

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL
GEN INTERFERÓN GAMMA MEDIANTE RT-PCR EN
CÉLULAS MURINAS TRATADAS CON *Galipea longiflora*
(EVANTA)

TESIS DE GRADO PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

POR: SILVANA MARÍA LIMACHE VALDERRAMA

TUTORES: MSc. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS

Lic.Esp. RUDDY LUNA BARRÓN

LA PAZ - BOLIVIA
DICIEMBRE 2011

DEDICATORIA

A Dios por darme lo que necesito para continuar el camino, por su paciencia, fuerza y perseverancia depositada en mí, por encaminar mi vida y mantenerme cerca de él dándome la oportunidad cada día de corregir mis errores.

A mis padres Abraham y Magy por su guía, amor, esfuerzo, constante apoyo y sacrificio a largo de mi vida.

A mi hermano Imbert por su compañía, alegría y comprensión.

A mi Pequeña sobrinita "Estefi" por alegrarme cada día con sus travesuras y su inocencia.

A mi prima América por su compañía y su fuerza brindada.

A mi gran amigo Ruddy por todas sus enseñanzas, paciencia y comprensión brindadas.

A toda mi familia por el apoyo incondicional.

A mi grupo "Tanta Sarañani" por estar a mi lado y mantener la cohesión del grupo a pesar de los obstáculos.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Jacqueline Calla de Magariños MSc. Y al Lic. Esp. Ruddy Luna Barrón por su orientación, tiempo y apoyo a lo largo del desarrollo de la Tesis.

Al Dr. Alberto Giménez por su tiempo, colaboración y observaciones como tribunal de defensa.

A la Dra. Luisa Hurtado por sus observaciones y correcciones como tribunal de defensa.

A la Lic. Karina Salazar, Lic. Daniela Artega, Lic. Vanessa Serrudo por su amistad, camaradería, apoyo, consejo, ejemplo y cariño constante quedo muy agradecida.

A mis amigas del alma Emma P., Wendy, Aneliz, Maria Esther, Dina, Paulina, Yovana, Sadoth, Julia, Claudia, Giorgia, Roxana y Aneth por su cariño, apoyo, compañía y por el trabajo en equipo brindado "seguimos juntas".

Al Dr. Enrique Udaeta por brindarnos su apoyo y creer en nuestro grupo hasta el último momento.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por la formación brindada.

Al Centro de Investigaciones Genéticas del IITCUP por brindarme la capacitación y los ambientes para el desarrollo de la Tesis.

Al Dr. Walter Magariños Loredo Coordinador del Proyecto ASDI "Enfermedades Infecciosas" por el apoyo para el desarrollo del presente trabajo.

Al convenio UMSA - POLICÍA BOLIVIANA por permitirnos trabajar por nuestro País

A todas las personas que brindaron el apoyo al grupo: "Tanta Sarañani" que a pesar de todos los obstáculos ha cumplido con sus objetivos.

Nadie tiene amor más grande que el que da
la vida por sus amigos y vosotros sois mis
amigos, si hacéis lo que yo os mando"

Jesús

Juan 15:13-15

RESUMEN

El presente trabajo caracterizó la expresión del gen Interferon Gamma (IFN γ) en cultivo in vitro de células murinas sometidas al extracto de alcaloides totales (EAE) de *Galipea longiflora* (evanta), al estimulante Concanavalina A (ConA), al antígeno (Ag) del parásito *Leishmania* sp. y a combinaciones de estos. El extracto de evanta se ha utilizado experimentalmente como antiparasitario para combatir los efectos de la leishmaniosis cutánea en el marco del proyecto ASDI/UMSA Enfermedades Infecciosas del trópico boliviano.

Para obtener datos semi-cuantitativos de la expresión del IFN γ , que forma parte de la respuesta inmune en los murinos, se utilizaron tres sistemas semi-automatizados: 1) Maxwell 16 para la extracción de ARN total, 2) PolyAT-tract para purificar el ARN mensajero, y 3) Access RT-PCR para la retro-transcripción y obtención de ADN copia (ADNc) a partir del ARNm purificado del gen IFN γ y del gen de expresión constante B2-microglobulina como patrón de normalización proporcional.

La normalización se empleó para ajustar los valores semi-cuantitativos de ADNc a una escala común de comparación.

Los resultados obtenidos mostraron que las variables ensayadas son estimulantes en todos los casos, siendo la combinación de EAE+Ag cuatro veces más potente que la ConA (estimulante control) y tres veces más que el antígeno solo o que la combinación ConA+EAE, lo que demuestra que la presencia del parásito *Leishmania* sp. en combinación con los alcaloides totales de evanta estimula la expresión del gen IFN γ del sistema inmune murino. Asimismo se desarrollaron cebadores específicos y una sonda para PCR en tiempo real con proyección a realizar una cuantificación absoluta del fenómeno estudiado.

ABSTRACT

This study characterized the expression of interferon gamma gene (IFN γ) over in vitro culture of murine cells subjected to total alkaloid extract (SEA) from *Galipea longiflora* (evanta), to the stimulant Concanavalin A (ConA), to the antigen (Ag) of parasite *Leishmania* sp. and combinations of these. Evanta extract has been used experimentally to combat the effects of cutaneous leishmaniasis in the framework of the SIDA / UMSA Bolivian tropics Infectious Diseases project.

To obtain semi-quantitative data of the expression of IFN γ , a protein part of the immune response in murines, it has been used three semi-automated systems: 1) Maxwell 16 for total RNA extraction, 2) PolyAT-tract to purify messenger RNA, and 3) Access RT-PCR for retro-transcription and DNA copy (cDNA) synthesis from the purified mRNA and B2-microglobulin as a constant pattern for the proportional normalization subsequent procedure.

The normalization was used to adjust the semi-quantitative DNAc data to a common scale for comparison between variables.

The results showed that the variables tested are inducers for gene expression in all cases, with the combination of EAE+Ag four times more effective than ConA (control inducer) and three times more than the antigen alone or the combination ConA+EAE, showing that the presence of the parasite *Leishmania* sp. in combination with evanta total alkaloids effectively stimulate IFN γ gene expression in the murine immune system. This work also developed specific primers and one probe for real-time PCR applications with projection to perform absolute quantification of the studied phenomenon.

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la secuencia del genoma humano, ha sido una de las herramientas que hasta la actualidad permite el estudio a nivel molecular de enfermedades y tratamientos en el área de biomedicina. Sin embargo, estos estudios requieren de procesos de experimentación que permitan dilucidar los mecanismos involucrados, para ello a mediados del año 2002, la obtención de la secuencia completa de la especie *Mus musculus* (ratón), y al ver que la similitud entre ambos es de un 90% convierte al ratón en el animal de experimentación más utilizado en los laboratorios a nivel mundial. El uso experimental de la especie *Mus musculus* (ratón) ha sido de gran utilidad para los diferentes tipos de estudios científicos a nivel molecular en la relación salud, enfermedad y tratamiento, pues bioquímica e inmunológicamente la similitud entre el ratón y el ser humano es del 75% ya que los genes del ratón tienen sus homólogos en el hombre, siendo de gran utilidad para la identificación de los genes que predisponen a diferentes tipos de enfermedades inmunológicas, virales y oncológicas ya que el aislamiento celular a partir de órganos o tejidos permite la manipulación de variables sobre las células in vitro, para estimar su efecto y realizar comparaciones. (*Waterston et al 2002*) (*Karlin Et al 1985*)

Siguiendo este tipo de estrategias se han identificado genes particulares que intervienen en la susceptibilidad a diversas enfermedades. Por ejemplo, para la artritis reumatoide se encontró un gen denominado NCF que predispone a la enfermedad; de hecho, las deficiencias en este gen producen la destrucción del cartílago por linfocitos T, lo que fue algo inesperado para los científicos encargados de la investigación.

Las enfermedades involucran una serie de procesos en nuestro organismo, entre los cuales tenemos a la respuesta inmune que empieza con el reconocimiento de un microorganismo invasor, lo que involucra a su vez una serie de procesos complejos comandados principalmente por células que por medio de señales activan la maquinaria de síntesis selectiva de proteínas especializadas denominadas citoquinas, que se encargan de destruir al microorganismo intracelular o extracelular. (*Guevara et al 2002*)

En las enfermedades infecciosas producidas por parásitos intracelulares como la *Leishmaniosis*, que es una enfermedad infecciosa producida por el parásito del género *Leishmania* la producción de algunas citoquinas son propias de diferentes líneas celulares como linfocitos T cooperadores 1 que son activadas en respuesta a virus y parásitos produciendo citoquinas como ser Interferón gamma (INFg), Interleucina - 2 y Factor de Necrosis Tumoral Beta (FNT-B). La detección de estas citoquinas en sangre o tejido son ampliamente utilizadas para el diagnóstico. (Pérez et al 2011)

La leishmaniosis es una enfermedad infecciosa endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo. En total la prevalencia mundial estimada es de 12 millones de casos y 38 países endémicos entre los cuales se encuentra Bolivia. (Lydyard et al 2010)

El régimen de tratamiento contra la leishmaniosis incluye fármacos de primera elección que son potencialmente tóxicos, presentan inconvenientes al administrarlos y del 10 al 15% de los pacientes presentan resistencia. Entre ellas tenemos a la anfotericina B que es efectiva en *leishmaniosis* pero su uso es limitado por su nivel de toxicidad. (Fournet. Et al 1994)

Por estas razones la mayoría de los estudios se enfocan en la evaluación de nuevas alternativas de tratamiento que permitan su administración oral y dérmica para mayor facilidad de los pacientes. Extractos de diversas plantas actúan como agentes leishmanicidas y al mismo tiempo sobre los componentes del sistema inmune. Entre las plantas más estudiadas en la actualidad tenemos: *Wedelia trilobata*, *Clivadium remotiflorum* “huaca”, *Lepidium peruvianum*, *Galipea longiflora* (Evanta). (Giménez et al 2005)

Estudios in vivo han mostrado que los alcaloides encontrados en la Evanta exhiben un efecto leishmanicida, mostrado por una reducción en el tamaño de las lesiones cuando alcaloides purificados son administrados a ratones infectados con *L.donovani*, *L.braziliensis*, *L. amazonensis* y *L.venezuelensis*, pero a su vez parece ejercer un efecto también a nivel del sistema inmune más específicamente a nivel del la citoquina INFg. (Giménez et al 2005)

El presente trabajo estudió la expresión del gen INFg en células esplénicas de ratón tratadas con extractos de Alcaloides Totales de *Galipea longiflora* (Evanta).

1.1 INFORMACIÓN GENÉTICA

La naturaleza hereditaria de todo organismo viviente está definida por su genoma, el cual consiste en una secuencia larga de ácido nucleíco (ADN ó ARN) que proporciona la información necesaria para su funcionamiento. (Lewin 2008)

Se utiliza el término “información” debido a que el ADN como tal, tiene una escasa acción sobre el funcionamiento de los organismos: no transporta oxígeno, no cataliza reacciones para obtener energía, ni destruye a los gérmenes invasores por sí mismo, más bien es la secuencia de las subunidades individuales (bases) las que son responsables de la producción de los elementos necesarios para que la célula por una serie de interacciones produzca las proteínas que el organismo vivo necesita en el momento y lugar necesario. (Passarge, MD 2007) (Lehninger 2006)

Estructuralmente el genoma puede ser dividido en Cromosomas y Funcionalmente en genes (Fig.1). Cada cromosoma consiste en una estructura lineal de genes. Cada gen reside en una localización particular del cromosoma llamada locus.

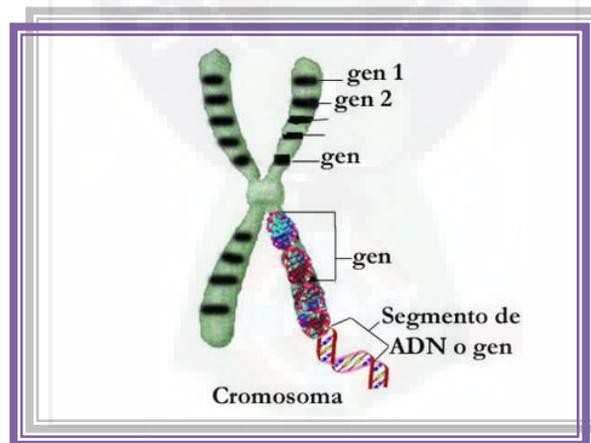


Fig.1 Organización estructural y funcional del genoma

Secuenciar un cromosoma significa identificar toda la secuencia de nucleótidos que componen el ADN de ese cromosoma y, a partir de ahí, determinar qué piezas o trozos de esa molécula de ADN constituyen los genes. Porque debe tenerse en cuenta que no toda la larga cadena de ADN presente en un cromosoma tiene capacidad para originar los

transcritos de ARN que darán origen a las proteínas. Por eso es preciso identificar qué trozos o segmentos de la larga cadena de ADN presente en el cromosoma poseen realmente la actividad propia de un gen. (*Passarge, MD 2010*)

La información genética se encuentra en la secuencia de los pares de bases nitrogenadas (Adenina-Timina o Citocina-Guanina) que conforman la molécula de ADN, cuyas combinaciones diferentes en tripletes dirigen la especificidad de los 20 aminoácidos y las señales de iniciación y terminación de la síntesis proteica. Están organizados en palabras de tres letras llamados codones, y el conjunto de codones constituye el código genético. Antes de que se dilucidara el código genético, resultaba imposible comprender la síntesis de proteínas o explicar las mutaciones. (*Murray 2007*). Esta se decodifica y se lee en dos pasos denominados: Transcripción y Traducción. (*Passarge, MD 2010*)

La primera definición del gen como unidad funcional se derivó del descubrimiento de que cada gen es responsable de la producción de una proteína específica. Actualmente se sabe que algunos genes codifican más de un polipéptido y que una proteína puede ser codificada por el conjunto de diferentes genes. La existencia de genes solapantes y el procesamiento alternativo rebaten la hipótesis de que el gen codifica a una proteína. Además existen algunos genes que no codifican proteínas sino ARN con función propia (ARN de transferencia y ARN ribosómico) y que no se traducen, por lo que no es necesaria la traducción para que un gen tenga una función determinada. El gen es, pues, la unidad mínima de función genética, que puede heredarse. (<http://www.ferato.com/wiki/index.php/Gen>)

La identificación de un gen supone un largo proceso mediante el cual se ha de conocer:

- Su longitud y estructura, que vendrá identificada por la secuencia y número de nucleótidos del ADN.
- Los productos originados a partir del gen; es decir, la proteína resultante de la acción de ese gen. Con frecuencia, un mismo gen origina diversas proteínas.
- Qué función cumple como molécula química (enzima, receptor, transportador, etc.

- Dónde se localiza dentro de la célula y qué función cumple en ese sitio (transportador, qué transporte ejecuta, dónde, cómo).
- El organismo completo: en qué órgano o tejido se expresa el gen, en qué momento de la vida, etc.
- Las consecuencias que se derivan de la modificación estructural de ese gen por cambios en su contenido: mutaciones (supresión o cambio en algún aminoácido, duplicación de una secuencia), anulación del gen, duplicación o triplicación del gen completo, etc.

El número total de genes en el genoma humano, según los más recientes cálculos, está entre 30.000 y 50.000. De ellos 37 son mitocondriales y el resto son nucleares. Estas estimaciones están por debajo de los 50.000 a 100.000 genes que se previeron hace unos años. Sin embargo, todavía no hay certeza sobre el número exacto de genes. (*Down21.org*)(http://www.down21.org/salud/genetica/genoma_humano.htm)

El tamaño total del genoma humano es de una 3.200 Mega pares de bases (Mb) de ADN que se distribuyen entre los cromosomas de manera irregular, desde las 270 Mb que contiene el cromosoma 1 hasta las 45 Mb del cromosoma más pequeño, el 21.

Los genes humanos no se distribuyen de modo igual por los cromosomas, lo que hace que su densidad (número de genes por unidad de ADN) varíe sustancialmente de un cromosoma a otro y, dentro de un cromosoma, de una porción a otra.

Los genes de organismos sencillos (bacterias), tienen un tamaño parecido, en general corto. Pero en los organismos complejos como es el humano, el tamaño de los genes es enormemente variable desde menos de 1 kb como es el gen del interferón hasta el gen de la distrofina que tiene cerca de 2.500 kb. La mayoría del ADN con capacidad codificadora se utiliza para fabricar ARN mensajero (ARNm) y, a partir de él, la síntesis de polipéptidos formados gracias al ensamblaje de aminoácidos. (*Lehninger 2006*)

El gen del INFg tiene un tamaño de 1207 pares de bases (pb) sin contar con los intrones que son regiones no codificantes y son eliminadas por el proceso de corte y empalme para la síntesis de ARNm maduro.

1.1.1 LOS GENES ESTÁN FORMADOS POR INTRONES Y EXONES

Los genes están constituidos por fragmentos de dos clases: Exones e Intrones. Los exones son los fragmentos del gen que codifican aminoácidos de la proteína mientras que los intrones son fragmentos del gen que se encuentran separando los distintos exones y no codifican aminoácidos. En un primer momento de la transcripción la información genética pasa del ADN al ARN y se produce un ARNm inmaduro que contiene una copia exacta del gen, con exones e intrones. En el proceso de maduración del ARNm se eliminan los intrones y se unen los exones para formar un ARNm maduro que ya puede salir del núcleo hacia el citoplasma. Aunque puede parecer que los intrones no sirven para nada ya que son desechados en este proceso, esto no es cierto pues en muchas ocasiones contienen importantes señales reguladoras del gen. Por otra parte, su existencia permite que los genes sean modulares y permite que los exones puedan combinarse de diversas maneras produciendo proteínas diferentes con un mismo gen.

El primer paso de la transcripción de un gen consiste en la producción de una secuencia de ARN complementaria a la longitud completa del gen, este ARN es denominado transcrito primario. En el caso de los genes que contienen múltiples exones, este transcrito primario contiene las secuencias complementarias, tanto de los exones como de los intrones del gen, pero posteriormente el transcrito primario de ARN sufre un proceso de corte y empalme (splicing) del ARN: una serie de reacciones por las que los segmentos de ARN intrónico son seccionados y eliminados, y los segmentos de ARN exónico se van juntando uniéndose un cabo a otro (empalme), dando origen a un segundo transcrito de ARN que es más corto (figura 1) (http://www.down21.org/salud/genetica/genoma_humano.htm) (B. Lewin 2008)

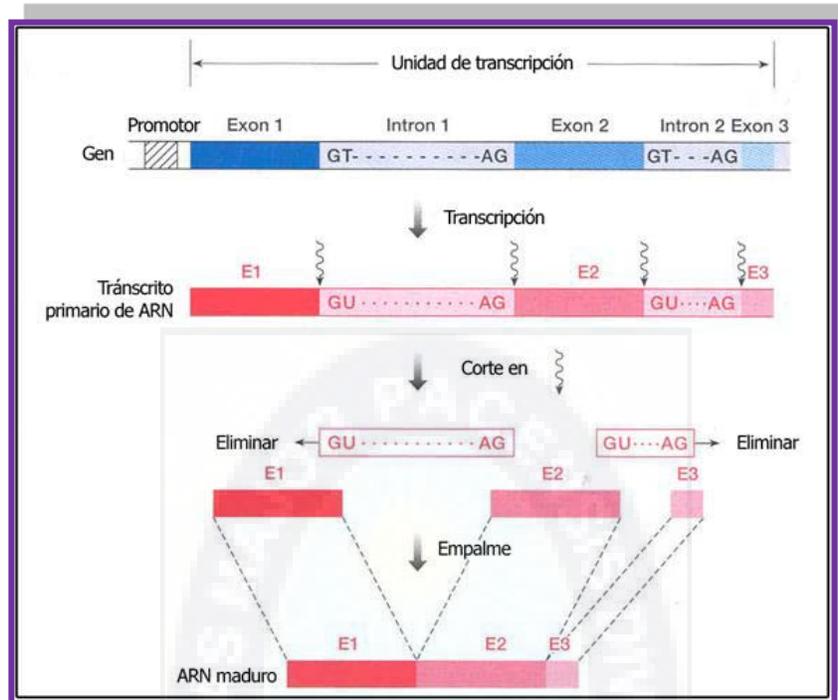


Figura 2. Proceso de corte y empalme (splicing) de ARN, por el cual el gen origina el transcrito final maduro de ARN. El gen (en azul) contiene 3 exones (codificadores) y 2 intrones (no codificadores). El transcrito primario de ARN (en rojo) posee todas las secuencias complementarias. Posteriormente se cortan y eliminan las secuencias intrónicas (GU...AG) y se empalman las exónicas (E1, E2, E3) para originar el ARN maduro. (Figura tomada de: Stracham T, Read AP. *Human Molecular Genetics*, 3ª ed., New York, Garland Publishing 2004).

En el caso del gen de la citoquina INF γ está constituido por 4 exones y 5 intrones que se encuentran ubicados en forma intercalada a lo largo del gen (Anexo 1).

La unión de estos 4 exones da origen al ARNm maduro para que posteriormente sea transcrito.

1.2 EXPRESIÓN GÉNICA

Desde que en 1995 se secuenciaron los primeros genomas, la velocidad y el rango de secuenciación han mejorado extraordinariamente. Los primeros genomas secuenciados fueron genomas bacterianos pequeños, de < 2Mb, hacia 2002 la secuencia del genoma humano de 3000Mb había sido completada. A la fecha se han secuenciado los genomas

de una gran variedad de organismos, entre otros, bacterias, arqueobacterias, levaduras, eucariotas inferiores, plantas y animales, incluidos, en este último caso, gusanos, moscas, roedores. Quizá la información más importante derivada de la secuenciación de un genoma sea el número de genes. Por ejemplo *Mycoplasma genitalium*, bacteria intracelular obligada, tiene el genoma más pequeño conocido de cualquier organismo, de solo 470 genes aproximadamente; el genoma de las bacterias de vida libre oscila entre 1700 genes y genomas de las arqueobacterias abarcan un rango similar; los de las eucariotas unicelulares empiezan en aproximadamente 5300 genes, en tanto que los gusanos y moscas tienen unos 18500 y 13500 genes respectivamente; sin embargo, ese número se incrementa a aproximadamente 25000 en el ratón y el hombre. (Murray 2007).

De los genes presentes en el genoma bacteriano, o de los presentes en el genoma humano, únicamente se expresa una fracción en un momento dado. Algunos productos génicos tienen funciones que requieren su presencia en grandes cantidades. Por ejemplo, los factores de elongación requeridos para la síntesis proteica se encuentran entre las proteínas más abundantes en las bacterias. Otros productos génicos son necesarios en cantidades menores; por ejemplo, una célula ha de contener solo pocas moléculas de las enzimas que reparan lesiones poco comunes del ADN. La necesidad de un determinado producto génico también cambia en el tiempo dependiendo de la necesidad de la célula o el agotamiento de sus fuentes de alimentación. (http://www.down21.org/salud/genética/genoma_humano.htm) es decir que, no todos los genes dan origen a la síntesis de proteínas de manera constante o en cualquier momento, si no que está regulado por señales celulares que activan a la expresión de un determinado gen.

La expresión génica se concretiza por la transformación de la información genética desde moléculas de ADN a moléculas de ARN y posteriormente a sus polipéptidos correspondientes. Esta se decodifica en dos pasos denominados transcripción y traducción. (Passarge, MD 2010)(Anexo 2)

La regulación de la expresión génica constituye un aspecto fundamental en la regulación del metabolismo celular y en el mantenimiento de las diferencias

estructurales y funcionales de células en desarrollo. Debido al alto coste energético de la síntesis de proteínas la regulación de la expresión génica es esencial para que la célula pueda hacer un óptimo uso de la energía disponible. (*Lehninger 2006*)

Regular la concentración de una proteína celular implica mantener un equilibrio preciso entre muchos procesos. Existen al menos seis puntos potenciales en los que la cantidad de proteína puede ser regulada y son las siguientes: síntesis del transcrito primario de ARN, procesamiento post-transcripcional del ARNm, degradación del ARNm, síntesis proteica (traducción), modificación post traduccional de proteínas, y degradación proteica.

La modificación post transcripcional del ARNm mediante procesos como el mecanismo de maduración por corte y empalme (“splicing”) diferencial o el procesamiento del ARN pueden determinar cuáles serán las proteínas producidas a partir de un transcrito de ARNm y en qué cantidad. (*Lehninger 2006*)

De la misma forma que cambian las necesidades de diferentes proteínas, los mecanismos por los que se regulan sus genes respectivos, también varían. El grado y tipo de regulación, reflejan de forma natural la función del producto proteico del gen. Algunos productos génicos son siempre necesarios y sus genes se expresan a nivel más o menos constante en prácticamente todas las células de una especie u organismo.

Muchos de los genes para enzimas que catalizan pasos en vías metabólicas centrales, como en el ciclo del ácido cítrico, pertenecen a esta categoría. Estos genes son generalmente denominados como genes constitutivos (“Housekeeping”). La expresión constante de un gen, aparentemente no regulada, es conocida como expresión génica constitutiva. (*Lewin 2008*)

Las cantidades de otros productos génicos aumentan y disminuyen en respuesta a señales celulares. Los productos génicos que incrementan su concentración bajo determinadas circunstancias moleculares son conocidos como inducibles, y el proceso que da lugar al incremento de la expresión del gen se llama inducción.

Las proteínas que se rigen a este tipo de proceso son las citoquinas, ya que solo son producidas cuando las células del sistema inmune las activa como ser las interleucinas e interferones, por lo que sus concentraciones varían en determinadas circunstancias.

1.3 TRANSCRIPCIÓN

En la expresión de la información genética contenida en un segmento de ADN siempre interviene la generación de una molécula de ARNm, puede parecer muy similar a una cadena de ADN, con la única diferencia del grupo hidroxilo en la posición 2' y la sustitución de la timina por el uracilo (Anexo 3). Sin embargo, estas diferencias le confieren al ARN el potencial para una diversidad estructural mucho mayor que el ADN, una diversidad que le permite asumir varias funciones celulares. Las moléculas de ARN no solo son portadoras y expresan información genética sino que también actúan como catalizadores. (*Lehninger 2006*)

La replicación y la transcripción difieren en un aspecto importante: durante la replicación se copia el cromosoma entero dando ADN hijo que es idéntico al ADN parental, mientras que la transcripción es selectiva: en un momento determinado, se transcribe sólo un gen determinado o un grupo de genes. Se puede regular por tanto la transcripción del ADN de modo que solo se transcriba la información genética necesitada por la célula en un momento cualquiera. Secuencias reguladoras específicas indican el principio y el fin de los segmentos de ADN que se han de transcribir, así como que cadena se utilizará como molde. (*Murray 2007*) (Figura3)

El RNA es la única molécula conocida que tiene funciones tanto informativas como catalíticas, la transcripción se engloba en 4 fases:

1) **Iniciación.**

Para la síntesis de ARNm existen dos señales de inicio denominadas secuencias de consenso en una región del ADN denominada región promotora: la TATA, a 25 pares de bases del inicio de la transcripción hacia el extremo 5', y la CAAT, algo más alejada. Los factores que ayudan a la localización y unión de la enzima al promotor, son denominados factores basales.

2) Alargamiento.

El proceso de síntesis continúa en sentido $5' \rightarrow 3'$. Al cabo de 30 nucleótidos transcritos se añade al extremo $5'$ una caperuza de 7-metil-guanosín-trifosfato (Anexo 4), que protege al ARNm de su degradación y es lugar de reconocimiento para el inicio de la traducción.

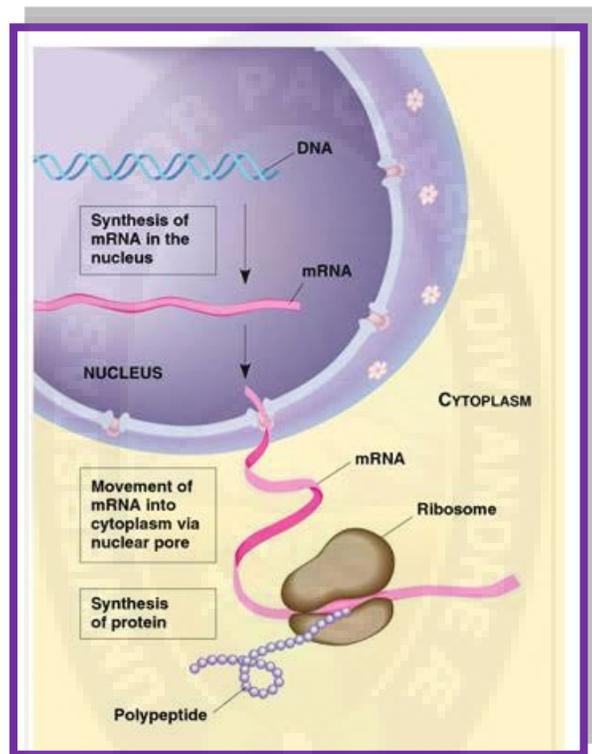


Fig. 3 Esquema representativo de la Síntesis de proteínas.

3) Finalización

A continuación interviene la enzima poli.A-polimerasa que añade al extremo final $3'$ un segmento de unos 200 ribonucleótidos de adenina, denominado cola de poli-A, que interviene en la maduración posterior y en su transporte desde el núcleo.

4) Maduración.

Se debe producir la eliminación de los intrones y la posterior unión de los exones. En este proceso intervienen un conjunto de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPpn), denominadas en su conjunto, espliceosoma que reconocen a los intrones que

suelen empezar por los nucleótidos GU y acabar por AG; los corta y los retira y a continuación actúan ARN ligasas que empalman exones (Anexo 5). Puede darse la unión de los exones consecutivos como se encontraban en el gen, o hacerlo en una ordenación alternativa. Asimismo, puede producirse la eliminación o introducción de bases, o transformación de unas bases en otras. Todo ello produce una amplificación de la expresión génica, ya que un solo gen puede dar lugar a proteínas distintas según la maduración post-transcripcional que se lleve a cabo. (Anexo 6) (Murray 2007)

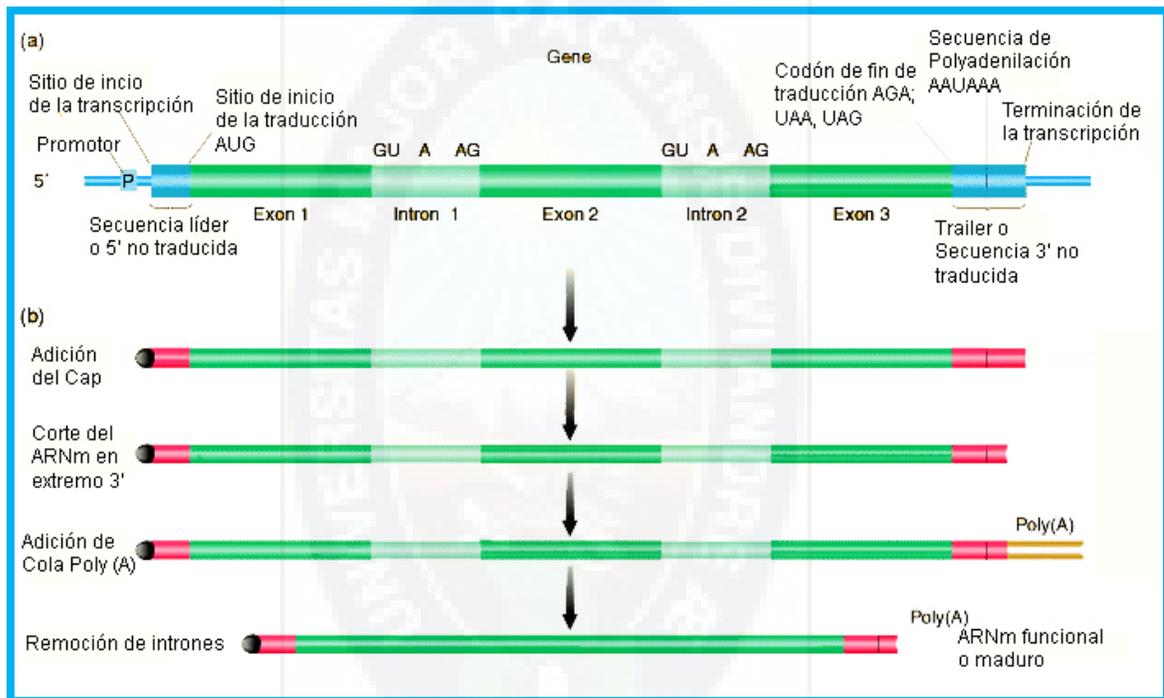


Fig. 4 Proceso de “Splicing” eliminación de intrones en la transcripción.

En el caso del gen del INFg en esta fase son eliminados los 5 intrones de su estructura y unidos los 4 exones que darán origen a la citoquina.

Con la excepción de los genomas de ARN de ciertos virus, todas las moléculas de ARN se forman a partir de información contenida permanentemente en el ADN. En un proceso denominado transcripción, un sistema enzimático convierte la información genética de un fragmento de ADN en una cadena de ARN con una secuencia de bases complementaria una de las cadenas de ADN.

Existen tres clases principales de ARN. El ARNm, es portador de las secuencias que codifican las secuencias de aminoácidos, de uno o más polipéptidos especificados por un gen o conjunto de genes en los cromosomas. El ARN de transferencia (ARNt) es un adaptador que lee la información codificada en el ARNm y transfiere el aminoácido adecuado a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis proteica. Las moléculas de ARN ribosómico (Anexo 7) (ARNr) se asocian con proteínas formando la intrincada maquinaria para la síntesis de proteínas en este caso con el ribosoma. (Anexo 4) No obstante, existen muchos ARN especializados con funciones reguladoras o catalíticas que no serán discutidos en el presente trabajo.

1.3.1 SÍNTESIS DE ARN DEPENDIENTE DE ADN

La transcripción es muy similar a la replicación en términos de mecanismo químico, polaridad (dirección de síntesis) utilización de un molde. Los dos procesos difieren, sin embargo, en que la transcripción no requiere un cebador, sólo afecta generalmente a cortos segmentos de una molécula de ADN y, dentro de estos segmentos, solo una de las dos cadenas de ADN actúa como molde.

El descubrimiento de la ADN polimerasa y su dependencia de un molde de ADN animó a una búsqueda de una enzima que sintetizase una cadena ARN complementaria a un molde de ADN. Tal enzima, capaz de formar un polímero de ARN a partir de ribonucleósido 5'- trifosfatos, se aisló a partir de extractos bacterianos en 1959 por cuatro grupos de investigación independientes. Esta enzima, ARN polimerasa dirigida por ADN, requiere, además de un molde de ADN, los cuatro ribonucleósidos 5' trifosfatos (ATP, GTP, UTP, CTP) como precursores de las unidades nucleotídicas del RNA, así como Mg^{2+} . La RNA polimerasa elonga una cadena de ARN por la adición de unidades de ribonucleósido al extremo 3' hidroxilo de la cadena de ARN, por lo que construye cadenas de ARN en la dirección 5' → 3'. El grupo 3' hidroxilo actúa como nucleófilo atacado el fosfato alfa del ribonucleósido trifostato entrante y liberando pirofosfato.

La ARN polimerasa requiere ADN para su actividad siendo más activa con un molde de ADN bicatenario. Solo se utiliza una de las dos hebras de ADN como molde, copiada en la dirección 3' → 5' (antiparalela a la nueva cadena de ARN) al igual que en

la replicación de ADN. Cada nucleótido en el ARN recién formado se selecciona según las interacciones de apareamiento de Watson – Crick; los residuos de uridilato (U) se insertan en el ARN opuesto a residuos adenilato en el ADN molde. Los residuos guanilato y citidilato especifican citidilato y guanilato respectivamente, en la nueva cadena de ARN.

A diferencia del ADN polimerasa, la ARN polimerasa no requiere un cebador para iniciar la síntesis. Sin embargo, el inicio de síntesis de ARN solo tiene lugar en secuencias específicas llamadas promotores. Las síntesis de ARN empieza normalmente con un residuo de GTP o ATP, cuyo grupo 5'-trifosfato no es cortado, sino que se mantiene intacto durante toda la transcripción.

Durante la transcripción la ARN polimerasa de *E. coli* mantiene generalmente 17 pares de bases desenrollados, desenrollando el ADN por delante y enrollándolo por detrás. Debido a que el ADN es una hélice, este proceso requiere una rotación considerable de las moléculas de ácido nucleíco. La rotación está restringida en muchos ADN por proteínas fijadoras de ADN y otras barreras estructurales, por lo que el desplazamiento de una ARN polimerasa genera ondas de superenrollamientos positivos por delante y negativos por detrás del punto en el que se está produciendo la transcripción. Este súperenrollamiento del ADN impulsado por la transcripción se ha observado in vitro y en las bacterias también in vivo. En la célula, la acción de topoisomerasas alivia los problemas topológicos causados por la transcripción. Una vez iniciada, la transcripción en *E. Coli* ocurre a una velocidad de unos 50 nucleótidos por segundo. (De la Barreda 2008)

Las secuencias de dos cadenas de ADN complementarias son diferentes y ambas cadenas realizan también funciones diferentes en la transcripción. Se utilizan diversas designaciones para distinguir las dos cadenas. La hebra que sirve de molde para la síntesis de ARN se la denomina hebra molde o hebra menos (-). En todo cromosoma, genes diferentes pueden utilizar hebras diferentes como molde. La hebra de ADN complementaria al molde se denomina hebra no molde o hebra más (+) y es idéntica en secuencia de bases al ARN transcrito del gen con T en lugar de U. la hebra no molde se la denomina a veces hebra codificante aun cuando no tiene una función

directa ni en la transcripción ni en la síntesis de proteínas. Las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción se dan, por convención, como secuencias de la hebra no molde (codificante o +). (*Lehninger 2006*)

1.4 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas son los productos finales de la mayoría de las rutas informativas. Una célula típica necesita miles de proteínas diferentes en cualquier instante. Estas proteínas se han de sintetizar en respuesta a las necesidades celulares del momento, transportar (dirigir) a la localización celular y posteriormente se degradan.

La síntesis de proteínas es el más complejo de los mecanismos biosintéticos y su dilucidación ha sido uno de los mayores retos de la historia de la bioquímica. En las células eucariotas la síntesis proteica requiere la participación de más de 300 macromoléculas diferentes. (*A. Lehninger 2006*)

Para la síntesis del complemento celular de proteínas se requiere 20 aminoácidos diferentes; de esta forma, por lo menos debe haber 20 codones distintos que constituyen el código genético. Debido a que solo existen cuatro nucleótidos en el ARNm, cada codón deberá incluir más de un nucleótido de purina y pirimidina.

Codones con dos nucleótidos cada uno podrían formar solo 16 codones específicos (4^2), en tanto que los codones de tres nucleótidos podrían formar 64 codones específicos (4^3).

En la actualidad, se sabe que cada codón consiste en una secuencia de tres nucleótidos, es decir, es un código de tripletes. El descifrado del código genético dependió en gran medida de la síntesis química de polímeros de nucleótidos, en particular de tripletes con una secuencia repetida. (*Murray 2007*)

Algunos experimentos genéticos tempranos, demostraron de manera concluyente no solo que las palabras del código genético o codones de los aminoácidos son tripletes de nucleótidos, sino también que los codones no se solapan no habiendo puntuación entre codones para los residuos sucesivos entre los aminoácidos (Anexo 8). La secuencia de aminoácidos de una proteína está definida, por tanto, por una secuencia lineal de

codones, formados por tripletes, contiguos. El primer codón de la secuencia establece un marco o pauta de lectura, en el que empieza un nuevo codón cada tres residuos de nucleótidos. Fig. 3 (*Lehninger 2006*)



Fig. 5. Secuencia de codones formados en tripletes

La clave de la organización de la información genética que especifica una proteína puede encontrarse en los codones y en el ordenamiento de codones que constituyen el marco de lectura.

Varios codones tienen funciones especiales. El codón de inicio, AUG, señala el principio de cadenas polipeptídicas. AUG no es solo un codón de inicio tanto en procariontes como en eucariotes sino que también codifica residuos Metionina (Met) en posiciones internas de los polipéptidos. De los 64 tripletes de nucleótidos posibles, tres (UAA, UAG y UGA) no codifican ningún aminoácido conocido; pero son utilizados por la célula como codones de terminación también llamados stop ó “sin sentido” y normalmente señalan el final de la síntesis de la cadena proteica. (Anexo 8)(*Lewin B.2008*)

1.4.1 INICIO DE LA TRADUCCIÓN

Componentes del equipo de traducción

ARN mensajero. El ARN mensajero (ARNm) transmite la información genética almacenada en el ADN. Mediante el proceso conocido como transcripción, secuencias específicas de ADN son copiadas en forma de ARNm que transporta el mensaje contenido en el ADN a los sitios de síntesis proteica (los ribosomas) (Anexo 9)

ARN de transferencia y aminoácidos. Los aminoácidos (componentes de las proteínas) son unidos a los ARN de transferencia (ARNt) que los llevarán hasta el lugar de síntesis proteica, donde serán encadenados uno tras otro. La enzima aminoacil – ARNt-sintetasa se encarga de dicha unión, en un proceso que consume ATP.

Ribosomas. Los ribosomas son los orgánulos citoplasmáticos encargados de la biosíntesis proteica; ellos son los encargados de la unión de los aminoácidos que transportan los ARNt siguiendo la secuencia de codones del ARNm según las equivalencias del código genético.

Es la primera etapa de la biosíntesis de proteínas. El ARNm se une a la subunidad menor de los ribosomas. A éstos se asocia el aminoacil-ARNt, gracias a que el ARNt tiene en una de sus asas un triplete de nucleótidos denominado anticodón, que se asocia al primer codón del ARNm según la complementariedad de las bases. A este grupo de moléculas se une la subunidad ribosómica mayor, formándose el complejo ribosomal o complejo activo. Todos estos procesos están catalizados por los llamados factores de iniciación (FI). El primer codón que se traduce es generalmente el AUG, que corresponde con el aminoácido metionina en eucariotas. En procariontes es la formilmetionina (Anexo 9) (*Lehninger 2006*)

1.4.2 ELONGACIÓN DE LA CADENA POLIPEPTÍDICA

El complejo ribosomal posee dos sitios de unión o centros. El centro peptidil o centro P, donde se sitúa el primer aminoacil-ARNt y el centro aceptor de nuevos aminoacil-ARNt o centro A. El carboxilo terminal (-COOH) del aminoácido iniciado se une con el amino terminal (-NH₂) del aminoácido siguiente mediante enlace peptídico. Esta unión es catalizada por la enzima peptidiltransferasa. El centro P queda pues ocupado por un ARNt sin aminoácido. El ARNt sin aminoácido sale del ribosoma. Se produce la translocación ribosomal. El dipeptil-ARNt queda ahora en el centro P. Todo ello es catalizado por los factores de elongación (FE) y precisa GTP. Según la terminación del tercer codón, aparece el tercer aminoacil-ARNt y ocupa el centro A. Luego se forma el

tripéptido en A y posteriormente el ribosoma realiza su segunda translocación. Estos pasos se pueden repetir múltiples veces, hasta cientos de veces, según el número de aminoácidos que contenga el polipéptido. La translocación del ribosoma implica el desplazamiento del ribosoma a lo largo de ARNm en sentido 5'→3'.

1.4.3 TERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA CADENA POLIPEPTÍDICA

Los codones UAA, UAG y UGA son señales de paro que no especifican ningún aminoácido y se conocen como codones de terminación; determinan el final de la síntesis proteica. No existe ningún ARNt cuyo anticodón sea complementario de dichos codones y, por lo tanto, la biosíntesis del polipéptido se interrumpe. Indican que la cadena polipeptídica ya ha terminado. Este proceso viene regulado por los factores de liberación, de naturaleza proteica, que se sitúan en el sitio A y hacen que la peptidiltransferasa separe, por hidrólisis, la cadena polipeptídica del ARNt. Un ARNm, si es lo suficientemente largo, puede ser leído o traducido, por varios ribosomas a la vez, uno detrás de otro. Al microscopio electrónico, se observa como un rosario de ribosomas, que se denomina polirribosoma o polisoma.

Una vez finalizada la síntesis de una proteína, el ARN mensajero queda libre y puede ser leído de nuevo. De hecho, es muy frecuente que antes de que finalice una proteína ya está comenzando otra, con lo cual, una misma molécula de ARN mensajero, está siendo utilizada por varios ribosomas simultáneamente. (*Devlin 2004*)

1.4.4 PLEGAMIENTO Y MADURACIÓN

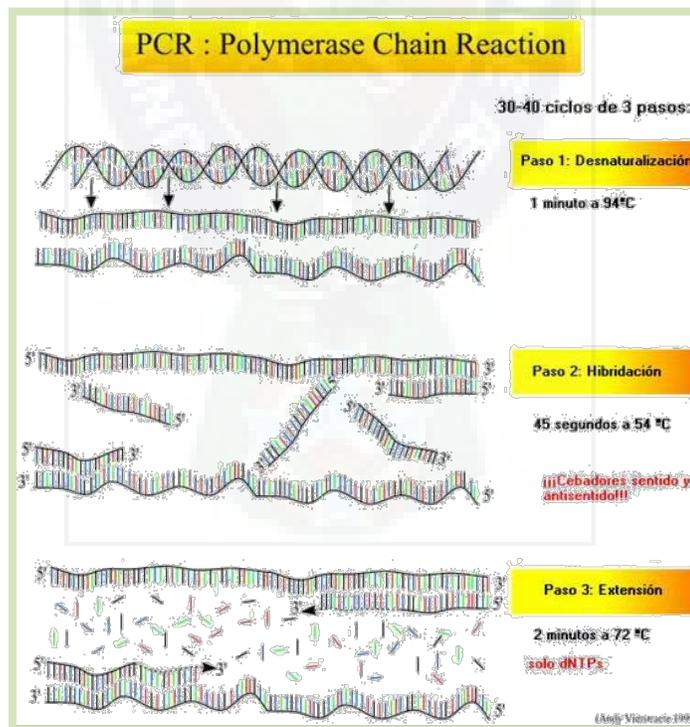
Con el fin de adoptar su forma biológicamente activa el polipéptido ha de plegarse dando su conformación tridimensional adecuada. Antes o después del plegamiento, el nuevo polipéptido puede experimentar modificación enzimática para eliminar uno o más aminoácidos del extremo amino – terminal; para añadir acetilo, fosfato, metilo, carboxilo u otros grupos en ciertos residuos aminoácidos; para cortar la proteína proteolíticamente o para unir oligosacáridos o grupos prostéticos. (*Lehninger 2006*)

1.5 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Estrictamente, el término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular. Este hecho puede ser abordado por técnicas de análisis de proteínas («*binding*» molecular, RIA, ELISA, western blot, e inmunohistoquímica). Además, si la proteína es una enzima se puede estudiar su grado de expresión titulando su actividad enzimática.

Sin embargo, es un hecho generalmente aceptado que la abundancia de un ARNm y el número de moléculas por célula de ese transcrito se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente.

Por esta razón, en la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante detección y/o cuantificación de los ARNm funcionales del citoplasma, por lo que los métodos utilizados para esta finalidad se basan en la detección de ARNm específicos y no productos proteicos.



Una de las técnicas moleculares

Fig. 6 Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa. (PCR)

técnicas más desarrollada

para la detección de material genético (ADN o ARN) es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) este es un método para amplificar de un modo eficiente y rápido fragmentos de ADN específicos de un determinado gen. (Fig 6) (Hernández *Et al* 1995)

Puesto que la PCR produce una amplificación de una región determinada que se desea caracterizar, donde la Taq polimerasa sólo es capaz de sintetizar ADN a partir de un molde de ADN, para la detección de ARNm es necesario entonces generar primero una cadena de ADN complementario (DNAc) a partir de un molde de ARNm mediante una ADN polimerasa dependiente de ARN, enzima conocida como transcriptasa inversa ó RT (Reverse Transcriptase).

En conjunto, el método RT-PCR (llamado así por el paso de transcripción inversa previo a la PCR), o ARN-PCR, utiliza como sustrato ARN mensajero o total obtenido a partir de la muestra en la que se quiere estudiar la expresión de un determinado gen (Fig. 7).

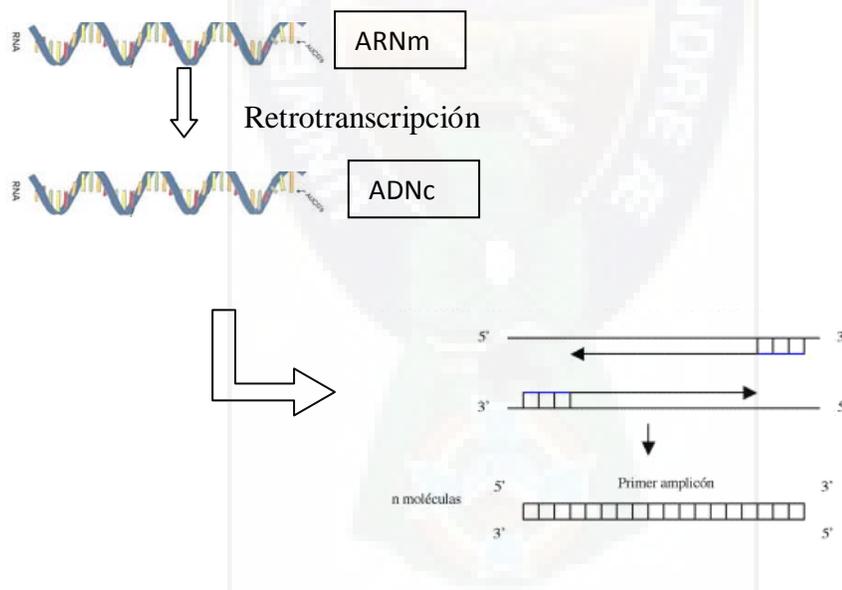


Figura 7 Representación esquemática de la Retrotranscripción PCR: Síntesis de ADN a partir de ARNm por reverso transcripción, hibridación de los cebadores específicos a la secuencia de interés, por último amplificación.

El siguiente paso es la síntesis de una cadena de ADNc a partir del ARNm mediante una retrotranscripción. Para ello se aprovecha la presencia de la *cola poli(A)* de los ARNm y se utiliza como cebador un oligonucleótido sintético de (oligodT) que se une a las colas de poli(A) puesto que esta cola es una característica casi universal en los distintos tipos de ARNm, tendremos entonces una muestra de moléculas de DNAc representativa de los tipos de mensajeros expresados en esta muestra. Seguidamente se toma de esa solución una alícuota y se somete a una reacción de PCR utilizando una pareja de cebadores o “primers” específica del ADNc de interés, y si la elección de los “primers” y de las temperaturas del proceso ha sido adecuada, tendremos moléculas de ADN idénticas correspondientes a un fragmento del ARNm específico que se quiere detectar. (Hernández, *Et al* 1995)

La visualización y detección de este producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel, permitiendo la comparación entre diferentes tipos de muestra.

Hay que destacar el hecho de que tras la transcripción inversa disponemos de una mezcla de DNAc representativos de las distintas especies de ARNm celulares y que se puede tomar de ahí alícuotas para estudiar por PCR diferentes transcritos simultáneamente (siempre que se elija para cada mensajero una pareja específica de primers).

1.5.1 AISLAMIENTO CELULAR

La mayoría de los estudios a nivel celular requieren aislar las células intactas a partir de un determinado órgano para que luego estas sean cultivadas en un medio de cultivo siendo el más utilizado el medio RPMI que le otorga a las células los nutrientes necesarios para su multiplicación y/o desarrollo a una temperatura e 37% durante el tiempo que se requiera.

Mayormente las células son estimuladas con agentes mitógenos para así multiplicar el número de células inicialmente aisladas. La Concanavalina A es una lectina (proteína de unión a carbohidratos) originalmente extraída de la frijol *Canavalia ensiformis*. Se une específicamente a ciertas estructuras y se encuentran en diversos azúcares, glicoproteínas y glicolípidos, principalmente en el extremo terminal no reductor α -D-

manosil y los grupos α -D-glucosil (*Derewenda et al 1989*). La CONA es un mitógeno y es conocido por su capacidad para estimular a 4 subconjuntos funcionalmente distintos de células T de ratón, incluyendo los precursores celulares (citoquinas). (*Dwyer et al 1981*). La CONA fue la primera lectina disponible comercialmente y es ampliamente utilizada en biología y bioquímica para caracterizar las glicoproteínas y otras entidades con contenido de azúcar en la superficie de varias células, también es utilizada para purificar macromoléculas por cromatografía de afinidad, así como para estudiar la regulación de la respuesta inmune de varias subunidades celulares que forman parte del sistema inmune (*GE Healthcare Life Sciences*), también pueden ser utilizados antígenos específicos que son reconocidos por células específicas también generando así la multiplicación de determinadas líneas celulares.

1.5.2 EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR

Aislar ARN lo más intacto posible es esencial tanto para el clonado de genes como para el análisis de la expresión génica. El éxito de cualquier extracción de ARN es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ribonucleasas (ARNsas) que degradan el ARN durante y después de la extracción, provocando la obtención de ARN de cadena incompleta.

Las ribonucleasas son enzimas muy resistentes y de gran actividad catalítica 10: a) son marcadamente resistentes al calor, manteniendo incluso una considerable actividad tras un ligero calentamiento; b) son activas dentro de un amplio rango de pH; c) usualmente no requieren cofactores para su actividad.

El contenido de ARNsas endógenas varía con el tejido que se estudia: páncreas y bazo son tejidos con muy altos contenidos de ARNsas, mientras que riñón, hígado e intestino tienen niveles menores, aunque no despreciables. Un problema adicional es que el contenido de ARNm en cualquier tejido es muy bajo: una célula típica de mamífero contiene aproximadamente 10-5 ug de ARN total, del que tan sólo 1-5 % corresponde a ARNm. De ese ARNm, aproximadamente el 50 % lo constituyen clases de mensajeros presentes en un número de copias < 10 por célula.

Por esta razón, una pequeña contaminación de ARNsas, tanto endógena (del propio tejido) como exógena (del material utilizado, soluciones, manos, polvo, etc.), puede suponer un problema serio, por lo cual se deben tomar algunas precauciones.

Los recipientes a utilizar deben ser de plástico y estériles, y si se quiere trabajar con recipientes de cristal es necesario calentarlos a 250° C durante 24 horas o más (ni siquiera el autoclavado nos garantiza la inactivación de ribonucleasas) .

Hay que trabajar, además, con soluciones libres de ARNsas contaminantes, y esto se consigue tratándolas previamente con DEPC (dietilpirocarbonato) este es un agente alquilante que reacciona covalentemente y de modo inespecífico con las proteínas, pero es muy reactivo con los sitios activos de las ARNsas, inactivándolas de manera muy eficaz, aunque no absolutamente.

El DEPC sobrante puede reaccionar con el ARN y es preciso eliminarlo autoclavando las soluciones antes de utilizarlas; así, el DEPC se descompone en etanol y CO₂, que son volátiles.

Una vía para eliminar la degradación de ARN durante la extracción es desnaturalizar todas las proteínas celulares, incluyendo las ARNsas. Se utilizan potentes agentes caotrópicos, como las sales de guanidinio. Desde hace tiempo se sabe que las proteínas se desnaturalizan y, por tanto, pierden su actividad a concentraciones 4M de cloruro de guanidinio, en contraste con la estructura secundaria de los ácidos nucleicos, que casi no se ve afectada. La eficacia del tiocianato de guanidinio (GTC) es aún mayor y su uso es prácticamente universal en todos los métodos de extracción de ARN. Como ejemplo de su efectividad baste decir que la vida media de las ARNsas pancreáticas es de 3 minutos en 8M urea y de sólo unos 5 segundos en tiocianato de guanidinio 4M. La solución en que el tejido debe ser homogeneizado debe tener 4M GTC, además de detergentes (como el SDS o el sarcosil) que ayudan a romper membranas celulares y desnaturalizar proteínas, y agentes reductores (como el 2-mercapto-etanol) que contribuyen también a la desnaturalización proteica mediante la rotura de puentes disulfuro (típicos de las ARNsas).

Las técnicas caseras de ARN han sido frecuentemente empleadas, las cuáles involucran la homogenización del tejido con buffer que contenga tiocianato de guanidino, seguida de una extracción por fenol y una precipitación alcohólica. Actualmente el número de kits para extracción de ARN están comercialmente disponibles en el mercado; estos usualmente obvian la necesidad de utilizar fenol.

Entre los kits comerciales actualmente utilizados se encuentran las cromatografías en columna y la extracción en base a partículas magnéticas tanto para ARN total como ARNm, estos a comparación de los métodos tradicionales otorgan una mayor rapidez y menor contacto con las muestras.

Al realizar la extracción de ARN generalmente se encuentra contaminado con ADN genómico.

La mejor manera de purificar ARN sin contaminación por ADN genómico es utilizando o sometiendo a la muestra a DNAsas o por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, pero en rutina de laboratorio no es lo más práctico. La solución más simple para este problema es el uso de primers libres de intrones, para el RT-PCR puesto que los productos del PCR que derivan del ARNm son fácilmente distinguibles de los que derivan de la contaminación de ADN genómico por la diferencia de tamaños, siendo más grandes los productos que derivan del ADN genómico a comparación de los de ARNm.

Si la región target de ARNm no contiene intrones puede utilizarse el reactivo “libre de DNAsas” en las muestras de ARN pero requeriría de un procedimiento para eliminar estas DNAsas antes del RT-PCR. (*Hernández et al 1995*)

1.5.3 RETRO TRANSCRIPCIÓN – REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Tras la extracción de ARN es necesario fabricar ADNc que pueda servir de sustrato para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esto se consigue mediante una enzima extraída originariamente de ciertos retrovirus, la *transcriptasa inversa* (RT), que utiliza como molde una molécula de ARN a la que se ha unido un pequeño fragmento de ADN que actúa como cebador (en nuestro caso, oligo – dT de unos 15 nucleótidos de longitud). La enzima copiará sólo los ARNm (que son los únicos que poseen extremo de poli Adenilato) y lo hará en sentido 3'-5' del ARNm.

Dependiendo de lo óptimas que sean las condiciones de la reacción, el ADNc será de longitud más o menos completa (según acabe más cerca del extremo 5' del ARNm). Sin embargo, para el método Retrotranscripción Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) la calidad de la síntesis de ADNc no necesita ser tan alta. Aunque haya muy poca abundancia de cadenas de ADNc de longitud completa («full length ADNc»), éste es un hecho irrelevante, ya que bastará con que la síntesis progrese hasta la región a la que luego se unirán los dos primers durante la PCR, y las cadenas de ADNc que no lleguen a esa zona se perderán durante la amplificación. (O'Connell 2002)

Tampoco es necesario generar mediante la RT una segunda cadena de ADNc complementaria a la primera, como ocurre para la construcción de genotecas de ADNc, ya que esa cadena será generada por la Taq polimerasa durante el primer ciclo de la PCR.

La RT-PCR se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para las investigaciones biomédicas por la facilidad con que esta técnica permite detectar y cuantificar ARNm específico como complemento de la investigación en la patogénesis de enfermedades. Las enfermedades relacionadas a desequilibrios en la expresión de ARNm (desbalance) pueden ser detectados sensiblemente por RT-PCR. El RT-PCR es un complemento integral en la mayoría de las metodologías en biomedicina incluyendo la localización *in situ* de un ARNm específico, ingeniería de anticuerpos y clonación de ADNc.

1.5.3.1 ELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Una especial atención merece el cebador (primer) utilizado para la transcripción inversa. Existen al menos tres formas de cebar la reacción con «random primers» (hexanucleótidos con secuencias al azar), con oligo (dT) o con un oligonucleótido específico en el caso de que se esté trabajando con ARN total.

La utilización de oligo (dT) tiene la teórica desventaja de producir ADNc menos completos en la región 5' del ARNm ya que usualmente la transcripción no progresa hasta el final, pero su gran ventaja es que sólo produce ADNc a partir de ARNm poli (A)+ (que son los de interés), con lo cual se evitan amplificaciones inespecíficas durante la PCR. El uso de random primers permite síntesis representativa tanto de regiones 5' como 3', pero generalmente es preciso purificar ARNm a partir de ARN total mediante cromatografía de afinidad (oligodT). De lo contrario, la transcripción inversa de ARN total con random primers rinde poco ADNc, ya que el ARNm es una fracción pequeña del ARN total. (*O'Connell 2002*)

En el presente trabajo se utilizarán cebadores específicos para el gen INFG, que será detectado en el DNAc sintetizado por retrotranscripción.

1.5.4 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para detectar el fragmento de ADNc amplificado por PCR se somete el producto de esta reacción a una electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, para separar los posibles fragmentos de ADN de distinto tamaño. A continuación se tiñe el gel en una solución con bromuro de etidio y mediante una lámpara de luz UV se visualizan las bandas de DNA.

Si hemos elegido las condiciones adecuadas (número de ciclos, temperaturas del proceso, etc.) y si no hay «splicing» alternativo, aparecerá una única banda correspondiente al ADNc amplificado, procedente del ARNm en estudio. En cambio, si no aparece tal banda, la conclusión es que en ese tejido no se expresa ese mensajero, o al menos no con la intensidad que nuestras condiciones experimentales son capaces de detectar.

Para comprobar la especificidad del producto amplificado se utilizan varios métodos:

1. Puesto que conocemos el tamaño esperado del producto amplificado, podemos comparar su migración en la electroforesis con ADN estándar de tamaño molecular conocido y también cantidad conocida.
2. Si disponemos de un oligonucleótido sintético complementario de la porción central del fragmento amplificado, podemos usarlo como sonda.
3. Si existe en el fragmento esperado una diana de restricción, su digestión con el enzima correspondiente dará lugar a dos fragmentos de tamaños conocidos.
4. Podemos también secuenciar directamente el fragmento amplificado y comprobar que su secuencia es la esperada.

La posibilidad de detectar con gran sensibilidad un ARNm mediante la estrategia RT-PCR representa la mayor aportación de esta técnica al estudio de la expresión génica. No existe casi límite para su poder de detección: Rappolee, Wang y cols. (Rappolee Et. al) han demostrado que es posible detectar un ARNm específico en cantidades muy limitadas de muestra (< 0,1 ng de ARN total), incluso aunque se trate de mensajeros con bajos niveles de transcripción. Es obvio que el estudio de la expresión génica abarca más aspectos que la simple detección de un mensajero, en una segunda etapa mediante el PCR en tiempo real cuantifica la expresión del gen en tiempo real con el empleo de un control interno permitiendo cuantificar la cantidad inicial de ADNc retrotranscrito, lo cual es lo ideal para un estudio netamente cuantitativo. Sin embargo, para la simple comparación de niveles de expresión basta con realizar RT-PCR.

De enorme interés en biología celular y fisiología es la posibilidad de semicuantificar un ARNm. Esto es posible hacerlo de un modo relativamente preciso mediante RT-PCR. Existen fundamentalmente dos métodos para medir la cantidad de un producto de PCR que ha sido separado por electroforesis en gel:

1. Al observar mediante luz UV un gel teñido con bromuro de etidio (BrEt), la intensidad de la fluorescencia emitida por cada banda es proporcional a su contenido en DNA. Esta intensidad se puede medir con un sistema densitométrico de análisis de imagen.

2. Un método alternativo consiste en añadir a la mezcla de PCR una cierta proporción de uno de los nucleótidos marcado radiactivamente (p. ej., $^{32}\text{PIdCTP}$).

Cuando se revele el gel con BrEt y se observe la banda de interés, se corta la porción del gel que contiene esta banda y se mide su radiactividad en un contador B de centelleo líquido, siendo proporcional la señal a la cantidad de producto amplificado.

En general es preferible utilizar el segundo método, ya que da estimaciones más exactas, aunque el primero es quizá el más extendido. En ambos casos, los datos son susceptibles de un tratamiento estadístico.

Sin embargo, en la realidad sólo se observa un crecimiento exponencial durante los primeros 10-25 ciclos de la PCR. Por encima de 30 ciclos se observa a menudo sólo un 10 % de eficiencia, y por encima de 60 ciclos el número de copias deja de crecer 20. Esto depende mucho de la cantidad de molde inicial, pero siempre se aprecia un plateau tras un cierto número de ciclos. Por otro lado, dado que la PCR implica una amplificación exponencial, pequeños cambios en la eficiencia durante los primeros ciclos pueden causar grandes cambios durante la amplificación.

Estos hechos explican que los datos empíricos no se ajusten fielmente a la ecuación teórica, por lo que resulta imposible deducir la cantidad inicial de ADNc, (o del ARNm de partida) midiendo la concentración del producto amplificado. A esto se une la falta de reproducibilidad de la síntesis de ADNc. Sin embargo, sí se puede estimar la cantidad inicial de un ARNm con gran exactitud utilizando un estándar interno.

El Sistema Maxwell® 16 lleva a cabo la purificación automatizada que ahorra tiempo y trabajo porque elimina los pasos de la preparación de reactivos, pipeteo y centrifugación, disminuyendo de esta manera posibles riesgos de contaminación en el momento de procesamiento de las muestras, lo cual es de vital importancia cuando se trabaja con una molécula lábil como es el ARN.

Maxwell 16 consiste en un instrumento preprogramado y cartuchos individuales preparados con reactivos, el sistema procesa de 1 a 16 muestras en alrededor de 30 minutos. Simplemente se debe agregar el lisado directamente a los cartuchos e iniciar la purificación de ARN en el equipo con rendimientos consistentes y alta pureza.

1.6 ALTA SENSIBILIDAD EN LA DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO

Una de las mayores ventajas de la RT-PCR para el estudio de ARNm es su extraordinaria sensibilidad ya que puede amplificar y detectar pequeñas cantidades de ARNm dependiendo de la especificidad de los marcadores utilizados para la detección del nivel de expresión de genes.

La RT-PCR semi - cuantitativa facilita la identificación de la expresión diferencial de ARNm de forma individual para ser medidos o caracterizados en varias muestras y poder compararlas.

1.7 INTERFERÓN GAMMA

El interferón-gamma (INFg) es una citoquina dimérica soluble, es el único miembro de la clase de tipo II de los interferones. Este interferón fue originalmente llamado factor activador de los macrófagos.

El INFg o interferón de tipo II es una glicoproteína multifuncional producida principalmente por sub - poblaciones de linfocito TCD4⁺ Th1, células CD8⁺, células NK, linfocitos con TCR (receptor de la célula T). Actúa inhibiendo la replicación viral, influye en el tipo de inmunoglobulinas secretadas por las células B, además aumenta la expresión de moléculas del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de tipo I y de tipo II, e incrementa la eficiencia de los macrófagos para eliminar parásitos intracelulares (*Ijzermans, et al 1989*), (*Mogensen, et al 1987*). La mayoría de las actividades atribuidas al INFg son producidas por proteínas inducidas por esta citoquina intracelularmente. La aparición de estas proteínas es consecuencia de la ligazón de IFNg con su receptor específico, el que es diferente del receptor usado por IFN alfa e IFN beta.

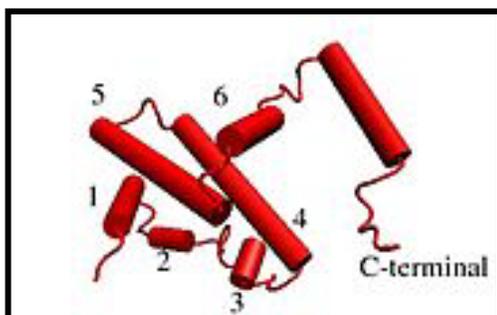


Fig 8. Estructura tridimensional del INFg

Aunque la respuesta inmune de tipo Th1 protege contra la mayor parte de las formas de leishmaniosis, parece ser que algunos tipos de respuesta inmune pueden llevar a una forma

clínica más severa, mientras que en otras llevan a la resolución de la infección.

Los genes que codifican a los interferones humanos tipo 1 están ubicados en el cromosoma 9, mientras que el gen del INFg está en el cromosoma 12 y tiene su homólogo en el cromosoma 10 de la especie *M. musculus* (ratón).

El INFg monómero consta de un núcleo de seis α -hélices y una región C-terminal es una proteína activadora de los macrófagos y tiene funciones fundamentales en la inmunidad celular adaptativa frente a los microorganismos intracelulares. (*Galindo et al 1983*)

Aunque tiene cierta actividad antivírica, no es una citoquina antivírica potente, y actúa principalmente como activador de las células efectoras del sistema inmunitario, (*Abbas et al 2008*) a través de la regulación transcripcional de genes inmunológicamente relevantes especialmente los relacionados con la respuesta de macrófagos a la infección. El interferón gamma aumenta la expresión de genes relacionados con reconocimiento de patógenos, procesamiento y presentación de antígenos, respuesta antiviral, respuesta antiproliferativa con acciones sobre la apoptosis, activación de efectores antimicrobianos, inmunomodulación y tráfico de leucocitos. (*Schroder et al 2004*)

El Interferón gamma es producido por linfocitos T CD4+ de tipo T cooperadores 1(Th1), linfocitos CD8+ y existen evidencias de que también las células B, las NK y las células presentadoras de antígeno (APC) son capaces de producirlo. El interferón gamma es una de las citoquinas más característica del perfil Th1, su producción es controlada por citoquinas secretadas por APCs especialmente por la interleucina 12 (IL-12) y la interleucina 18 (IL-18).

El interferón gamma se encarga de incrementar la respuesta de los macrófagos, el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, refuerza la actividad de las células NK (Natural Killer) y regula la función de las células B.

Los lipopolisacáridos (LPS) de patógenos y las regiones no metiladas presentes en el ADN de patógenos aumentan la producción de IFN gamma. (Schroder *et al* 2004)

1.7.1 INTERFERÓN GAMMA Y LEISHMANIOSIS

En la terminología de las enfermedades infecciosas, una infección parasitaria es la producida por parásitos animales, tales como helmintos y ectoparásitos. En la actualidad, estos parásitos son responsables de una morbilidad y una mortalidad superiores a las generadas por cualquier otra clase de microorganismo infeccioso, en especial en los países en vías de desarrollo. Se calcula que alrededor del 30% de la población mundial sufre infestaciones parasitarias.

La mayoría de los parásitos tienen ciclos vitales complejos, una parte de los cuales tiene lugar en el ser humano (o en otros vertebrados), mientras que el resto depende de huéspedes intermediarios, como moscas, garrapatas o caracoles. El ser humano suele infectarse a través de picaduras de los huéspedes intermediarios. La mayoría de las enfermedades parasitarias son crónicas, dadas por la debilidad de las defensas inmunitarias innatas contra ellas y la capacidad de los parásitos para evitar o resistir la eliminación a través de las respuestas inmunitarias adaptativas. Además muchos antibióticos antiparasitarios no erradican con eficacia estos microorganismos.

Generalmente los patógenos que ingresan son opsonizados por los macrófagos y se mantienen en el citoplasma de la célula. Eventualmente los lisosomas se fusionan con los fagosomas y descargan sus contenidos. Las enzimas lisosomales lisan a los patógenos. Durante la opsonización los fagocitos son activados para producir especies reactivas de oxígeno o especies intermediarias del nitrógeno y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), contribuyendo así a su estado de activación.

La leishmaniosis es una enfermedad infecciosa producida por el parásito del género *Leishmania* diseminada por un insecto del género phlebotomus y endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, se han notificado casos de leishmaniosis solo en 32 de los 88 países endémicos, el número de personas con leishmaniosis visceral por año se acerca a los 0,5 millones de estos el 90% corresponden a Bangladesh, Brasil, India, Nepal, y Sudan. Otros 1,5 millones de individuos con leishmaniosis cutánea o mucocutánea de los cuales cerca del 90% corresponden a Bolivia, Brasil y Perú y cerca del 90% de leishmaniosis cutánea ocurre en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita, y Siria. En total la prevalencia mundial estimada es de 12 millones de casos.

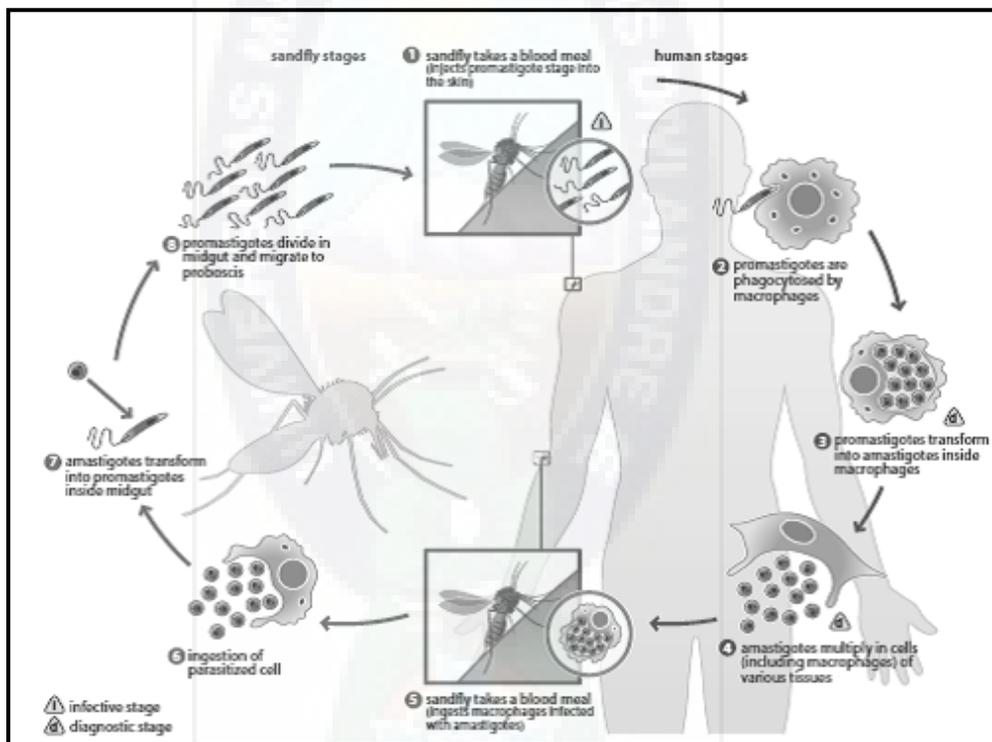


Fig. 9 Ciclo biológico del parásito *Leishmania*

La Leishmaniosis se presenta en cuatro formas diferentes con un amplio rango de manifestaciones: Leishmaniosis Visceral (VL), Leishmaniosis Mucocutánea (MCL), Leishmaniosis Cutánea (CL) y Leishmaniosis cutánea diseminada (LCD). (Lydyard et al 2010) Los promastigotes atraviesan la piel y son fagocitados por los macrófagos y neutrófilos.

En los últimos años, se ha evidenciado la existencia de una polarización funcional en la respuesta de las células T CD4+ basado en su perfil de secreción de citoquinas contra el parásito intracelular. Unas células T colaboradoras de tipo 1 (Th1) producen INFg, IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF-B) los cuales activan macrófagos y son responsables de la inmunidad celular mediada por células. En contraste unas células T colaboradoras de tipo 2 (Th2) producen IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, las cuales son responsables de una fuerte respuesta por anticuerpos e inhiben muchas de las funciones del macrófago. Las respuestas Th1 preferentemente se desarrollan durante las infecciones por bacterias intracelulares, mientras las células Th2 predominan durante las infestaciones por nematodos gastrointestinales. (Romagnani 1995)

Los macrófagos son activados por el interferón gamma producido por las células de tipo Th1 y la IL-2 estimula la presentación antigénica por las células dendríticas. Cuando la interacción con los patógenos toma más tiempo los macrófagos y las células Th1 se organizan en granulomas.

La infección de un ratón por *Leishmania major*, que sobrevive en el interior de los endosomas de los macrófagos, es el ejemplo mejor conocido de cómo el predominio de las respuestas Th1 o Th2 determina la resistencia o tendencia a la enfermedad. La resistencia a la infección se asocia a la activación de los linfocitos Th1 específicos de *Leishmania*, que elaboran interferón gamma para activar a los macrófagos, con el fin de que estos destruyan los parásitos intracelulares. Por otro lado, la activación de los linfocitos Th2 por los protozoos conlleva una prolongación de la supervivencia de los parásitos y la exacerbación de las lesiones, debido a las acciones supresoras de los macrófagos que tienen las citoquinas de los linfocitos Th2, en especial la interleucina 4 (IL-4). (Calla.J. Et al 2009)

El sistema inmune es crucial en el control de la infección por *Leishmania*, como demuestra el hecho de que enfermedades inmunosupresivas, como el SIDA, incrementa el riesgo de los pacientes de desarrollar Leishmaniosis visceral. La inmunidad, mediada por células juega un rol central en la respuesta a patógenos intracelulares. (Calla.J. Et al 2009)

Aunque la respuesta inmune de tipo Th1 protege contra la mayor parte de formas de Leishmaniosis, parece ser que algunos tipos de respuesta inmune dirigida contra *Leishmania* pueden llevar a una forma clínica más severa de Leishmaniosis, mientras que en otras llevan a la resolución de la infección con poca patología como en la CL. Los datos proveen evidencia que una inadecuada modulación de una respuesta Th1 puede producir una expansión clonal exagerada de células T reactivas. Estas células T reactivas pueden estimular la producción de INF g que puede llevar a una reacción exagerada y puede contribuir a la inmunopatogénesis. (*Calla.J. Et al 2009*)

La respuesta de las células T en las lesiones no está totalmente entendida, se ha observado marcada heterogeneidad en el curso de CL. Varios estudios han analizado la expresión de genes intralesional en CL. En CL causada por *L.brazilensis*, INFg fue preferentemente expresada en las lesiones localizadas mientras que IL-4, IL-5 e IL-10 fueron detectadas en las formas mucosa y difusa de la enfermedad. Sin embargo pacientes infectados con *L mexicana*, niveles elevados de ARNm de IL-10 e INFg fueron expresados. Más aún, IL-13, que comparte funciones con IL-4, ha sido detectada en la mayor parte de los especímenes de pacientes con leishmaniosis causados por *L. guyanensis* (*Pirmez et al 1993*) (*Calla.J. Et al 2009*)

Para sobrevivir, leishmania necesita revertir el proceso o la activación de las células Th1. Varios efectos han sido descritos, pero los mecanismos aún no están del todo claros. Algunas moléculas de leishmania que han demostrado experimentalmente formar parte de dicho proceso son los lipofosfoglicanos un metaloproteína de membrana (gp63). El resultado es la inhibición de la activación de macrófagos de la generación de EROS y ENOS. La proteína gp63 es homólogo del receptor de la proteína C quinasa activada (LACK). En respuesta a LACK existe la rápida producción de IL-4, montándose así la respuesta de tipo Th2 la cuál inhibe la respuesta inmune de tipo Th1. (*K. Kemp2000*)

1.8 EVANTA Y LEISHMANIOSIS

Los fármacos de primera elección contra la leishmaniosis están basados en componentes pentavalentes antimónicos, los cuales tienen un alto nivel de toxicidad y cuando son administrados requieren de control clínico ya que presenta efectos secundarios. (A Fournet. *Et al* 1994)

El desarrollo de fármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades es esencial, especialmente para aquellas enfermedades de impacto global, como las infecciosas. El hecho de que las enfermedades infecciosas afecten a las poblaciones de más bajos recursos económicos y que muchas de ellas se traten con hierbas debido a la accesibilidad y al costo, muestra la urgencia de llevar a cabo programas que detecten remedios locales con la mayor eficacia, de hecho actualmente existe el interés de estudiar fuentes naturales de nuevas drogas. Sin embargo, pocos son los datos que estiman la eficacia, seguridad y validación de estas nuevas alternativas. (Calla. *Et al* 2009)

Las personas que viven en áreas endémicas necesitan tratamientos quimioterápicos repetidos, debido a su continua exposición, y es frecuente que el coste y los problemas logísticos hagan imposible la administración de tales tratamientos. Por tanto, desde hace mucho tiempo se considera que la obtención de vacunas profilácticas es un objetivo importante para los países en desarrollo.

Muchas drogas utilizadas para el tratamiento de enfermedades han mostrado que no solo eliminan al patógeno sino que modifican la respuesta inmune.

Galipea longiflora (Krause) (*Angostura longiflora* Kallunki) es una planta que está siendo utilizada para el tratamiento de la leishmaniosis. Es un árbol que se encuentra en el área amazónica de Sud América que incluye Bolivia y es conocida localmente con el nombre de Evanta. Basados en el conocimiento tradicional y estudios científicos mostraron que el extracto crudo de Evanta tiene capacidad antiparasitaria. (Giménez *Et al.* 2005)

Estudios *in vivo* han mostrado que los alcaloides encontrados en la Evanta exhiben efecto leishmanicida, mostrado por una reducción en el tamaño de las lesiones cuando

alcaloides purificados son administrados a ratones infectados con *L. donovani*, *L. brazilensis*, *L. amazonensis* y *venezulensis*. (A *Fournet. Et al 1994*) (*Calla.J. Et al 2009*)

1.9 JUSTIFICACIÓN

La Leishmaniosis es una enfermedad parasitaria endémica que aún no ha sido erradicada en nuestro país ni en el mundo. El tratamiento contra la leishmaniosis consiste en la utilización de fármacos altamente tóxicos como el Glucantime y la anfotericina B (*Fournet. Et al 1994*) ya que debe suministrarse una alimentación alta en proteínas durante todo el tratamiento, y éste debe ir precedido, de la corrección de una eventual carencia de hierro o de cualquier otra carencia específica. Hay que vigilar el electrocardiograma, y las funciones hepática y renal durante todo el tratamiento. En caso de aparecer anomalías, hay que reducir la dosis, este producto contiene sulfitos que pueden en un momento dado ocasionar o agravar reacciones de tipo anafiláctico. Al comienzo del tratamiento puede presentarse una reacción febril transitoria acompañada de escalofríos o sensación de debilidad excesiva con sudoración, tos asociada con el antimonio y vómito. Cefalea, malestar general, disnea, erupción cutánea, edema de la cara y dolores abdominales, problemas funcionales hepáticos y renales. Se han observado muy raros casos de pancreatitis. Las alteraciones del electrocardiograma se presentan en función de la dosis y suelen ser reversibles lo que nos dirige al estudio exhaustivo de un tratamiento accesible y menos tóxico y administración sencilla a la población involucrada, ya que afecta en especial a las personas de bajos recursos ubicadas en las zonas tropicales de Bolivia y el mundo.

La búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento menos tóxicas y menor costo contra la leishmaniosis se enfoca en la utilización de extractos de alcaloides de plantas medicinales.

La búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para la leishmaniosis requiere el desarrollo de un estudio exhaustivo a diferentes niveles, que permita determinar el mecanismo de acción, en este caso, de los alcaloides totales de *Evanta*.

En la Leishmaniosis cutánea la producción de interferón gamma, tiene un efecto crucial para la resolución o agravamiento de las heridas. Hasta la actualidad han sido estudiadas

superficialmente, algunas plantas como alternativas de tratamiento contra la Leishmaniosis. Los extractos de Alcaloides totales de Evanta han mostrado tener un efecto leishmanicida, pero a su vez parece también tener un efecto modulador a nivel del interferón gamma (*Calla.J. Et al 2009*)

Ha sido demostrado que el estudio a nivel genético es una de las herramientas más utilizadas en la actualidad debido a su alto grado de especificidad y sensibilidad en comparación de los métodos convencionales para diferentes estudios, no obstante son un complemento importante para la investigación, por lo que el presente trabajo pretende estandarizar e implementar una nueva técnica que en este caso permita la detección de la expresión de interferón gamma en células sometidas a extractos de alcaloides totales de evanta (EAE) y otras variables como ser Concanavalina A y antígeno purificado de leishmania, posteriormente dicha técnica podrá ser empleada para la detección de otros genes involucrados en diferentes procesos que conllevan a una determinada enfermedad.

La etapa posterior a la detección y semicuantificación del gen interferón gamma, es la cuantificación en tiempo real (Real Time PCR) que permitirá el monitoreo de los cambios de expresión en las diferentes fases de la infección y el cambio de las respuestas biológicas frente a varios estímulos cuantificando la expresión del gen en tiempo real para implementar el estudio en ensayos In vivo con muestras de tejido de ratón y células de personas con leishmaniosis y así poder cuantificar la expresión In situ en el caso de tejido de ratones con leishmaniosis cutánea, por lo cual con los datos obtenidos que entre ellos está incluida la caracterización del gen interferón gamma se pretende terminar el trabajo con el diseño de las sondas marcadas para en una segunda etapa realizar el real time PCR, ya que esta técnica cuantitativa nos permitirá a su vez comprender la interacción de INFg y el parásito Leishmania a diferentes niveles de evolución de la enfermedad.

El presente trabajo sentará las bases técnicas preliminares para estudios mediante PCR en tiempo Real que podrá ser aplicado para el estudio de diferentes enfermedades.

Actualmente se conoce que el extracto de alcaloides totales de evanta (EAE) ejerce un efecto leishmanicida en pacientes con leishmaniosis. Sin embargo, parece ser que a su vez ejerce un efecto sobre la regulación de la respuesta inmune del organismo, específicamente en la regulación de producción de interferón gamma por las células T

colaboradoras de clase 1 dicha regulación involucra las etapas transcripcionales y post transcripcionales de la síntesis de proteínas.

Para implementar el uso de los extractos de alcaloides totales de evanta que mostraron tener un efecto leishmanicida como tratamiento alternativo es necesario dilucidar el mecanismo de acción de estos alcaloides sobre el sistema inmune u otros mecanismos involucrados en la resolución de lesiones cutáneas en pacientes con leishmaniosis, es por eso que los ensayos en animales de experimentación como los ratones permiten cumplir este objetivo.

Los métodos y técnicas convencionales para el estudio de las enfermedades, tratamientos y mecanismos de acción cada vez son menos específicos debido a la aparición de nuevos factores involucrados en dichos mecanismos. En la actualidad estos factores son estudiados de manera más exhaustiva a nivel genético debido a que los mecanismos de regulación genética pueden ser responsables de la mayoría de las enfermedades infecciosas, virales y oncológicas.

Por lo que el presente trabajo pretende realizar el estudio de la producción de INFg a nivel transcripcional (expresión génica) para evaluar el efecto de los extractos de Evanta sobre dicho mecanismo bajo el marco del Proyecto ASDI "Enfermedades Infecciosas".

2. HIPÓTESIS

La expresión del gen INFg se encuentra modulada por los Extractos de Alcaloides Totales de Evanta y es detectable y semi-cuantificable mediante la combinación de métodos semi-automatizados de extracción y purificación de ARN mensajero, de retro transcripción y post-amplificación, y el empleo de un gen normalizador, que permite estimar las diferencias existentes en el nivel de expresión del gen entre las células murinas sometidas a diferentes variables.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Detectar la expresión del gen del interferón gamma en células esplénicas de ratón mediante la combinación de métodos semi - automatizados de retro transcripción y post-amplificación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar ARN total y mensajero mediante la combinación de métodos semi automatizados basados en propiedades de atracción magnética Maxwell 16 y Poly AT tract a partir de células murinas sometidas a Antígeno de Leishmania, Concanavalina A y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta
- Implementar la técnica de retrotranscripción – reacción en cadena de la polimerasa para la obtención de ADN copia específico del gen interferón gamma en células esplénicas de ratón sometidas a Antígeno de Leishmania, Concanavalina A y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.
- Obtener datos preliminares de semicuantificación mediante la utilización de la expresión constante del gen de la beta – 2 – microglobulina como gen normalizador.
- Secuenciar el gen de interferón gamma de ratón para el diseño de sondas marcadas que posteriormente podrán ser utilizadas en la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (Real – Time PCR)

4. METODOLOGÍA

Cultivo de Células esplénicas de ratón.

Las células esplénicas fueron obtenidas mediante el aislamiento celular por densidad en gradiente utilizando el reactivo ficoll hipaque a partir de bazo, órgano linfoide

secundario en el cual se da el proceso de maduración de las células del sistema inmune de los ratones utilizados como modelo animal para el experimento, posteriormente fueron cultivadas en RPMI bajo el siguiente esquema:

- Solo células. (Control negativo)
- Células + Concanavalina A. (CONA)
- Células + Concanavalina A +Extracto de alcaloides totales de evanta (EAE)
- Células + Antígeno purificado de leishmania (Ag)
- Células + Antígeno purificado de leishmania + extracto de alcaloides totales de evanta.

Tabla 1.
Estimulación In vitro de Cultivos celulares

VARIABLE IN VITRO	CONA	CONA + EAE	Ag	Ag + EAE	
CONCENTRACIÓN (ug/ml)	5	5	10	20	10
TIEMPO (horas)	48	48	24	48	24
En medio RPMI a 37oC , 5% de CO2 y 90% de humedad					

4.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

500 ul de cada cultivo celular fueron centrifugados a 300 g durante 5', luego se procedió a desechar el sobrenadante, obteniendo así el pellet de células concentrado al fondo del tupo eppendorff.

Posteriormente se siguió el protocolo señalado por la línea de reactivos Promega, utilizando el kit Maxwell® 16 Cell LEV Total ARN Purification Kit para la extracción de ARN total celular. Prácticamente el protocolo consiste en la realización de una lisis utilizando el reactivo “Lisis Buffer” junto con el reactivo beta mercaptoetanol y ARNsas con la finalidad de eliminar todas las proteínas provenientes del cultivo celular y ARNsas de la solución, seguidamente de la lisis citoplasmática se procedió a recuperar el sobrenadante en 400ul de “ARN dilution Buffer” obteniendo alrededor de 600ul de mezcla en la cual se encuentra el ARN liberado de las células.

Las mezclas de los tubos fueron depositadas cada una en sus respectivos cartuchos proporcionados por el kit para luego ser sometidas a la purificación automatizada empleando el equipo Maxwell 16.

Cada cartidge contiene 8 pozos en los cuales las moléculas de ARN son purificadas y luego atrapadas gracias a las partículas magnéticas (magnesil) que por atracción magnética se pegan a ellas las moléculas de ARN y posteriormente son eluidas en agua libre de nucleasas.

1. ARN Lysis Buffer (RLA) (muestra)
2. MagneSil® PMPs.
3. ARN Lysis Buffer (RLA)
4. Yellow Core Wash Solution
5. ARN Alcohol Wash B
6. ARN Alcohol Wash B
7. ARN Alcohol Wash B

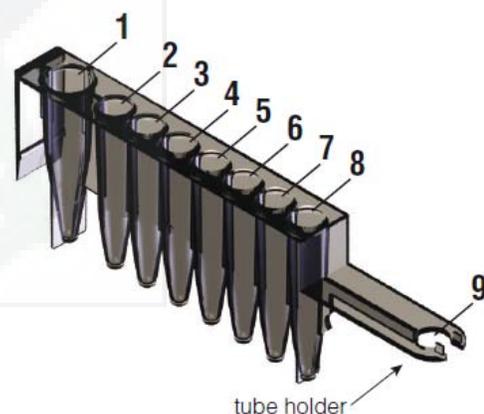


Fig. 10 Cartucho de purificación RNA total Maxwell 16 Cell LEV

8. Empty (Plunger)

9. Holder tube

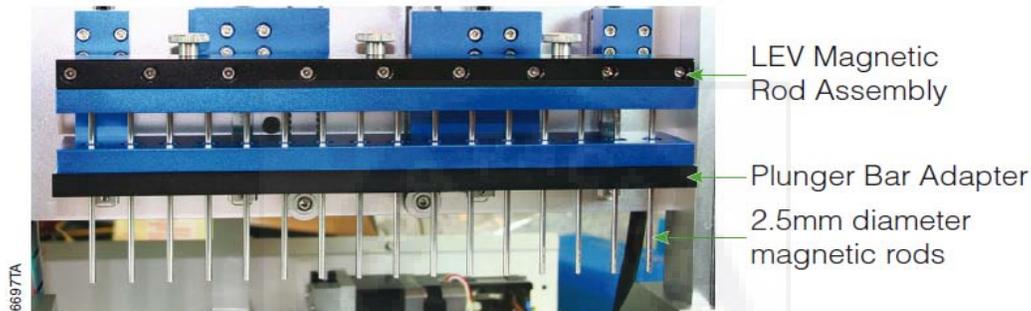


Fig.11 Maxwell 16 Hardware Bajo volumen de Elución

El bajo volumen de elución permite obtener el ARN total más concentrado ya que el volumen de elución es de 30 – 100 ul de agua libre de nucleasas.

Las muestras fueron eluidas en 55 ul de agua libre de nucleasas. Para visualizar el ARN obtenido, se realizó la corrida electroforética en gel de agarosa al 1,2% con envirosafe (agente intercalante no cancerígeno) durante 30 min a 100 voltios. Posteriormente las muestras fueron almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar la posible degradación de ARNm por ARNsas restantes u otras nucleasas.

4.2 PURIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO

Para la purificación de ARN mensajero, la metodología fue en base también al uso de tubos que en su interior contienen magnesil con un buffer de conservación.

Las partículas de magnesil fueron lavadas con soluciones SSC (87.7g NaCl y 44.1g citrato de sodio) de la línea de reactivos y equipos Promega al 0.2 X y 0.5X de concentración, luego se añade una mezcla de sondas oligo dT las cuales por atracción magnética logran aislar el ARN mensajero de ARN total, identificando la cola poli A característica de los ARN mensajeros maduros. Basándose en la atracción magnética el ARNm recuperado en agua DEPC libre de nucleasas fue de 250ul, en este paso las

moléculas de ARNm pegadas a las PMPs son despegadas y eluidas obteniendo así un producto apto para la retrotranscripción – reacción en cadena de la polimerasa. La obtención resultante es una mezcla de ARNm que codifican a diversas proteínas.

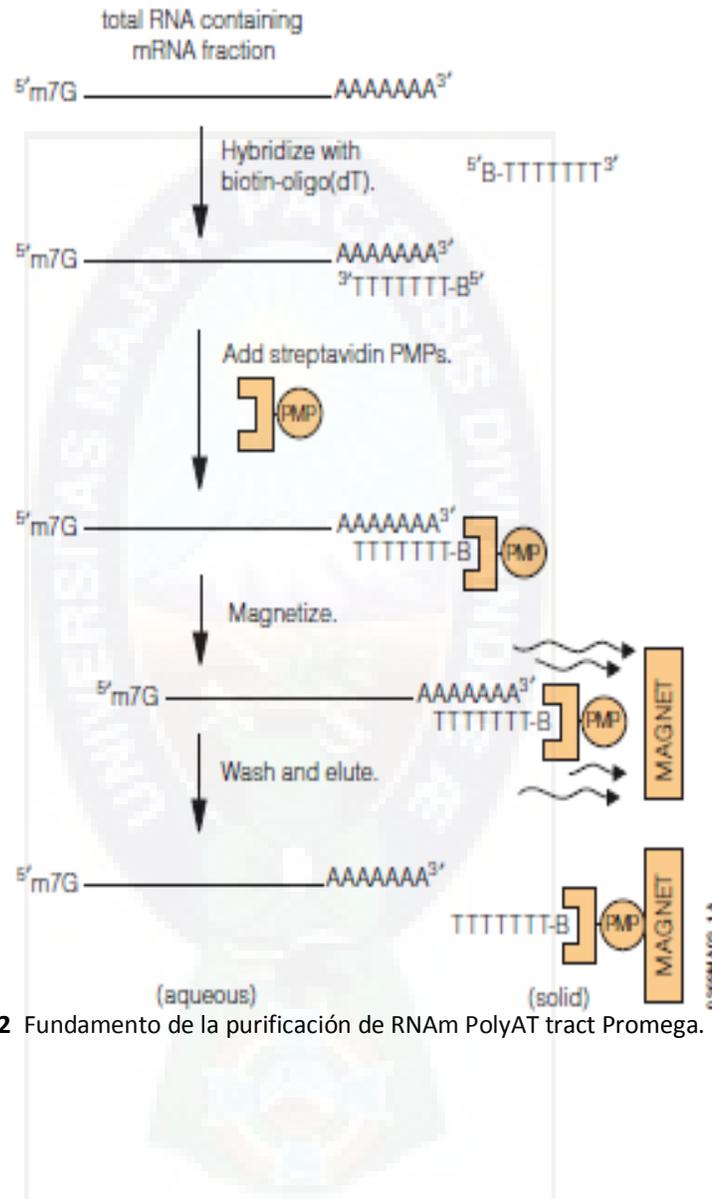


Fig. 12 Fundamento de la purificación de RNAm PolyAT tract Promega.

4.3 RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARNm Y AMPLIFICACIÓN DE ADNc DEL GEN INTERFERÓN GAMMA

Para la retrotranscripción de ARNm y posterior amplificación del ADNc se emplearon un par de oligonucleótidos (cebadores) específicos para la amplificación de una región conocida del gen de interferón gamma, ubicada en el cromosoma 12 del ratón.

IFNg

Forward GCA TCT TGG CTT TGC AGC TC

Reverse CGA CTC CTT TTC CGC TTC CT *Gerald. S Et al 1999*

B₂M

Forward ATGGCTCGCTC-GGTGACCCTAG

Reverse TCATGATGCTTGATCACATGTTCTG *Yong Et al 2006*

Los componentes de un sistema de retrotranscripción consiste en Buffer, dNTP mix, un par de cebadores, magnesio, Taq polimerasa y retro transcriptasa. Las concentraciones de los componentes pueden variar de acuerdo al tipo de muestra y mediante el proceso de optimización disminuir o aumentar volúmenes de reacción en nuestro caso el volumen de reacción era 50ul por tubo pero al final del proceso de estandarización y optimización el volumen final de reacción fue de 20ul por tubo.

La retrotranscripción fue de un solo paso, en el cual se combinan los componentes tanto de retrotranscripción como de amplificación sin la necesidad de realizar dos reacciones por separado. El protocolo de ciclaje fue estandarizado en base a la temperatura de hibridación de los cebadores y es el siguiente:

Retrotranscripción	35oC	45 min.	1 ciclo
Pre desnaturalización	94oC	2 min.	1 ciclo
Desnaturalización	94oC	30s	}

Hibridación	57oC	1min	40 ciclos
Polimerización	68oC	2min	
Polimerización final	68oC	7min	
Suspenso	4oC		

La utilización del gen normalizador, en nuestro caso Beta – 2 – microglobulina nos permite evaluar el efecto del extracto de alcaloides totales de evanta sobre la expresión del gen interferón gamma en células esplénicas, normalizando los datos semicuantitativos obtenidos evitando que sean influenciados por el número de células iniciales, el aumento de número de células por la acción mitogénica producida por Concanavalina A de tal forma que nos permite establecer un marco referencial de semicuantificación de expresión del Interferón gamma .

La Beta -2- microglobulina es una proteína que se produce de manera continua ya que forma parte de la membrana celular y es específicamente componente del MHC .II, por lo tanto la expresión del gen que lo codifica es también continua de tal forma que sirve también como control interno.

4.4 DETECCIÓN Y SEMICUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

La cuantificación puede realizarse en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la estrategia es relacionar la señal de amplificación obtenida con el contenido en ADN empleando una curva de calibrado; para este enfoque es vital que la PCR de la muestra y de los elementos de la recta de calibrado posean una misma eficiencia de amplificación. En el segundo caso, se expresa el cambio en los niveles de expresión de ARNm; esta cuantificación relativa es más fácil de realizar, puesto que no requiere curva de calibrado, y se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar versus un gen control (también llamado de referencia, interno o normalizador o, en inglés, Housekeeping gene).

Por tanto, en la cuantificación relativa es irrelevante en qué unidades se expresa la cuantificación, y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos de RT-PCR. De hecho, el propósito de emplear uno o más genes de normalización es corregir

la variación no específica, como las diferencias en la cantidad y calidad del ARN empleado, que pueden afectar a las eficiencias de retrotranscripción y de PCR. No obstante, un aspecto crucial es que la estabilidad del gen de referencia sea una realidad (*Brunner Et al., 2004*).

La selección de los genes internos se ha realizado clásicamente en Biología Molecular analizando la estabilidad de la expresión en estudios cualitativos o de baja sensibilidad, como el examen visual de geles de ARN, densitometría de Northern blots o PCR semicuantitativa. En plena era de la genómica, es posible realizar una aproximación a gran escala empleando los chips de ADN para muchos organismos. (*Czechowski et al., 2005*) No obstante, se ha descrito que la mayoría de los genes empleados como normalizadores en la cuantificación de la expresión de ARN mensajero varían según las condiciones experimentales (*Thellin et al., 1999*) (*Stürzenbaum&Kille, 2001*) (*Radonić et al., 2004*). Por ello, es preciso estudiar la estabilidad de los genes normalizadores bajo las condiciones experimentales a emplear a fin de seleccionar estadísticamente los más apropiados.

Se han ido desarrollando diferentes tipos de software que nos permiten en base a la comparación con un estándar de cuantificación con gran aproximación la estimación de una determinada cantidad de producto de ADN obtenido por la amplificación de determinado fragmento, en nuestro caso el producto del gen interferón gamma y B-2 Microglobulina (gen normalizador) obtenido por Retrotranscripción – Reacción en Cadena de la Polimerasa.

4.5 SECUENCIACIÓN Y DISEÑO DE SONDAS PARA PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN INFg

Se realizó la secuenciación del producto obtenido por RT-PCR, mediante purificación fenólica (lavados y centrifugación con fenol) y un posterior PCR de secuenciación con solo uno de los cebadores en nuestro caso el cebador Forward del INFg para verificar que el producto obtenido es el deseado, corroborando la secuencia con referencias en el Gen Bank, teniendo un número de acceso de NM_008337.3 en el mismo.

5. RESULTADOS

5.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Los productos de ARN total disueltos en agua DEPC libre de nucleasas obtenidos a partir de células esplénicas mediante la purificación automatizada por el equipo Maxwell16, fueron de alta calidad como se puede observar mediante electroforesis en el gel de agarosa a una concentración de 1,2% una diferencia de potencial eléctrico de 100 voltios, durante 45 minutos con envirosafe el cual nos permite visualizar el material genético en el gel de forma decreciente a lo largo del gel (figura 13). Las bandas observadas corresponden a diferentes tipos de ARN de las células esplénicas de ratón.

Los ARN ribosomales 18S y 28S debido a su presencia en los organismos eucariotes son característicos de toda extracción de ARN de cualquier organismo de este tipo, la electroforesis en gel de agarosa orienta a cerca de la calidad del producto de ARN obtenido en nuestro caso no se observa degradación, se pueden observar las bandas asemejadas a una escalera de peso, en la parte superior del gel, se encuentran los extractos de ARN más pesados y en la parte inferior los de menor peso. (Anexo 7)

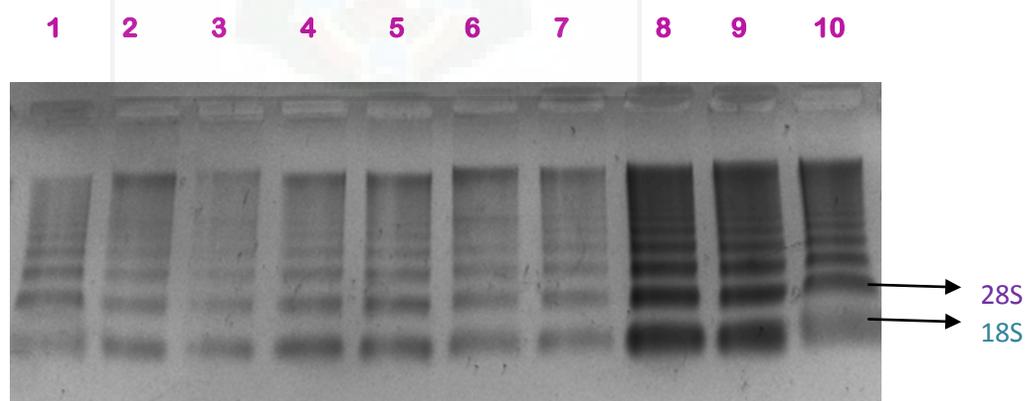


Fig.13 Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.2% de extractos de RNA total de células murinas

- 1) En el primer carril observamos los extractos de ARN de las células control negativo ya que las mismas no fueron estimuladas in vitro. Extracto de ARN → Sólo células.
- 2) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A.
- 3) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.
- 4) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania.
- 5) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.
- 6) Extracto de ARN → Sólo células
- 7) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A.
- 8) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.
- 9) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania.
- 10) Extracto de ARN → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania y extracto de alcaloides totales de evanta.

5.2 PURIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO

Después de observar los extractos de ARN total, se procedió a realizar la purificación de ARNm a partir de los mismos al igual que el anterior proceso esta purificación se basa en la atracción magnética utilizando soportes magnéticos, magnesil y soluciones SCC 20X (NaCl, Citrato de sodio).

5.3 RETRO TRANSCRIPCIÓN PCR

Los extractos de ARNm fueron resuspendidos en 250ul de agua DEPC libre de nucleasas, y fueron sometidos directamente a la Retro-Transcripción y PCR con el objetivo de obtener ADN copia a partir de ARN y posteriormente con el empleo de un par de cebadores para el gen INFg con la siguiente secuencia:

Forward GCA TCT TGG CTT TGC AGC TC

Reverse CGA CTC CTT TTC CGC TTC CT *Gerald. S Et al 1999*

El tamaño de referencia del producto del gen INFg es de 445bp y del gen B₂M es de 375bp.

Y para el gen control interno B₂M

Forward ATGGCTCGCTC-GGTGACCCTAG

Reverse TCATGATGCTTGATCACATGTTCTG *Yong Et al 2006*

Los productos de la reverso-transcripción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de concentración durante 45 minutos a 100 voltios. Para la visualización de los fragmentos de DNac se añadió al gel de agarosa 7ul de envirosafe (agente fluorescente no cancerígeno), sembrando en cada pozo 7ul de producto.

Para la comparación de las variables ConA, Ag, EAE, y las combinaciones de ambos se utilizó un patrón de masa conocida Marcador Lambda, donde la intensidad de brillo de la imagen fotográfica es directamente proporcional a la cantidad de ADN en base a esto se compararon las intensidades de las bandas mediante el software Lab Image utilizando como patrón de masa el marcador lambda. (fig 14)

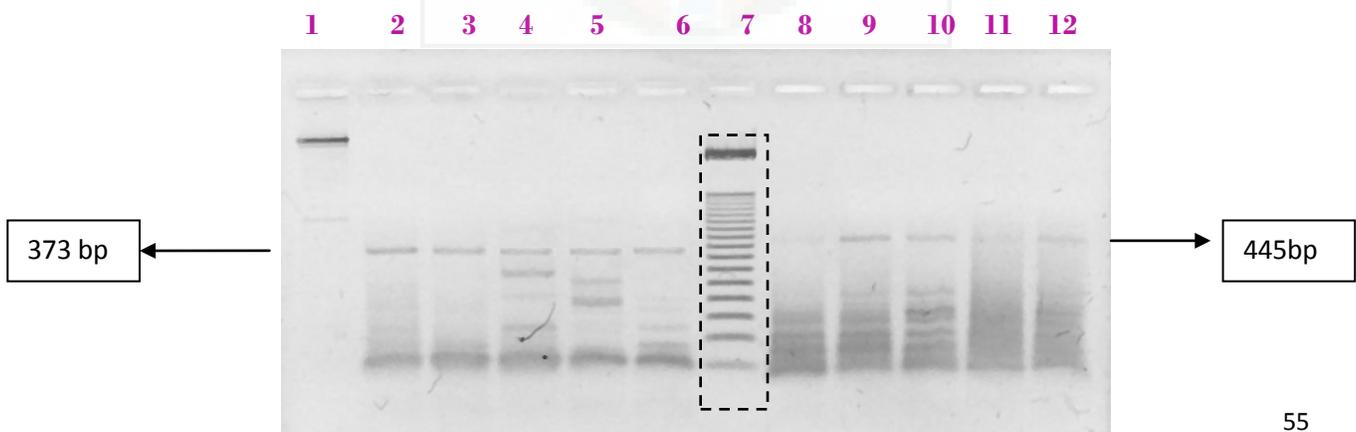


Fig.14 Revelado de **productos de RT-PCR en gel de agarosa** al 1.5%, 30min. De electroforesis a 100voltios.

1. Lambda (Marcador de masa conocida)
2. RT-PCR Beta 2 microglobulina → Sólo células
3. RT-PCR Beta 2 microglobulina → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A.
4. RT-PCR Beta 2 microglobulina → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.
5. RT-PCR Beta 2 microglobulina → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania.
6. RT-PCR Beta 2 microglobulina → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.
7. Marcador de Peso Molecular 50bp (Ladder)
8. RT-PCR Interferón gamma → Sólo células
9. RT-PCR Interferón gamma → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A.
10. RT-PCR Interferón gamma → Células estimuladas in vitro con Concanavalina A y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.
11. RT-PCR Interferón gamma → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania.
12. RT-PCR Interferón gamma → Células estimuladas in vitro con Antígeno purificado de Leishmania y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta.

Como se puede observar en la fotografía del gel (Fig.14), se logró amplificar el fragmento del gen del INFg obteniendo un tamaño de 445 pares de bases (pb), comparando con el marcador de peso molecular (ladder). A su vez la amplificación de la B - 2-

Microglobulina fue exitosa también, obteniendo un peso aproximado de 373pb. Los tamaños obtenidos fueron los esperados ya que se los obtuvieron al realizar PCR in silico empleando el software “Fast PCR”.

5.4 DETECCIÓN Y SEMICUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN INFg

Posteriormente la fotografía fue analizada con el software de cuantificación “Lab Image”, comparando las intensidades en base al patrón de masa conocida “Lambda” obteniéndose los siguientes datos por muestra. Tabla N° 2

Variable In Vitro	C-	CONA	CONA+EAE	AG	AG+EAE
Gen					
BETA	40,5	38	30	30	23,5
IFNg	23	40,4	42,3	45,3	49,2

Tabla N°2. Estimación cuantitativa de los productos de amplificación B2M e INFg de control negativo, Concanavalina A, Antígeno purificado de Leishmania, Concanavalina A combinado con Evanta, Antígeno purificado de Leishmania combinado con Evanta

Como se puede observar en la tabla de estimación de masa para 40,5 ng de B2M corresponde 23ng de INFg en el control negativo, estos datos serán utilizados para la normalización ya que corresponde al control negativo que consiste en solo células sin ningún tratamiento in vitro.

NORMALIZACIÓN ARITMÉTICA	VARIABLE IN VITRO				
	C-	CONA	CONA+EAE	AG	AG+EAE
IFNg(ng)	-17,5	2,4	12,3	15,3	25,7

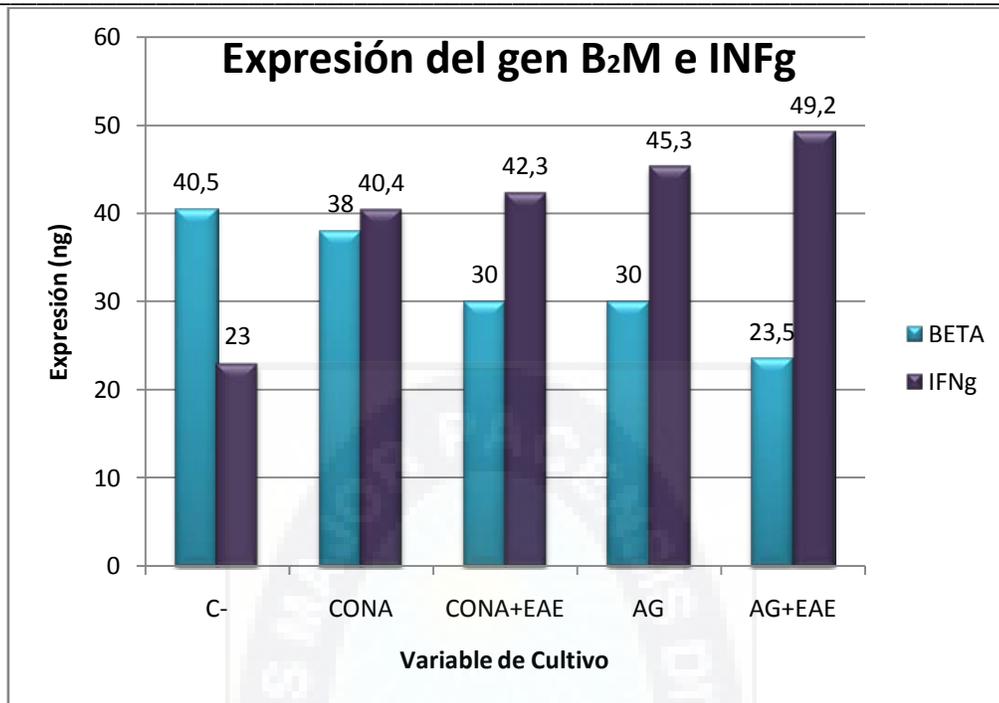
Tabla N° 3 Normalización aritmética de los datos obtenidos mediante el ajuste al gen normalizador (B₂M)

En la tabla N° 3 y 4 se observan los datos de normalización Aritmética y proporcional respectivamente a la señal basal en este caso B₂M (gen normalizador) del control negativo,

donde la producción de INFg es inferior a la producción basal proporcionándonos un valor negativo, lo que demuestra que la normalización aritmética no es la conveniente para el presente estudio. Sin embargo en la tabla 4 que corresponde a la normalización lineal o proporcional podemos observar que no se obtienen datos negativos y que el incremento de la producción de interferón gamma incrementa en forma proporcional al del gen normalizador y no altera el producto del cociente entre los niveles de expresión del gen INFg y B₂M.

NORMALIZACIÓN LINEAL O PROPORCIONAL	VARIABLE IN VITRO				
	C-	CONA	CONA+EAE	AG	AG+EAE
B ₂ M	40,5	40,5	40,5	40,5	40,5
IFNg(ng)	23,0	43,1	57,1	61,2	84,8

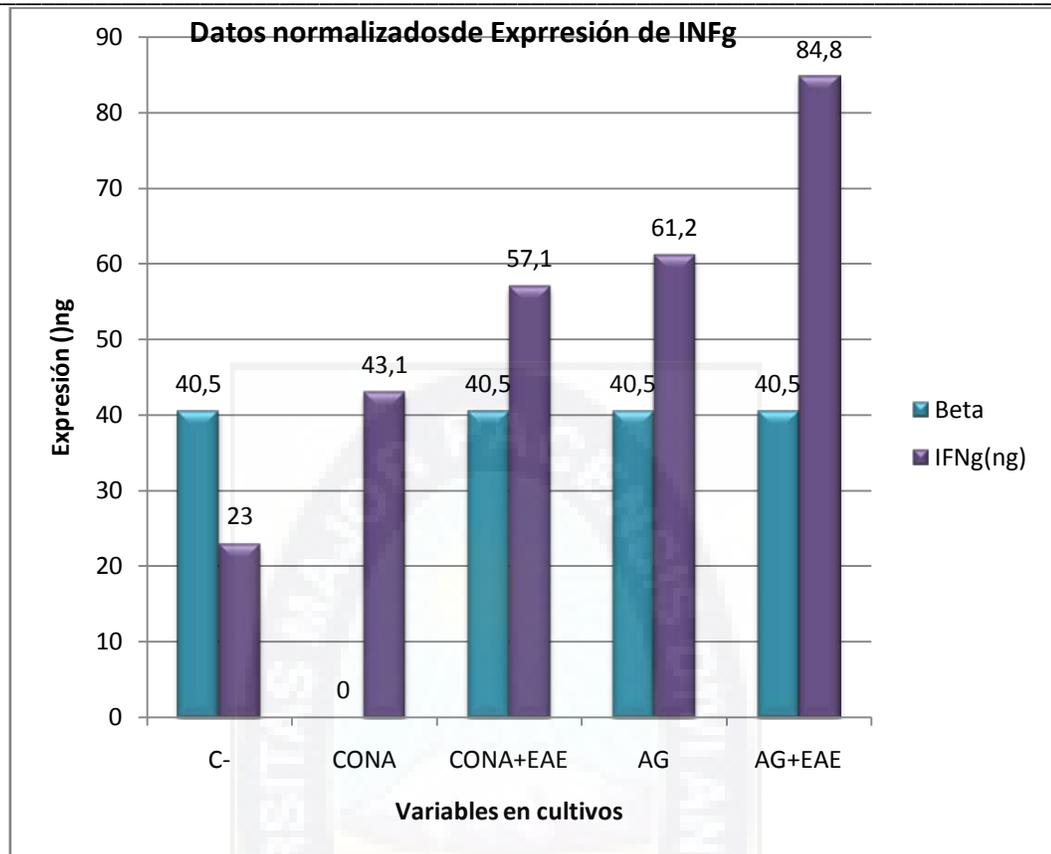
Tabla N° 4 Normalización lineal o proporcional de los datos obtenidos mediante el ajuste al gen normalizador (B₂M)



Gráfica 1 Representación del nivel de expresión del gen de interferón gamma y Beta 2 microglobulina

En la gráfica N°1 se encuentran plasmados los datos de expresión obtenidos con el Software LabImage producto de la medición de la intensidad de las bandas de la imagen fotográfica. Las barras de color celeste representan la expresión del gen B₂M en los diferentes cultivos celulares mostrando ser variable de un cultivo a otro.

Las barras violetas representan la expresión del gen INFg, obteniendo como resultado la diferencia plasmada en la gráfica, en la cual el control (-), que consiste en células sin estimulación, se observa que la proporción de INFg es de 23ng para 40,5 ng de B₂M en el cultivo control negativo. Comparando los datos obtenidos en cada cultivo celular nos dan una estimación referencial comparativa entre la expresión del gen del interferón gamma y del gen beta – 2- microglobulina por muestra.



Gráfica 2 Representación del nivel de expresión del gen de interferón gamma normalizado con la expresión constante del gen Beta 2 microglobulina

La normalización nos proporciona datos diferentes a comparación de los proporcionados por el software LabImage, debido a que este ajuste de datos en base a la expresión constante del gen B₂M evita que las variables a las que fueron sometidas las células no interfieran en la obtención de datos semicuantitativos.

5.5 SECUENCIACIÓN Y DISEÑO DE SONDAS PARA PCR EN TIEMPO REAL

Posteriormente se procedió a secuenciar el gen de INFg para constatar su secuencia comparándola con la base de datos del “Gen Bank”, obteniendo la siguiente secuencia: un producto de 445bp.

GCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTCTGGCTGTTACTGCCACGGCACAG
 TCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTTTAACTCAAGTGGCATAGATGTGGAAG
 AAAAGAGTCTCTTCTTGGATATCTGGAGGAACTGGCAAAGGATGGTGACATGAAAATCC
 TGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACCTCAGACTCTTTGAAGTCTTGAAAGACAATCAGG
 CCATCAGCAACAACATAAGCGTCATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCAGCAACA
 GCAAGGCGAAAAGGATGCATTGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAGG
 TCCAGCGCCAAGCATTCAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATCCA
 GCCTCAGGAAGCGGAAAAGGAGTCG

Las letras resaltadas corresponden a los cebadores empleados para la amplificación del DNAc. Esta información nos servirá para el diseño de cebadores y sondas de marcaje par el Real Time PCR.

En base a la secuencia obtenida se procedió al diseño de las sondas mediante el software ofrecido por Roché que podrán ser empleadas para Real Time PCR cuantitativo, obteniendo la siguiente sonda.

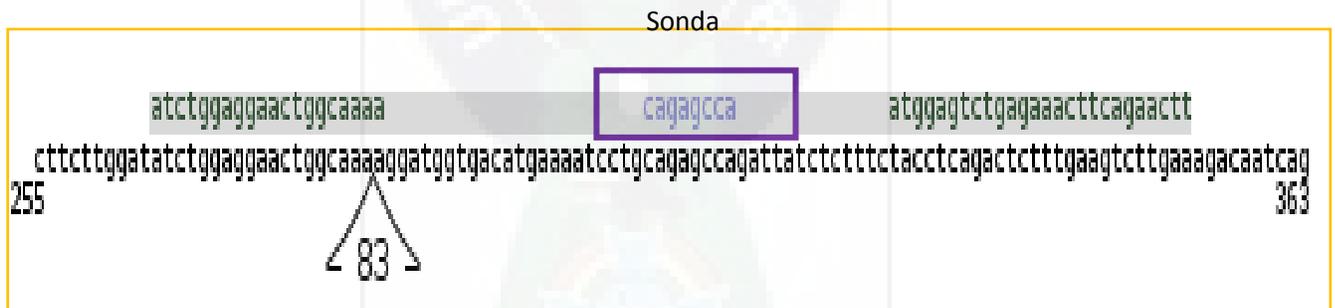


Fig.15 Esquema de la sonda marcada diseñada para Real time PCR basada en la secuencia del gen del INFg del *Mus musculus* (Ratón)

“Primer”	Longitud	Posición en el gen	Temperatura Melting	% GC	Secuencia
Izquierda	20	265-284	59°C	45	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA
Derecha	26	328-353	59°C	38	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTA
Tamaño del Amplicón: 89nucleotidos ATCTGGAGGAACTGGCAAAAAGGATGGTGACATGAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTTACCTCAGACTCTTTGAAGTCTTGAA					

Tabla N° 5 Diseño de Primers para Real Time PCR INFg *Mus musculus* (Ratón)

6. DISCUSION

A diferencia del ADN, el ARN es muy inestable una vez obtenido del tejido, por la presencia de las ARNsas celulares tiende a ser degradado con gran facilidad, lo cual representa una mayor complejidad en los procedimientos para la eliminación de estas enzimas, ya que tienen una alta actividad catalítica y son resistentes a altas temperaturas y cambios bruscos de Ph por ello resulta crítica la congelación del tejido o su rápido aislamiento celular. Una fuente potencialmente grande de contaminación con ARNsas son las manos del investigador por las células epidérmicas que se liberan continuamente. De fundamental importancia para una extracción de ARN intacto con éxito es la ejecución de todas las fases tan rápidamente como sea posible, ya que esto elimina riesgos de contaminación, ya que esta etapa es crucial para las aplicaciones posteriores.

En la actualidad los métodos de extracción de ARN se encuentran distribuidos en una amplia variedad desde los clásicos los cuales incluyen el empleo de reactivos como las

perlas de vidrio, Agua DEPC, tiocianato de guanidino, LETS (LiCl 0,1M; EDTA 10mM; SDS 0,2%, Tris.HCl 10mM pH=7,4), fenol-cloroformo, que al no ser retirado de forma correcta el cloroformo llega a interferir en la reacción de RT-PCR. Los reactivos utilizados en este tipo de extracción se mantienen en elevado costo como podemos observar en, además que requieren su preparación por separado y utilizando otros reactivos como complemento de tal forma que una extracción de ARN resulta altamente costosa. Otro de los inconvenientes consiste en las precauciones de seguridad que se deben tomar en el manejo de estos reactivos ya que en su mayoría son tóxicos y cancerígenos.

La preparación de los reactivos y su manipulación extienden el protocolo de extracción que ya por sí solo dura alrededor de 2 días, requiriendo una etapa de incubación a -20°C toda la noche, con tal de asegurar la eliminación de las ARNsas.

Mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1,2% combinado con envirosafe (revelador) los extractos de ARN total obtenidos a partir de células esplénicas de ratón, fueron visualizados mediante un transiluminador de luz ultravioleta, mostrando ser de buena calidad ya que las fracciones de diferentes ARN celulares fueron separadas y visualizadas como bandas definidas sin mostrar degradación o suciedad ni arrastres característicos de una extracción no óptima, gracias al uso combinado de un método semi-automatizado denominado Maxwell 16 el cual es un aparato que se fundamenta en la atracción magnética a través de partículas de magnesil envueltas por celulosa atrayendo el material genético de interés.

Los kits de extracción utilizados con este equipo permiten el procesamiento individualizado de las muestras ya que los cartuchos contienen 8 pozos con Buffer de lavado, etanol, y magnesil cada reactivo en un respectivo pozo, la cantidad constante de partículas de magnesil nos garantiza la obtención también constante de cantidades de ARN total, por lo cual el método cualitativo pasa a ser un método semicuantitativo que permite la estimación comparativa de valores. Este equipo realiza una purificación mecánica con astas de metal y posteriormente la elución del producto en agua libre de nucleasas reactivo también proporcionado por el kit., dichos pasos nos aseguran la obtención de material genético de buena calidad debido a que el contacto con la muestra es mínimo y la obtención de los extractos es constante en volumen, evitando los errores de pipeteo por lo tanto nos

proporciona material apto para posteriores aplicaciones, en nuestro caso para la purificación de ARNm, dicho proceso previo a la RT-PCR aumenta la especificidad de la reacción ya que los extractos de ARN total son una mezcla de ARN como los ribosomales y de transferencia, lo cual dificultaría el reconocimiento de la secuencia blanco para los cebadores. La purificación también se realizó en base al empleo de un sistema de atracción magnética de partículas, las cuales vienen contenidas por tubo para cada muestra, una vez más se trabaja con material individualizado por muestra, lo que garantiza su obtención. La evaluación de este material obtenido se la realiza ya en la última etapa, mediante la obtención de ADN copia durante la RT – PCR.

Por todo lo expuesto el uso de sistemas pre ensamblados semiautomatizados son convenientes ya que ahorran tiempo, insumos, espacio, dinero y disminuyen los riesgos para el operador, demostrando ser eficientes para la obtención de resultados óptimos.

Por otro lado Los sistemas de retro transcripción utilizados pueden ser de dos tipos: de un solo paso o de dos pasos. Los de un solo paso consisten en emplear todos los reactivos tanto de reverso transcripción (RT) como de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que el de dos pasos consiste en realizar primero la RT y luego preparar el mix de reactivos para la PCR. En esta etapa los resultados fueron los esperados, obteniendo el fragmento del gen interferón gamma a partir del ADNc sintetizado por reverso transcripción, lo cual puede deberse a la elección del sistema de un solo paso lo que omite la manipulación repetida de ARNm y del ADN copia (ADNc).

La certeza de haber obtenido la amplificación del fragmento del gen INFg radica en que este contiene intrones que en el proceso de corte y empalme (splicing) durante la formación del ARNm maduro son eliminados de la secuencia, uniéndose los exones a través de ligasas conforman una nueva secuencia ya que los intrones pueden encontrarse en varias regiones del gen. A través de la retro transcripción se obtiene la secuencia del ADN sin intrones y los cebadores son diseñados en base a esa secuencia y la flanquean. Esto elimina la inespecificidad por la posible contaminación de ADN genómico en los extractos de ARNm, ya que el ADN genómico contiene intrones por lo tanto no sirve como plantilla para los cebadores en la RT-PCR.

La combinación de la purificación del ARNm y el empleo de cebadores específicos de la región que deseamos amplificar o detectar garantizan los resultados obtenidos y aumentan la especificidad y reproducibilidad entre muestras, lo cual permite comparar las diferentes variables que queremos evaluar sobre la expresión del gen de interferón gamma.

El gen del interferón gamma ubicado en el cromosoma 10 del ratón es un gen que contiene intrones que separan a los exones que codifican para una determinada proteína por lo tanto para la elección de los cebadores es crucial en esta etapa ya que deben ser diseñados para reconocer DNAc sin intrones, ya que el ARNm se origina de la secuencia del gen luego de que de esta hayan sido eliminados los intrones por lo tanto la región que detectamos es el gen sin intrones, de esta forma también aseguramos que no haya cruce con ADN genómico ya que este no será reconocido por que contiene intrones y exones. El gen interferón gamma en el humano se ubica en el cromosoma 12 teniendo su homólogo en el cromosoma 10 del ratón, por lo tanto este tipo de ensayos nos permiten realizar la apertura para posteriores estudios en humanos y poder estimar los efectos a nivel del gen interferón gamma frente a los extractos de evanta e incluso realizar la detección in situ en tejido de ratones o pacientes con leishmaniosis.

Para la detección de fluctuaciones en la producción de interferón gamma frente a las diferentes variables evaluadas la técnica RT-PCR es suficiente para proporcionar datos preliminares que permitan visualizar algunos efectos comparando diferentes tipos de variable, para ello es necesario disminuir los posibles factores que puedan producir variabilidad y sesgo.

Los posibles factores de error por si ya son disminuidos con el empleo y la combinación de métodos semiautomatizados para la extracción de ARN total y la purificación de ARNm como el empleado en este trabajo. Sin embargo, también deben disminuirse estos factores en la etapa de amplificación lo cual se realizó con el empleo de un gen de expresión constante (gen normalizador) en todas las células del sistema en estudio.

El gen normalizador nos proporciona una señal basal a la cual podemos referir todos los datos permitiendo excluir los posibles factores de fluctuación como ser: número de células o agentes estimulantes de la división celular.

El efecto del antígeno purificado de *Leishmania* sobre la producción de INFg es más potente que el de Concanavalina A ya que la respuesta de tipo T helper 1 es específica contra parásitos intracelulares de manera que el patrón de citoquinas producidas por el tipo de células T helper 1 incluye a INFg producido específicamente contra parásitos como es el caso de *Leishmania*. Sin embargo, el efecto de la CONA también muestra un incremento en la producción de INFg pero en menor potencia ya que este es un mitógeno que solamente activa la división celular sin especificidad de linajes celulares ni de producción de citoquinas.

El efecto de la combinación del Extracto de Alcaloides de Evanta más el Ag demostraron ser los más potentes de este grupo de variables. Sin embargo, el incremento en la producción de interferón gamma por el EAE es mínimo aumentando solo en un tercio del total ya que el incremento considerable se debe al antígeno de *Leishmania*, mismo comportamiento se observa en la combinación de CONA y EAE mostrando la misma proporción de incremento por el EAE, por lo tanto no tienen un efecto considerable sobre la producción de INFg a nivel de transcripción. Considerando que puede tener efecto a otros niveles de regulación de la síntesis de INFg como ser traduccionales, excreción o secreción.

Este método de cuantificación basado en la PCR mide la cantidad de producto generado al final de la reacción de amplificación y luego estima la concentración de ADN de los extractos. Sin embargo en la cuantificación por Real Time PCR la detección comienza durante los primeros ciclos de amplificación, cuando la cantidad de producto amplificado sobrepasa un determinado umbral. Cuanto mayor es el número de copias presentes en el extracto de DNA, antes se sobrepasa este umbral y se inicia la detección lo cual es conveniente para la cuantificación absoluta de la expresión génica. Para esto el primer paso a seguir es la estandarización de las técnicas previas de Real Time como ser la Extracción de ARNm, la Reverso transcripción de ARN, la amplificación a partir del DNAc y por último el diseño de sondas marcadas en base a la secuencia del fragmento de interés en nuestro caso el gen interferón gamma. Por lo tanto las bases preliminares ya están estandarizadas en este trabajo para su posterior acoplamiento al PCR en Tiempo Real (qRT-PCR)

La normalización es un procedimiento matemático que permite ajustar datos de una misma variable, pero de diferentes sistemas y escalas, a una sola escala de referencia para poder

compararlas entre sí y este es el caso de los ensayos realizados para la semi-cuantificación de la expresión del gen INFg. Puesto que cada uno de los cinco ensayos realizados en el presente trabajo (CONA, CONA + EAE, AG, AG+EAE, C-) es un sistema independiente, la presencia de un patrón de referencia constante, como el B₂M, permite ajustar a la misma escala todos los resultados, de tal forma que es posible la semi-cuantificación comparativa de los cinco.

Otro nivel de variación en la semicuantificación realizada en el presente estudio es la captura de la imagen fotográfica, la cual fue subsanada también con la normalización de datos.

Para efectuar una normalización es necesario disponer de un patrón de referencia constante y de un patrón de triangulación de ajuste proporcional. En este caso el patrón de triangulación lo compone: 1) el mínimo valor posible de expresión, que es cero; 2) la cantidad de ADNc del gen de expresión constante beta 2 microglobulina; y 3) la cantidad relativa de ADNc del gen IFNg. La normalización se realiza ajustando todos los valores de IFNg al patrón establecido por valor B₂M del control negativo (C-) de los ensayos, aplicando una regresión lineal para predecir el valor proporcional de ADNc del gen IFNg ajustado a la escala de B₂M del control negativo. Así se obtiene las Tablas N° 3 y 4 y en el Gráfico N°2, ya ordenados de forma ascendente.

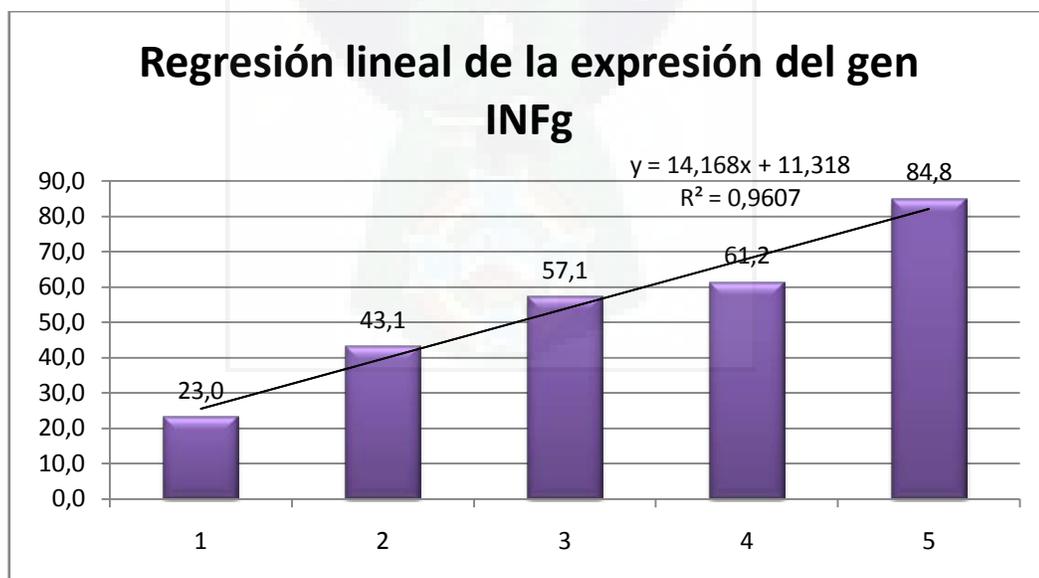


Gráfico N° 3 Regresión Lineal de los datos de expresión del gen INFg

Se ha seleccionado el modelo de normalización proporcional lineal en contraste al aritmético (en el que solo se tendría que restar el valor de B_2M al valor de IFNg) por que la expresión génica es una función que, teóricamente, se inicia en cero y tiende al infinito, mientras que para el otro modelo la función no tendría ningún límite (de menos infinito a más infinito); en consecuencia el modelo proporcional está más ajustado a la realidad que el aritmético.

Más aún, al aplicar el modelo proporcional y considerando las posibles fuentes de sesgo para la semi-cuantificación de la expresión génica, las siguientes fuentes quedan tácitamente anuladas: 1) el número diferencial de células entre ensayos, pues al emplear B_2M como referencia de normalización se elimina el efecto cuantitativo de los productos de PCR inducido por variación en la cantidad de células de cada cultivo; 2) el efecto de la estimulación o inhibición de la división celular sobre la cantidad final de ADNc de IFNg, por la misma razón anterior; 3) el efecto de la manipulación por pipeteo, pues al retirar un volumen dado de células, productos de RT-PCR o ADNc, se retira la misma cantidad de B_2M y de IFNg; y 4) las variaciones producidas por el sembrado, la electroforesis y la captura de la imagen digital, porque en todo momento se mantiene constante la relación o cociente IFNg / B_2M , y nótese que IFNg es inferior a B_2M solo en el control negativo.

Por lo tanto, la normalización efectivamente permite concluir sobre la tendencia incremental (estimulación) o decremental (inhibición) de la expresión del gen de interés bajo las variables seleccionadas (CONA, CONA + EAE, AG, AG+EAE, C-). Sin embargo y como ya se sostuvo previamente, mientras no se aplique una cuantificación por PCR en tiempo real, no es posible discutir sobre valores absolutos.

La regresión lineal del orden ascendente de estimulación de las variables ensayadas muestra un patrón lineal significativo. La única excepción corresponde a la extrema semejanza entre la combinación ConA+EAE y el Antígeno de *Leishmania* sp.. La dispersión del dato correspondiente al antígeno muestra que es similar al valor de la combinación ConA+EAE, por lo que el efecto inductor más potente corresponde a los extractos de alcaloides. Esto permite proponer que la influencia real del extracto de alcaloides (EAE) de Galipea

logiflora durante una infección con leishmaniosis es en realidad un estimulante de la respuesta inmune antes que un antihemoparasitario.

La cuantificación por Real Time PCR permite monitorizar la reacción de PCR al mismo tiempo que éste tiene lugar.

Existen dos tipos de químicas disponibles para realizar ensayos de cuantificación por Real Time PCR, SYBR-GREEN I y TaqMan. El diseño de cuantificación TaqMan se diseña una sonda específica complementaria a una región del producto que se desea amplificar (sonda TaqMan). Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó reporter (FAMTM, TETTM o VICTM) y otro unido en el extremo 3' ó quencher (TAMRATM). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el reporter es absorbida por el quencher mediante un proceso conocido como energía de transferencia de Förster (FÖRSTER 1948; LAKOWICZ 1983). Si la secuencia de ADN complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador degrada la sonda gracias a su actividad 5' nucleásica. Esta degradación hace que el reporter y el quencher se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es recogido y almacenado por el secuenciador. La separación de la sonda del ADN posibilita que el proceso de extensión del primer continúe hasta el final.

Para el diseño de la sonda TaqMan MGB se deben tener en cuenta un conjunto de parámetros situados a continuación:

- ✓ Longitud del amplicón comprendida entre pares de bases, dentro de la zona amplificada.
- ✓ Mínima distancia entre la sonda y los cebadores sin llegar al solapamiento.
- ✓ Contenido de G-C de los cebadores y de la sonda entre 20-80%. Un elevado contenido en G-C dificulta la desnaturalización de las cadenas durante la amplificación, resultando en una disminución de la eficiencia de la reacción.
- ✓ Temperatura de fusión de los cebadores elevada, entre 58-60°C, para garantizar la especificidad de su unión.

- ✓ Temperatura de fusión (T_m) de la sonda también elevada, de 8 a 10°C superior a la de los cebadores, entre 68-70°C.
- ✓ Ausencia de regiones de autocomplementariedad dentro de los cebadores, para evitar la formación de estructuras secundarias dentro de cada cebador y el apareamiento entre la pareja de cebadores (primer-dimer).
- ✓ Longitud de los cebadores entre 20-25 pares de bases.
- ✓ Ausencia de G en el extremo 5' de la sonda, puesto que dificulta su separación del DNA. Esto puede resultar en una disminución de los valores de fluorescencia normalizados (R_n).
- ✓ Ausencia de más de dos G o C en los últimos 5 nucleótidos del extremo 3' de cualquiera de los dos cebadores, ya que favorece la formación de subproductos inespecíficos de la reacción de amplificación.
- ✓ Selección de la cadena de ADN que proporciona una sonda con un mayor contenido de Cs respecto a Gs debido a que observaciones empíricas han demostrado que esta combinación produce valores más elevados de R_n .

7. CONCLUSIONES.

El uso combinado de la metodología semi-automatizada del sistema "Maxwell 16" para la extracción de ARN total, del sistema "PolyAT-tract" para la purificación de ARNm y del "Access RT-PCR" para la retro-transcripción y amplificación de ARN a partir de cultivos celulares tratados con alcaloides totales de evanta, es un método viable, preciso, confiable y económicamente recomendable para la caracterización de la expresión del gen interferón-gamma (IFN γ) producido por células del sistema inmune murino.

La normalización de los datos semi-cuantitativos empleando la señal de referencia del gen de expresión constante beta-2-microglobulina (B2M), nivela los valores de ADNc a un estándar que permite el análisis comparativo del efecto de los alcaloides totales de evanta, del estimulante mitógeno Concanavalina-A, del antígeno purificado de células de *Leishmania braziliensis* y de combinaciones de estos sobre la expresión del gen INF en cultivos de células murinas.

El efecto combinado del antígeno purificado (Ag) de *Leishmania braziliensis* y el extracto de alcaloides totales de evanta (EAE) genera el más alto nivel de expresión del gen INFg. El efecto individual de Ag es tres veces la señal basal, mientras que el de EAE es de solo una vez, siendo el total cuatro. Por otro lado, el efecto individual de Ag sobre la expresión del gen INFg es similar al ejercido por la combinación del mitógeno Concanavalina-A (ConA) y EAE, que genera una señal dos veces el nivel basal. El efecto estimulante individual de ConA es el más bajo de todos.

La secuencia obtenida a partir del ADNc permite el diseño de la sonda óptima para PCR en tiempo real está en el extremo 5' ó reporter (FAMTM, TETTM o VICTM) y otro unido en el extremo 3' ó quencher del gen INFg, esta configuración garantiza la obtención de datos cuantitativos para una cuantificación absoluta de la expresión génica.

Mediante el uso de **Maxwell® 16 Cell LEV Total RNA Purification Kit** un método semi-automatizado de extracción, **PolyATtract® System 1000** un método de purificación magnética de ARNm y **Access RT-PCR System** un sistema de retro transcripción reacción en cadena de la polimerasa la detección de la expresión del gen del interferón gamma en células esplénicas de ratón sometidas a Antígeno de Leishmania, Concanavalina A y Extracto de Alcaloides Totales de Evanta, mostró diferencias las cuales al ser evaluadas frente a un cultivo control definen que el efecto estimulante del Ag es el más potente estimulante, aumentando 3 veces más la expresión de INFg, seguido de la mezcla de CONA y el EAE con incremento de 1 vez sobre la señal basal.

8. RECOMENDACIONES

La semicuantificación basada en retro-transcripción y electroforesis en gel solo brinda una caracterización preliminar de la expresión del gen IFNg, por lo que es recomendable la aplicación de PCR en tiempo real para lograr datos cuantitativos.

En este sentido, es recomendable emplear una sonda basada en la secuencia de IFNg para el estudio cuantitativo de la expresión de este gen. La información que el PCR en tiempo real pueda proveer permitirá comprender mejor la influencia de los extractos de Evanta sobre el sistema inmune.

Debe considerarse expandir este estudio empleando cultivos de células humanas pues en última instancia son las poblaciones humanas las que requieren la evaluación del efecto inhibitor o estimulante de estos extractos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abbas. Abul K., Litchamn Andrew H., Pillai Shiv.2008. **Immunología Celular y Molecular**.6ed.Barcelona.GEA.Cap15.

Brito et al. 2006. **Eficacia de un ácido kauremico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (asterácea) contra *leishmania* (*Viannia*) *braziliensis***. Biomédica.v.26

Brunner A, Yakovlev I, Straus S. 2004. **Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies**. *BMC Plant Biology*.4:14.

Calla-Magarinos J, Giménez A, Troye-Blomberg M, Fernández C.2009. **An alkaloid extract of Evanta, traditionally used as anti-Leishmania agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells**. *Scandinavian Journal of Immunology*.v.69:251–258.

Cordero. P, Torres. L, Muñoz. L. 2011. **Expresión de citocinas en células de sangre periférica de pacientes con trasplante hepático ortotópico: resultados preliminares**. *Revista de Gastroenterología de México*.v.76 (2):108-112

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.R. (2005). **Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis***. *Plant Physiol*. V.139: 5–17.

De La Barreda.N.2008. **Biomarcadores epigenéticos**. Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá.p.85-112.

De la Barreda N.2008. **Explorando los genes. Del big-bang a la nueva Biología**.1ed.Madrid.p425.

Derewenda Z. et al.1989. **The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A**. The EMBO Journal.v.8(8):2189-2193.

Devlin, T.2004. **Bioquímica**.4ed.Barcelona.Cap.I

Dwyer et al.1981. **The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells**.Clin.exp.Immunol.v. 46(2): 237–249.

Falcoff, E; Gimenez, L 1994. A; Bernabo, J. G; Bottasso, O. **The interferon gamma as an immunological strategy for the human leishmaniosis treatment** Medicina (B.Aires);54(3):265-72

Fournet et al. 1994. **The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with Leishmania donovani**. Journal Antimicrobial Chemotherapy.v.33: 537-544

Galindo. M, Solano J. 1983. **Interferón: mecanismos bioquímicos de formación y acción**. Anales de Biología.v.5:3-15.

Giménez et al.2005.**Estudios Químicos, Biológicos Y Farmacológicos De Galipea longiflora, krause**. Rev. Bol. Quim.v.22 (1): 94-107.

Guevara et al. 2002. **El Sistema Inmune en los Estados de Salud y Enfermedad.** MEDISAN.v.6 (1):60-68.

Hernández A. et al 1995.**Análisis del ARN: Estudio de la expresión génica.** NEFROLOGIA.v.15 (2):67-84.

http://www.down21.org/salud/genetica/genoma_humano.htm

<http://elmonoauillador.blogspot.es/img/transcripcion.doc>

[http://www.ferato.com/wiki/index.php/Gen\(Down21.org\)\(http://www.down21.org/salud/genetica/genoma_humano.htm\)](http://www.ferato.com/wiki/index.php/Gen(Down21.org)(http://www.down21.org/salud/genetica/genoma_humano.htm))

Ijzermans J., Marquet, R., 1989. **Inhibition of duck hepatitis B virus replication by interferon- γ .** Immunobioly.v.179 (1-2): 456-476.

Karlin S, Ghandour Ghassan, Foulser D.1985. **ADN Sequence Comparisons of the Human, Mouse and Rabbit Immunoglobulin Kappa Gene.** Mol. Biol. Evol.v. 2(1):35-52.

Kemp.K.2000. **Review Cytokine-Producing T Cell Subsets in Human Leishmaniasis.** Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.v. 48:173-176.

Lenhninger A. 2005.**Principios de Bioquímica.** 2ed.T.I.Cap.21.

Lewin B.2008.**Genes IX.**9ed.México.Cap.5, 7, 10,11.

Lydyard P. Et al.2010. **Case Studies In Infectious Disease.** New York.Case9.p 249-256.

Mogensen et al.1987. **The interferon-macrophage Alliance.** Interferón.v.8:55-84.

Murray Robert. et al.2007. **Bioquímica Ilustrada**.17ed. México Cap34.

O'Connell J.2002. **RT-PCR Protocols**.1ed. United States of America.Cap.1,2,3.

Passarge, MD 2010. Eberhard, MD.2010. **Genética Texto y Atlas**.3ed.España.Cap.2,3.

Pérez.C.et al.2011. **Expresión de citocinas en células de sangre periférica de pacientes con trasplante hepático ortotópico: resultados preliminares**. Revista de Gastroenterología. 76(2):108-112

Pirmez Claude et al.1993. **Cytokine Patterns in the Pathogenesis of Human Leishmaniasis** *J. Clin. Invest. C The American Society for Clinical Investigation*.v.91: 1390-1395.

Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I., Landt, O., Siebert, W. & Nitsche, A. 2004. Biochemical and Biophysical Research Communications.v.313: 856-862.

Rappolee.et al.1988. **Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping**.*Science*.v.241:708-712.

Rogmanani S.1995. **Biology of human Th1 and Th2 cells**. *ClinImmunol*.v.15: 121-129.

Schroder K. et al. 2004. **Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions**. *Journal of Leukocyte Biology*.v.75:163-189

Stürzenbaum et al, 2001. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**.v.130: 281-289.

Thellin O. et al. 1999. **Housekeeping genes as internal standards: use and limits**. *Journal of Biotechnology*. V. 75: 291–295

Waterston Robert H.2002.**Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome.** NATURE.v.422: 520-562.



10. ANEXOS

```

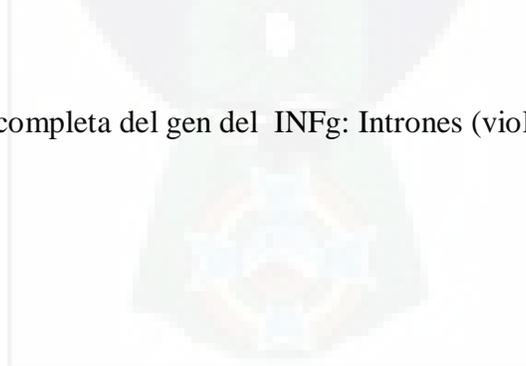
AGGAGCCTTCGATCAGGTATAAACTGGAAGCCAGAGAGGTGCAGGCTATAGCTGCCATCGGCTGACCTA
GAGAAGACACATCAGCTGATCCTTTGGACCCTCTGACTTGAGACAGAAGTTCTGGGCTTCTCCTCCTGCG
GCCTAGCTCTGAGACAATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTTCCTCATGGCTGTTTCT
GGCTGTTACTGCCACGGCACAGTCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTTTGTAAAGTATGAATT
CTTAATAATGCTTGTGGTTGGTTGACCGTGGTTGATGTTGACTTGCTACGGTGAGCGCCAGGCTGCCGTC
    
```

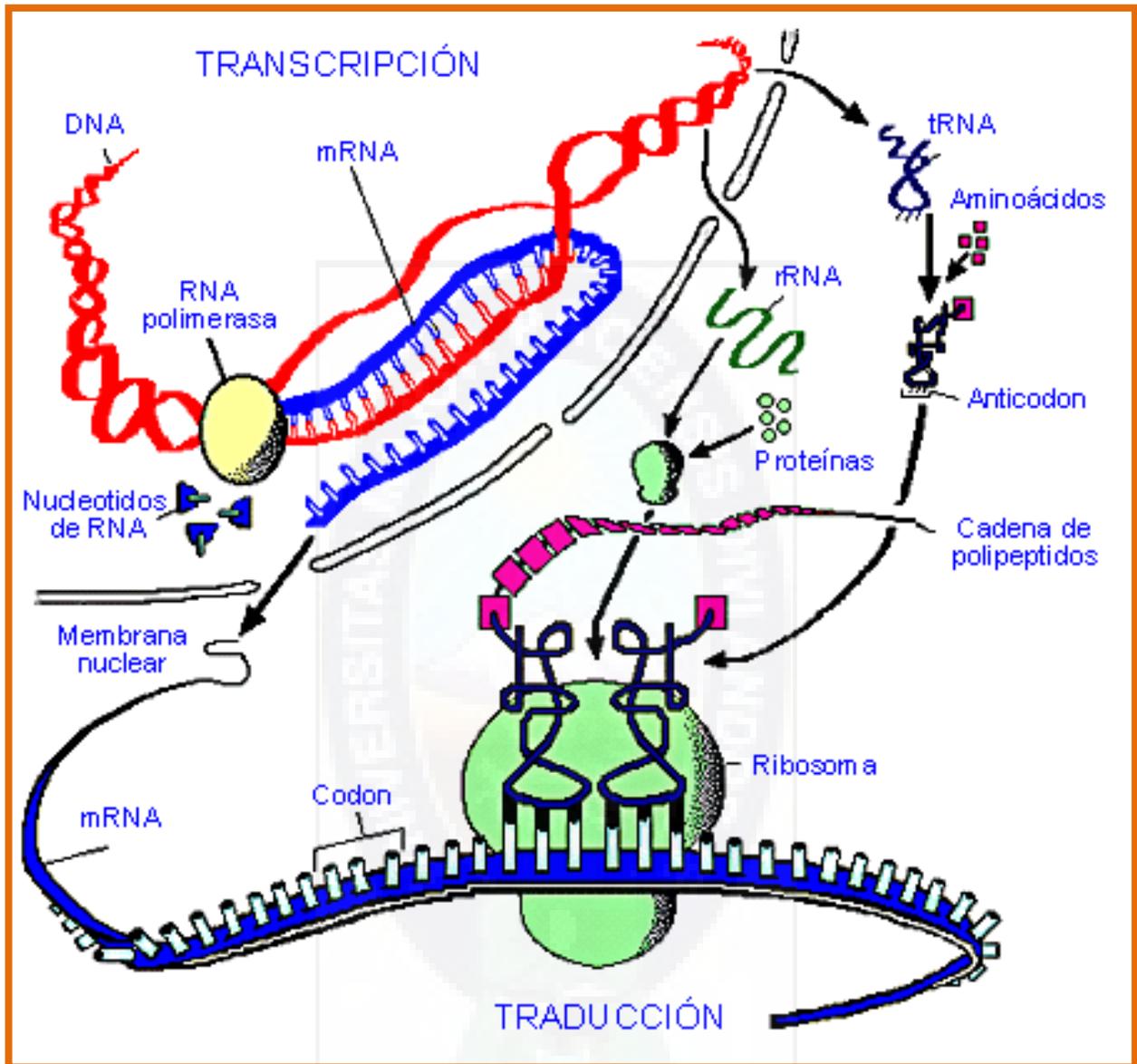
TCTGGTCCCCAGTCATTTTGGAGAAGATGGGGTGTCTACGTTGCTATTTGCTGGAGAGGTGTTTATTGACTT
 AATGATCTCAATATCGATTTAACCTCTGTCCAACCTACTACGGAGTTAGAGGGCAATTACCAATCTTCC
 CAAAGATAGGCATAGTATAGGTCCAAGGTACAAAGATGCTGATGATTTTGTGATTTCTTATCATTAGTT
 GTGATAAAAAATATCCTTACCTCAATGGTTCTTATTCCCTTCAGACGTCTTGAAAGTGATAGTGAGAGATG
 GATATTACCACCAAAACTACGCAGGGAAACAGCTTATCACTTAAAGTAATGGGAGGCAAAGTTCTTAATG
 TTTCTGTTTAAAGAAATGCCCCCTCCCCGAAGTTGTTTTACCTGAGGAGTAATTTTGAAATTCTACTA
 CAATCGAATCAAAGCCAGCCGCTTGGTGAGGTTTAAATGAGACTCTATATTTCTCAGAGTTTTTCAGGATTT
 TCTCTTTTGTGATTTTTTTTTTAAATTAATGGTTAACAGAAGCAAATTTTATATCCTTAGAATTTTATAA
 TTTGTCCCAAATGTATATACTAGTATACATATAGCTATTAGCATAATGTTCAAGCATCTACGGTCAATCC
 TCTCCTCACAGTGTAATCAAGCTGCCTCCCGTATGTGTTTGGAGCTATTTTTTAAAGTAGCAATGAAGC
 CCTATTACAGCACAGACTGATGTTTCAGAGGCCTGGACCATAAGGGGGCAGTGTGCACAGTGGGATGATT
 CTAATGATTTTCTCTCTCCCTTTCTTAATTTGAGAGTAAGTTTCTTTTTAGCTCACTATGGTTACTTGAG
 GGTACTTGAAACCTCGTCAGCTTTGTTGAGTTTATTTGTGGCCTTGCAGTTTCAAGACTGGGCCAGTACA
 TCCTGCAGCTAAAAGAATGTAACAGTAACAGTGTTTGGCTACATGCAGTCTTTTAGGGGATACTTGTTGT
 TAGAAGTAAGTGGAAGGGCCAGAAGGAAACCTGTGACCATTATCAGCACTGAATTC AACAAAACCTTGAT
 AGATATTTT CAGGGCAATTGGTGAAATAATTACAAATCAATTTTTTTTTCTCTTTTCTCAGAACTCAAGT
 GGCATAGATGTGGAAGAAAAGAGTCTCTTTCTTGGATATCTGGAGGAACTGGCAAAGGTGAGTTGAATAT
 TTCTCCTCTCCAGTTTCCCTGTTGTTTCTAATGGGTCAATTTCTTAAAATCCTCCCTTTGTGTTATTTCC
 CAAGGATGGTGACATGAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACCTCAGACTCTTTGAAGTCTTG
 AAAGACAATCAGGCCATCAGCAACAACATAAGCGTCATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCAGCA
 ACAGCAAGGCGAAAAAGGATGCATTTCATGAGTATTGCCAAGTTTGGAGGTGAGACGGCATTGCAAGTTGCT
 GTATTGTTGGCTTTTTATTTTTTCAATTGTCTCTAATTATCAAGCGGTAGAACTAACTACTCATCAGCTGA
 TAAAGCTAGGAGGTGAAGCAGGATCTCATGTTTCCCCACTGCAGACAGATTGGGAGGACTTTTTTTTTGTG
 TGTGTGTCAATTTTGGAAAAACACAGACAATCAAATATTGCCACATGCTGGGTAAATGCACTGAGGAG
 GAGGCAGAATAGGGGAGCATTGAGCAGAGCTCTTGTGGTCCCCCTGGGTGTGTGATGGAAACTCTTGCT
 TAGGCTGGGAGGTTGTGTGTTAGTGGAAGAGCAGTGGGTAGGAGGGAGTGAGAAGACTTGTATCCTCCT
 CCTCCTCCTCCTAGTTAGGCCACAAGGAGGAACGCTGACTACAGATGACTCACACGACTGGCTGGGG
 TGCAACTGGGATCGCTACATAAGTTTTATCTCTTTTGTCAAAAACAAAACAAAATGAAACCTCCACAGTG
 TCAAGGGTAGAAGACGAGGATGAGGGAAGGAAAGGAATCAGGCTCTGAGGAGACTTCTGGGCGTCTACC
 CCTCGGCTCTGGTTAGCCTCTAGTGCTATGCAGTCCAGTTTGTTTTTCAGGCGAAGCAATGGTAGACATCC
 TTTAAAAGGATTGCTTTATACATCTTATGAAAGGCTTGGTCAATTAACCTTTCAGATATGGCGGTATTCCA
 GCCATTCATGCTTTATATCATGAACTACCTTAAAAGTACCTTTAAAGTATGGCCGTGAGAATCCAAAAG

GTAACCTAAAAGCATAAAGACTATTCTCATTCTTCTAAATTTTACATAGAAGGCCAAAGGCATTCCAAAC
 ATCCTTGGGCTTTGATGATGAATGACGTCAAATGAAAGGGACAGGTGTCTTGTTACATTTTGTGGCCTAA
 TTACTCATGCTCACCTTTCAGGCTACCTGCCTCTGCCTCTAACTAGCCTCCCGCTCTCGCTCAGGAGCAG
 GGAGATGGTAGCCCGTCTTAGTCCATGGACTAGAGATGGATGAAATAATCGTTTCTCACTGACTTTGCTT
 CTGCCTTTCCATCCTGCTCTGGCTAAGTCTCTTGGAGTCTTGACAATGTCCTGAAACACAGGAAATACAT
 TTGTGTTTCAACACACAGTTGGGAGAAACCTGTAACCTCCCAGGCCTTGGTTTTCATCTTTTTGGAAACC
 CTGGGTCTTGTGCTTCTGTGGGTGACCTTGTGACAAGCTCTTAACTCTTATCCTATATTGATGCATTGT

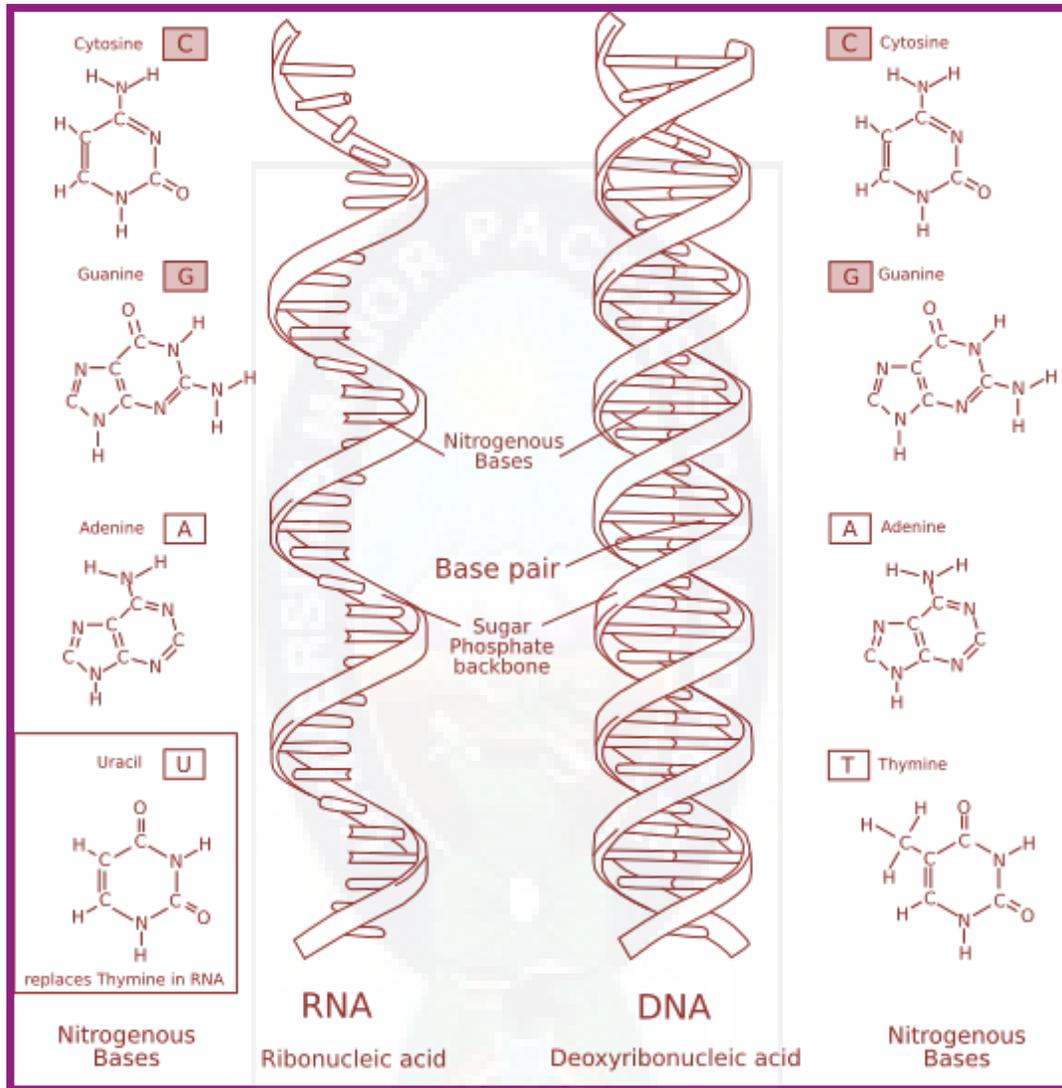
CAACATGTTTTAGGAACATACACTTTTCCTT
 AGTAACTAGTCTATAAACTTCTGTGTCTTTCTTGGAAATGTAGCAAGGGAGTCAGAGTATTTTCAGTAT
 TAGAAACAAACAAACAAACAGACAGACAGACAGACAGACCACACAGCAGTAAATGGTCTTCATTTTACTA
 AGCACAAAATTGCCCAAGTGGTCTTCTGGTTAGAATGAAAAAATCTAAGTAGTTAAATTAATGATGGAG
 AAAGCAGAGAAGAGGAAATATTGTTGCACCTTCAAATTGTAACACTCTCTGTGTCAACAAATTGATTAT
 TACTAATCTGGTCATGATTTGTGTTTTATTTTTAATCCCATCCCAGAAATGATGACACCTATCTGATTTGG
 GAGAAAATTGAAAATATATATTTTTTTCATTTATTTTTGGACTTGGGTTGTTCTACAGTACTTAGACTGTT
 GGTGGCTCTCAAATTGTGGCTTGTACAGAATCTCTTGGTGGGACTTAGCTCACAAAGGCATCTGGGTCTC
 TGGGCTCCTTGGTAGATATCCAAAGCATTCTGCTAGAGCAAGGGGAGCCTTGGCTAACATAAAATGTTTTT
 CCTGGTCTGAATAGAGAGGACTAATCAAAGAAGAAGGTGGTAGACCTTGTAGATAAGAGATTATCTTGCC
 AATATCTTCATAAGAAAACAGGTTCTGCAGGTTAAGTGTCTGATTCAAGTTCAGAGTTACCGTCTATTC
 ATCCCCATTCTTTCTCCACCCCATGCCACCCAGCAGTCTCTTTAATTCTCCATTTTGAGTTTTCTGTAGC
 AGTTAAGGGAAAGGTAGATGTGTGATGTGTGAGGTGGCTCAGCACACTCCCTGTGGTACAACCTTAGAAAT
 CATGATGGTCTTAACTGCTACAGAAGTGAATACCACAAGTAGAAGGAATATATTGCTGTACTTTTCTTAA
 AAGGAAGATTTCCATCTTCACTGACCATGATGTAAAAACAAAAATAGCCCAACAACCTTGTATACTTGGAA
 TTAATTTTCATTTTTTTCCCCATTAGGT **CAACAACCCACAGGTCCAGCGCCAAGCATTCAATGAGCTCATC**
CGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATCCAGCCTCAGGAAGCGGAAAAGGAGTCGCTGCTGATTCCGGG
 TGGGGAAGAGATTGTCCCAATAAGAATAATTCTGCCAGCACTATTTGAATTTTTAAATCTAAACCTATTT
 ATTAATATTTAAACTATTTATATGGAGAATCTATTTTAGATGCATCAACCAAAGAAGTATTTATAGTAA
 CAACTTATATGTGATAAGAGTGAATTCCTATTAATATATGTGTTATTTATAATTTCTGTCTCCTCAACTA
 TTTCTCTTTGACCAATTAATTATTCTTTCTGACTAATTAGCCAAGACTGTGATTGCGGGGTTGTATCTGG
 GGGTGGGGGACAGCCAAGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAGCTTGTACCTTTACTTCACTGACCAATAA
 GAAACATTCAGAGCTGCAGTGACCCCGGGAGGTGCTGCTGATGGGAGGAGATGTCTACACTCCGGGCCAG
 CGCTTTAACAGCAGGCCAGACAGCACTCGAATGTGTGAGGTAGTAACAGGCTGTCCCTGAAAGAAAGCAG
 TGTCTCAAGAGACTTGACACCTGGTGCTTCCCTATACAGCTGAAAACCTGTGACTACACCCGAATGACAAA
 TAACTCGCTCATTTATAGTTTATCACTGTCTAATTGCATATGAATAAAGTATAACCTTTGCAACC

Anexo 1. Secuencia completa del gen del INFg: Intrones (violeta) y Exones (Turquesa)

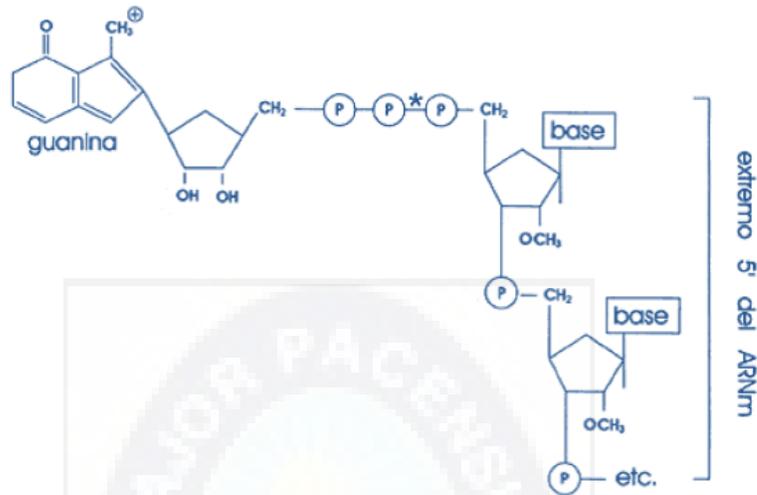




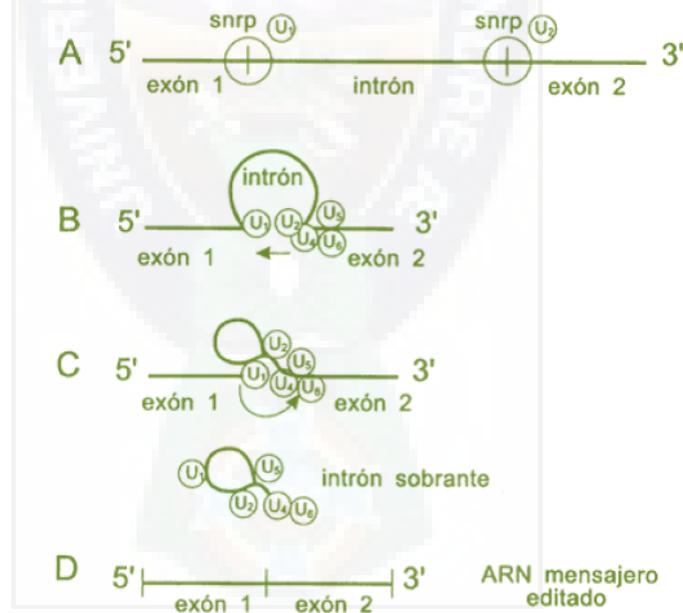
Anexo 2. Proceso de Transcripción a partir de la molécula de ADN



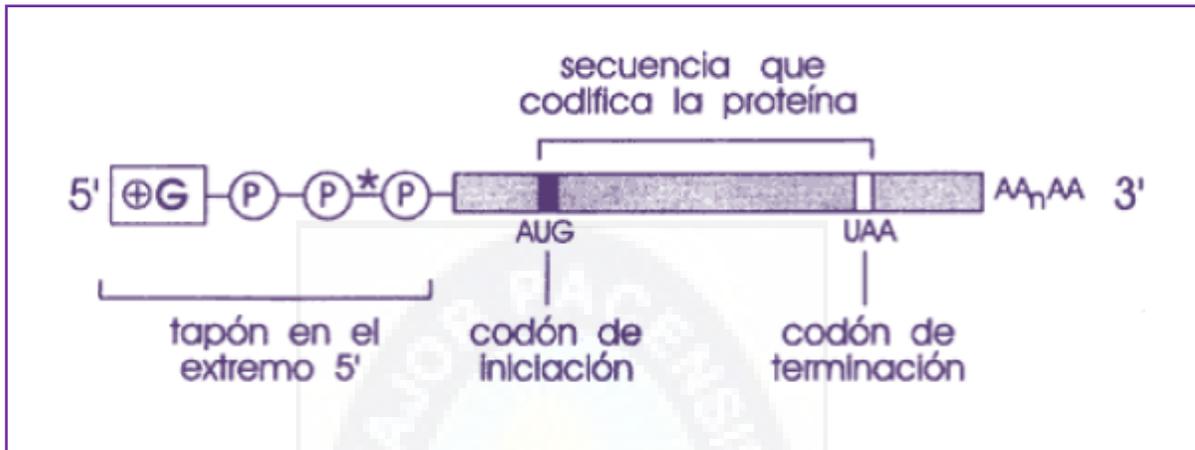
Anexo 3. Diferencia estructural de las moléculas de ADN y ARN



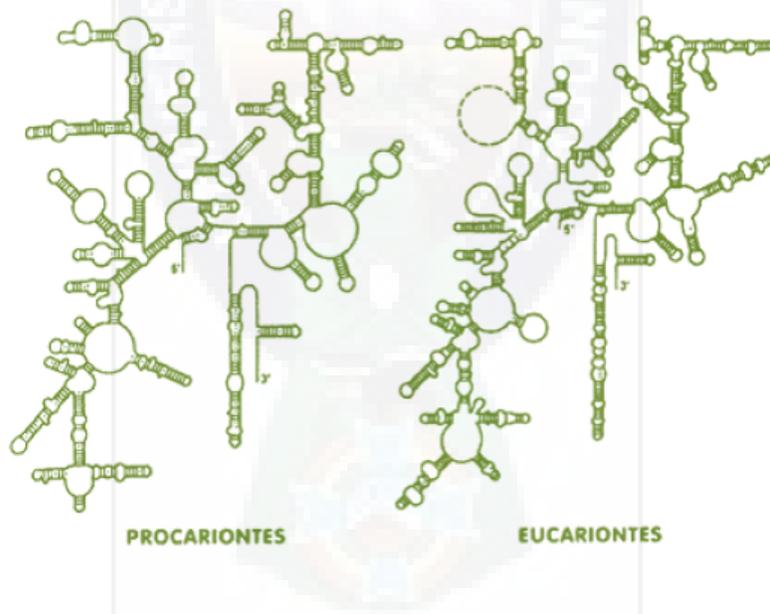
Anexo 4 Bases metiladas en el tapón o casquete del extremo 5' (Caperuza) de los ARN mensajeros.



Anexo 5 Proceso de edición (*splicing*) de un ARN mensajero snrp = partículas ribonucleoproteicas. Los números 1 a 6 se refieren a diferentes tipos de partículas: A) mensajero que se va a editar; B) eliminación del intrón; C) formación de la estructura de lazada (*lariat*); D) mensajero editado.



Anexo 6 Estructura del ARNm

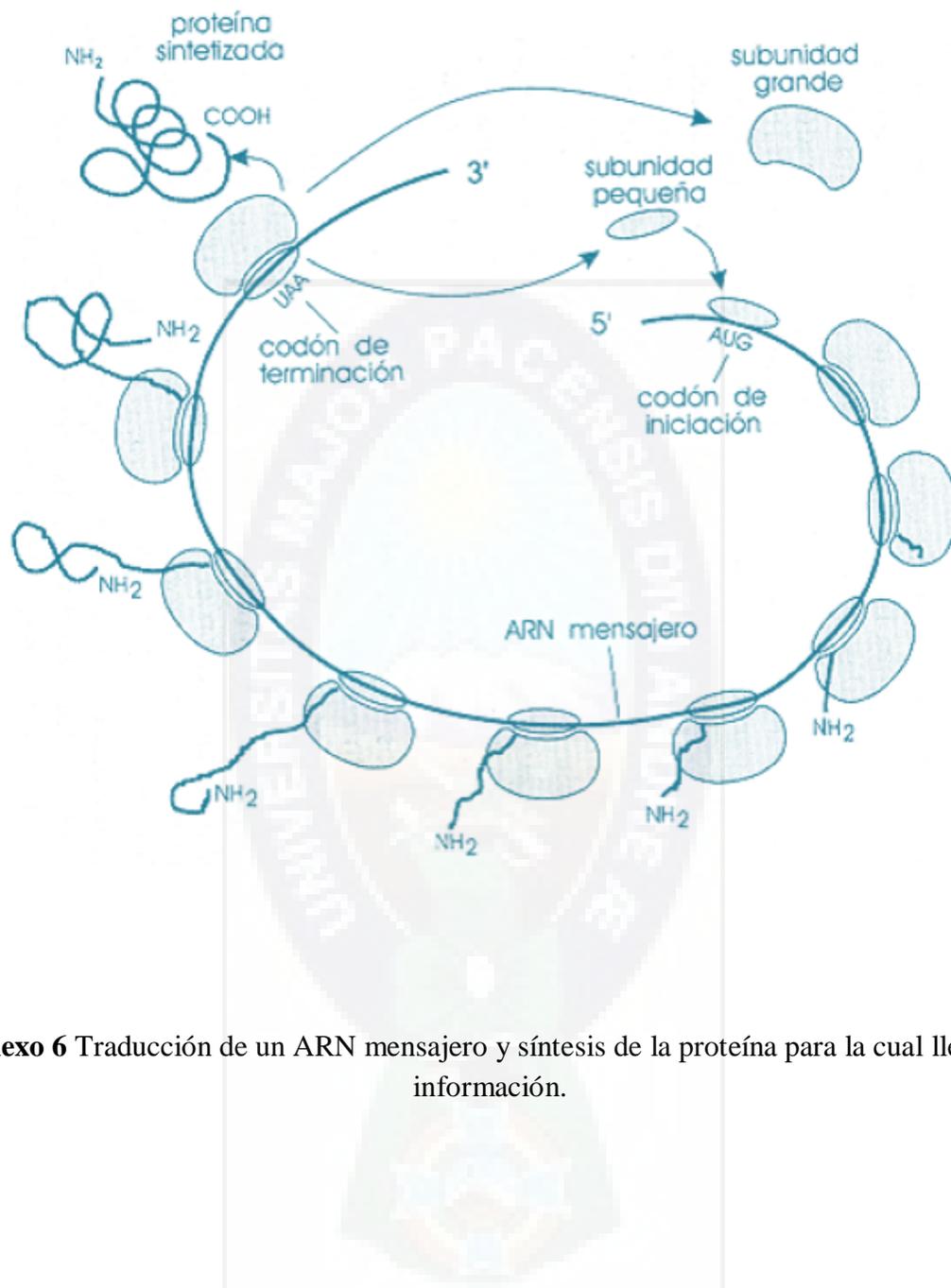


Anexo 7 El complejo arreglo de asas y regiones de doble cadena que muestran las ARN ribosomales en procariontes (16S) y en eucariontes (18S). Se nota una cierta similitud estructural entre los ARN, la cual se mantiene en toda la escala evolutiva.

Segunda Letra

		U	C	A	G			
Primera letra	U	UUU UUC	UCU UCC UCA UCG	UAU UAC	UGU UGC UGA UGG	U		
		UUA UUG		Serina		Tirosina	Cisteína	C
		Leucina						UAA UAG
								Triptófano
	C	CUU CUC CUA CUG	CCU CCC CCA CCG	CAU CAC	CGU CGC CGA CGG	U		
		Leucina		Prolina		Histidina	Arginina	C
								CAA CAG
								G
	A	AUU AUC AUA	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC	AGU AGC AGA AGG	U		
		Isoleucina		Treonina		Asparagina	Serina	C
								AAA AAG
		AUG		Metionina (Iniciación)				G
	G	GUU GUC GUA GUG	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC	GGU GGC GGA GGG	U		
		Valina		Alanina		Ácido Aspartico	Glicina	C
								GAA GAG
								G

Anexo 5 Código Genético (Tripletes)



Anexo 6 Traducción de un ARN mensajero y síntesis de la proteína para la cual lleva la información.