; **R**: Rearreglo; ND: No Determinado.

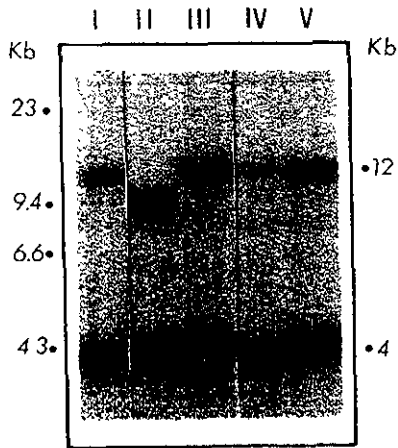


Figura 22.- Análisis del RCT β mediante hibridación con sonda radiactiva. I: Control no linfóide; II: Control de células T; III, IV y V: Muestras PA5, PA6 y PA7. Enzima de restricción: EcoRI.

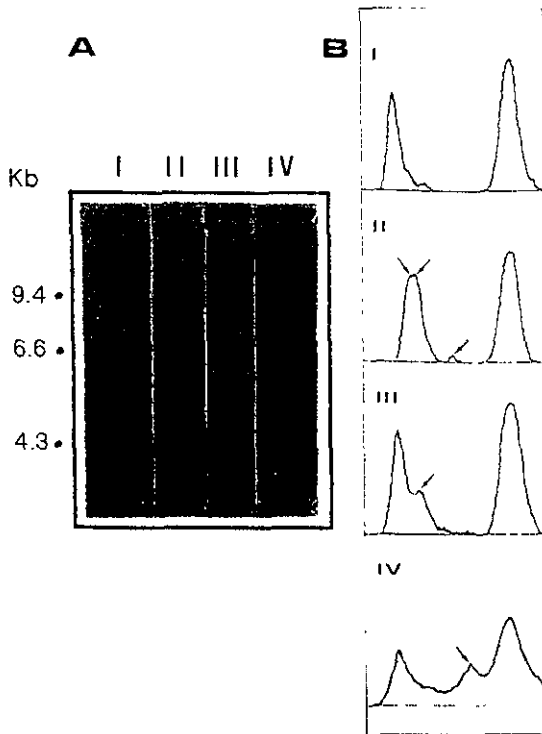


Figura 23.- Análisis del RCT b mediante hibridación tipo Southern en muestras de PA. Panel A: Muestras de DNA digeridas con la enzima EcoRI. I: Control no linfoide; II: Control de células T; III: Muestra PA9L; IV: PA11L. Panel B: Análisis densitométrico. Las flechas indican las bandas rearrregladas y la curva correspondiente.

TABLA 10.- HALLAZGOS GENETICOS EN CONTROLES Y EN 11 PACIENTES CON PRURIGO ACTINICO. CADENAS PESADAS DE INMUNOGLOBULINAS (JH).

No.	JH		
	BamHI	EcoRI	HindIII
CONTROLES			
Testículo	G	G	G
Riñón	G	G	G
HuT102	G	G	G
OCY-L43	R	R	R
MUESTRAS			
PA1	G	G	G
PA2	G	G	G
PA3	G	ND	G
PA3C	R	ND	ND
PA4	G	G	G
PA5	G	G	G
PA6	G	G	G
PA7	G	G	G
PA8C	G	G	ND
PA8	G	G	ND
PA9	G	G	ND
PA10	G	G	G
PA11	G	G	G

C: Conjuntiva; G: Germinal; R: Rearreglo; ND: No Determinado.

linfoide mostró un patrón germinal (una banda de 16.7 Kpb, en el caso de la digestión con la enzima BamHI), y el control de células B presentó rearrreglo (Fig. 24). Una muestra proveniente de lesión en conjuntiva (PA3C, Fig. 25), presentó rearrreglo con la enzima de restricción BamHI. El análisis de esta muestra con otras endonucleasas no se realizó, ya que la muestra proporcionada fué muy pequeña (Tabla 7), sin embargo, la rehibridación de este filtro con la sonda que reconocía al RCT beta, mostró un patrón germinal, indicando que las bandas adicionales obtenidas con la sonda para Ig correspondían a un rearrreglo genético y no a una posible degradación o restricción parcial de la muestra.

Con base al resultado anterior, el filtro se rehibridó con una sonda que reconoce a la región constante de la cadena ligera kappa (Cκ) (54), para tratar de establecer el estadio de la clona detectada para las cadenas pesadas. Se observó un patrón germinal de acuerdo a los controles incluidos (55), lo que sugirió la presencia de una población probablemente de células B inmaduras (ver Discusión) (Fig. 26) (39, 40).

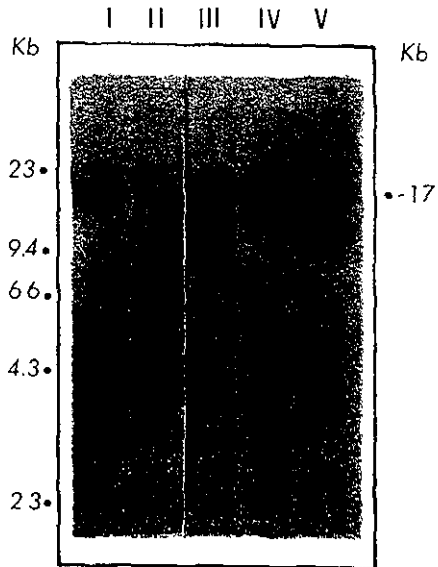


Figura 24.- Análisis de cadena pesada de Ig (JH). I: Control no linfoide; II: Control de células B; III: Muestra PA5; IV: PA6; V: PA7. Enzima utilizada: BamHI.

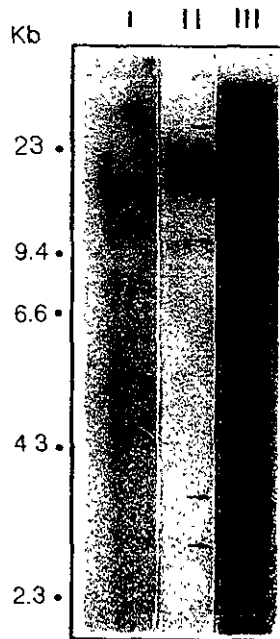


Figura 25.- Hibridación tipo Southern para la detección de la cadena pesada de Ig en pacientes con PA. Análisis con la enzima BamHI. I: Control no linfoide; II: Control de células B; III: Muestra PA3C (conjuntiva). Las flechas indican las bandas rearrregadas.

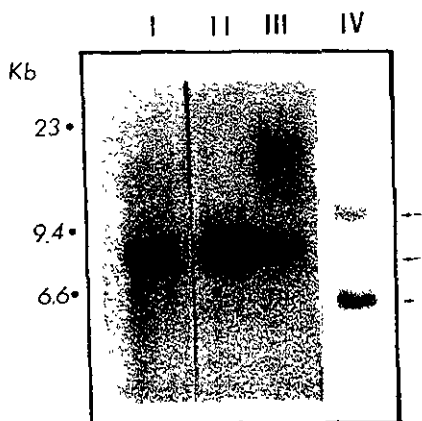


Figura 26.- Detección de la región constante de la cadena ligera κ de Ig ($C\kappa$). I: Control no linfoide; II: PA3L; III: PA3C y IV: NI3 (control para $C\kappa$).

DISCUSION

El propósito de este estudio fué caracterizar a nivel molecular los infiltrados linfocitarios de esiones en pacientes con PA para obtener mayor conocimiento de la naturaleza de estos nfiltrados.

La detección de rearrreglos genéticos del RCT, sugieren la presencia de poblaciones clonales de estirpe T. Estos resultados apoyan los hallazgos inmunohistoquímicos realizados previamente que sugerían la presencia de células T (56, Dr. J. Arrese, Centre Hospitalier Universitaire de Lieja, Service de dermatopathologie, Bélgica. Comunicación personal).

El hecho de detectar una población clonal, sugiere un mecanismo inmune involucrado en la patogenia del Prúrigo Actínico; posiblemente esta población se originó como parte de una respuesta posterior a la activación de células T, mismas que al ser estimuladas, probablemente migraron hacia el lugar de respuesta a la luz UV. Dado que el factor etiológico aceptado para el PA es la incidencia de luz UV, los eventos que se podrían presentar es la formación de fotoproductos, o bien, de proteínas alteradas producidas por daños en el DNA.

Cualquiera de estas 2 situaciones o la combinación de ambas, posiblemente tengan la capacidad de despertar una respuesta inmune. Lo anterior es apoyado por lo siguiente:

- 1) La respuesta de los pacientes a la talidomida, un fármaco que probablemente tiene una acción inmunosupresora, y una acción inhibitoria sobre el TNF α (19-22).
- 2) La presencia de linfocitos CD4+ detectados con anticuerpos monoclonales (56).
- 3) Estudios inmunohistoquímicos que revelan células CD45R+ y CD45RO+, siendo la mayoría CD45RO+ a nivel folicular (Dr. J. Arrese, Centre Hospitalier Universitaire de Lieja, Service de

dermatopathologie, Bélgica. Comunicación personal).

4) La resistencia de las células de Langerhans a la luz UV, es decir, el número de estas células no fué afectado por la irradiación a diferencia de lo observado en los controles (57).

5) Producción incrementada de ciertas citocinas en queratinocitos irradiados con UV *in vitro* (24, 29, 31-37, ver Introducción).

6) La expresión de moléculas de adhesión (LFA-1, LFA-2, ICAM-3, VLA-4) descritas en lesiones de PA inducidas artificialmente con luz UV (57).

7) El hecho de detectar poblaciones clonales de células T en 2 muestras y de células B en una muestra, descritas en el presente estudio.

Los hallazgos obtenidos en el análisis para genes de cadena pesada de Ig revelaron la existencia de poblaciones clonales de estirpe B.

Al realizar la detección de cadenas ligeras (con Ck), el patrón germinal resultante sugiere un estadio inmaduro de las células B, existen situaciones que explicarían la presencia de éstas en la lesión:

1) La población clonal de células inmaduras podría sugerir el desarrollo de un evento neoplásico, sin embargo, ni el paciente analizado (muestra PA3C) ni otros pacientes con PA han presentado correlación con el desarrollo de tumores, por lo que se puede descartar esta posibilidad.

2) La presencia de células pre-B en conjuntiva, podría sugerir una alteración importante en el mecanismo o vía de diferenciación de las células B, sin embargo, no se ha descrito disminución de células B maduras circulantes en pacientes con PA (58) Por lo tanto se propone que esta

detección corresponde a células B maduras que presentan un rearrreglo evidente para cadenas pesadas pero no para ligeras. Es decir, en la hibridación con Cκ existe la posibilidad de haberse detectado una banda correspondiente al tamaño del patrón germinal probablemente debido a un rearrreglo productivo, pero que haya originado un fragmento de restricción de igual tamaño o al menos de una extensión similar al germinal, comigrando con el mismo.

Para descartar esta posibilidad, es necesario el análisis posterior de nuevas muestras de conjuntiva, así como de la misma paciente, utilizando sondas moleculares distintas a la empleada, o bien, obteniendo RNA de estas muestras para detectar la expresión tanto de cadenas pesadas como de ligeras.

CONCLUSIONES

1) En lesiones de algunos pacientes con PA existen poblaciones clonales de estirpe T;

2) Pueden existir poblaciones clonales de células de estirpe B en pacientes con PA y

3) Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a la definición de un mecanismo

inmune probablemente involucrado en la patogenia del PA como se ha propuesto anteriormente.

Cabe mencionar que el análisis prospectivo a nivel molecular contribuirá con estudios más específicos para explicar la presencia de células B en conjuntiva, la existencia de otras poblaciones clonales de células T (RCT γ/δ), así como la determinación del uso preferencial de regiones variables del receptor.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hojyo MT, Vega ME, Granados J, Flores O, Cortés FR, Teixeira F, y Domínguez L. Actinic Prurigo: An Update. *Int J Dermatol* 34:380-4, 1995
- 2.- Domínguez L. Prúrigo Actínico. Historia y situación actual. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:292, 1993
- 3.- Hojyo MT. Prúrigo Actínico. Diagnóstico diferencial. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:303-4, 1993
- 4.- Moncada B. Erupción Polimorfa Lumínica/Prúrigo Actínico. *Inmunopatología. Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:320-1, 1993
- 5.- Flores O. Prúrigo Solar de Altiplanicie. Resultados preliminares del tratamiento con Talidomida en 25 casos. *Dermatol Rev Mex* 19:26-38, 1975
- 6.- Novales J. Prúrigo Actínico. Características clínicas. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:293-4, 1993
- 7.- Lane PR, Hogan DJ, Martel MJ, Reeder B y Irvine J. Actinic Prurigo: Clinical features and prognosis. *J Am Acad Dermatol* 26:683-91, 1992
- 8.- Champion RH, Burton JL, y Ebling FJG. *Textbook of Dermatology*. Vol. 4, 5a. edición. Blackwell Scientific Publications. Inglaterra, 1992, pp 849-60.
- 9.- Sheridan DP, Lane PR, Irvine J, Martel MJ, y Hogan DJ. HLA typing in Actinic Prurigo. *J Am Acad Dermatol* 22:1019-23, 1990
- 10.- Lane PR, Sheridan DP, Hogan DJ, y Moreland A. HLA typing in polymorphous light eruption. *J Am Acad Dermatol* 24:570-3, 1991

- 11.- Bernal JE, Duran MM, Ordoñez CP, Duran C, y Brigard D. Actinic Prurigo among the Chimila Indians in Colombia: HLA studies. *J Am Acad Dermatol* 22:1049-51, 1990
- 12.- Granados J, y Domínguez L. Inmunogenética del Prurigo Actínico en mexicanos. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:314-15, 1993
- 13.- Ibarra G, Mena CA, y Pérez ML. Aspecto Familiar. Revisión de 10 años en el HIM FG. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:300-2, 1993
- 14.- Durán MM, Ordoñez CP, Prieto JC, y Bernal J. Manejo del Prurigo Actínico en indígenas Chimila. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:333-4, 1993
- 15.- Vega ME. Características histopatológicas del Prurigo Actínico. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:295-7, 1993
- 16.- Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, Ed. *Dermatology in General Medicine*. Vol. 1, 4a. edición. McGraw-Hill. E.U.A., 1993, pp 145-50, 180-9, 1627-50
- 17.- Champion RH, Burton JL, y Ebling FJG. *Textbook of Dermatology*. Vol. 2, 5a. edición. Blackwell Scientific Publications. Inglaterra, 1992, pp 8449-60
- 18.- Vickers CFH. *Modern Management of Common Skin Diseases*. 1a. edición. Churchill Livingstone. Inglaterra, 1986, pp 136-55
- 19.- Londoño F. Thalidomide in the treatment of Actinic Prurigo. *Int J Dermatol* 12:326-9, 1973
- 20.- Vega ME, Hojyo MT y Domínguez L. Tratamiento del Prurigo Actínico con Talidomida. Estudio en 30 pacientes. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:342-3, 1993
- 21.- Barnhill RL, y McDougall AC. Thalidomide: Use and possible mode of action in reactional lepromatous leprosy and in various other conditions. *J Am Acad Dermatol* 7:317-23, 1982

- 22.- Klausner JD, Freedman VH y Kaplan G. Thalidomide as an anti-TNF-alpha inhibitor: Implications for clinical use. *Clin Immunol Immunopathol* 81:219-23, 1996
- 23.- Moschella SL y Hurley HJ. *Dermatology*. 3a. edición. W.B. Saunders Company. E.U.A., 1992, pp 125-9, 507-18
- 24.- Ledo E. Photodermatosis. Part I: Photobiology, Photoimmunology, and idiopathic photodermatoses. *Int J Dermatol* 32:387-96, 1993
- 25.- Watson JP, et al. Ed. *Molecular Biology of the gene*. Vol. 1, 4a. edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. E.U.A., 1987
- 26.- Aberer W, Schuler G, Stingl G, Hönigsmann H, y Wolff K. Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J Inv Dermatol* 76:202-10, 1981
- 27.- Stingl LA, Sauder DN, Iijima M, Wolff K, Pehamberger H, y Stingl G. Mechanism of UV-B-induced impairment of the antigen-presenting capacity of murine epidermal cells. *J Immunol* 130:1586-91, 1983
- 28.- Ashworth J, Kahan MC y Breathnach SM. PUVA therapy decreases HLA-DR⁺CD1a⁺ Langerhans Cells and epidermal cell antigen-presenting capacity in human skin, but flow cytometrically-sorted residual HLA-DR⁺ CD1a⁺ Langerhans Cells exhibit normal alloantigen-presenting function. *Br J Dermatol* 120:329-39, 1989
- 29.- Kupper TS, Chua AO, Flood P, McGuire J, Gubler U. Interleukin 1 Gene Expression in Cultured Human Keratinocytes is Augmented by Ultraviolet Irradiation. *J Clin Invest* 80:430-6, 1987

- 30.- Norris P, Poston RN, Thomas DS, Thornhill M, Hawk J y Haskard DO. The expression of endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: a comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 96:763-70, 1991
- 31.- Gallo RL, Staszewski R, Sauder DN, Knisely TL y Granstein RD. Regulation of GM-CSF and IL-3 production from the murine Keratinocyte cell line PAM212 following exposure to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 97:203-9, 1991
- 32.- Kimbauer R, Köck A, Krutmann J, Schwarz T, Urbanski A y Luger TA. Different effects of UVA and UVB irradiation on epidermal cell-IL-6 expression and release. *J Invest Dermatol* 92:459a, 1989
- 33.- Kimbauer R, Köck A, Neuner P, Förster E, Krutmann J, Urbanski A, Schauer E, Ansel JC, Schwarz T y Luger TA. Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* 96:484-9, 1991
- 34.- Chung JH, Youn SH, Koh WS, Eun HC, Cho KH, Park KC y Youn JI. Ultraviolet B irradiation-enhanced interleukin (IL-6) production and mRNA expression are mediated by IL-1a in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106:715-20, 1996
- 35.- de Vos S, Brach M, Budnik A, Grewe M, Herrmann F y Krutmann J. Post-transcriptional regulation of interleukin 6 gene expression in human keratinocytes by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* 103:92-6, 1994

- 36.- Urbanski A, Schwarz T, Neuner P, Krutman J, Kirnbauer R, Köck A y Luger TA. Ultraviolet light induces increased circulating interleukin 6 in humans. *J Invest Dermatol* 94:808-11, 1990
- 37.- Oxholm A, Oxholm P, Staberg B y Bendtzen K. Immunohistological detection of interleukin-1 molecules and tumor necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. *Br J Dermatol* 118:369-78, 1988
- 38.- Nozaki S, Abrams JS, Pearce MK y Sauder DN. Augmentation of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression by ultraviolet irradiation is mediated by interleukin 1 in Pam 212 keratinocytes. *J Invest Dermatol* 97:10-4, 1991
- 39.- Stites DP, Abba TI y Tristram GP. *Basic & Clinical Immunology*. 8a. edición. Appleton & Lange. E.U.A., 1994, pp 80-104
- 40.- Abbas A, Lichtman A y Pober J. *Cellular and Molecular Immunology*. 2a. edición. W.B. Saunders Company. E.U.A., 1994
- 41.- Alt FW, Oltz EM, Young F, Gorman J, Taccioli G y Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today* 13:306-14, 1992
- 42.- Gellert M. Molecular analysis of V(D)J recombination. *Ann Rev Genet* 22:425-46, 1992
- 43.- Schatz DG, Oettinger MA y Schliessel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Ann Rev Immunol* 10:359-83, 1992
- 44.- Roitt I. *Essential Immunology*. 8a. edición. Blackwell Scientific Publication. Inglaterra, 1994, pp 43-80

- 45.- Blackwell TK y Ait FW. Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Ann Rev Genet* 23:605-36, 1989
- 46.- Harriman W, Völk H, Defranoux N y Wabl M. Immunoglobulin class switch recombination. *Ann Rev Immunol* 11:361-84, 1993
- 47.- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-17, 1975
- 48.- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.U.A., 1989, pp 1.21-1.52
- 49.- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience. E.U.A., 1987, pp 2.1.1-2.9.15
- 50.- Yoshikai Y, Anatoniou D, Clark SP, Yanagi Y, Sangster R, Van den Elsen P, Terhorst C y Mak TW. Sequence and expression of transcripts of the human T-cell receptor β -chain genes. *Nature* 312:521-4, 1984
- 51.- Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T y Leder P. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 27:583-91, 1981
- 52.- Mandel M y Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-63, 1970
- 53.- Vogelstein B y Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci* 76:615-19, 1979

- 54.- Hieter PA, Maizel JV y Leder P. Evolution of human immunoglobulin k J region genes. *J Biol Chem* 257:1516-23, 1982
- 55.- Ortega V, Meneses A, Hernández R, Jessurum J, Ocadiz R, Flores G, Rodríguez P y Alfaro G. Clinical, histological and genetic characterization of non-Hodgkin's lymphomas in mexicans patients. *Rev Inv Clin* 44:203-14, 1992.
- 56.- Moncada B, González-Amaro R, Baranda ML, Loredó C y Urbina R. Immunopathology of polymorphous light eruption. *J Am Acad Dermatol* 10:970-3, 1984
- 57.- Torres-Alvarez B, Baranda L, Moncada B, Delgado C, Fuentes C, Santos-Martinez ML, Portales-Perez D y Gonzalez-Amaro R. An immunohistochemical study on UV-induced skin lesions from actinic prurigo (AP) patients. Resistance of Langerhans cells (LC) to ultraviolet (UV). IV Latin American Congress of Immunology and XII Mexican Congress of Immunology. March 3-7, 1996. Abstract MO26, Zacatecas, Zac. México
- 58.- Avalos E, Ramírez R, Presno M, Vega E, Hojyo T, Domínguez L, Alvarado E, López A, Pérez O y Herrera R. Subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con Prurigo Actínico. I Comunicación preliminar. *Dermatol Rev Mex Supl* 1:37:305-7, 1993