



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Miguel Barría M.

Instituto de Inmunología

Facultad de Medicina

ACTIVACION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION NF-kB EN LINFOCITOS
AUTORREACTIVOS ANTI-Tg DE RATON

Tesis de Grado presentada como parte de los
requisitos para optar al Grado de Licenciado
en Ciencias Biológicas.

GAYNOR ALEJANDRA AGUILAR HENRÍQUEZ

VALDIVIA-CHILE

2005

A MI MADRE

A MI PADRE

A MI MAMA Y A MI "TATA"

AGRADECIMIENTOS

Sinceros agradecimientos dedicados al Doctor Miguel Barría, por su apoyo incondicional y su buena disposición durante el desarrollo de mi tesis.

Al Doctor Richard Leyán por la ayuda brindada en momentos previos a mi participación en el congreso de la Sociedad de Biología, y a todos los que hicieron posible con su trabajo y buena voluntad la realización de mi tesis; Sra. Nelida, Priscilla y Sra. Magaly.

DID-UACH S-200011

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
1.1 SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCION.....	3
3. MATERIAL Y METODO.....	8
3.1 . Animales de experimentación.....	8
3.2 . Antígeno.....	8
3.3 . Electroforesis.....	9
3.4 . Inmunización.....	10
3.5 . Obtención de sueros.....	11
3.6 . Obtención y procesamiento de los nódulos linfoides.....	11
3.7 . Determinación de anticuerpos anti- Tg.....	12
3.8 . Inmunocitoquímica Southwestern.....	13
3.9 . Determinación de linfoproliferación específica a Tg.....	15

4. RESULTADOS.....	16
4.1. Análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).....	16
4.2. Respuesta inmune de ratones hembras frente a la inmunización con tiroglobulina más lipopolisacárido y PBS más lipopolisacárido.....	17
4.2.1. Respuesta inmune humoral de ratones inmunizados con tiroglobulina más LPS, frente a IgG ₁ , IgG ₂ e IgG total.....	19
4.3. Respuesta linfoproliferativa.....	20
4.3.1. Antígeno específica.....	20
4.3.2. Con mitógeno.....	21
4.4. Grado de activación de NF-kB aplicando Inmunocitoquímica Southwestern.....	22
5. DISCUSION.....	26
6. ANEXO.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la activación del factor de transcripción NF-kB en linfocitos de ratones con tiroiditis autoinmune experimental, y comparar con la respuesta linfoproliferativa de las células sensibilizadas con tiroglobulina (Tg) *in vitro*. Después de 2 inmunizaciones con Tg más lipopolisacárido (LPS), los animales fueron sacrificados, se obtuvieron nódulos linfáticos y los linfocitos fueron estimulados *in vitro* con Tg. Se evaluó la respuesta linfoproliferativa mediante incorporación de timidina tritiada y la activación de NF-kB mediante "southwestern". Los resultados demuestran que las células estimuladas con Tg presentan una activación postiva de NF-kB, y se puede correlacionar directamente con la respuesta linfoproliferativa.

Se puede concluir que NF-kB estaría participando en la activación de linfocitos autoreactivos Tg- específicos.

1.1. SUMMARY

The purpose of this work was to evaluate the activation of NF- κ B transcription factor in mouse lymphocytes with experimental autoimmune thyroiditis, and compare with the “in vitro” lymphoproliferation of the thyroglobulin (Tg)-stimulate cells. The animals were sacrificed after the second Tg immunization, the lymph nodes were removed and the lymphocytes stimulated with Tg. The lymphoproliferation was evaluated by ^3H thymidine incorporation. The NF- κ B activation was evaluated by immunohistochemistry “southwestern”.

The results show that the Tg-stimulated T cells present an important activation of NF- κ B, and we can to relate directly with theTg-specific lymphoproliferation .

We can to conclude that NF- κ B to take part in the activation of Tg-specific lymphocytes.

2. INTRODUCCIÓN

La tiroiditis autoinmune experimental (TAE) es un modelo experimental de tiroiditis de Hashimoto, enfermedad autoinmune órgano específica mediada por linfocitos T, la cual se caracteriza por presentar una infiltración linfocitaria en la glándula tiroidea, además de la producción de autoanticuerpos anti-tiroglobulina. La TAE puede ser inducida en ratones genéticamente susceptibles, por medio de la inyección de tiroglobulina (Tg) en dosis repetidas o en combinación con coadyuvantes como lipopolisacáridos (LPS) (Esquivel et al, 1977).

La susceptibilidad de esta enfermedad autoinmune se asocia a ciertos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad. Esto se puede observar en una buena respuesta de cepas de ratones con el haplotipo H-2^k ante la inmunización con Tg +LPS (Tang, H. and Braley-Mullen, H et al., 1997; Matsuoka, N et al., 1994). Lo contrario sucede en cepas H-2^d, las cuales no dan una buena respuesta autoinmune frente a la inmunización. En el hombre, el desarrollo de tiroiditis de Hashimoto se relaciona con la expresión del alelo HLA-DR3 (Kong, Y.M., et al, 1996).

Además de lo anteriormente descrito, la TAE puede ser transferida por la inyección de linfocitos T provenientes de animales que están desarrollando la enfermedad, esto demuestra el rol fundamental de los linfocitos T en su inducción (Braley-Mullen, H et al, 1985).

El desarrollo de las enfermedades autoinmunes se encuentran fuertemente condicionadas por la acción de citoquinas, en especial el balance producto de las células TH1/TH2. Sin embargo, en TAE se ha observado una modulación diferencial por parte de IL- 12, debido a que al cultivar las células con esta citoquina más tiroglobulina de ratón se induce TAE granulomatosa extremadamente severa y destructiva en los animales, mientras que la adición de anti-IL-12 suprime la activación de las células efectoras (Braley-Mullen, H et al, 1998; Tang, H and Sharp, G. et al, 1998a). Se sabe además que la actividad local de IFN-gama en la tiroides es suficiente para la supresión de la enfermedad (Tang, H. and Sharp, G. et al, 1998b). Con respecto a esto, las mismas citoquinas aparecen para ejercer actividades como inmunoestimuladoras o inmunosupresoras. La decisión sobre cual efecto predomine, probablemente dependerá de la regulación en el tiempo y ubicación de ésta secreción, además del tiempo de exposición (Barin, J.G., 2003; Yu, S., 2002; Wang, S., 2002). Por otro lado IL-4 no es esencial para el desarrollo de la enfermedad (Tang, H et al, 1998c; Chen, K., 2002).

La TAE es una enfermedad autoinmune multifactorial afectada por una serie de factores internos y externos, que incluyen desordenes tiroideos congénitos, previas cirugías tiroideas e irradiación, drogas tales como Carbonato de litio, además de desordenes hipotalámicos y en la glándula pituitaria (Roberts, C.G., et al, 2004). Por otra parte el Yodo es un importante factor exógeno modulador del proceso, un exceso de Yodo acelera tiroiditis autoinmune en individuos propensos (Ruwhof, C. et al, 2001; Rasooly, L., 1996; Dai, Y., 2002).

Se ha descrito que una de las señales requeridas por los linfocitos T para la secreción y proliferación es la señal coestimuladora, con respecto a esto se sabe que la interacción de B7.1/B7.2 con las moléculas CD28 y CTLA-4 provee la señal coestimuladora más potente para la activación de las células T (Salmaso, C. et al, 2002; Battifora, M., 1998). En cuanto a los procesos moleculares que interactúan y de los genes que codifican factores para moléculas coestimuladoras, receptores para el antígeno, citoquinas y moléculas de adhesión, aun no han sido dilucidados. Sin embargo se puede afirmar que éstos genes son regulados por varios grupos de factores de transcripción, entre ellos; NF-kB, NF-IL-6 y NF-AT (Akira et al, 1997; Michael, M. et al, 1998).

El factor de transcripción NF-kB (Nuclear factor kappa B) es una proteína dimérica, que en un principio fue identificado como un regulador de la expresión de los genes de la cadena liviana kappa en linfocitos B murinos, y que hoy se sabe regula la expresión de citoquinas, proteínas quimiotácticas, moléculas de adhesión y proteínas de matriz comprometidas en mecanismos inflamatorios, respuesta inmunológica, diferenciación celular y control de crecimiento (Akira et al, 1997; Barnes et al, 1997).

El factor de transcripción NF-kB se encuentra en forma inactiva en la mayoría de las células formando un heterodímero de las subunidades p65 y p50, aunque también puede estar formado por otras proteínas como, rel, relB, y p52. (Michael, M. et al, 1998).

Este factor de transcripción puede encontrarse en el citoplasma de las células formando un complejo inactivo con la proteína I kB. La estimulación, por diferentes agentes, conduce a la fosforilación y degradación de I kB; subsecuentemente el heterodímero NF-kB es traslocado al núcleo celular donde se une a secuencias específicas de las regiones promotoras de ciertos genes con lo cual se activa la transcripción (Akira, et al, 1997).

Una característica importante producto de la activación de NF-kB es la rápida “*up regulation*” de genes en respuesta a la estimulación, sin el retardo requerido para la síntesis de proteínas.

Con respecto a esto se ha demostrado la importancia de NF-kB en el desarrollo de encefalomielitis experimental autoinmune (Hilliar, H. et al 1999). Este factor de transcripción juega un rol crucial en la activación y diferenciación de las células T autorreactivas “*in vivo*”, y el bloqueo de la función de NF-kB puede ser un método efectivo para prevenir encefalomielitis autoinmune (Hilliard, B. et al 1999).

El estudio de NF-kB ha sido realizado principalmente mediante EMSA (electrophoretic mobility shift assay), por el aumento de la sub-unidad p-65 en la fracción nuclear (Guthmann, F. et al 2005), también se ha reportado otra técnica que permite la detección “*in situ*” del factor de transcripción NF-kB en su forma activa, basada en la utilización de sondas de oligonucleótidos marcados con digoxigenina, que poseen la secuencia específica a las cuales se une éste factor de transcripción (Hernández-Presa et al, 1999).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo consistió en demostrar la activación del factor de transcripción NF- κ B *in situ* en linfocitos autorreactivos anti-Tg mediante inmunocitoquímica southwestern; correlacionado con la linfoproliferación de células T autorreactivas anti-Tg de ratón.

3. MATERIAL Y METODO

3.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Rockefeller (RK), con edades aproximadas entre 4 y 6 semanas, mantenidos a una temperatura regulada de 22°C en cajas que contenían cada una 8 ejemplares, con agua y alimento a disposición.

3.2. Antígeno.

Se utilizó tiroglobulina (Tg) purificada, para lo cual se extirparon glándulas tiroideas de ratones Rockefeller normales sacrificados por sobredosis de éter. Las tiroides fueron limpiadas cuidadosamente de los tejidos anexos y suspendidas en 10 ml de suero fisiológico, para luego ser sometidas a homogeneización por un lapso de 15 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 9.000g a 4°C por 20 minutos. El sobrenadante obtenido se precipitó con 33% de una solución saturada de sulfato de amonio pH 8.0 agregada gota a gota en agitación constante por 10 minutos, luego se centrifugó a 9.000g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante nuevamente se precipitó con sulfato de amonio saturado, agregando gota a gota al 45% (rango de precipitación de la Tg) dejándose agitar por 10 minutos en agitación constante, para luego volver a centrifugar a 9.000g a 4°C por 20 minutos.

Se eliminó el sobrenadante, y el sedimento que contenía la Tg fue resuspendido en 1 ml de agua destilada, y posteriormente dializado en dos cambios de suero fisiológico durante un lapso de 24 horas a 4°C en agitación constante.

La concentración de Tg fue determinada mediante espectrofotometría a 280nm y finalmente almacenada a -20°C hasta su uso. La pureza de la tiroglobulina se verificó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes.

3.3. Electroforesis.

La muestra de Tg fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes al 10% (ver anexo). Para esto 80µl de la muestra fueron diluidos con buffer muestra (ver anexo), luego la proteína fue denaturada calentándola a ebullición por 3-5 minutos en presencia de 2-mercaptoetanol. Además de la muestra, se hizo correr en forma paralela un estándar de masas moleculares para electroforesis con un rango de 29.000 - 116.000 daltons (Sigma Chemical Co., USA). La electroforesis fue realizada en un sistema vertical utilizando placas de vidrio, primero fue preparado el gel separador con un 10% de poliacrilamida (ver anexo), permitiendo que se polimerice, para luego colocar el gel espaciador al 4% (ver anexo). Luego de polimerizado el gel se sembró la muestra. La corrida electroforetica comenzó una vez que se añadieron 500 ml de buffer de corrida en la cámara, deteniéndola una vez que el azul de bromofenol adicionado como indicador alcanzó el borde inferior de la placa. Luego se tiñó con azul

de Coomassie (ver anexo), para posteriormente decolorar con solución de desteñido (ver anexo).

3.4. Inmunización.

Ocho ratones fueron inmunizados dos veces vía intravenosa con 150µg de Tg (0.2 ml de 750µg/ml). Luego de tres horas fueron inmunizados vía intravenosa con 20µg de LPS de *Salmonella enteritidis* (0.2 ml de suero fisiológico conteniendo 100µg/ml de LPS). Como controles se inyectaron animales con PBS seguido de 20µg LPS.

Dos semanas post inmunización fueron sangrados para la obtención de suero de acuerdo al requerimiento del test de ELISA.

Otra forma de inmunización fue realizada a ocho ratones vía cojinetes plantares con Tg emulsionada en Coadyuvante Incompleto de Freund's (CIF) (razón 1:1). Animales controles fueron inmunizados con PBS.

Dos semanas post inmunización fueron sacrificados para la obtención de los nódulos poplíteos destinados a Southwestern y linfoproliferación.

3.5. Obtención de sueros.

Los sueros se obtuvieron por sangramiento, para lo cual fue necesario calentar a los animales en una cámara durante 15 minutos aproximadamente, de esta manera se dilatan las venas caudales de la cola sobre la cual se realizó una incisión con el objetivo de obtener 10 a 15 gotas de sangre colectadas en un tubo eppendorf. Luego se procedió a incubar la sangre a 37°C con el fin de retraer el coagulo y proceder a obtener los sueros mediante centrifugación a 1.000g durante 2 minutos. Los sueros fueron almacenados a -20°C hasta el momento de su uso.

3.6. Obtención y procesamiento de los nódulos linfoides.

Con el objetivo de analizar la distribución y actividad de NF-kB en la propia célula, los ratones inmunizados con el antígeno y ratones controles fueron seleccionados de acuerdo al nivel de anticuerpos anti-Tg medido por el test de ELISA, luego fueron sacrificados y sus nódulos linfáticos extraídos asépticamente para ser depositados en una placa petri con 5 ml de RPMI 1640 incompleto (Sigma Chemical Co., USA), posteriormente los nódulos fueron disgregados mediante el uso de pinzas y tijeras estériles. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1.000g por 7 minutos y el sobrenadante eliminado, el pellet fue resuspendido en RPMI incompleto, éste método se realizó 2 veces. A partir de la última resuspensión en RPMI 1640 completo se hicieron las diluciones en una concentración de 1×10^6 cel/ml, sembrando 100 μ l en cada

pocillo de la placa de cultivo, posteriormente las células se estimularon con 50µl de concanavalina A (1µg/ml), Tg (50 µg/ml) y medio RPMI 1640 completo por 3 días a 37°C y 5% de CO₂. Terminado el tiempo de incubación, las células fueron resuspendidas y recolectadas en un tubo falcon para ser centrifugadas 7 minutos a 1.000g y resuspendidas en PBS (anexo) 3 veces. Finalmente el contenido celular fue traspasado a portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su tratamiento.

3.7. Determinación de anticuerpos anti-Tg.

Esta determinación se llevó a cabo aplicando el test de ELISA a los sueros recolectados. El procedimiento es el siguiente; el antígeno (Tg) fue fijado en placas de 96 pocillos, utilizando 100µl de una solución de Tg de ratón conteniendo 10µg/ml en buffer carbonato bicarbonato 0.05M a pH 9.6, dejándose incubar toda la noche a 4°C. Luego de eliminar el antígeno remanente, se procedió a bloquear con 100 µl de leche descremada 5% en PBS dejando incubar por 1 hora a 37°C.

Pasado el tiempo de bloqueo se preparon las diluciones de los sueros de ratones inmunizados con Tg, usando una concentración 1/100 preparadas en leche descremada 5% en PBS, cada pocillo de la placa se cargó con 100 µl y se dejó incubar 2 horas a 37°C. Terminado éste período se realizaron tres lavados con PBS-tween 20 (0.05 %).

Luego se agregaron los anticuerpos anti-IgG₁ y anti-IgG₂ de ratón conjugado a peroxidasa 1/4000 en 100 µl de PBS leche y se dejó incubar a 37°C durante 1 hora.

Se repitió el lavado anteriormente descrito para luego agregar el sustrato orto-fenilendiamina (OPD) (Sigma Chemical Co., USA), 0.4 mg/ml en buffer fosfato citrato pH 5.0 más 6 µl de H₂O₂ 10 volúmenes.

Después de 20 minutos aproximadamente se detuvo la reacción agregando a cada pocillo 50 µl de ácido sulfúrico 2.5 M. La lectura de la densidad óptica se hizo a una longitud de onda de 490 nm en un lector automático de ELISA (EL_x 800, Universal microplate reader, Bio-tek Instruments).

3.8. Inmunocitoquímica Southwestern.

Consiste en la determinación de la distribución y actividad de la unión del factor de transcripción en la propia célula, a través de una sonda específica de oligonucleótidos doble hebra marcados con Biotina, la cual contiene la secuencia de consenso a la que se une NF-kB, ésta es:

NF-kB: sense: 5`-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3` – Biotina

Antisense : 5`-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3`

Las células previamente montadas en portaobjetos de acuerdo al procedimiento antes descrito fueron sometidas a un tratamiento con H_2O_2 /PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, para eliminar peroxidasas endógenas y de esta manera evitar las reacciones inespecíficas en la etapa de revelado.

Luego fueron sometidas a un lavado con buffer fosfato salino (PBS), tras lo cual se fijaron con 0,2 % de paraformaldehído disuelto en PBS durante 30 minutos a 28°C. Al concluir la etapa se lava nuevamente con PBS. Posteriormente las células fueron digeridas en Pepsina 0,5 % (433 U/mg) en HCl 1N a 37°C por 30 minutos y lavadas dos veces con buffer 1 (10 mM HEPES, 40 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 0,25 % BSA a pH 7.4). Luego de la digestión, fueron tratadas con DNAsa I (0,1 mg/ml), y lavadas dos veces en buffer 2 (10 mM HEPES, 40 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM EDTA, 0,25% BSA a pH 7), para continuar con una deshidratación en concentraciones crecientes de etanol al 70, 96 y 100% por tres minutos cada uno.

Concluido el proceso anterior, las células fueron incubadas con los oligonucleótidos doble hebra marcados con Biotina (50 pmoles/ml) conteniendo 0.5 μ g/ml poli (dI-dC) durante toda la noche a 37°C en cámara húmeda.

Terminado el tiempo de incubación las células fueron lavadas dos veces con buffer 1 y dos veces con buffer de lavado (buffer 1, 0.03% Tween 20, 100 mM ácido maléico, 0.15 mM NaCl, pH 7.5) 5 minutos cada uno, para luego incubar con buffer de bloqueo (0.1 X SSC, 0.1% SDS 1/10 en buffer de lavado) durante una hora a temperatura ambiente. Luego de esto fueron incubadas con streptoavidina-peroxidasa (1/250) una hora a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación se procedió a lavar con buffer de lavado por 10 minutos a temperatura ambiente, el mismo procedimiento se aplicó a las mismas células pero con PBS . Por último se procedió a revelar la reacción agregando sustrato para peroxidasa Aminoetilcarbazole (AEC) a 37°C durante 30 minutos aproximados en oscuridad, o hasta la aparición de color a 37°C en cámara húmeda. La reacción se detuvo incubando con buffer TE (anexo), para finalmente montarlas en glicerol.

3.9. Determinación de linfoproliferación específica a Tg.

A los animales experimentales y controles luego de la sensibilización en los cojinetes plantares se les extrajeron nódulos linfáticos regionales (poplíteos) en forma aséptica, y se preparó una suspensión de células a una concentración de 5.0×10^6 cel/ml, las que se cultivaron en placas de 96 pocillos usando medio de cultivo RPMI 1640 en presencia de diferentes concentraciones de Tg (50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 4 días a 37°C y a 5% de CO_2 .

Como control se utilizaron linfocitos incubados con medio de cultivo solamente, y linfocitos estimulados con concanavalina A (1 $\mu\text{g/ml}$).

Doce horas antes de cosechar las células se agregó 0.5 μCi de timidina tritiada a cada pocillo. Las células se cosecharon automáticamente y se midió la radioactividad incorporada en un contador de centelleo, cuyos valores se expresaron como promedio de cultivos triplicados en cpm.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE):

Con el fin de determinar la pureza de la tiroglobulina se preparó un gel de poliacrilamida con gradiente de 10-4% en condiciones denaturantes.

En la figura 1(carril B) se pueden apreciar dos bandas principales de tiroglobulina y ausencia de proteínas de peso molecular mas bajo, descartando la degradación de la Tg durante el proceso de extracción.

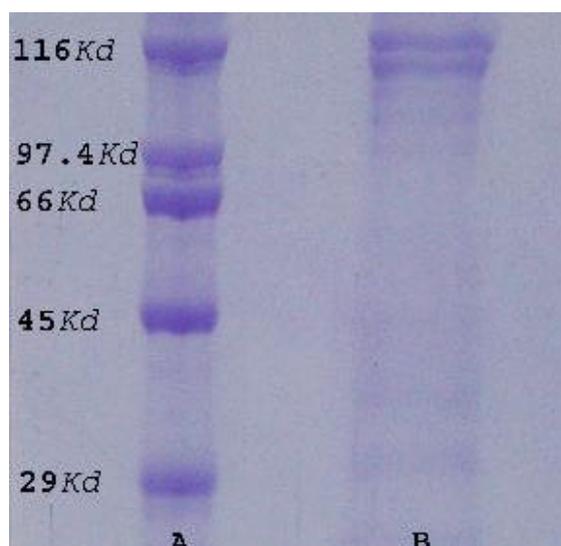


Figura 1: Electroforesis de proteínas en gel con gradiente 10-4% de poliacrilamida SDS.

4.2. Respuesta inmune de ratones hembras frente a la inmunización con tiroglobulina más lipopolisacárido y PBS más lipopolisacárido:

Para evaluar el nivel de anticuerpos anti-tiroglobulina se procedió a inmunizar a ocho ratones con tiroglobulina más LPS, siete días después fueron sangrados para la obtención de sueros. Los niveles de anticuerpos anti-tiroglobulina fueron medidos mediante el test de ELISA.

Además se procedió a inmunizar a un grupo de ocho ratones con PBS más LPS utilizando el protocolo anterior. El propósito de éste fue establecer un control negativo con el cual poder comparar los resultados obtenidos.

En la figura 2 se puede observar que gran parte de los animales inmunizados con Tg más LPS muestran niveles moderadamente altos de autoanticuerpos anti-Tg. En cambio en el gráfico que muestra la figura 3, todos los valores de los animales controles se encuentran cercanos a cero.

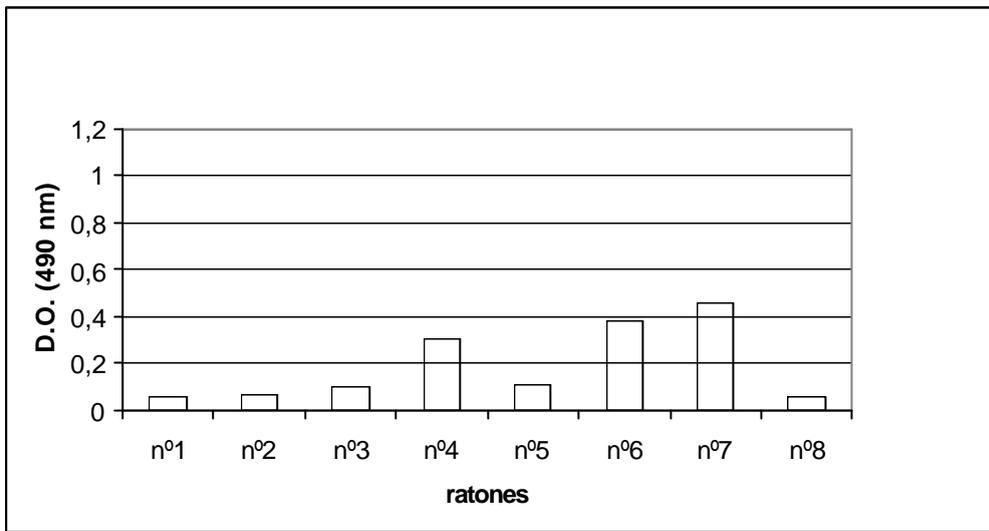


Figura 2: Respuesta inmune humoral frente a la inmunización con tiroglobulina más LPS, expresada en los resultados del ELISA (490 nm) aplicado a los sueros de los 8 ratones en experimentación.

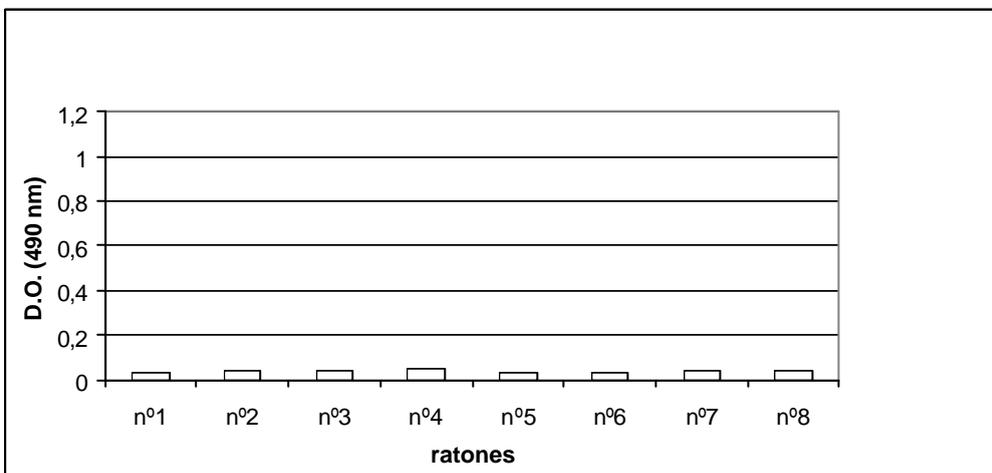


Figura 3: Respuesta inmune humoral frente a la inmunización con PBS más LPS, expresada en los resultados del ELISA (490 nm) aplicado a los sueros de los 8 ratones en experimentación.

4.2.1. Respuesta inmune humoral de ratones inmunizados con tiroglobulina más LPS, frente a IgG₁, IgG₂ e IgG total:

Esta determinación se llevó a cabo aplicando el test de ELISA como se ha descrito anteriormente a los sueros de ocho ratones, inmunizados con tiroglobulina más LPS. Este análisis nos permitió obtener resultados más específicos con respecto a hacia que tipo de respuesta inmune nos enfrentábamos.

La evaluación de las subclases muestra que no hay una tendencia hacia ninguno de los isotipos.

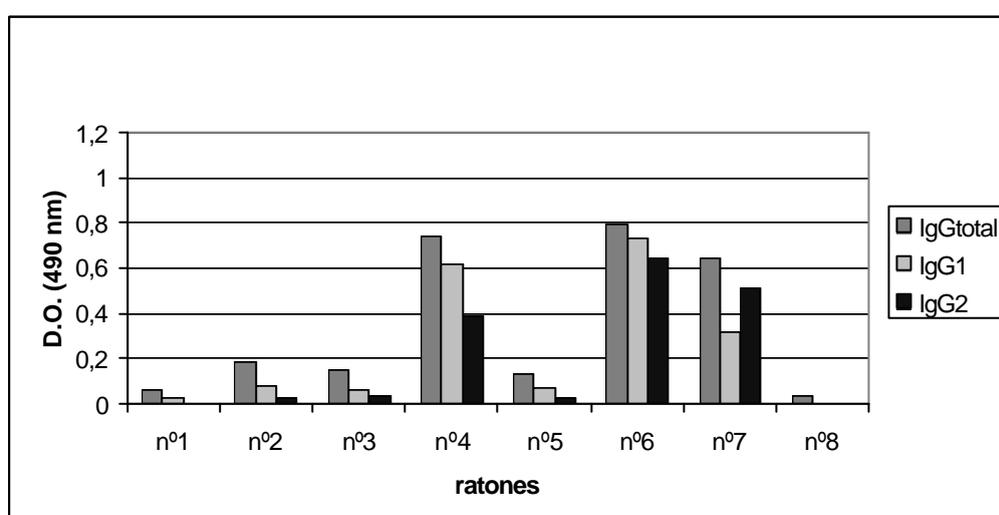


Figura 4: Respuesta inmune humoral de ratones inmunizados con Tg más LPS frente a anticuerpos anti-IgG₁, IgG₂ e IgG total, expresada en los resultados del ELISA (490 nm).

4.3. Respuesta linfoproliferativa:

4.3.1. Antígeno específica

Los animales experimentales fueron sensibilizados en los cojinetes plantares, luego se les extrajeron los nódulos poplíteos y se preparó una suspensión de células, las que se cultivaron durante 4 días. Posteriormente se evaluó la respuesta linfoproliferativa mediante incorporación de timidina tritiada.

En los linfocitos de animales inmunizados se puede ver que hay un aumento de la respuesta proliferativa dependiente de la concentración de antígeno usado en la incubación "in vitro".

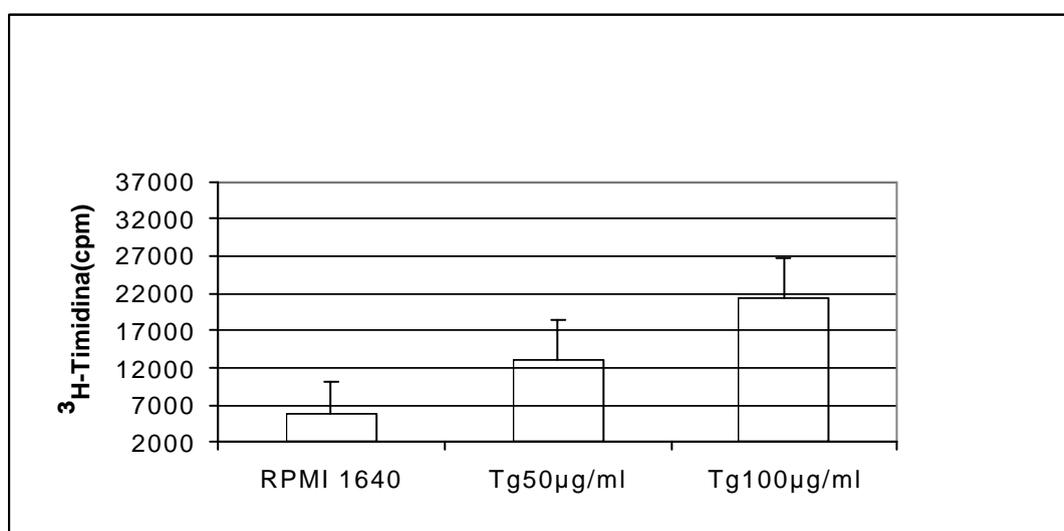


Figura 5: Respuesta linfoproliferativa de linfocitos autorreactivos estimulados con el antígeno (tiroglobulina), medida por incorporación de timidina tritiada.

4.3.2. Con mitógeno:

A los animales controles se les aplicó el mismo protocolo anteriormente descrito. Como control se utilizaron linfocitos incubados con medio de cultivo solamente, y linfocitos estimulados con concanavalina A (ConA).

De acuerdo a la figura 6 se puede deducir que la respuesta proliferativa de los linfocitos T en general, medidos por su capacidad de responder al mitógeno fue la adecuada.

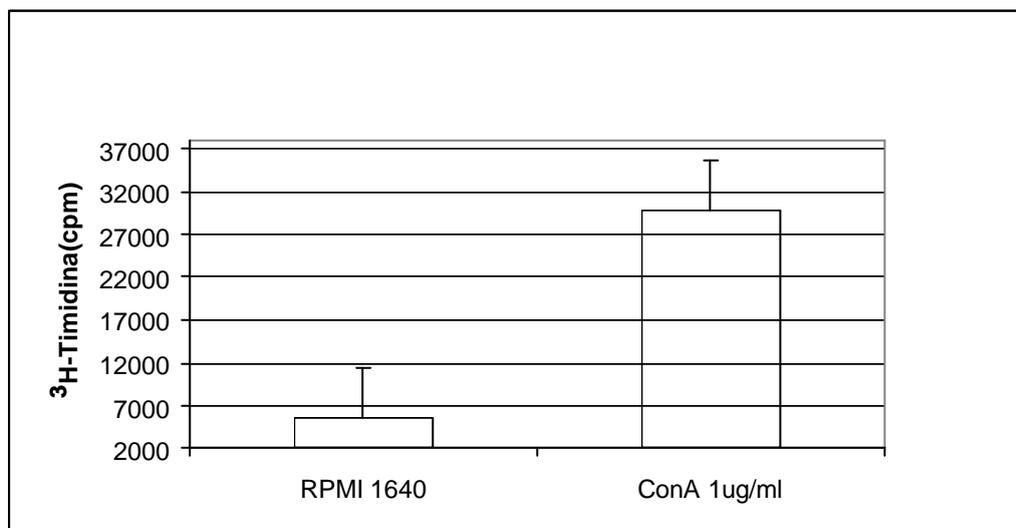


Figura 6: Respuesta linfoproliferativa de linfocitos autorreactivos estimulados con medio RPMI 1640 completo y con mitógeno (Concanavalina A), medida por incorporación de timidina tritiada.

4.4. Grado de activación de NF-kB aplicando Inmunocitoquímica Southwestern:

Según los resultados de la respuesta inmune humoral (punto 2), se procedió a sacrificar a los ratones de acuerdo a su similar nivel de respuesta anti-Tg. La técnica consistió en fijar y digerir con pepsina y DNAsa. Posteriormente se agregó una sonda de oligonucleótidos Biotinilada, la cual contiene la secuencia de consenso a la que se une NF-kB. Luego se incubaron los cortes con streptoavidina-peroxidasa, para proceder a agregar el sustrato (AEC). Ocurrido esto, la reacción se detuvo y los cortes fueron montados en glicerol.

Finalmente se realizó el análisis bajo microscopio óptico y se generó un registro fotográfico.

De acuerdo a los registros fotográficos se puede inferir que las células incubadas sin sonda son negativas, en cambio frente a la sensibilización con tiroglobulina se aprecia una actividad importante de algunas células, con una tinción bastante fuerte y específica.

En la figura 9 se puede observar que la mayoría de las células se presentan positivas cuando se incuban con concanavalina A.

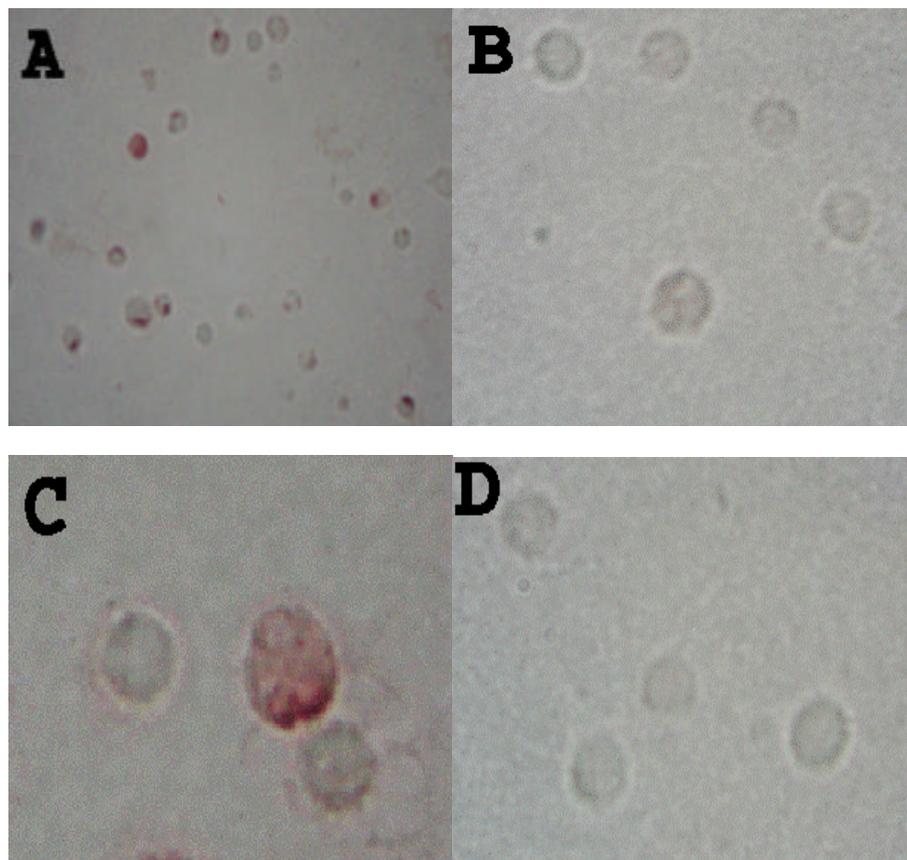


Figura 7: En las fotografías A: objetivo(40x) y C: objetivo(200x), se puede observar el análisis microscópico de linfocitos levemente teñidos (concentración de sonda 10). Las células tratadas sin sonda se distinguen en las fotografías B: (40X) y D: (200X) sin tinción. Las células no estimuladas con RPMI 1640 fueron tratadas mediante “Southwestern”.

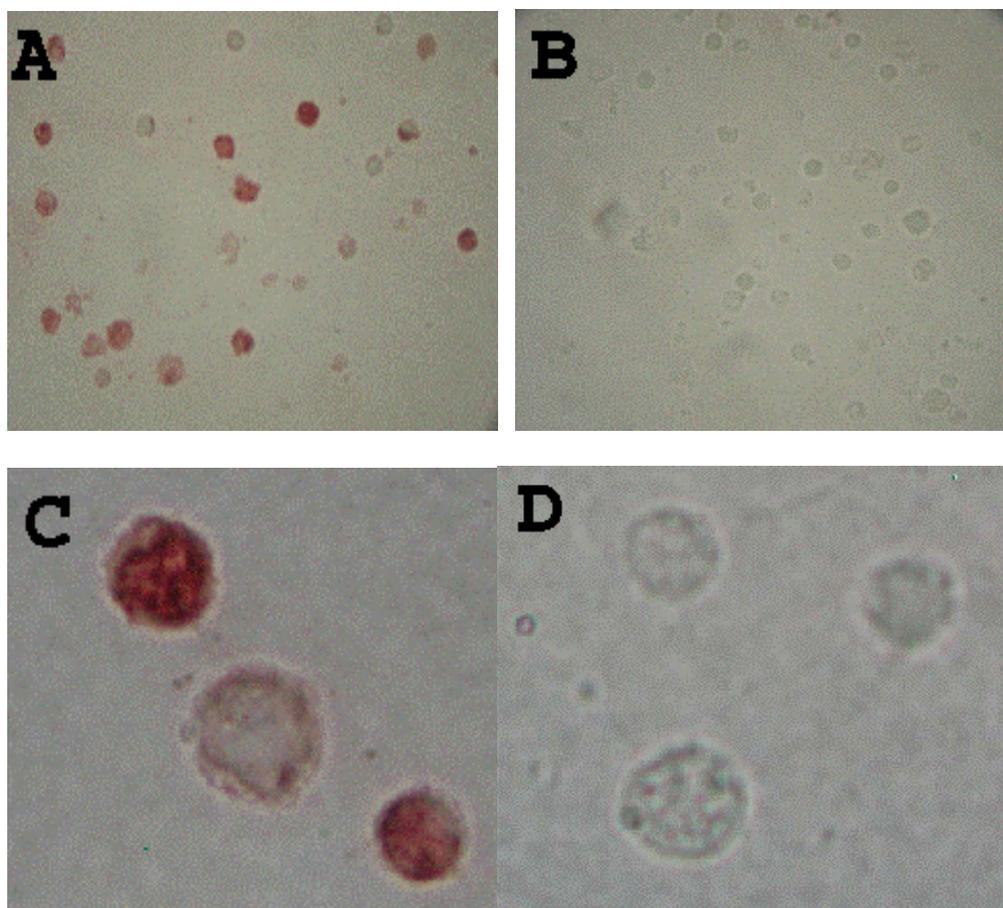


Figura 8: En las fotografías A: objetivo(40x) y C: objetivo(200x), se observa una tinción bastante más específica y fuerte de linfocitos con una concentración de sonda 10. En las fotografías B: (40X) y D: (200X), las células tratadas sin sonda presentan una tinción negativa. Los linfocitos fueron estimulados con tiroglobulina(Tg) y tratados mediante "Southwestern".

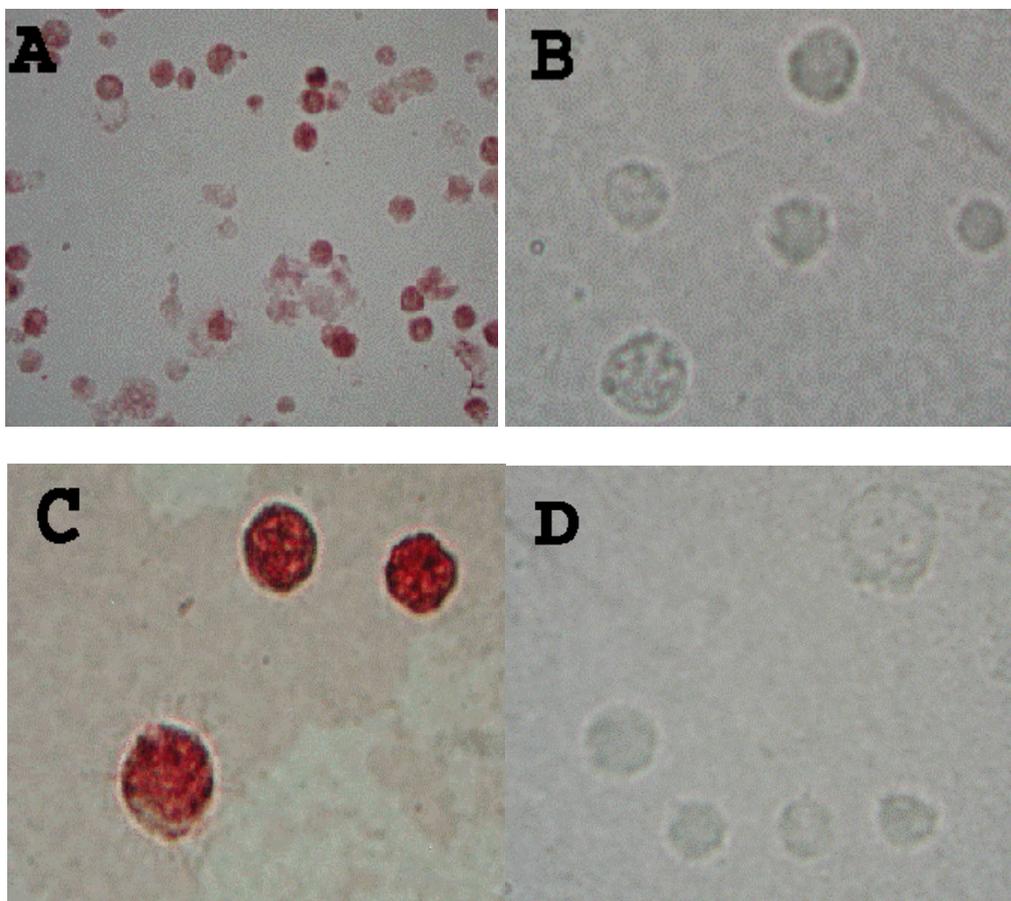


Figura 9: Las imágenes A:(40x) y C:(200x) con una concentración de sonda 10, muestran una tinción aún mas fuerte, aunque menos específica que la anteriormente descrita. En las fotografías B: (40X) y D: (200X), los linfocitos sin sonda presentaron una respuesta negativa frente al tratamiento. Los linfocitos fueron estimulados con concanavalina A (ConA) y tratados mediante “Southwestern”.

5. DISCUSION

Como se ha descrito anteriormente, la inducción de TAE en animales de experimentación mediante la inmunización del antígeno (Tg) más LPS, trae como consecuencia una importante respuesta inmune humoral y celular, evidenciado por la aparición de elevados títulos de anticuerpos anti-Tg, y de una creciente infiltración de linfocitos en la glándula tiroidea (Esquivel, 1977). Al respecto, los resultados indican que en gran parte de los animales inmunizados con el antígeno se encontraron niveles altos de anticuerpos anti-Tg, lo contrario sucedió con la respuesta que presentaron los animales controles frente a la inmunización con PBS, debido a los valores de anticuerpos anti-Tg cercanos a 0.

Por otro lado, al evaluar las distintas sub-clases de inmunoglobulinas por medio de la misma técnica, los resultados no arrojaron una evidencia positiva, debido a que no hubo tendencia hacia ninguno de los isotipos.

La activación de NF- κ B *“in situ”* ha sido demostrada a través de una novedosa técnica, basada en la utilización de sondas de oligonucleótidos doble hebra marcadas con digoxigenina, que poseen la secuencia específica a las cuales se une éste factor de transcripción. Este trabajo fue capaz de reproducir lo descrito por otros autores (Hernández-Presa, 1999) satisfactoriamente, debido a que al analizar los resultados de la inmunocitoquímica “southwestern”, se puede deducir que generalmente los linfocitos frente a una mayor activación presentaron una mayor tinción, estudio que se reafirma al analizar los resultados de las células incubadas sin sonda, las cuales no se tiñeron.

Esto pudo ser demostrado al estimular estas células con concanavalina A; mitógeno que estimula específicamente a los linfocitos T, debido a que se observó en los resultados fotográficos que gran parte de las células se presentaron positivas y activadas. En cuanto a la activación antígeno-específica, los resultados indican que las células frente a la estimulación con tiroglobulina presentan una tinción más específica que la anteriormente descrita, aunque el número de células teñidas es menor. En contraste con esto, al estimular las células con RPMI 1640 completo no se observa activación.

Al hacer una comparación con la respuesta linfoproliferativa, pudimos ver que existe una correlación directa entre la respuesta proliferativa medida por incorporación de timidina y el grado de activación de NF- κ B, por lo tanto se puede postular que la respuesta proliferativa de los linfocitos anti Tg-específicos es mediada por la activación del factor de transcripción NF- κ B, estudio que es apoyado por los resultados obtenidos por Hilliard (1999), en que la respuesta linfoproliferativa antígeno específica disminuye en animales “*knock out*” para p50 (sub-unidad del heterodimero NF- κ B).

De lo descrito anteriormente se puede concluir que el factor de transcripción NF- κ B estaría participando directamente en la activación y desarrollo de los distintos procesos inflamatorios que desencadenan tiroiditis autoinmune experimental, lo cual puede tener homología con EAE, donde se ha determinado la participación de NF- κ B en el desarrollo de la patología, usando modelos de animales “*knock out*” para P50 .

6. ANEXO:**SOLUCIONES USADAS****1. Suero Fisiológico:**

NaCl	9,0 grs.
H ₂ O destilada	1000 ml

2. Buffer Fosfato Salino (PBS 5x) pH 7,2:

Na ₂ HPO ₄ anhidro	7,4 grs.
KH ₂ PO ₄ anhidro	2,15 grs.
NaCl	36,10 grs.
H ₂ O destilada	1000 ml

Ajustar con NaOH a Ph 7,2, guardar a 4°C. Para obtener una concentración 1x diluir 1:5 con agua destilada.

3. PBS-Tween 20 0,05%:

Tween 20	0,5 ml
PBS	1000ml

4. Buffer Carbonato-Bicarbonato (Buffer de pegado) Ph 9,6:

Na ₂ CO ₃	0,53 grs.
H ₂ O csp	100ml

NaHCO ₃	0,42 grs.
H ₂ O csp	100ml

Se mezclan ambas sales para ajustar a pH 9,6.

5. Buffer de bloqueo:

Leche descremada 5%	2,5 grs.
PBS	50 ml

6. Buffer fosfato-citrato (BFC) pH 5,0 (buffer sustrato):

Na₂ HPO₄ anhidro 0,2 M 2,84 grs.

H₂O csp 100ml

C₆H₈O₇ 0,1 M 2,1 grs.

H₂O csp

100ml

Se toman 50 ml de cada solución, y se ajusta el pH con la solución 1 ó 2 según sea el caso.

Se guardan a 4°C por separado.

Se agrega 1 mg de OPD por cada 2,5 ml de BFC y 3 µl de H₂O₂.

7. Medio de cultivo RPMI-1640 incompleto:

Disolver un frasco de 10,4 grs de RPMI (Sigma Chemical Co) en 1 litro de agua destilada, luego agregar 2 grs de bicarbonato de sodio y 10 mM de HEPES.

Ajustar a pH 7,1 con HCl concentrado, esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

8. Medio de cultivo RPMI-1640 Completo:

Al medio RPMI-1640 incompleto se le agrega:

Penicilina sódica	120U/ml
Estreptomicina	0,12 U/ml
Piruvato de sodio	1×10^{-3} M
Anforeticina B	2 μ g/ml
2-Mercaptoetanol	5×10^{-5} M
Suero de bovino fetal	10%

9. Gel separador al 10%:

Acril-Bis 30:08	1,67ml
Tris-HCl pH 8,8 (1,5M)	1,25 ml
SDS10%(Dodecil sulfato de sodio)	0,15ml
PSA10% (Persulfato de amonio)	50 μ l
TEMED(Tetrametil Etilendiamina)	10 μ l
H ₂ O destilada	1,87 ml

10. Gel espaciador 4%:

Acril-Bis 30:08	0,66ml
Tris-HCl pH 6,8 (0,5M)	1,0ml
SDS10%(Dodecil sulfato de sodio)	0,12ml
PSA10% (Persulfato de amonio)	50 μ l
TEMED(Tetrametil Etilendiamina)	8 μ l
H ₂ O destilada	3,33ml aprox.

11. Buffer muestra 5x:

SDS10%	2 grs.
Tris-HCl pH 6,8 (0,3M)	10 ml
Azul de bromofenol 0,1%	2 mg
Glicerol 50%	10 ml

12. Buffer de corrida 10x Tris-Glicina pH 8,3:

Glicina (1,92 M)	72 grs.
Tris (0,25 M)	15,1 grs.
SDS 1%	5,0 grs.

H ₂ O destilada	500ml
----------------------------	-------

Ajustar la solución a pH 8,3 con NaOH o HCl según corresponda.

Conservar a 4°C. Para utilizar se debe diluir 1:10.

13. Solución de tñido:

Azúl de Coomassie	0,5%
-------------------	------

Metanol	50%
---------	-----

Acido acético	10%
---------------	-----

El coomassie debe ser diluído en metanol agitándose durante 4 horas, después se agrega el ácido acético y se agita por 10 minuto, enseguida se agrega agua destilada en la cantidad necesaria para completar el volumen deseado, y finalmente se hace pasar a través de papel filtro.

14. Solución de desteñido:

Metanol	10%
---------	-----

Acido acético	10%
---------------	-----

Agua c.p.s.	500ml
-------------	-------

15. Buffer 1 (5x) pH 7,4:

10 mM HEPES	2,38 grs.
40 mM NaCl	2,34 grs.
10 mM MgCl ₂	2,03 grs.
1 mM EDTA	0,292 grs.
BSA 0,25%	*
1 mM DTT	0,154 grs.*
H ₂ O destilada	200 ml

*Para preparar 100 ml 1x, pesar 0,25 grs. de BSA y disolver en 20 ml de buffer 5x, aforar a 100 ml con H₂O destilada.

*Para 100 ml buffer-1- 1x, agregar 100µl de DTT 1M.

16. Buffer 2 (5x) pH 7,4:

10 mM HEPES	1,19 grs.
40 mM NaCl	1,17 grs.
10 mM EDTA	1,46 grs.
BSA 0,25%	*
1 mM DTT	77,1 mgr.*
H ₂ O destilada	100 ml

*Para preparar 100 ml 1x, pesar 0,25 grs. de BSA y disolver en 20 ml de buffer 5x, aforar a 100 ml con H₂O destilada.

*Para 100 ml buffer-2- 1x, agregar 100µl de DTT 1M.

17. Buffer de lavado pH 7,5:

100 mM Acido maleico	2,32 grs.
0,15 M NaCl	1,76grs.
0,03% Tween 20	60µl
Buffer-1- 5x	40ml
0,25% BSA	0,5 grs.
1 M DTT	200 µl
H ₂ O destilada	200 ml

Tomar 40 ml de buffer -1- y disolver 0,5 gr de BSA, una vez disuelto agregar los reactivos restantes.

18. Buffer de bloqueo pH 7,0:

0,1x SSC	0,05 ml
0,1% SDS	0,01 grs.
Buffer lavado	90 ml
H ₂ O destilada	9,5 ml

19. Buffer TE (5x) pH 8,0:

10 mM Tris	6,05 grs.
1 mM EDTA	0,145 grs.
H ₂ O destilada	100 ml

7. BIBLIOGRAFIA

1. Akira S. and Kishimoto T. (1997) NF-IL6 and NF-kB in cytokine gene regulation. *Adv. Immunol.*, 65, 1-25.
2. Barin J.G., Afanasyeva M., Talor M.V., Rose N.R., Burek C.L. and Caturegli P. (2003) Thyroid-specific expression of IFN- γ limits experimental autoimmune thyroiditis by suppressing lymphocyte activation in cervical lymph nodes. *J. Immunol.*, 170, 5523-5529.
3. Barnes P.J. and Karin M. (1997) Nuclear factor-kB. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, 336, 1066-1071.
4. Battifora M., Pesce G., Paolieri F., Fiorino N., Giordano C., Riccio A.M., Torre G., Olive D. and Bagnasco M. (1998) B7.1 Costimulatory molecule is expressed on thyroid follicular cells in Hashimoto's thyroiditis, but not in graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 4130-4139.
5. Braley-Mullen H., Johnson M., Sharp. and Kiriakos. (1985) Induction of experimental autoimmune thyroiditis in mice with in vitro activated splenic T cell. *Cell. Immunol.*, 93,132-143.

6. Braley-Mullen H., Sharp, G.C., Tang, H., Chen, K., Kyriakos, M. and Bickel, J.T. (1998) Interleukin-12 promotes activation of effector cells that induce a severe destructive granulomatous form of murine experimental autoimmune thyroiditis. *Am. J. Pathol.* 152, 1347-1358.

7. Chen K., Wei Y., Sharp G.C. and Braley-mullen H. (2002)
Inhibition of TGF β 1 by anti- TGF β 1 antibody or lisinopril reduces thyroid fibrosis in granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J. Immunol.*, 169, 6530-6538.

8. Dai Y.D., Rao V.P., Carayanniotis G. (2002) enhanced iodination of thyroglobulin facilitates processing and presentation of a cryptic pathogenic peptide. *J. Immunol.*, 168, 5907-5911.

9. Esquivel P., Rose N.R. and Kong Y.M. (1977) Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 145, 1250-1262.

10. Guthmann F., Wissel H., Schachtrup C., Tolle A., Rudiger M., Spener F and Rustow B. (2005) Inhibition of TNF α in vivo prevents hyperoxia-mediated activation of caspase 3 in type II cells. *Respir. Res.*, 21, 6-10.
11. Hernandez-Presa M., Gomez-Guerrero C. and Egido J. (1999) In situ nonradiative detection of nuclear factor in paraffin section by southwestern histochemistry. *Kidney International.*, 55, 209-214.
12. Hilliard B, SamoiloVA EB, Liu TS, Rostami A, Chen Y. (1999) Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.*, 163, 2937-2943.
13. Kong Y.M., L.C., Motte R.W., Giraldo A.A., Baisch J., Strauss G., Hamerling G.J. and David C. (1996) HLA-DRB1 Polymorphism determines susceptibility to autoimmune thyroiditis in transgenic mice: definitive association with HLA-DRB1*0301 (DR3) gene. *J. Exp. Med.*, 184, 1167-1172.
14. Matsuoka N., Unger P., Ben-Nun A., Graves P. and Davies T. (1994) Thyroglobulin-Induced murine thyroiditis assessed by intrathyroidal T cell receptor sequencing. *J. Immunol.* 152, 2562.

15. Michael, M and Glosch, S. (1998) Signal transduction through NF- κ B. *Rev. Immunol. Tod.* Vol.19 N^o2: 80-87.
15. Rasooly L., Burek C.L., Rose N.R. (1996) Iodine-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H-2(h4) mice. *Clin. immunol. and immunopathol.*, 81, 287-292.
16. Roberts C.G.P., Ladenson P.W. (2004) Hypothyroidism. *Lancet.*, 363, 793-803.
17. Ruwhof C., Drexhage H.A. (2001) Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. *Thyroid.*, 11, 427-436.
18. Salmaso C., Olive D., Pesce G. and Bagnasco M. (2002) Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity.*, 35, 159-167.
19. Tang H. and Braley-Mullen H. (1997) Intravenous administration of deaggregated mouse thyroglobulin suppresses induction of experimental autoimmune thyroiditis and expression of both T_h1 and T_h2 cytokines. *International Immunol.*, 9, 679-687.

20. Tang H., Sharp G.C., Kiriakos M. and Bickel J.T. (1998a) Interleukin-12 promotes activation of effector cell that induce a severe destructive granulomatous form of murine experimental autoimmune thyroiditis. *Am. J. Pathol.*, 152, 1347-1358.
21. Tang H., Sharp G.C., Peterson K.E., Braley-mullen H. (1998c) Induction of granulomatous experimental autoimmune thyroiditis in IL-4 gene-disrupted mice. *J. Immunol.*, 160, 155-162.
22. Tang H., Sharp G.C., Peterson K.E. and Braley-mullen, H. (1998b) IFN-gamma-deficient mice develop severe granulomatous experimental autoimmune thyroiditis with eosinophil infiltration in thyroid. *J. Immunol.*, 160, 5105-5112.
23. Wang S.H., Bretz J.D., Phelps E., Mezosi E., Arscott P.L., Utsugi S. and Baker J.R. (2002) A unique combination of inflammatory cytokines enhances apoptosis of thyroid follicular cells and transforms nondestructive to destructive thyroiditis in experimental autoimmune thyroiditis. *J. Immunol.*, 168, 2470-2474.

24. Yu S., Sharp G.C., Braley-mullen H. (2002) Dual roles for IFN- κ , but not for IL-4, in spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. *J. Immunol.*, 169, 3999-4007.