



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dr. Miguel Barría M.**  
Instituto de Inmunología  
Facultad de Medicina

**ROL DEL FACTOR NUCLEAR *KAPPA B* (NF-KB) EN  
TIROIDITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**ANDREA MAGDALENA VERA CÁRDENAS**

**VALDIVIA – CHILE**

**2006**

*A mis padres, Nora y Luis.....*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, en especial, a mis padres Nora y Luis por su incondicional apoyo y amor.

Además, agradecer a mis compañeras y amigas de laboratorio, Asunción, Evelyn y Alejandra, por los gratos momentos vividos durante la última etapa de mi carrera, por su apoyo y consejos. Además, sinceros agradecimientos al personal del instituto de inmunología.

Al Dr. Miguel Barría, por permitir realizar mi tesis en su laboratorio y en especial, al Dr. Hugo Folch por su atención y ayuda en la última etapa de realización de la tesis.

A mis amigas de carrera, Ingrid M., Ingrid O., María Elena A., Natalia R. y Paula S., por su cariño y amistad desde el comienzo de la etapa universitaria.

Finalmente, agradecer a Pablo, por su amor y comprensión durante estos últimos años.

Esta tesis fue financiada por el proyecto DID UACH S-200011.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>INDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>i</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Summary.....</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Hipótesis de trabajo.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Objetivos.....</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.1 Animales para inducción de TAE.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.2 Antígeno.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.3 Coadyuvante.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.4 Inmunización.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Determinación de anticuerpos anti-Tg.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Procesamiento de glándula tiroides.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4 Cultivo celular de linfocitos.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5.1 Dimerización de sonda oligonucleótidos NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5.2 Dot-blot para sonda oligonucleótidos NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5.3 Inmunohistoquímica Southwestern.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6 Inmunohistoquímica para subunidad p65 de NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>15</b>
<b>3.7 Estudio de la tiroides con el procedimiento histológico convencional....</b>	<b>16</b>

3.8	Extracción de proteínas nucleares de linfocitos.....	17
3.9	ELISA para NF- $\kappa$ B desde extracto de proteínas nucleares linfoides.....	17
4.	RESULTADOS.....	19
4.1	Evaluación de respuesta inmune humoral contra Tg.....	19
4.2	Evaluación de respuesta inmune celular.....	22
4.2.1	Análisis grado de infiltración celular en tiroides.....	22
4.2.2	Análisis grado de activación NF- $\kappa$ B mediante southwestern en tiroides..	24
4.2.3	Inmunohistoquímica para subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en tiroides.....	28
4.2.4	Estudio de la respuesta linfoproliferativa anti-Tg <i>in vitro</i> .....	30
4.2.5	Análisis grado de activación NF- $\kappa$ B en linfocitos estimulados <i>in vitro</i> ....	32
4.3	ELISA para NF- $\kappa$ B desde extracto proteico nuclear de linfocitos.....	34
5.	DISCUSIÓN.....	36
6.	REFERENCIAS.....	43
7.	ANEXO.....	47

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura Nº 1.</b> <i>Títulos de anticuerpos anti-Tg de sueros mediante ELISA.....</i>	<b>20</b>
<b>Figura Nº 2.</b> <i>Cortes histológicos de tiroides teñidos con hematoxilina/eosina.....</i>	<b>23</b>
<b>Figura Nº 3.</b> <i>Dot blot para evaluación de la sonda de oligonucleótidos NF-κB.....</i>	<b>25</b>
<b>Figura Nº 4.</b> <i>Cortes de tiroides sometidos a southwestern para evaluar activación de NF-κB .....</i>	<b>27</b>
<b>Figura Nº 5.</b> <i>Cortes de tiroides sometidos a inmunohistoquímica contra la subunidad p65 de NF-κB.....</i>	<b>29</b>
<b>Figura Nº 6.</b> <i>Respuesta linfoproliferativa de linfocitos auto-reactivos .....</i>	<b>31</b>
<b>Figura Nº 7.</b> <i>Linfocitos sometidos a southwestern para evaluar activación de NF-κB.....</i>	<b>33</b>
<b>Figura Nº 8.</b> <i>ELISA para pesquisar la subunidad p50 y p65 de NF-κB aplicado a extractos de proteínas nucleares de linfocitos .....</i>	<b>35</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AEC</b>	aminoetilcarbazol
<b>APES</b>	3-amino-propil-tri-etoxi-xilosa
<b>AP-1</b>	proteína de activación 1
<b>CIF</b>	coadyuvante incompleto de Freund
<b>CCF</b>	coadyuvante completo de Freund
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>EAE</b>	encéfalomielitis autoinmune experimental
<b>ELISA</b>	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>MHC</b>	complejo mayor de histocompatibilidad
<b>NF-AT</b>	factor nuclear de activación de linfocitos
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	factor nuclear <i>kappa</i> B
<b>OPD</b>	o-fenilendiamina
<b>Rk</b>	<i>rockefeller</i>
<b>SA</b>	streptoavidina
<b>TAE</b>	tiroiditis autoinmune experimental
<b>Tg</b>	tiroglobulina
<b>TH</b>	tiroiditis de Hashimoto
<b>Th-1</b>	células T helper 1
<b>Th-2</b>	células T helper 2

## 1. RESUMEN

La tiroiditis autoinmune experimental (TAE) es un modelo murino de tiroiditis de Hashimoto y corresponde a una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T.

En este estudio se indujo TAE a ratones de la cepa *Rockefeller* mediante la inmunización con tiroglobulina de ratón (Tg) utilizando LPS o coadyuvante completo de Freund como adyuvantes. Se evaluó la respuesta inmune humoral midiendo el título de anticuerpos anti-Tg a través del ensayo ELISA y la respuesta inmune celular mediante la evaluación de la respuesta linfoproliferativa antígeno-específica y a través del análisis del grado de infiltración celular de la glándula mediante la tinción con hematoxilina/eosina. También se evaluó la activación de NF- $\kappa$ B en cortes de tiroides de ratones inmunizados y en linfocitos provenientes de estos mismos animales a través de la técnica *southwestern*, además, se realizó una inmunohistoquímica para subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en cortes de tiroides.

Los resultados obtenidos muestran que los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos anti-Tg y los cortes de tiroides presentaron un importante grado de infiltración celular. El análisis de la activación de NF- $\kappa$ B en las células del tejido tiroideo mostró que este factor se localiza en el núcleo de las células infiltrantes y de células foliculares propias de la glándula. También, observamos que NF- $\kappa$ B se encuentra activo (núcleo) en los linfocitos antígeno-específicos cultivados *in vitro* estimulados con Tg.

Podemos concluir que durante el desarrollo de TAE, la glándula tiroides es infiltrada y que NF- $\kappa$ B se encuentra activo tanto en las células infiltrantes como en las células foliculares propias de la glándula, lo que estaría indicando que juegan un importante rol en el proceso de desarrollo y progresión de esta patología.



## 1.1 SUMMARY

The autoimmune experimental thyroiditis (EAT) is an animal model for Hashimoto thyroiditis, is an T cell-mediated autoimmune disease.

In the present study we induced EAT in *Rockefeller* mice by injection of mouse thyroglobulin (mTg) and LPS or complete Freund's adjuvant . The humoral immune response was evaluated, measuring anti-mTg antibodies by ELISA. Cellular immune response was analyzed by histology in sections of thyroids using haematoxylin and eosin stain, and antigen-specific T cell-proliferation. Also the NF- $\kappa$ B activation was evaluated in immunized mice thyroids and in Tg-specific lymphocytes by immunohistochemistry southwestern and immunohistochemistry with anti-p65 antibodies.

The results obtained show high level of anti-mTg autoantibodies and the thyroid lesion with mononuclear cell infiltration in the mTg immunized mice. In the analysis of the NF- $\kappa$ B activation was observed that NF- $\kappa$ B is active in the thyroid tissue, including mononuclear infiltrating cells and follicular cells. We also observed an important activation of NF- $\kappa$ B in "in vitro" Tg-stimulating lymphocytes.

We could be conclude that during the development of the EAT, when the thyroid is infiltrated, the activation of NF- $\kappa$ B in lymphocytes and follicular cells is playing an important role in the development and progression of this pathology.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La tiroiditis autoinmune experimental (TAE) es una enfermedad autoinmune crónica e inflamatoria mediada por linfocitos T, caracterizada por una infiltración de células mononucleares en la glándula tiroides y la producción de altos títulos circulantes de autoanticuerpos anti-Tg en el suero de ratón (Tang y col., 1998). TAE presenta manifestaciones inmunológicas similares a la tiroiditis de Hashimoto (TH), como la infiltración de la glándula por células mononucleares y la producción de autoanticuerpos contra antígenos tiroideos específicos (Barin y col., 2003). En el modelo experimental se utilizan ratones genéticamente susceptibles a la TAE, los que son inmunizados con tiroglobulina murina (mTg) y alternativamente se pueden inmunizar con tiroglobulina humana (hTg) o con péptidos de Tg de ambas especies con coadyuvante de Freund o lipopolisacárido (LPS) (Karras y col., 2005).

La TAE, así como otras enfermedades autoinmunes, tiene un origen multifactorial, dependiendo de factores ambientales y genéticos. Dentro de los factores genéticos, se ha establecido que la susceptibilidad a la enfermedad, está bajo el control ciertos genes que codifican moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Gentile y col., 2004; Karras y col., 2005), siendo los ratones de haplotipos H-2<sup>s</sup>, H-2<sup>k</sup> y H-2<sup>q</sup> los más susceptibles a la enfermedad, ya que desarrollan altos títulos de anticuerpos anti-Tg y una extensa infiltración celular dentro de la tiroides (Esquivel y col., 1977). En el caso de la tiroiditis de Hashimoto, también han sido implicadas las

moléculas de histocompatibilidad, específicamente, se ha observado una mayor susceptibilidad en individuos que expresan el gen HLA-DR3 (Kong y col., 1996).

Por otro lado, la tiroglobulina (Tg) es la proteína más abundante del coloide de la glándula tiroides, (Karras y col., 2005) y recientemente, se ha sugerido que el polimorfismo existente en el locus 8q24 del gen de la Tg, puede alterar la estructura de esta proteína y de esta manera, jugar un rol importante en el desarrollo de la tiroiditis autoinmune, pues puede afectar su antigenicidad y la interacción con las moléculas de histocompatibilidad clase II. (Ban y col., 2003).

Existen epítopes conservados entre mTg y hTg, los que son reconocidos por linfocitos T de ratones con haplotipos susceptibles, característica fundamental para el desarrollo de TAE murino (Gentile y col., 2004). En los últimos diez años se han identificado trece epítopes de Tg inmunopatogénicos para las células T, ocho de ellos han sido identificados en mTg, tres en hTg y dos compartiendo una idéntica secuencia aminoacídica entre mTg y hTg (conteniendo los sitios hormonogénicos de la Tg) (Karras y col., 2005).

El desarrollo de la TAE se encuentra bajo el efecto de la respuesta inmune, donde las citoquinas, especialmente el balance Th1/Th2, juegan un papel importante en el desarrollo de la autoinmunidad, pues se ha demostrado que citoquinas pro-inflamatorias están presentes en la glándula tiroides durante el transcurso de enfermedades autoinmunes de tiroides (Wang y col., 2002).

En otros modelos experimentales de autoinmunidad, el fenotipo de las células T que inducen la enfermedad ha sido exhaustivamente estudiada, por ejemplo, en encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), en diabetes de ratón no obeso (NOD) y probablemente, en otras enfermedades autoinmunes órgano-específicas, pueden ser causadas por células auto-reactivas del tipo Th-1. Estableciendo que, además del background genético del individuo, otros factores pueden influenciar la diferenciación de las células T en autoinmunidad, tales como: las citoquinas, la modulación de receptores de superficie celular, la vía de inoculación, dosis y tipo de antígeno administrado (Nicholson y Kuchroot, 1996).

La activación de células T y B durante el desarrollo de la respuesta inmune, desencadena la expresión de genes específicos, lo que requiere de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, NF-AT y AP-1 entre otros. La activación temprana de estos genes es mediada principalmente por NF- $\kappa$ B, ya que este factor se encuentra normalmente en el citoplasma en forma inactiva y bajo los estímulos específicos es translocado al núcleo (Gerondakis y col., 1998).

NF- $\kappa$ B fue identificado en 1986 como un factor nuclear limitado como un potenciador (*enhancer element*) del gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina *kappa* (Ig $\kappa$ ) y se creía que sólo se expresaba específicamente en células B. Rápidamente, llegó a ser evidente que NF- $\kappa$ B está presente virtualmente en todos los tipos celulares, pero es retenido en el citoplasma de una forma inactiva unido a sus inhibidores específicos (I $\kappa$ B) (Karin y Ben-Neriah, 2000). Existen cinco miembros de la

familia Rel/ NF- $\kappa$ B en mamíferos: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100). Estos pueden presentarse ya sea, como homo o heterodímeros y comparten un conservado extremo N-terminal de 300 aminoácidos llamado dominio de homología Rel (Rel-homology domain, RHD). Este dominio es responsable de la dimerización, translocación nuclear, unión al DNA y activación de la transcripción de genes  $\kappa$ B dependientes. El dímero NF- $\kappa$ B predominante en la mayoría de los tipos celulares (incluyendo linfocitos maduros) es p65/p50 (Ruland y Mak, 2003). Recientes informes, destacan el rol crucial y específico de los miembros de la familia Rel/NF- $\kappa$ B en los procesos de: división, apoptosis y diferenciación celular que resultan de la activación de linfocitos (Gerondakis y col., 1998).

NF- $\kappa$ B regula la expresión de numerosos componentes del sistema inmune que incluyen citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y enzimas inducibles, tales como, cicloxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa, que regulan la respuesta inmune innata como también proteínas que regulan la respuesta inmune específica, tales como, el complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas co-estimuladoras cruciales en la inducción de la fase específica de la inmunidad y citoquinas del tipo IL-2, IL-12 y IFN- $\gamma$  que controla la proliferación y diferenciación de linfocitos (Moynagh, 2005; Pahl, 1999). Por lo tanto, la desregulación de este factor de transcripción, puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Moynagh, 2005).

Es de nuestro interés, estudiar la activación de NF- $\kappa$ B en los tipos celulares relacionados con el desarrollo de TAE.

## 2.1 Hipótesis de Trabajo

Se postula que durante el desarrollo y progresión de la TAE, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B estaría involucrado en la expresión de genes que promueven la activación de linfocitos antígeno-específicos (anti-Tg) y de células foliculares tiroideas.

## 2.2 Objetivos

- Demostrar la activación de NF- $\kappa$ B en linfocitos que participan del proceso de daño durante el desarrollo de TAE mediante las técnicas *southwestern* e inmunohistoquímica.
- Estudiar la expresión de NF- $\kappa$ B translocado al núcleo, en células foliculares de la glándula tiroides.
- Correlacionar la respuesta inmune humoral analizada mediante la técnica ELISA con el grado de activación de NF- $\kappa$ B en linfocitos y células foliculares de la glándula tiroides.
- Correlacionar la respuesta inmune humoral con el grado de infiltración celular en la glándula tiroides.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.1 Animales para inducción de TAE.**

Se utilizaron ratones hembras de la cepa *Rockefeller* de 4-6 semanas de edad aproximadamente, mantenidos en un vivero a temperatura regulada de 22°C, en cajas que contienen 8 ejemplares, cada una con alimento y agua en forma constante y a disposición.

#### **3.1.2 Antígeno.**

Se utilizó tiroglobulina (mTg) purificada proveniente de glándulas tiroideas de ratones normales de la cepa *Rockefeller*, sacrificados por sobredosis de éter. Para ello, las tiroides fueron extirpadas en forma estéril para ser sometidas a homogenización, luego fueron centrifugadas por 20 minutos a 9000 g a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido se precipitó con sulfato de amonio al 33% a pH 8,0 agregado gota a gota en agitación constante; el precipitado resultante fue centrifugado por 10 minutos a 9000 g a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido, nuevamente se precipitó con sulfato de amonio al 45% de saturación a pH 8,0 (rango de precipitación de la Tg) agregado gota a gota en agitación constante para luego, volver a centrifugar por 20 minutos a 9000 g a una temperatura de 4°C. El precipitado final, que contenía la Tg, fue resuspendido en 1 ml de agua destilada y posteriormente dializado con suero fisiológico durante 24 horas a 4°C en agitación constante. La concentración de Tg fue determinada mediante espectrofotometría a 280 nm y finalmente almacenada a -20°C hasta su uso.



### **3.1.3 Coadyuvante.**

Se utilizó LPS de *Salmonella enteritidis* empleando una solución de 100 µg/ml en suero fisiológico, inyectado por vía intravenosa. El volumen de inyección para cada ratón fue de 200 µl. Además, se utilizó Coadyuvante Completo de Freund (CCF) emulsionado con Tg en una proporción 1:1, inyectado por vía subcutánea. El volumen de inyección fue de 200 µl por ratón.

### **3.1.4 Inmunización.**

Ratones hembras fueron inmunizados vía intravenosa con 150 µg de Tg (750 µg/ml) y luego de tres horas, fueron inyectados con 20 µg de LPS de *Salmonella enteritidis*. Los ratones control fueron inyectados con PBS seguido de 20 µg de LPS. Siete días más tarde, fueron reinmunizados en las mismas condiciones anteriores. Dos semanas post segunda inmunización se recolectaron muestras de sangre para la obtención de suero para realizar el test de ELISA indirecto, con el fin de cuantificar el nivel de anticuerpos anti-Tg. Estos animales fueron sacrificados para la obtención de glándula tiroides y nódulos linfáticos requeridos para otros experimentos que más adelante serán detallados.

Para la inmunización con coadyuvante de Freund, se inoculó a otro grupo de ratones con 50 µl de una emulsión que contenía Tg (2 mg/ml) y coadyuvante completo de Freund (CCF) en una proporción 1:1 por vía subcutánea. Los ratones control fueron inmunizados con PBS. Dos semanas post inmunización fueron sacrificados para la obtención de nódulos poplíteos destinados a cultivo celular.

### **3.2 Determinación de anticuerpos anti-Tg.**

La determinación cuantitativa de anticuerpos anti-Tg en los sueros recolectados se realizó mediante el test de ELISA indirecto. Así, 100  $\mu$ l de Tg de ratón (10  $\mu$ g/ml) fueron adsorvidos a las placas de ELISA en presencia de buffer bicarbonato 0.05 M a pH 9,6 por toda la noche. Luego, fueron bloqueadas con PBS-leche 5% durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, fueron añadidos los sueros diluidos (1:100) dejándose incubar por 1 hora a 37°C. Luego del lavado de las placas con PBS, fue agregado un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (1:4000) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron y se agregó el sustrato o-fenilendiamina (OPD) en buffer citrato-fosfato 0.2 M adicionando 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción colorimétrica se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M. Finalmente, se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 490 nm en un lector de ELISA (Eix800 BIO-TEK INSTRUMENT INC.)

### **3.3 Procesamiento de glándula tiroides.**

Las tiroides provenientes de ratones de los diferentes grupos experimentales fueron almacenadas en N<sub>2</sub> líquido. Las tiroides, embebidas en una solución crioprotectora Tissue-Tek (OCT), fueron utilizadas para realizar cortes histológicos de un grosor de 6-7  $\mu$ m a una temperatura de -20°C en crióstato. Una vez terminado este proceso, los cortes de tiroides fueron sometidos a métodos como inmunohistoquímica para pesquisar proteína p65, *southwestern* y tinción hematoxilina/eosina.

### **3.4 Cultivo celular de linfocitos.**

Los linfocitos provenientes de nódulos poplíteos de ratones inmunizados fueron extraídos en forma estéril y disgregados, bajo campana de flujo laminar, para obtener una suspensión celular.

Las células obtenidas fueron lavadas por centrifugación a 260 g por 6 minutos por tres veces, para ser finalmente resuspendido en 2 ml de medio RPMI completo (RPMI Médium 1640, GIBCO, Invitrogen Corporation). Luego, se realizó el conteo celular en cámara Neubauer con el reactivo Hayem II utilizando microscopio óptico. Las células se ajustaron a una concentración de  $1,0 \times 10^6$  células por ml y se dispusieron en una placa de 24 pocillos con medio RPMI completo en presencia de: antígeno (Tg) 100  $\mu\text{g/ml}$ , mitógeno (concanavalina A) 1  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$  y como control sólo con medio de cultivo RPMI. Este cultivo fue incubado en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Transcurrido este periodo, las células fueron cosechadas y centrifugadas a 260 g por 6 minutos. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 10 ml de PBS y centrifugado a 260 g por 6 minutos. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 200  $\mu\text{l}$  de PBS. Enseguida, esta suspensión celular fue distribuida en gotas sobre los portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas, tras lo cual, se almacenaron a –20°C hasta su utilización en la evaluación de la activación de NF- $\kappa$ B mediante la técnica *southwestern* y en la evaluación de la distribución de la proteína p65 en las células por inmunocitoquímica.

### **3.5.1 Dimerización de sonda oligonucleótidos NF-κB.**

Para dimerizar las hebras de oligonucleótidos fueron mezclados 25 µl de la solución que contenía NF-κB antisense y 25 µl de la que contenía NF-κB sense-biotina (Biosource). Esta mezcla tenía una concentración final de 100 nM sonda por ml.

Luego, los tubos se dispusieron en el termociclador (Minicycler™, MJ Research) y fue iniciado el programa que comienza a 80°C y cada minuto decrece 1°C. Finalmente, las hebras de oligonucleótidos fueron dimerizadas con su DNA complementario (sonda) y fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

### **3.5.2 Dot-blot para la sonda oligonucleótidos NF-κB.**

Con el propósito de probar la sonda biotinilada dimerizada, se realizó un dot-blot. Esta técnica consistió en agregar en una membrana de nitrocelulosa 3 µl de la sonda mezclada en distintas diluciones (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) con buffer 1 (10 mM hepes, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0,25% BSA a pH 7,4). Luego, la membrana fue expuesta a radiación U.V. durante 15 minutos para fijar la sonda. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con PBS-leche 5% a temperatura ambiente por 1 hora. Enseguida, fue incubada con streptoavidina-peroxidasa (SIGMA U.S.A.) diluída en PBS (1:250 y 1:500) durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la membrana se lavó dos veces con PBS-Tween 20 0,05% por tres minutos y luego, se agregó el sustrato diaminobenzidina 0,1%. Para detener la reacción, las membranas fueron sumergidas en agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### 3.5.3 Inmunohistoquímica *Southwestern*.

Este método consiste en la determinación de la actividad y distribución de NF- $\kappa$ B en la propia célula. Por medio de una sonda específica de oligonucleótidos doble hebra marcado con biotina que contiene la secuencia consenso de este factor, se logra pesquisar NF- $\kappa$ B translocado al núcleo celular.

La secuencia oligonucleotídica es:

<i>NF-<math>\kappa</math>B sense</i>	5'-Biotina-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'
<i>NF-<math>\kappa</math>B antisense</i>	5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3'

Para la realización de esta técnica, los cortes de tejido de glándula tiroides y linfocitos provenientes de nódulos linfáticos fueron tratados con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente para eliminar peroxidases endógenas. Luego, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 0,2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al concluir esta etapa, los cortes fueron lavados con PBS y tratados con pepsina (433 U/mg) en HCl 1N durante 30 minutos a 37°C y se lavaron con PBS. El siguiente paso, fue lavar dos veces con buffer 1 por cinco minutos (10 mM Hepes, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0,25% BSA a pH 7,4). Luego, fueron tratadas con DNAsa I 0,1 mg/ml (Winkler) durante 30 minutos a 37°C y luego lavadas dos veces con buffer 2 por cinco minutos (10 mM HEPES, 40 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM EDTA. 0,25% BSA a pH 7,0). Luego, los cortes se deshidrataron sumergiéndolos en concentraciones crecientes de etanol al 70, 96 y 100% durante tres minutos cada uno. Concluido el proceso, las células fueron incubadas con una mezcla que contiene la sonda de oligonucleótidos (50 pmoles/ml) en

buffer 1, conteniendo 0,5 µg/ml de poli dl/dC (Amersham Biosciences) durante toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con buffer 1 y dos veces con buffer de lavado (buffer 1; 0,03% Tween 20; 100 mM ácido maleico; 0,15 mM NaCl a pH 7,5) durante cinco minutos. Luego, se incubó con buffer de bloqueo (0,1X SSC; 0,1% SDS; 1:10 en buffer de lavado a pH 7,0) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con streptoavidina-peroxidasa (1:250) durante una hora a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, los cortes fueron lavados con buffer de lavado y con PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se incubó con buffer acetato de sodio (0,17M a pH 5,2) durante cinco minutos. Finalmente, se reveló la reacción agregando el sustrato aminoetilcarbazol (AEC) en buffer acetato de sodio que se incubó hasta la aparición del color rojizo en el tejido o células, mantenido en oscuridad y a 37°C en cámara húmeda. Esta reacción se detuvo incubando con PBS para ser montadas en glicerol/PBS (1:5).

El análisis de estas muestras fue realizado mediante microscopio óptico (ZEISS Axioskop) y registrado fotográficamente (ZEISS MRGrab 1.0).

### **3.6 Inmunohistoquímica para subunidad p65 de NF-κB.**

Para determinar la distribución de la proteína p65, componente del factor de transcripción NF-κB, los cortes de glándula tiroides se fijaron en acetona a -20°C durante 15 minutos y se hidrataron con PBS a temperatura ambiente. Luego, se trataron

con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% por 20 minutos para eliminar peroxidasas endógenas y con una solución de bloqueo (PBS-leche 5%) durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó el primer anticuerpo que corresponde a anti-p65 (NF-κB p65 (A), Santa cruz Biotechnology) cuya dilución fue 1:50 y 1:100 incubándose en cámara húmeda a temperatura ambiente durante toda la noche.

Al día siguiente, los cortes fueron sumergidos en una solución de lavado (PBS, Tween20 0,5%, Triton x-100 0,25%) por 10 minutos y se aplicó el segundo anticuerpo correspondiente a anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (PIERCE) diluido en 1:500 incubándose en cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, los cortes se trataron con una solución de lavado durante 10 minutos y posteriormente se agregó el sustrato AEC, descrito anteriormente, incubándose en cámara húmeda a 37°C hasta la aparición del color característico. Finalmente, para detener la reacción, los cortes se lavaron con agua corriente para luego montar los portaobjetos con PBS/glicerol.

### **3.7 Estudio de la tiroides con el procedimiento histológico convencional.**

Este procedimiento de tinción con hematoxilina/eosina se realizó en los cortes de glándula tiroides obtenidos en crióstato. En primer lugar, las muestras se deshidrataron con xileno y alcohol (100, 96%) por cinco minutos respectivamente. En la coloración, se utilizó hematoxilina (tres minutos), buffer borato (un minuto) y eosina (cinco minutos), intercalado con lavados de un minuto con agua corriente. Luego, se secaron al aire y se montaron en PBS/glicerol.

### **3.8 Extracción de Proteínas Nucleares de Linfocitos.**

Para este procedimiento, se cosecharon las células (linfocitos) cultivadas por 24 horas y se centrifugaron a 260 g durante 6 minutos. El *pellet* celular se lavó dos veces más por centrifugación y finalmente, las células fueron resuspendidas en 1 ml de buffer de extracción citoplasmática (CE); véase anexo 12. Posteriormente, esta suspensión se dejó enfriar por 15 minutos en hielo, luego se agregó NP40 0,5% y se centrifugó a 653 g durante 30 segundos a 4°C. Concluido este procedimiento, el *pellet* fue resuspendido en 100 µl de buffer de extracción nuclear (NE); véase anexo 13, durante 30 minutos en agitación sobre hielo. Luego, se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante (extracto nuclear) se recuperó y fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

### **3.9 ELISA para NF-κB desde extracto de proteínas nucleares de linfocitos.**

Con el propósito de evaluar cuantitativamente la presencia de NF-κB desde el extracto de proteínas nucleares, se realizó un ELISA que consistió en incubar en pocillos que contenían streptoavidina (Pierce Reacti-Bind Streptavidin HBC Coated Plates) 20 µl del extracto de proteínas nucleares junto con 80 µl de buffer 1 con sonda y como control del experimento, se incubaron las mismas soluciones sin sonda durante la noche a 4°C.

Al otro día, se desechó la solución añadida y la placa fue bloqueada con 150 µl de BSA 2% en PBS-Tween 20 0,05% a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, se agregó el primer anticuerpo anti-p65 (1:100) diluido en BSA



2% en PBS-Tween 20 0,05% durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 0,05% y se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (PIERCE) (1:1000) diluido en BSA 2% en PBS-Tween 20 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 0,05% y finalmente, se agregó la solución que contiene el sustrato OPD (2 mg OPD, 5 ml BFC ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M y ácido cítrico 0,1M en proporción 1:1 ajustado a pH 5,0) y 6  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30 vol) y se esperó 10 a 15 minutos a 37°C la aparición de color. Para detener la reacción se agregó 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5M por pocillo y el resultado fue leído a 490 nm en lector de ELISA (Eix800 BIO-TEK INSTRUMENT INC.).

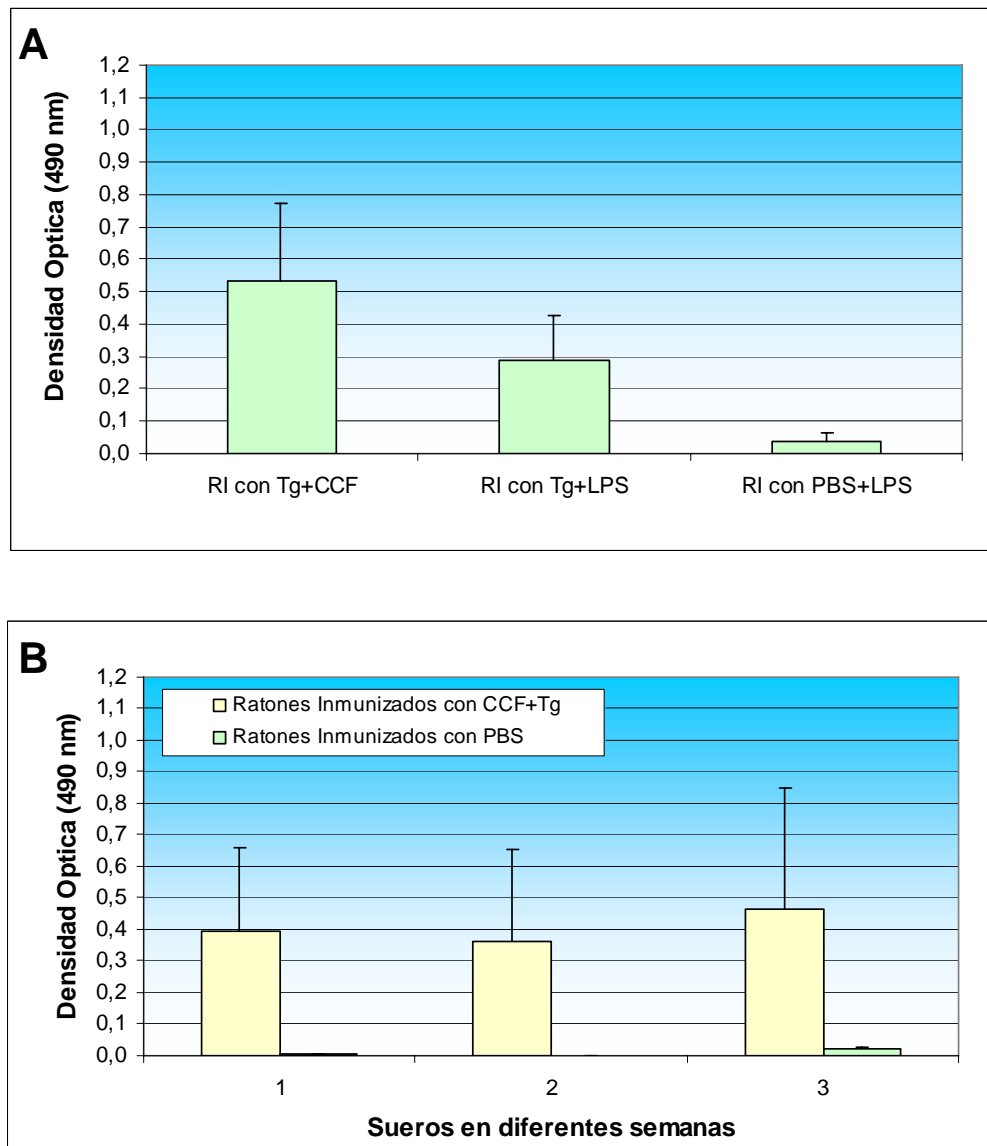
Para pesquisar la subunidad p50, este procedimiento fue repetido utilizando como primer anticuerpo anti-p50 (1:100).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral contra Tiroglobulina.**

La primera etapa de evaluación de la inducción de TAE, corresponde al análisis de la respuesta humoral mediante la cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-tiroglobulina de los sueros de ratones inmunizados con: Tg emulsionada con CCF, Tg más LPS y como control con PBS más LPS.

Estos resultados se han recopilado en dos gráficos (figura 1). En la primera barra de la figura 1 (A) se muestra un promedio de la respuesta inmune humoral medida por ELISA que presentaron los ratones inmunizados con tiroglobulina emulsionada con CCF. En primer lugar, se observa que existe una respuesta importante de niveles de anticuerpos anti-Tg en los sueros de ratones inmunizados. También se observa que la respuesta varía entre un ratón y otro pues, los títulos no son homogéneos, lo que explica la elevada desviación estándar. En la segunda barra se presenta un promedio de los títulos obtenidos en el otro protocolo de inmunización utilizado, que corresponde a la utilización de Tg seguido de LPS. Además, se observa que existe una respuesta heterogénea entre los ratones, al igual que en el protocolo de inmunización con Tg más CCF. Sin embargo, se observa que estos títulos de anticuerpos anti-Tg son inferiores a los obtenidos en ratones inmunizados con Tg más CCF. En la tercera barra, que corresponde al suero de ratones control, se observa un nivel mínimo de densidad óptica siendo el nivel basal de la técnica.



**Figura 1: (A)** Promedio de los títulos de anticuerpos anti-Tg de sueros provenientes de ratones inmunizados con Tg emulsionada con CCF, Tg más LPS y PBS más LPS como control obtenidos mediante test de ELISA.

**(B)** Promedio de los títulos de anticuerpos anti-Tg de sueros provenientes de ratones inmunizados con Tg más CCF comparado con sueros de ratones control. Donde suero 1, 2 y 3 corresponde a 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> semana post-inmunización).

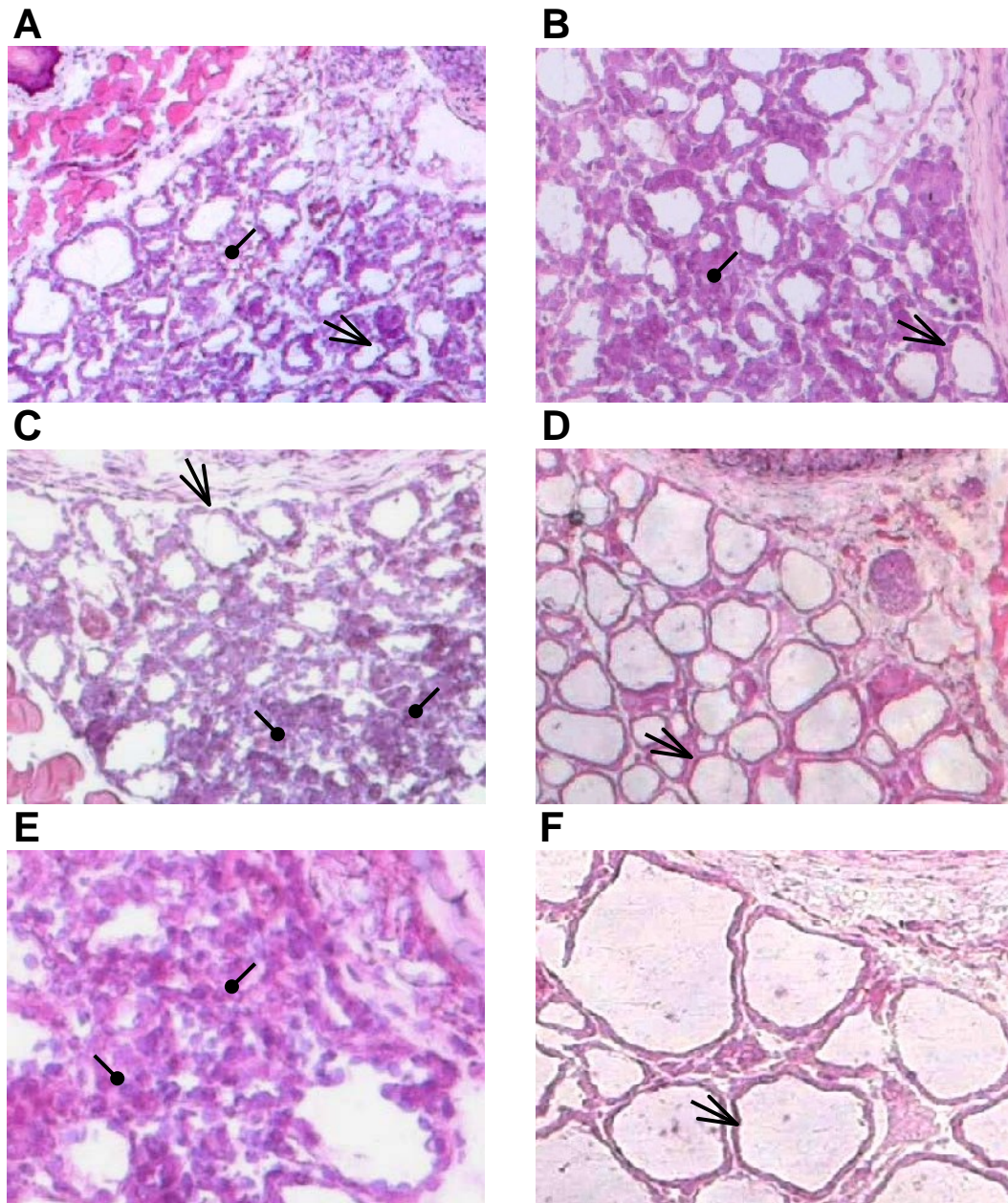
En la figura 1 (B), se muestra el promedio de títulos obtenido del protocolo de inmunización que presentó mayor respuesta inmune humoral (Tg+CCF). Cada barra corresponde a una semana distinta de recolección de sueros post-inmunización (donde el suero 1, 2 y 3 corresponde a 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> semana post-inmunización). De dicha figura, se desprende que los ratones inmunizados presentan un nivel de anticuerpos anti-Tg similares durante la primera y segunda recolección de sueros y aumenta en la tercera recolección de los mismos. También se muestra el bajo título presentado por los ratones controles.

## **4.2 Evaluación de la Respuesta Inmune Celular.**

Luego de obtener los resultados de respuesta inmune humoral se procedió a sacrificar los ratones para realizar el estudio histológico de la glándula tiroidea de estos animales.

### **4.2.1 Análisis histológico del grado de infiltración celular en la glándula tiroidea.**

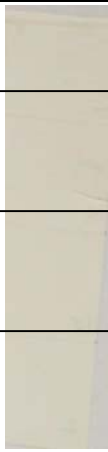


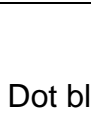
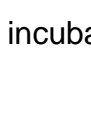

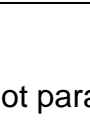
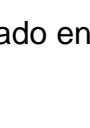

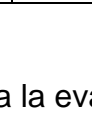
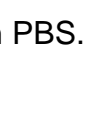

El grado de infiltración celular se evaluó por medio de la tinción hematoxilina/eosina sobre cortes histológicos de glándula tiroidea, obtenidos 30 días después del inicio de la inmunización con Tg más CCF, período en el cual se alcanza el grado máximo de la enfermedad (figura 2). Como se puede observar, todos los animales que fueron inmunizados con Tg+CCF (A y B) o con Tg+LPS (C y E) desarrollaron un grado importante de infiltración celular, lo que altera la estructura normal de la glándula tiroidea, coincidiendo con lo encontrado en la literatura. Sin embargo, es posible apreciar la presencia de algunos folículos tiroideos intactos, por lo tanto, el daño generado fue moderado. Por otro lado, en los cortes del tejido tiroideo provenientes de los animales controles (PBS+LPS), no se observó infiltración celular, conservándose la arquitectura de la glándula (D y F).



**Figura 2:** Cortes histológicos de glándula tiroidea teñidos con hematoxilina/eosina, provenientes de ratones Rk inmunizados con Tg+CCF (**A, B**), con Tg+LPS (**C, E**) y con PBS+LPS (**D y F**). Las flechas comunes muestran folículos tiroideos intactos y las flechas ovaladas muestran infiltración celular. Aumento de 100x (A, B, C y D) y 400x (E y F).

#### **4.2.2 Análisis del grado de activación de NF- $\kappa$ B aplicando inmunohistoquímica *southwestern* en glándula tiroides.**

Los experimentos de inmunohistoquímica *southwestern*, requieren de una sonda biotinilada que es reconocida específicamente por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B cuando se encuentra activado, preferentemente en el núcleo celular. Por lo tanto, el primer paso consistió en realizar una prueba de dot-blot, para confirmar el marcaje de esta sonda. En la figura 3, se muestran los resultados registrados fotográficamente donde se aprecia que la intensidad de la marca es proporcional a la cantidad de sonda biotinilada, indicando que el preparado de sonda biotinilada puede ser aplicado en el protocolo de *southwestern*.

SA Dilución Sonda Dilución	Control Negativo	1 : 250	1 : 500
1 : 1			
1 : 10			
1 : 100			
1 : 1000			

**Figura 3:** Dot blot para la evaluación de la sonda de oligonucleótidos biotinilada.

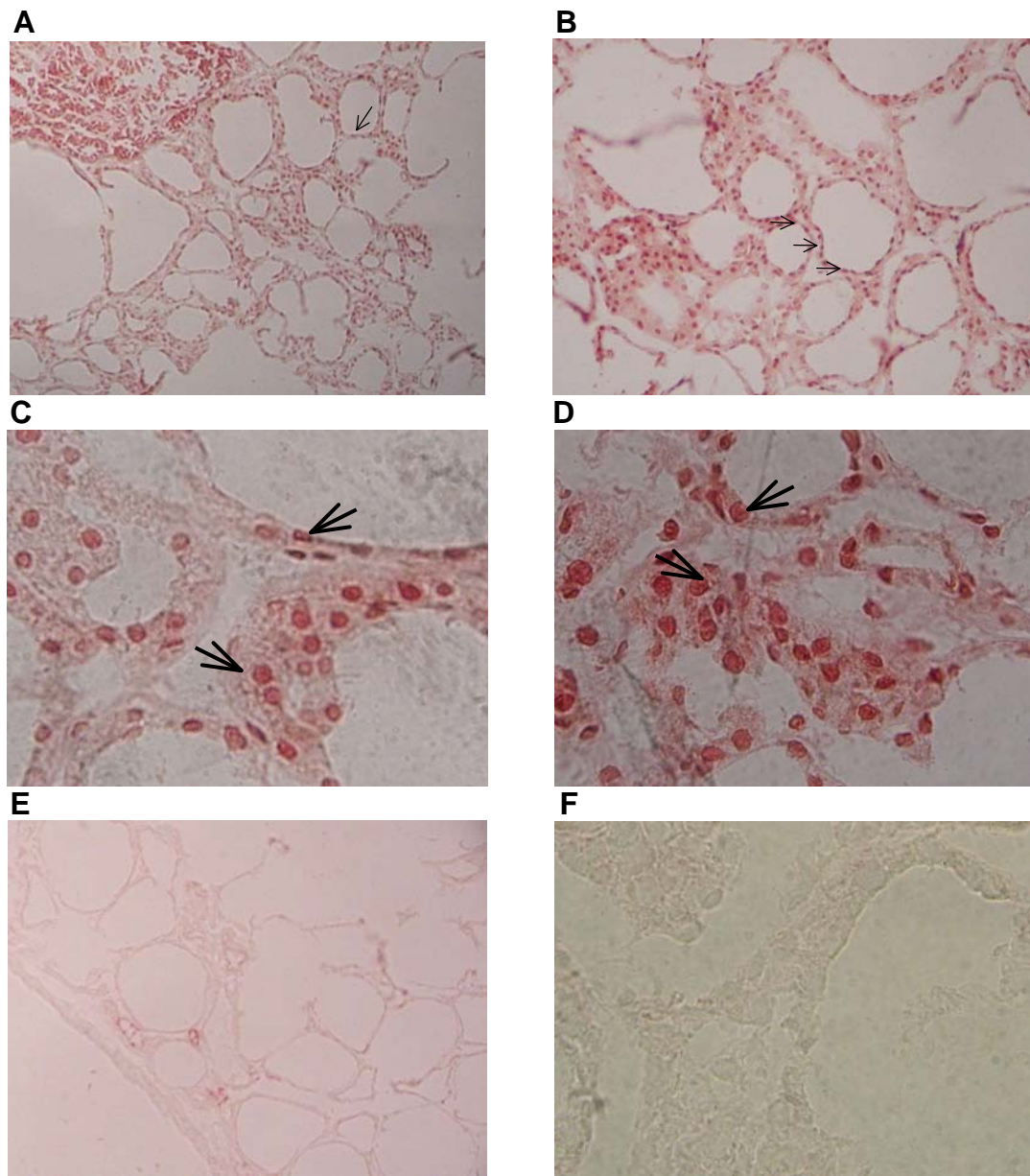
Las concentraciones de sonda utilizada fueron (1:1), (1:10), (1:100), (1:1000) distribuidas en gotas de 3  $\mu$ l. La streptoavidina (SA) conjugada a peroxidasa se agregó en concentraciones (1:250) y (1:500). El control negativo fue incubado en PBS. El sustrato de revelado fue 0.1% diaminobenzidina.



Una vez probada la sonda, se realizó la técnica *southwestern* sobre cortes histológicos de tiroides obtenidos de los animales inmunizados con Tg+LPS, Tg+CCF y PBS+LPS (figura 4).

En la figura 4 (A, C, B y D), se muestran cortes de tiroides de los animales inmunizados con Tg+LPS (A y C) y con Tg+CCF (B y D), que fueron sometidos a la técnica *southwestern*. Se aprecia una fuerte tinción nuclear en las células infiltradas y en las células foliculares propias del tejido, indicando que existe un importante grado de activación de NF- $\kappa$ B en estos tipos celulares. Por el contrario, en la figura 4 (E), que corresponde a tejido de ratones no inmunizados, no se observó tinción en los núcleos de las células, indicando que en condiciones normales, las células de las glándulas tiroideas no presentan activación de NF- $\kappa$ B, es decir, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B se encuentra unido a su inhibidor natural (I $\kappa$ B) por lo tanto, no es detectado mediante esta técnica. La figura 4 (F) corresponde a un control de la técnica, utilizándose un corte proveniente de ratón inmunizado con Tg+LPS al cual no se adicionó la sonda biotinilada con la secuencia de oligonucleótidos específica para NF- $\kappa$ B, por lo tanto, el resultado fue ausencia de tinción.

Cabe señalar, que en los cortes analizados mediante *southwestern* (figura 4), se observó un grado importante de destrucción del tejido atribuido a los procedimientos de esta técnica, que incluye entre otros, una digestión enzimática.

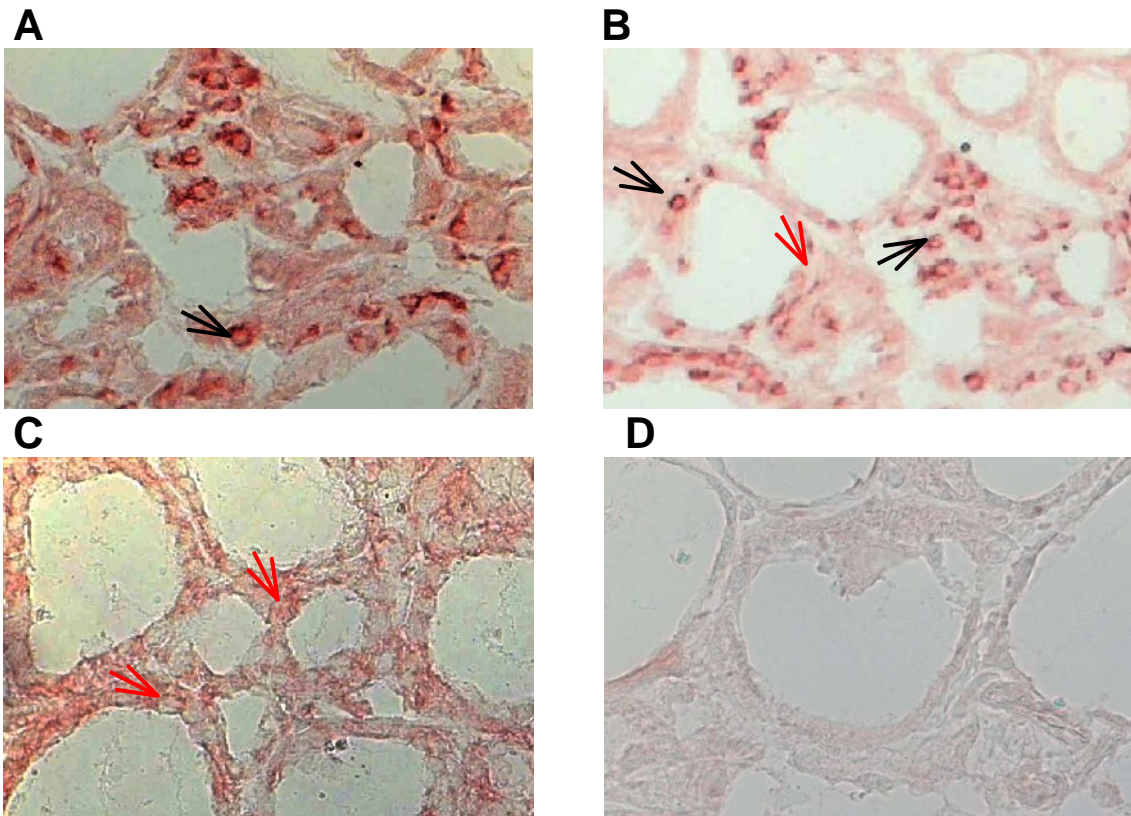


**Figura 4:** *Southwestern* en cortes histológicos para evaluar activación de NF- $\kappa$ B, obtenidos de ratones Rk inmunizados con Tg+LPS (**A** y **C**), Tg+CCF (**B** y **D**), ratones control que no recibieron antígeno (**E**) y un control de la técnica, al que no se aplicó la secuencia de oligonucleótidos marcada (**F**). La activación de NF- $\kappa$ B se observó por la presencia de una fuerte coloración roja en los núcleos de las células foliculares (flechas). Aumento 100x (A, B y E) y 400x (C, D y F).

#### 4.2.3 Inmunohistoquímica para subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en glándula tiroides.

Con el propósito de localizar la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en las células infiltrantes y en las células foliculares, se realizó una inmunohistoquímica. Mediante esta técnica podemos pesquisar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, tanto en su forma inactiva (tinción citoplasmática) como en su forma activa (tinción nuclear).

La figura 5 (A y B), corresponde a cortes histológicos de glándulas tiroideas de ratones inmunizados con Tg+LPS y Tg+CCF respectivamente. Se aprecia una tinción nuclear específica en gran parte de la tiroides, indicando la presencia de NF- $\kappa$ B en estado activo. Sin embargo, también se evidencia una tinción citoplasmática, correspondiendo a una parte de NF- $\kappa$ B que se encuentra en estado de inactividad, es decir, en el citoplasma asociado al I $\kappa$ B. En la figura 5 (C), se muestra un corte de tiroides de ratón control, observándose gran cantidad de tinción citoplasmática, lo que se relaciona con un estado inactivo de NF- $\kappa$ B en las células de la tiroides, corroborando los resultados obtenidos mediante *southwestern*. La figura 5 (D), nos muestra un control de la técnica, en la que no se agregó el primer anticuerpo, por lo tanto, no se aprecia tinción.



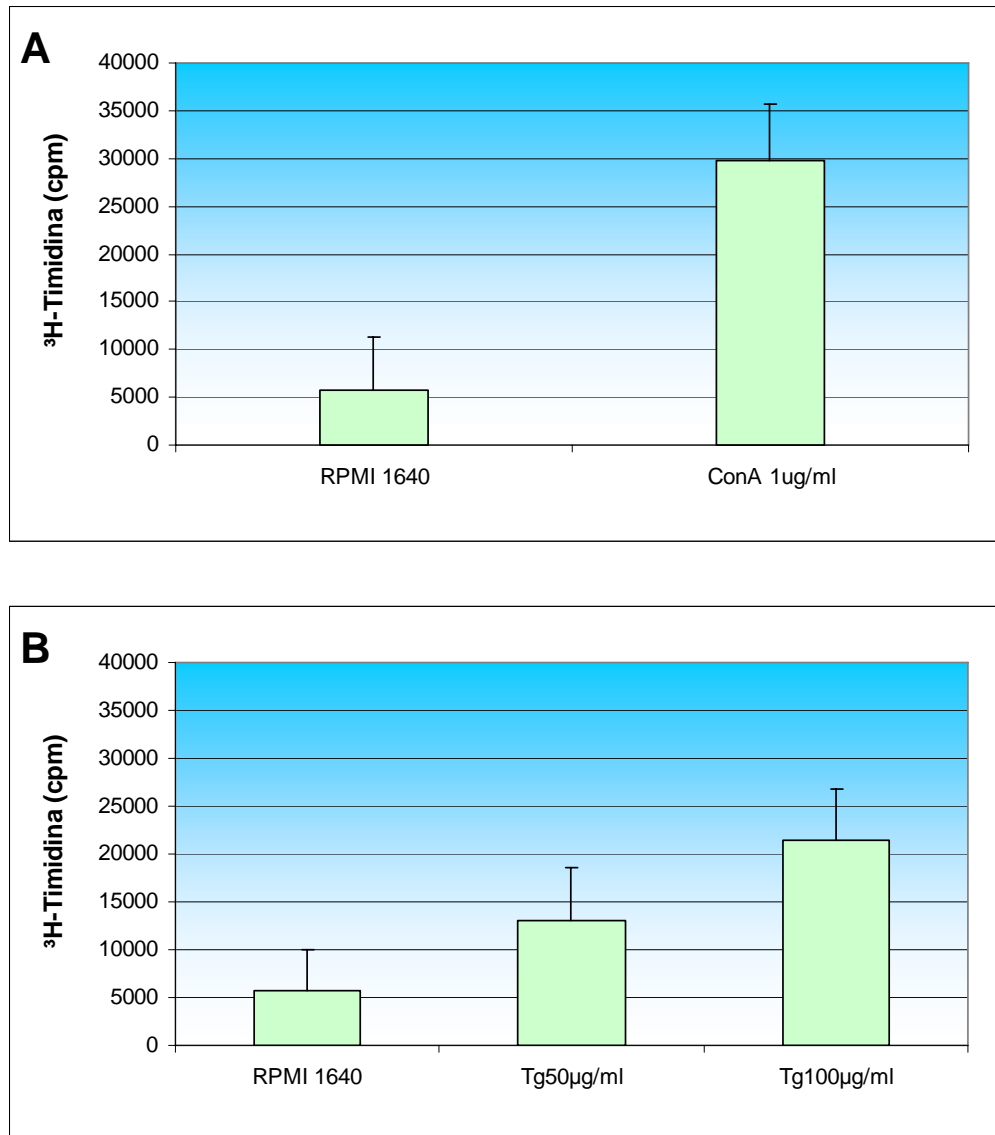
**Figura 5:** Inmunohistoquímica en cortes de glándula tiroidea contra la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. Las flechas indican tinción citoplasmática (roja) y nuclear (negra). Proviene de ratones Rk inmunizados con Tg+LPS (**A**), Tg+CCF (**B**) y ratones controles (**C** y **D**). Aumento 400x (A, B, C y D).

#### 4.2.4 Estudio de la respuesta linfoproliferativa anti-tiroglobulina *in vitro*.

Para evaluar la respuesta linfoproliferativa antígeno-específica, las células provenientes de nódulos linfáticos de animales inmunizados, fueron cultivados durante cuatro días con tiroglobulina en dos concentraciones (50 y 100  $\mu\text{g/ml}$ ) y como control, otras suspensiones celulares fueron incubadas con el mitógeno concanavalina A y con medio de cultivo RPMI 1640. Posteriormente, se evaluó la respuesta linfoproliferativa mediante incorporación de timidina tritiada.

La figura 6 (A) constituye un control de la técnica de linfoproliferación, se muestra que la respuesta proliferativa de los linfocitos fue adecuada, de acuerdo a su capacidad de responder a concanavalina A, pues corresponde a una respuesta proliferativa de tipo policlonal.

En cambio, en la figura 6 (B) se muestra la respuesta proliferativa antígeno-específica de linfocitos provenientes de ratones inmunizados, donde se aprecia que existe un aumento de la respuesta, que es dependiente y proporcional a la concentración del antígeno utilizado en la incubación *in vitro* (50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  Tg). Se muestra además, la diferencia entre la respuesta basal que existe en células no estimuladas (control) cultivados en medio de cultivo RPMI 1640.



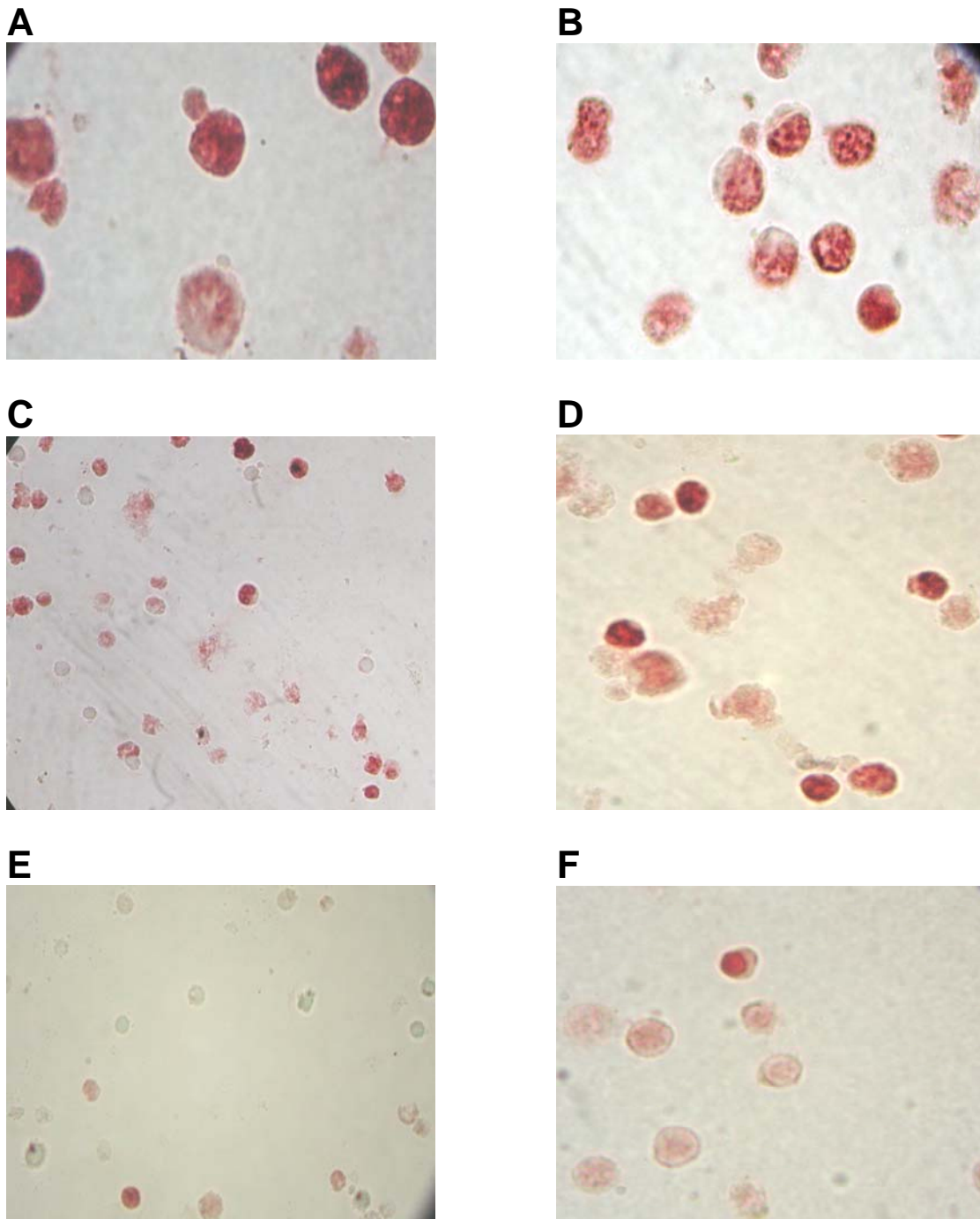
**Figura 6: (A)** Respuesta linfoproliferativa de linfocitos estimulados con medio de cultivo y con mitógeno (concanavalina A), medida por incorporación de timidina tritiada.

**(B)** Respuesta linfoproliferativa de linfocitos estimulados con el antígeno (tiroglobulina), medida por incorporación de timidina tritiada.

#### 4.2.5 Análisis del grado de activación de NF- $\kappa$ B en linfocitos estimulados *in vitro*.

De acuerdo a los resultados del punto anterior, observamos que existe una importante respuesta proliferativa antígeno-específica. Debido a esto, nos interesó determinar si durante este proceso de proliferación, está involucrada la activación de NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, linfocitos cultivados *in vitro*, en presencia del antígeno (Tg), fueron sometidos a la técnica *southwestern*, analizándose el grado de activación del factor.

En la figura 7 (A y B), se muestran linfocitos de ratones inmunizados con Tg+CCF y no inmunizados respectivamente, ambos sensibilizados con mitógeno ConA. Se observa que gran parte de las células se encuentran con tinción nuclear de color rojizo, evidenciando la presencia de NF- $\kappa$ B activo. En la figura 7 (C y D), se muestran linfocitos provenientes de ratones inmunizados con Tg+CCF y sensibilizados *in vitro* con Tg. Se observan algunas células teñidas fuertemente, pero en mucho menor cantidad que las mostradas en la figuras 7 (A y B), las que corresponden a la activación policlonal. Por lo tanto, podemos postular que estas células fuertemente teñidas corresponden a aquellas células antígeno-específicas (anti-Tg), las que presentan un alto grado de activación de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, en la figura 7 (E) se muestran linfocitos de ratones no inmunizados que fueron sensibilizados con Tg y en la figura 7 (F), se muestran linfocitos de ratones inmunizados cultivados sólo con medio RPMI 1640. En ambas figuras, se observan algunas células levemente estimuladas. También, se realizaron controles de la técnica, aplicándose poli dI/dC en lugar de la sonda de oligonucléotidos biotinilada. En ellos, los linfocitos aparecen incoloros en su totalidad (resultados no mostrados)



**Figura 7:** *Southwestern* para evaluar la activación de NF- $\kappa$ B en linfocitos.

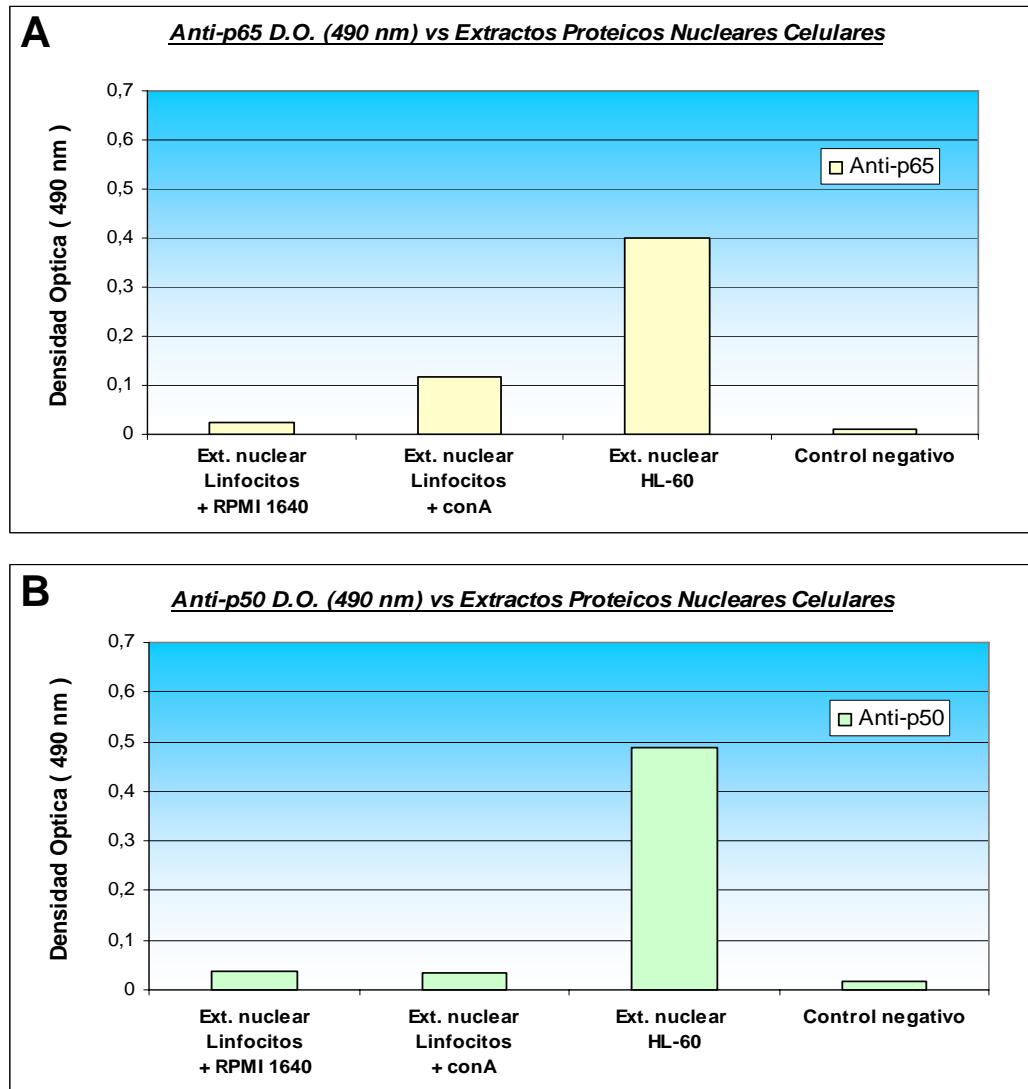
Proviene de ratones Rk inmunizados con Tg+CCF e incubado con conA (**A**), no inmunizados incubados con conA (**B**), inmunizados incubados con Tg (**C** y **D**), no inmunizados incubados con Tg (**E**), ratón inmunizado incubado sólo con medio de cultivo (**F**). Aumento 400x (A, B), 100x (C y E) y 200x (D y F).



### **4.3 ELISA para NF- $\kappa$ B desde extracto nuclear de linfocitos.**

Con el propósito de evaluar cuantitativamente NF- $\kappa$ B translocado al núcleo celular, se prepararon extractos de proteínas nucleares obtenidas de diferentes tipos celulares, para luego ser sometidos a un test de ELISA. Este ensayo consistió en utilizar placas recubiertas con streptoavidina, a las que se agregaron los extractos nucleares junto con la sonda biotinilada específica para NF- $\kappa$ B. Luego, se detectó el complejo sonda/NF- $\kappa$ B al incubarlo con los anticuerpos anti-p50 y anti-p65.

De la figura 8 (A), que corresponde a los resultados de D.O. del ensayo con anticuerpos anti-p65, observamos que las lecturas obtenidas para el extracto proteico nuclear de linfocitos incubados con mitógeno, es más elevada que el incubado sólo con medio de cultivo. Esto se correlaciona con los resultados de *southwestern*, donde observamos que los linfocitos activados con mitógeno, presentan un importante grado de activación de NF- $\kappa$ B, ya que una mayor lectura de D.O. indica una mayor cantidad de complejo sonda/NF- $\kappa$ B activo. También, observamos una lectura de D.O. considerable en los pocillos que corresponden a los extractos proteicos nucleares obtenidos de las células HL-60, que presentan un importante grado de activación de este factor de transcripción. Por otro lado, en la figura 8 (B), que corresponde a los resultados de D.O. del ensayo con anticuerpos anti-subunidad p50, se observa una diferencia mínima entre los valores de los extractos proteicos de los linfocitos cultivados con medio y con mitógeno. Sin embargo, la D.O. para el extracto nuclear de las células HL-60 es mayor, validando el experimento.



**Figura 8:** (A) Gráfico del resultado del test ELISA para pesquisar la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B aplicado a extractos de proteínas nucleares provenientes de linfocitos cultivados en presencia de mitógeno y medio de cultivo como control y células HL-60.

(B) Gráfico del resultado del test ELISA para pesquisar la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B aplicado a extractos de proteínas nucleares provenientes de linfocitos cultivados en presencia de mitógeno y medio de cultivo como control y células HL-60.

## 5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se indujo TAE en ratones de la cepa *Rockefeller*, mediante la inmunización con un antígeno específico (Tg) más LPS o CCF, inyectados en distintas concentraciones, de manera similar a lo descrito por otros autores (Esquivel et al., 1977). Luego, se evaluó la respuesta inmune humoral y celular para correlacionar bajo distintas técnicas, el desarrollo de esta enfermedad con la activación de NF- $\kappa$ B en las células infiltrantes como en células foliculares de la glándula tiroides.

La respuesta inmune humoral fue evaluada mediante ELISA, cuantificando los niveles de anticuerpos anti-Tg que presentaron los sueros recolectados post-inmunización. Distintos grupos de animales fueron inmunizados con Tg, utilizando dos diferentes adyuvantes (CCF y LPS). Cuando se utilizó CCF, se obtuvo niveles de anticuerpos anti-Tg mayores que cuando se utilizó LPS, lo cual es esperado, pues el CCF es un coadyuvante potente utilizado universalmente (Rose et al., 1971), aunque los valores obtenidos con LPS son considerables, comparados con los de animales no inmunizados. Por lo tanto, en ambos casos se obtuvo una respuesta inmune humoral importante.

Por otro lado, al analizar la respuesta inmune humoral en forma individual, vemos que los animales respondieron con niveles de anticuerpos anti-Tg heterogéneos, variaciones que pueden explicarse debido al polimorfismo genético que existe en cada cepa, en la cantidad de antígeno y coadyuvante administrado, pues se inducen

diferentes cantidades de citoquinas en respuesta al estímulo específico, lo cual concuerda con estudios anteriores (Zaccone et al., 2003).

Para analizar la respuesta inmune celular, fue necesario el sacrificio de los animales para la extracción de la glándula tiroides y nódulos linfáticos para obtener cortes histológicos y suspensión celular respectivamente.

El análisis histológico, a través de la tinción con hematoxilina/eosina, de los cortes de glándulas tiroides provenientes de ratones inmunizados, demuestra que estos animales desarrollaron una importante infiltración celular alrededor de los folículos tiroideos, observándose que en algunos casos, éstos destruyen la arquitectura normal del tejido aunque no en su totalidad, este daño se correlaciona con la presencia de altos niveles de anticuerpos anti-Tg encontrados en los sueros. Concluimos además, que el daño a nivel de la glándula tiroides se observó en ambos esquemas de inmunización. Estos resultados son comparables a los descritos por otros autores (Tang et al., 1998).

Estudios anteriores, reportan que durante el desarrollo de la TAE se produce una infiltración celular con la participación de distintos tipos celulares, principalmente linfoides. Por otra parte, sabemos que estarían participando una serie de citoquinas pro-inflamatorias que perpetúan el daño en el tejido glandular. Por lo tanto, nuestro interés es conocer que rol está cumpliendo el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en esta patología en particular y especialmente, a nivel de la tiroides, pues es conocida su participación en otras enfermedades autoinmunes y además, es considerado un “mediador central”

de la respuesta inmune, ya que una vez activado, regula la expresión de genes de citoquinas, quimioquinas, inmunoreceptores, moléculas de adhesión, diferenciación celular y control de crecimiento.

En la detección de NF- $\kappa$ B en su forma activa, mediante *southwestern* sobre cortes de glándula tiroides provenientes de animales que desarrollaron TAE, pudimos comprobar que este factor de transcripción presentó un importante grado de activación. Esta activación de NF- $\kappa$ B se observó en las tiroides de ratones inyectados con ambos esquemas de inmunización (Tg+CCF y Tg+LPS). Específicamente, se observa la activación de NF- $\kappa$ B en los núcleos de las células infiltrantes que, en general, no alteran la arquitectura de los folículos tiroideos, lo cual es esperable ya que está descrita la actividad de este factor de transcripción en células pertenecientes al sistema inmune (Gerondakis et al., 1998). Pero además, observamos una fuerte activación de NF- $\kappa$ B en las células foliculares propias de la glándula, evidenciado por la fuerte tinción nuclear presente en ellas, hecho que no ha sido descrito previamente. Este hallazgo, nos lleva a replantear el rol que eventualmente están cumpliendo las células foliculares tiroideas y podemos postular una participación activa de ellas en la progresión de la enfermedad. Además, estos resultados concuerdan con otros modelos de enfermedades autoinmunes como EAE, en el cual se postula que NF- $\kappa$ B juega un rol preponderante en la activación y diferenciación de los linfocitos T auto-reactivos (Hilliard et al., 1999).

Es importante señalar, que el tejido sometido a *southwestern* sufre algún grado de destrucción, debido a ciertos procesos utilizados en la técnica como: la

concentración de pepsina-HCl y el tiempo de incubación es crítico, sobre todo porque los cortes histológicos fueron realizados en congelación (crióstato).

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos a través de la técnica *southwestern*, se realizó una inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-p65 en cortes de glándulas tiroideas. Esta técnica nos permitió visualizar la proteína p65 cuando se encuentra en el citoplasma conformando el complejo NF- $\kappa$ B/ I $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B inactivo) como también a nivel nuclear, cuando el factor NF- $\kappa$ B se libera de su inhibidor I $\kappa$ B y es translocado al núcleo celular. Los resultados obtenidos muestran que existe una tinción nuclear específica en gran parte de la tiroides, tanto en células infiltrantes como células foliculares, lo que nos indica que en aquellas células, NF- $\kappa$ B se encontró activo, pues fue translocado al núcleo. Sin embargo, también se evidencia una tinción citoplasmática, que corresponde a un estado de inactividad del factor de transcripción. Además, en los cortes de ratones control se observó gran cantidad de tinción citoplasmática, lo que se relaciona con un estado inactivo de NF- $\kappa$ B en las células de la tiroides normales. Por lo tanto, estos resultados confirman aquellos obtenidos por la técnica *southwestern*.

Otra forma de analizar la respuesta inmune celular frente a Tg, fue realizar el estudio de linfoproliferación *in vitro*, donde las células provienen de ganglios linfáticos de animales inmunizados con Tg. En primer lugar, observamos que la respuesta proliferativa antígeno específica de los linfocitos anti-Tg específicos es considerable, apreciándose una respuesta dependiente de la concentración de antígeno utilizado, lo

cual da cuenta del desarrollo de una respuesta linfoproliferativa de tipo celular frente al antígeno y que puede explicar la presencia del infiltrado celular en la tiroides. Como control de esta técnica, se evaluó la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados *in vitro* con el mitógeno concanavalina A, en ellos se observó una respuesta más alta ya que existe una estimulación celular policlonal, lo que es esperado.

Debido a que otros autores han descrito que la respuesta linfoproliferativa antígeno-específica disminuye en animales *knock out* para la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B (Hilliard et al., 1999), nos propusimos estudiar el estado de activación de NF- $\kappa$ B, en linfocitos T antígeno-específicos.

La actividad de NF- $\kappa$ B fue analizada mediante *southwestern* en células provenientes de nódulos linfáticos, que fueron cultivados *in vitro* con medio RPMI 1640, Tg y concanavalina A. En la estimulación antígeno-específica (Tg), pudimos observar que en una pequeña población de células se encontró una fuerte tinción nuclear, lo que nos indica un grado importante de activación en ellas. Sin embargo, en muchas otras células no se evidenció activación. Estos resultados concuerdan con aquellos previamente descritos por nuestro laboratorio (Aguilar et al., 2005). La presencia de estas células altamente activadas que podrían corresponder a las células antígeno-específicas, permite postular que NF- $\kappa$ B está participando en la activación de los linfocitos eventualmente auto-reactivos. También, se aprecia que la mayor parte de los linfocitos que fueron estimulados con concanavalina A, presentaron una tinción nuclear

marcada y homogénea, lo que es de esperar, ya que esta molécula es un mitógeno que estimula específicamente a los linfocitos T.

De los resultados anteriores, observamos que la utilización de la técnica *southwestern*, nos permitió demostrar el estado de activación de NF- $\kappa$ B en distintos tipos celulares (linfocitos infiltrantes, células foliculares tiroideas, linfocitos Tg-específicos). Además, mediante esta técnica es posible distinguir distintos tipos de tinción nuclear, de acuerdo a la intensidad del color (intenso, medio, leve), indicando al mismo tiempo, varios grados de activación en las células analizadas, debido a que se utiliza una sonda doble hebra específica para NF- $\kappa$ B, que es capaz de unirse sólo al factor en estado activo. También, podemos señalar que esta técnica para NF- $\kappa$ B podría ser modificada para el estudio de otros modelos experimentales, utilizando tejidos o células en cultivo.

Como último punto, además del interés de determinar el grado de activación, también quisimos evaluar numéricamente la cantidad del factor de transcripción en estado activo. Por lo tanto, se diseñó un ensayo basado en un ELISA para cuantificar NF- $\kappa$ B. Este ensayo, consistió en la utilización de un extracto de proteínas nucleares extraídas de linfocitos, los que fueron incubados con la sonda biotinilada y luego puestos sobre placas de ELISA recubiertas con streptoavidina. De este modo, el complejo NF- $\kappa$ B/sonda se inmovilizó a la placa a través de la streptoavidina. Luego, se detectó la proteína p65 y p50 adicionando los anticuerpos específicos.



Las lecturas de absorbancias obtenidas de los extractos nucleares provenientes de linfocitos estimulados con concanavalina A y de la línea celular HL-60, fueron considerables, especialmente, las provenientes de éstas últimas, pues contienen un estado de activación de NF- $\kappa$ B permanente. Estos resultados, nos permiten plantear la posibilidad de utilizar este método en la cuantificación de NF- $\kappa$ B en forma precisa, pero obviamente requiere de la estandarización de los diferentes pasos del protocolo para la obtención de lecturas de D.O. más elevadas.

Cabe señalar, que la detección de NF- $\kappa$ B mediante ELISA, puede realizarse indistintamente utilizando anticuerpos anti-p65 o anti-p50, ya que ambos detectan el complejo NF- $\kappa$ B/sonda, aunque pareciera ser más recomendable el uso de anticuerpos anti-p65, pues esta subunidad se encuentra más ampliamente distribuida dentro de la familia NF- $\kappa$ B.

Finalmente, se concluye que los resultados concuerdan con la literatura citada, pues se observa una respuesta inmune humoral esperada y una infiltración de linfocitos interrumpiendo la morfología normal de los folículos tiroideos, aunque en una proporción menor a la esperada. También, se demostró la activación de NF- $\kappa$ B en linfocitos infiltrantes, en células foliculares tiroideas y en linfocitos antígeno-específicos cultivados *in vitro*, evidenciado por la tinción nuclear. De los hallazgos anteriormente señalados, podemos destacar la activación de NF- $\kappa$ B en las células foliculares tiroideas, permitiéndonos afirmar que ellas están relacionadas directa y activamente en el desarrollo de la TAE, mediada a través de la activación de NF- $\kappa$ B.

## 6. REFERENCIAS

Aguilar, G. (2005) Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en linfocitos auto-reactivos anti-Tg de ratón. *Tesis Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. pp. 22-25.*

Ban, Y., Greenberg, D. A., Concepcion, E., Skrabanek, L., Villanueva, R. y Tomer, Y. (2003) Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:15119–15124.*

Barin, J. G., Afanasyeva, M., Talor, M. V., Rose, N. R., Burek, C. L. y Caturegli, P. (2003) Thyroid-Specific Expression of IFN- $\gamma$  Limits Experimental Autoimmune Thyroiditis by Suppressing Lymphocyte Activation in Cervical Lymph Nodes. *J. Immunol. 170: 5523–5529.*

Esquivel, P. S., Rose, N. R. y Kong, Y. M. (1977) Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide. *J. Exp. Med. 145: 1250-1263.*

Gentile, F., Conte, M., Formisano, S. (2004). Thyroglobulin as an autoantigen: what can we learn about immunopathogenicity from the correlation of antigenic properties with protein structure?. *Immunology 112:13–25.*

Gerondakis, S., Grumont, R., Rourke, I., Grossmann, M. (1998) The regulation and roles of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 10:353-359.

Hernández-Presa, M., Gómez-Gerrero, C., Egido, J. (1999) *In situ* non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int.* 55:209-214.

Hilliard, B., Samoilova, E. B., Liu, T., Rostami, A. y Chen, Y. (1999) Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF $\kappa$ B- deficient mice : roles of NF- $\kappa$ B in the activation and differentiation of auto reactive T cells. *J. Immunol.* 163: 2937-2943.

Karin, M., y Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: The Control of NF- $\kappa$ B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18:621–663.

Karras, E., Yang, H., Lymberi, P., Christadoss, P. (2005) Human thyroglobulin peptide p2340 induces autoimmune thyroiditis in HLA-DR3 transgenic mice. *J. Autoimmun.* 24:291-296.

Kong, Y. C., Lomo, L. C., Motte, R. W., Giraldo, A., Baisch, J., Strauss, G., Hammerling, G.J., David, C. S. (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.

Moynagh, P. N. (2005) The NF- $\kappa$ B pathway. *J. Cell Sci.* 118:4389-4392.

Nicholson, L. B. y Kuchroot, V. K. (1996) Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* 8:837-849.

Pahl, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 18:6853-6866.

Rose, N. R., Twarog, F. J. y Crowle, A. J. (1971) Murine thyroiditis: importance of adjuvant and mouse strain for the induction of thyroid lesions. *J. Immunol.* 106: 698-704.

Ruland, J., Mak, T. W. (2003) From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF- $\kappa$ B. *Semin. Immunol.* 15:177-183.

Tang, H., Sharp, G. C., Peterson, K. E. y Braley-Mullen, H. (1998) Induction of Granulomatous Experimental Autoimmune Thyroiditis in IL-4 Gene-Disrupted Mice. *J. Immunol.* 160: 155–162.

Wang, S. H., Bretz, J.D., Phelps, E., Mezosi, E., Arscott, P. L., Utsugi, S. y 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.

Zaccone, P., Fehérvári, Z. y Cooke, A. (2003) Tumour necrosis factor-alpha is a fundamental cytokine in autoimmune thyroid disease induced by thyroglobulin and lipopolysaccharide in interleukin-12 p40 deficient C57BL/6 mice. *Immunology* 108:50-54.

## **7. ANEXO**

### **Soluciones**

**1) Suero Fisiológico:**

NaCl 0,9%	9 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 ml

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

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	7,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	2,15 g
NaCl	36,10 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 ml

Ajustar a pH 7,2 con NaOH y guardar a 4°C.

Para obtener una concentración 1x diluir 1:5 con agua destilada.

**3) PBS-Tween20 0,05%:**

Tween 20	0,5 ml
PBS	1000 ml

4) **Buffer 1 (5x) pH 7,4:**

HEPES 10 mM	2,38 g
NaCl 40 mM	2,34 g
MgCl <sub>2</sub> 10 mM	2,03 g
EDTA 1 mM	0,292 g
BSA 0,25%	*
DTT 1 mM	**
H <sub>2</sub> O destilada	200 ml

(\*) Para preparar 100 ml 1x, pesar 0,25 g de BSA y disolver en 20 ml de buffer 5x, luego aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

(\*\*) Para 100 ml de buffer 1 1x agregar 100 µl de DTT 1M.

Ajustar la solución a pH 7,4

5) **Buffer 2 (5x) pH 7,4:**

HEPES 10 mM	1,19 g
NaCl 40 mM	1,17 g
EDTA 10 mM	1,46 g
BSA 0,25%	*
DTT 1 mM	**
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

(\*) Para preparar 100 ml 1x, pesar 0,25 g de BSA y disolver en 20 ml de buffer 5x, luego aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

(\*\*) Para 100 ml de buffer 1 1x agregar 100 µl de DTT 1M.

Ajustar la solución a pH 7,4

6) **Buffer de Lavado pH 7,5:**

Acido Maleico 100 mM	2,32 g
NaCl 0,15 M	1,76 g
Tween20 0,03%	60 $\mu$ l
Buffer 1 (5x)	40 ml
BSA 0,25%	0,5 g
DTT 1 mM	200 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	200 ml

Tomar 40 ml de Buffer 1 y disolver 0,5 g de BSA, una vez disuelto agregar los reactivos restantes.

7) **Buffer de Bloqueo**

SSC 0,1x	0,05 ml
SDS 0,1%	0,01 g
Buffer Lavado	90 ml
H <sub>2</sub> O destilada	9,5 ml

8) **Buffer TE (5x) pH 8,0:**

Tris 10 mM	6,05 g
EDTA 1mM	0,145 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

Para obtener una concentración 1x diluir 1:5 con agua destilada.



9) **Sustrato AEC:**

Buffer CH <sub>3</sub> COONa 0,17 M pH 5.2	1 ml
Solución stock AEC	25 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 vol)	10 µl

Para preparar solución stock pesar 0,004 g de AEC y disolver en 1 ml DMSO, almacenar hasta dos semanas en la oscuridad a temperatura ambiente.

Para preparar buffer acetato de sodio 0,17 M pesar 2,79 g CH<sub>3</sub>COONa y aforar a 200 ml de agua destilada, una vez disuelto ajustar a pH 5,2

10) **Medio de Cultivo RPMI-1640 Incompleto:**

Disolver un frasco de 10,4 g de RPMI (Sigma Chemical Co.) en un litro de agua destilada, luego agregar 2 g 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.

11) **Medio de cultivo RPMI-1640 Completo:**

Al medio RPMI-1640 incompleto se le agrega

Penicilina Sódica	120 U/ml
Estreptomina	0,12 U/ml
Piruvato de Sodio	1,0x10 <sup>-3</sup> M
Anfotericina B	2 µg/ml
2-Mercaptoetanol	5,0x10 <sup>-5</sup>
Suero de Bovino Fetal	10%

## Soluciones ELISA

### 12) Buffer extracto citoplasmático (CE) a pH: 7,6

HEPES	10 mM
KCl	60 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
NP40	0,075%
PMSF	1 mM *

(\*) Solución stock de PMSF 100 mM en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 13) Buffer extracto nuclear a pH 8,0:

Tris/Cl	20 mM
NaCl	420 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
EDTA	0,2 mM
PMSF	1 mM *
Glicerol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	25%

(\*) Solución stock de PMSF 100 mM en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Soluciones Inmunohistoquímica

### 14) Solución de bloqueo PBS-Leche descremada 5%

Leche descremada	2,5 g
PBS	50 ml

### 15) Solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS 0,3%

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 µl
PBS	7 ml

### 16) Solución lavado PBS-Tween20 0,05%

Tween 20	0,25 ml
PBS	500 ml

### 17) Solución lavado PBS-Tween20 0,05% TRITON x-100 0,1%

Tween 20	0,25 ml
Triton x-100	0,5 ml
PBS	500 ml