



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA
UNIDAD REGIONAL SUR
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO, BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**Expresión de las citosinas de la respuesta Th1 (TNF- α , TNF- β , IFN- γ ,
IL-1 β), Th2 (IL-10) y Th17 (IL-17a)
en ventrículo izquierdo de rata**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

José Francisco Chiprés Montaña

Navojoa, Sonora

Marzo del 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN


Los miembros del jurado calificador designado para revisar la Tesis Profesional Práctica de José Francisco Chipres Montaña, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.




Dr. José Guadalupe Soñanez Organig
Presidente



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
Secretario



Dr. Edgar F. Morán Palacio
Vocal



M.C. Ramona Icedo García
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater Universidad de Sonora.

A mi comité de Tesis por sus atentos comentarios y ayuda.

A mi asesor Dr. José Guadalupe Soñanez Organis por siempre asesorarme, aconsejarme y guiarme de la manera correcta y por brindarme su amistad.

Al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez por sus consejos y brindarme su amistad.

A la Universidad de Sonora por el financiamiento del proyecto USO513002079 que permitió la realización del trabajo.

DEDICATORIAS

Primeramente, a Dios por permitirme culminar esta grata etapa de mi vida.

A mi Madre Rosa Dihnora, por sacarme adelante y siempre apoyarme. Te quiero mamá.

A mi padre Ofelio y mi hermano Eduardo por siempre apoyarme en mis decisiones.

A José Arquímides por siempre ayudarme de la mejor manera y por brindarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio Jeravy, Rafa, Melissa, José, Juan, Jenny y Mónica que siempre estuvieron ahí para apoyarme.

A mis amigos Julián, Ana Luceño, Arturo, María José, Daniel, Sergio, Ivan, José Angel, José Andrés, Yulenny, por siempre apoyarme en todo momento. Los amo amigos.

A Luz Andrea por siempre brindarme su ayuda y amistad.

Brenda, gracias por siempre apoyarme durante todo momento, gracias por siempre estar ahí cuando más lo necesité, gracias por ser un pilar muy importante en mi vida, te amo.

Tata, gracias por criarme como tu hijo y formarme como persona de bien, te extraño tanto Tata.

A mi mamá Cruz por siempre cuidarme y brindarme todo su amor, te extraño mucho mamá Cruz.

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
LISTA FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	10
El Corazón.....	10
Ventrículo izquierdo.....	10
Citosinas	12
Clasificación funcional de las citosinas	12
Citosinas de la respuesta de células T cooperadoras.....	14
Citosinas de la respuesta Th1	15
Citosinas de la respuesta Th2	15
Citosinas de la respuesta Th17	16
Citosinas expresadas en el corazón	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Especificos	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Manejo de animales y recolección de muestras	20
Extracción del RNA total de ventrículo izquierdo y síntesis de DNA complementario	20
Diseño de oligonucleótidos específicos.....	21
Especificidad de los oligonucleótidos utilizados por PCR cuantitativo	21

Expresión de las citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17 por PCR punto final	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Integridad y pureza del RNA total	23
Diseño de oligonucleótidos para cada una de las citocinas	24
Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos para cada una de las citosinas	27
Expresión de las citosinas en ventrículo izquierdo	30
CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA	33

LISTA FIGURAS

Figura		Página
1.	Morfología del corazón humano.	11
2.	Análisis de la integridad de las muestras de RNAt.	24
3.	Alineamiento múltiple de secuencias nucleóticas de las citosinas de la respuesta Th1.	25
4.	Alineamiento múltiple de secuencias nucleóticas de las citosinas de la respuesta Th2.	26
5.	Alineamiento múltiple de secuencias nucleóticas de las citosinas de la respuesta Th17.	27
6.	Diagramas de temperaturas de disociación de las citosinas Th1, Th2 y Th17.	28
7.	Productos de PCR obtenidos para cada citosina.	31

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Clases funcionales de citosinas	13
2.	Características de los RNAt extraídos de ventrículo izquierdo	23
3.	Características de los oligonucleótidos utilizados para amplificar las citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17	24
4.	Temperaturas de disociación de las citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17	28

INTRODUCCIÓN

El corazón es un músculo cardíaco que tiene la función principal es bombear sangre a todo el organismo para mantener la demanda de oxígeno y nutrientes. Está compuesto de una mezcla compleja de células, donde las más predominantes son los miocitos cardíacos (cardiomiocitos) y los fibroblastos. El papel que desempeñan los cardiomiocitos es estructural y funcional ya que son capaces de alterar sus procesos de síntesis y degradación en respuesta a sus cambiantes demandas fisiológicas del corazón, donde las citosinas y quimosinas desempeñan un papel importante en la remodelación cardíaca y fisiológica, principalmente en trastornos patológicos (Berne, 1981).

Las citosinas son proteínas de bajo peso molecular que juegan un papel importante en la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria. Existen varias familias de citocinas que se clasifican por su función biológica, y las citocinas de la respuesta de células T cooperadoras (Th, *T* por su maduración es en el timo y *h* helper, de la traducción del inglés) son una de las más importantes. La respuesta Th provee cooperación con células del sistema inmune y células que median la actividad citotóxica, y se dividen en tres tipos de células Th1, Th2 y Th17 (Berger, 2000; Damsker y col., 2010).

La inducción de quimosinas, citosinas pro-inflamatorias y otras moléculas relacionadas como interleucina (IL)-1 β , factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1) y factor nuclear κ B (NF- κ B) son característicos de trastornos patológicos del corazón (Serra y col., 2010; Murray y col., 2000; Xia y col., 2009). El incremento de citosinas pro-inflamatorias durante trastornos patológicos está altamente correlacionado con fibrosis, en contraste con corazones de animales ejercitados donde no hay un incremento de citosinas pro-inflamatorias tales como IL-6, TNF- α , TGF- β 1 y NF- κ B, mientras que otros estudios demuestran que citosinas anti-inflamatorias como IL-10 disminuyen. Sin embargo, la expresión génica de citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17 en ventrículo izquierdo de rata se desconoce. Por lo anterior, este trabajo plantea evaluar la expresión de las citosinas de la respuesta Th1 (TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1 β), Th2 (IL-4, IL-6, IL10) y Th17 (IL-17a) en ventrículo izquierdo de rata por medio de PCR.

ANTECEDENTES

El Corazón

El corazón humano es un músculo que contiene cuatro cámaras situadas a la izquierda de la cavidad torácica, cuya función es bombear sangre a todo el organismo para mantener la demanda de oxígeno y nutrientes. El pericardio exterior, miocardio medio y pericardio interior son las tres capas que comprenden la pared del corazón. El pericardio, consiste en tejido conectivo y tejido adiposo que protege el corazón al reducir la fricción, el miocardio grueso está hecho de tejido muscular cardíaco organizado en planos y suministrado por capilares sanguíneos, capilares linfoides y fibras nerviosas, y el endocardio se compone de epitelio y tejido conectivo con muchas fibras elásticas y colagenosas (Berne, 1981).

El interior del corazón está dividido en cuatro cámaras huecas, con dos a la izquierda y dos a la derecha (Figura 1). Las cámaras superiores son llamadas aurículas y reciben sangre regresándola al corazón, mientras que las cámaras inferiores son llamados ventrículos y reciben sangre de la aurícula para bombear hacia las arterias. La aurícula y ventrículo izquierdo están separados de la aurícula y ventrículo derecho por una pared sólida llamada septum evitando que la sangre se mezcle (Berne, 1981).

La aurícula derecha recibe sangre de la vena cava superior, cava inferior y la más pequeña (seno coronario), la cual drena sangre al interior de dicha aurícula al miocardio del corazón. La pared del músculo ventricular derecho es más delgada que el ventrículo izquierdo, debido a que solo bombea sangre a los pulmones con una baja resistencia al flujo de sangre. Por otro lado, el ventrículo izquierdo bombea sangre a todo el organismo y estructuralmente es más corto y tiene mayor forma cónica que el derecho y forma parte de ápex del corazón (Berne, 1981).

Ventrículo izquierdo

El ventrículo izquierdo forma el vértice del corazón, donde la mayor parte de toda su cara y borde izquierdos dan hacia al diafragma. Debido a que la tensión arterial es mucho más alta en la circulación sistemática que en la pulmonar, el ventrículo izquierdo desarrolla más trabajo que el ventrículo derecho (Moore y col., 2010). Una de sus funciones principales es

mantener las válvulas en su lugar durante la contracción del músculo cardíaco y así evitar un prolapso hacia las aurículas ya que la sangre pasa desde el Ventriculo izquierdo a través de la válvula aortica hacia la aorta ascendente donde esta se dirige hacia las arterias coronarias que irrigan el corazón (Tortora y Derrickson, 2011).

El ventriculo izquierdo tiene la capacidad de: 1) relajarse rápidamente por lo que participa en la relajación diastólica y de llenado, 2) contraerse rápidamente por lo que participa en la contracción sistólica y de eyección, y 3) aumentar o disminuir su capacidad de bombeo durante cambios de presión o volumen de sangre (Berne, 1981). La remodelación cardíaca, ya sea por cuestiones fisiológicas o patológicas (Grossman y col., 1975; Chung y Leinwand, 2014; Pelliccia y col., 1991), las citosinas desempeñan un papel importante durante dichos procesos, ya que, se han conducido estudios en los cuales se reporta la activación crónica de citosinas específicas que, si no son controladas, llevan a un fallo cardíaco y posteriormente la muerte (Nian y col., 2004; Mehra y col., 2005).

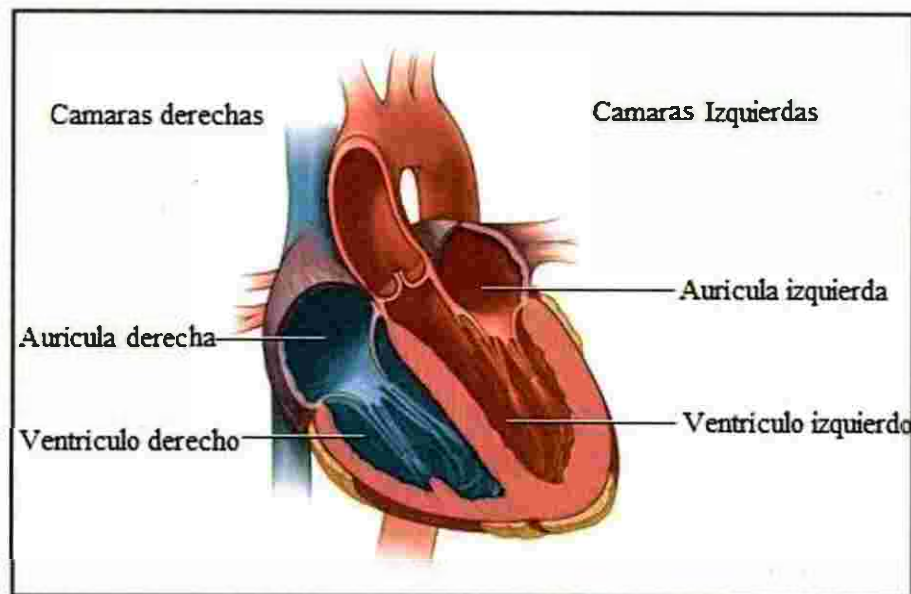


Figura 1. Cámaras huecas que dividen al corazón, con dos a la izquierda y dos a la derecha: 1) las cámaras superiores llamadas aurícula y 2) las cámaras inferiores llamadas Ventriculo (Tomado de Berne, 1981).

Citosinas

Las citosinas son proteínas reguladoras de bajo peso molecular o glicoproteínas que responden a diferentes estímulos del cuerpo (Salman y Salih, 2015), las cuales, constituyen una red de interacciones en la que se conectan distintos tipos celulares y cada una de ellas induce o suprime su propia síntesis o la de otras citosinas. Además, favorecen de manera sinérgica la acción de otras citosinas o bien actúan como verdaderos antagonistas de sus efectos biológicos y función reguladora (Filella y col., 2002) Las citosinas son nombradas de manera arbitraria dependiendo de su función biológica (Factor de necrosis tumoral, interferones, etc.), y algunas otras son llamadas interleucinas por que se creía que las citosinas se formaban y actuaban sobre los leucocitos (Abbas, 2012). Las funciones principales de las citosinas es estimular la respuesta inmune humoral, respuesta inflamatoria, regulación de la hematopoyesis y proliferación celular (Salman y Salih, 2015).

Las citosinas son producidas en forma limitada y con poca duración, la vida media de las citosinas depende de su función en el hospedero. Se da el caso que una citosina tenga diferentes efectos en la misma célula o diferentes citosinas que tengan la misma acción en una sola célula, esto último dependiendo del estímulo que haya recibido el cuerpo, una vez que la citosina llega a su célula diana produce su efecto o efectos específicos, estas células diana responden al efecto de las citosinas produciendo nuevo RNA mensajero (RNAm) y proteínas, siendo así una respuesta biológica específica (Khan, 2008).

Clasificación funcional de las citosinas

Las citosinas están clasificadas por familias y cada una de ellas tiene una función biológica específica (Tabla 1). La familia de las citosinas TNF incluye más de 20 miembros codificados por un gen, con un enfoque en la propiedad biológica como lo es evitar la proliferación celular. A pesar de que hay alrededor de 33 citosinas, la familia de IL-1 tiene 11 miembros, incluyendo a IL-1 α , IL-1 β , IL-18 e IL-33, esta familia funciona principalmente como citosinas inflamatorias. Por otra parte, la familia de IL-6, incluye miembros como IL-6, factor inhibidor de leucemia, IL-11, oncostatina, factor neurotrópico ciliar y cardiotropina-1 en donde cada una de ellas induce una fase aguda de proteínas hepáticas entre otro tipo de actividades biológicas. La familia de IL-10 incluye a IL-22 que se encarga de inhibir o regular las respuestas inflamatorias e inmunes (Dinarello, 2007).

Tabla 1. Clases funcionales de citosinas.

Clase Funcional	Propiedades Primarias	Otros efectos	Ejemplos
Factores de Crecimiento de Linfocitos	Expansión clonal	Polarización de Th1/Th2/Th17	IL-2, IL-4, IL-7, IL-17, IL-15
Citosinas Th1	↑ Respuesta Th1	Expansión Clonal de CTL ^a	IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18
Citosinas Th2	↑ Respuesta Th2	↑ Producción de anticuerpo	IL-4, IL-5, IL-18, IL-25, IL-23
Citosinas Th17	↑ Respuesta Th17, IFN- γ	Respuesta autoinmune	IL-17, IL-23, IFN- γ
Citosinas pro-inflamatorias	↑ Mediadores inflamatorios	↑ Respuesta inmune innata	IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-18, IL-23
Citosinas anti-inflamatorias	↓ Genes inflamatorios	↓ Letalidad mediada por citosinas	IL-10, IL-13, TGF- β , IL-22, IL-1Ra, IFN- α/β
Adipocinas	Pro-inflamatorias	↓ Enfermedad autoinmune pro-aterogénica	IL-1 α , TNF- α , IL-6, leptina, adiponectina,
Señalización de citosinas gp130	Factores de crecimiento	Activación de células B, fase aguda	IL-6, CTNF, IL-11, LIF, CT-1
Factores de crecimiento nervioso	↑ Células nerviosas/Schwann	Activación de células B	BDNF, NGF
Citosinas activadoras de osteoclastos	Resorción ósea	Estimulación inmune	RANK L
Factor de estimulación de colonias	Hematopoyesis	Pro y anti-inflamatorio	IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF, M-CSF
Citosinas angiogénicas	Neovascularización	Pro-metástasis	VEGF, IL-1, IL-6, IL-8
Factores de crecimiento mesenquimatosos	Fibrosis	Pro-metástasis	FGF, HGF, TGF- β , BMP
Interferón tipo II	Activación de macrófagos	Incrementar al MHC clase II	IFN- γ
Interferón tipo I	Anti viral; ↑ MHC clase I	Anti-inflamatorio; anti-angiogénico	IFN- α , IFN- β
Quimosinas, otros	↑ Migración celular	↑ Activación celular	IL-8, MCP-1, MIP-1 α

Tabla tomada de Dinarello, 2007.

Citosinas de la respuesta de células T cooperadoras

La respuesta de las células Th (llamadas T ya que maduran en el timo, y "h" de su traducción del inglés *helper*), las cuales son un grupo de células que se dividen funcionalmente para proveer cooperación con otras células del sistema inmune y células que median la actividad citotóxica. Las células Th expresan moléculas CD4 que, tienen la función biológica de interactuar con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, siendo este un proceso vital para la activación del sistema inmune (Albelo y col., 2013). Está regulada por citosinas que son responsables por la mayoría de los efectos biológicos del sistema inmune, así como, inmunidad mediada por células y respuestas alérgicas, donde los linfocitos T, son la mayor fuente productora de citosinas ya que estas células llevan receptores específicos de antígeno en su superficie que les permite el reconocimiento de patógenos extraños. Los linfocitos T se distinguen por la presencia de moléculas de superficie celular conocidas como células CD4 y CD8, donde los linfocitos T que expresan CD4 son conocidos también como células cooperadoras y a su vez estas se dividen en tres tipos de células Th1, Th2 y Th17 (Berger, 2000; Damsker y col., 2010).

Las citosinas de la respuesta Th1 que comprenden las citosinas IFN- γ , la familia de los TNF's, IL-1 e IL-2 que funcionan durante la respuesta inflamatoria. Las células Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 que intervienen durante proliferación células fagocíticas e inhibiendo a las mismas (Romagnani, 2000). Las células Th17 compuestas por la familia de las IL-17 son relacionadas con la respuesta pro-inflamatoria durante enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide (Hernández, 2009).

La respuesta por parte de las células Th1 media la actividad de IL-2 e IFN- γ que proliferan a las células T-citotóxicas en enfermedades autoinmunes. Las células Th2 por medio de IL-4 e IL-13 con una posible participación de IL-33 regulan la producción de anticuerpos. En el caso de Th17 que tiene efecto en enfermedades autoinmunes con la producción de IFN- γ dirigidas por IL-17 que a su vez son reguladas por IL-23. La diferenciación de T dentro de IL-17 juega un rol importante en modelos de enfermedades autoinmunes, en comparación con células T que son producidas por las células Th1, ya que el mismo efecto se da con las células T reguladoras (Treg) que son también controladas por las citosinas expresadas por dichas células. Las células Treg tienen la función de suprimir procesos autoinmunes como el caso de rechazo de injertos en humanos que depende de si hay una expresión por parte de IL-10 y TGF- β (Dinarello, 2007).

Citosinas de la respuesta Th1. Interleucina 1 beta (IL-1 β) es secretada en el torrente sanguíneo por macrófagos en procesos inflamatorios (Quanhui y col., 2016), causa destrucción de las células β que conducen a la diabetes mellitus tipo 1 (Khan, 2008). Esta citosina es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, también está envuelto en varios procesos celulares como apoptosis, proliferación y diferenciación celular.

El Interferón gamma (IFN- γ), pertenece a la familia de los interferones tipo II, es producido y activado por linfocitos T, células NK y células (Khan 2008). IFN- γ es esencial para la protección del cuerpo ante enfermedades causadas por bacterias, virus, parásitos, hongos y para la eliminación de células malignas (Mata y Hernández., 2008) además de ser un potente activador de fagocitos mononucleares. La expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I y II es aumentada por IFN- γ , induciendo la regulación del MHC I ante la defensa del huésped contra un patógeno intracelular. También regula la vía de presentación del antígeno MHC II dando como resultado a la activación de los linfocitos T CD4, no solo estimula a MHC II para que presente el antígeno, sino que también ayuda a inducir a que las células expresen sus genes constitutivamente (Khan 2008).

Otra de las citosinas pro-inflamatorias es el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que realiza su efecto como un poderoso inmunomodulador inflamatorio con actividad citotóxica, eliminando células malignas. Se ha visto que una deficiencia de esta citosina puede causar un incremento de células tumorales (Barbara y col., 1996), además de regular la activación de leucocitos, liberación de quimosinas, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e intermediarios de nitrógenos (Fragoso y col., 2013). TNF- α se induce a sí misma, y también la producción de IL-1, IL-6 vía macrófagos (Khan 2008).

Factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) es una citosina pro-inflamatoria también llamada linfotóxina alfa, es producida por células mononucleares humanas en sangre periférica (PBMC), mediada por IL-12 e IFN- γ (Srisakandan y col., 1996). Está envuelta en la formación de órganos linfoides secundarios durante su desarrollo. Una variación genética con esta citosina está relacionada con enfermedades como artritis psoriasica, linfoma no Hodgkin, entre otras.

Citosinas de la respuesta Th2. La interleucina 4 (IL-4) es una citosina producida por células Th2, mastocitos y células NK (natural killers), participa en la regulación del sistema inmune ayudando a la diferenciación de células T y también funciona como factor de crecimiento

para los linfocitos (Zamorano y col., 2003). La IL-4 suprime la producción de células Th1, es requerida para la producción de IgE y es la principal citosina que causa el cambio de isotipo de células B hacia IgG a IgE e IgG4 (Khan, 2008).

La interleucina 6 (IL-6) es producida por varios tipos celulares como: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, etc., tiene un efecto pro-inflamatorio. Es activada por virus, bacterias y también por otras citosinas y la acción de otras citosinas como IL-1 y TNF- α . La IL-6 es la principal estimuladora de proteínas de fase aguda. Tiene un papel importante en la termogénesis corporal y es secretada en el tallo cerebral ya que es muy importante para la producción de las etapas finales para la fiebre (Ramírez y col., 2010). Es regulada por factores esteroidales y hormonales (Khan, 2008).

Interleucina 10 (IL-10), es una citosina anti-inflamatoria secretada por los macrófagos (Khan, 2008), causa inhibición de la maduración de células dendríticas que esta a su vez causa una reducción de las citosinas pro-inflamatorias Interferón gamma, interleucina 1, 4 y 5 y factor de necrosis tumoral alfa. También funciona como inhibidor de células Th1 e inhibe células presentadoras de antígenos (Khan, 2008). Un nivel elevado de IL-10 puede provocar problemas al momento de combatir una infección microbiana y también se asocia que niveles bajos de esta interleucina puede llevar a un desarrollo de alguna enfermedad autoinmune e incluso cáncer (Iyer y Cheng., 2012).

Citosinas de la respuesta Th17. Interleucina 17a (IL-17a), es una citosina principalmente inflamatoria que ejerce principalmente su función sobre células mieloides y células mesenquimales al inducir la expresión del factor estimulante de colonias (G-CSF), en las cuales aumentan la granulopoyesis y dirigen neutrófilos hacia el sitio de infección (Flores y Talamás., 2012). Esta citosina regula IL-6 en células de cartilago, en el líquido sinovial y tejido óseo. Se ha visto también que regula la producción de óxido nítrico y aumenta niveles del RNA mensajero del óxido nítrico sintasa. Un incremento de IL-17a puede elevar los niveles de manera desenfrenada de IL-1 y TNF- α en el cartilago, líquido sinovial y el menisco y esto a su vez provocar artritis reumatoide (Moseley y col., 2003).

Citosinas expresadas en el corazón

Las citosinas desempeñan un papel importante en la remodelación cardíaca y fisiológica, principalmente en trastornos patológicos. Estudios demuestran que daños o padecimientos del músculo cardíaco están acompañados por la inducción de quimosinas, citosinas pro-inflamatorias y otras moléculas relacionadas como interleucina (IL)-1 β , factor α de necrosis tumoral (TNF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1) y factor nuclear κ B (NF- κ B) (Serra y col., 2010; Murray y col., 2000; Xia y col., 2009).

En contraste, corazones de animales ejercitados no tienen incremento de citosinas pro-inflamatorias tales como IL-6, TNF- α , TGF- β 1 y NF- κ B, mientras que otros estudios demuestran que citosinas anti-inflamatorias como IL-10 disminuyen. Además, la práctica de ejercicio en un modelo de hiperactividad por β -adrenérgicos atenúa la disfunción cardíaca y fibrosis mediante la inhibición de citosinas pro-inflamatorias (Ghung y Leinwand, 2014). Sin embargo, existen resultados contradictorios que demuestran que IL-6 aumenta en músculo esquelético ejercitado.

Se ha sugerido que el mantenimiento del embarazo esta mediado por un balance entre citosinas pro y anti- inflamatorias (Shurin y col., 1999; Thellin y col., 2000). Durante un embarazo normal, la sobre regulación de la respuesta inmune Th2 se encarga de regular varios efectores del sistema inmune celular, incluyendo la respuesta citotóxica y liberación de citosinas inflamatorias. En contraste, un desbalance en la producción de Th1/Th2 en favor de Th1 puede inducir labor de parto (Shurin y col., 1999). La producción de Th2 citosinas durante estadios tempranos del embarazo lleva a la producción de progesterona que estimula la secreción de citosinas Th2 (IL-10 y IL-6) y disminuye citosinas Th1 y pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-8 y TNF- α) permitiendo un balance positivo durante el embarazo (Diehl y Rincon, 2002; Ugwumadu, 2002).

JUSTIFICACIÓN

El ventrículo izquierdo es la sección del corazón encargado de bombear sangre a todas las partes del cuerpo, y en donde su funcionamiento depende de moléculas que participan en su remodelación estructural. Durante estímulos fisiológicos o patológicos, se ha demostrado que las citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17 participan en el buen funcionamiento del corazón. Sin embargo, la expresión de citosinas de la respuesta Th en corazón de un modelo de rata sana se desconoce. Por lo tanto, este trabajo plantea evaluar las citosinas de la respuesta Th1(TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1 β) Th2(IL-4, IL-6, IL-10) y Th17(IL-17a) mediante PCR en ventrículo izquierdo de ratas sanas. Lo anterior, permitirá evaluar el perfil génico de citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17 en futuros estudios con modelos de ratas sometidas a estrés fisiológico o patológico.

HIPÓTESIS

Las citosinas de la respuesta Th1 (TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1 β), Th2 (IL-4, IL-6, IL10) y Th17 (IL-17a) se expresan en ventrículo izquierdo de rata en condiciones normales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Amplificar las citosinas de la respuesta Th1 (TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1 β), Th2 (IL-4, IL-6, IL10) y Th17 (IL-17a) por medio de PCR en ventrículo izquierdo de rata.

Objetivos Específicos

Para cada una de las citosinas de la respuesta Th1 (TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1 β), Th2 (IL-4, IL-6, IL10) y Th17 (IL-17a):

- Diseñar oligonucleótidos específicos.
- Evaluar la especificidad de los oligonucleótidos por medio de PCR cuantitativo.
- Amplificar el cDNA por medio de PCR punto final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de animales y recolección de muestras

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley de tres meses de edad (260 ± 10 gr) sin ningún reto experimental. Para el manejo de las ratas se siguieron los cuidados descritos por el Comité de Ética de la Universidad de Colima con las bases de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (US Department of health). Las ratas fueron alimentadas y provistas de agua diariamente en cajas de acrílico, manteniendo un ambiente controlado de entre 20 y 25°C con intervalos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Para disectar el corazón, las ratas fueron sedadas con pentobarbital sódico (50 mg por kg de peso) vía peritoneal para posteriormente coleccionar el corazón y separar el ventrículo izquierdo. Las muestras se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para su posterior uso.

Extracción del RNA total de ventrículo izquierdo y síntesis de DNA complementario

Para la extracción del RNA total (RNA_t) se siguió el protocolo de TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se homogenizaron de 30 a 50 mg de ventrículo izquierdo en 500 μ L de TRIzol usando el homogeneizador POLYTRON PT 10-35 GT (Kinematica), se agregaron 100 μ L de cloroformo frío y se centrifugó a 12500 RPM por 15 min a 4°C. Una vez centrifugado se coleccionó la fase acuosa en un nuevo tubo, se agregaron 300 μ L de isopropanol frío y se centrifugó a 12,000g por 20 min a 4 °C para presipitar el RNA_t. El pellet de RNA_t formado se lavó con 500 μ L de etanol al 75% para finalmente resuspender en 50 μ L de agua tratada con dietilpircarbonato al 0.1% (DEPC). La concentración y pureza del RNA total se determinó por absorbancia a 260 y 280nm, y la integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con Sybr Safe (Invitrogen).

Para eliminar contaminaciones por DNA genómico (DNA_g) el RNA_t fue tratado con DNasas utilizando el kit DNase I (Roche). Se tomaron 10 μ g del RNA_t el cual se mezcló con 5 μ L de solución tamponada provista por el kit, 1 μ L (10 U de enzima) de la enzima DNase I y

se incubó a 37°C durante 15 min para finalmente se agregar 2 µL de EDTA (0.2 M) para detener la reacción.

La síntesis de DNA complementario (DNAC) se realizó a partir del RNAt libre de DNAG utilizando el kit QuantiTec Reverse Transcription Kit (Qiagen) y el oligo dT (50 µM), en donde se realizó la siguiente mezcla en un microtubo: 1 µg de RNAt, 2 µL de WipeOut y 2 µL de agua, y se incubó por 5 min a 42 °C. Una vez terminada la incubación se agregaron 4 µL de solución tamponada provista por el kit, 1 µL de la enzima transcriptasa reversa y 1 µL de oligo dT (50 µM) que se incubó a 42 °C por 25 min. Una vez terminada la incubación se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

Diseño de oligonucleótidos específicos

Los oligonucleótidos específicos para cada una de las citosinas se diseñaron en base a secuencias nucleotídicas de sus homólogos de *Rattus norvegicus* depositadas en el banco de genes GenBank. Las citosinas que presentaron isoformas se realizaron alineamientos múltiples en la herramienta bioinformática Clustal Omega (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y los oligonucleótidos fueron diseñados en base a las regiones no conservadas entre cada isoforma. Las características fueron analizadas utilizando el software OligoCalc (biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc). Para todos los oligonucleótidos se tomaron las siguientes consideraciones: 1) longitud de 20-23 nucleótidos; 2) amplifican fragmentos de PCR de 100-250 pares de bases; 3) temperatura de alineación (Tm) de ~60°C; 3) porcentajes de G-C de 55-60%; 4) no formen estructuras secundarias o dímeros de oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Integrate DNA Technology (IDT).

Especificidad de los oligonucleótidos utilizados por PCR cuantitativo

La especificidad de los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada una de las citosinas fue evaluada por medio de PCR cuantitativo (qPCR) utilizando los amplicones purificados de cada una de las citosinas. Se realizaron reacciones de PCR cuantitativo mezclando lo siguiente: 7.5 µL de SYBR Green (Bio-Rad), 2 µL del amplicon purificado, 5 µL de agua miliQ estéril y 0.25 µL (20 uM) de cada oligonucleótido (sentido y antisentido).

La mezcla de reacción fue colocada en el equipo Step-One Real-Time system (Applied Biosystems) y se utilizó las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C por 10 min; 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto (40 ciclos) con una única medición de fluorescencia. Para la curva de disociación el programa a utilizar fue: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 min y 95°C por 15 segundos, subiendo 0.3 °C cada 20 segundos. La especificidad de los oligonucleótidos se determinó mediante la temperatura de disociación obtenida para cada uno de los amplicones producidos durante la reacción de PCR, siguiendo la guía establecida por Bustin y col, en 2009 para la publicación de datos de qPCR (MIQE de sus siglas en inglés)

Expresión de las citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17 por PCR punto final

Las citosinas fueron amplificadas por medio PCR punto final utilizando los oligonucleótidos incluidos en la tabla 2, la mezcla de la reacción de PCR fue la siguiente: 3 µL de cDNA (equivalente a 150 ng de RNAt), 10 µL de Platinum Supermix (Invitrogen), 4.5 µL de agua mili Q estéril y 2.5 µL (20 µM) de los oligonucleótidos sentido y antisentido. La mezcla de reacción de PCR fue colocada en un termociclador de punto final (Applied Biosystems) utilizando las siguientes condiciones del programa: 94°C por 3 minutos; seguido de 40 ciclos con 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos y finalmente 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñidos con SybrSafe y posteriormente fueron purificados utilizando el kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science) para su posterior uso en el PCR cuantitativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Integridad y pureza del RNA total

La amplificación de las citosinas se inició con la extracción de RNAt de ventrículo izquierdo siguiendo las instrucciones del protocolo mencionado previamente. Los resultados de la extracción se muestran en la Tabla 3 y Figura 5, donde se pueden observar los diferentes RNA ribosomales 28S, 18S y RNAs de transferencia. Tanto las muestras de ventrículo derecho e izquierdo presentan bandas fuertes y definidas, indicando que el RNAt está íntegro y listo para la síntesis de cDNA. Además, la relación 260/280 de las muestras de RNA total para ambos ventrículos fue en promedio de 2 ± 0.05 , lo cual indica la pureza del RNA extraído. Este RNA se limpió de gDNA contaminante y se utilizó como templado para la síntesis de cDNA para posteriormente evaluar la expresión de las citosinas Th1, Th2 y Th17.

Tabla 2. Cuantificación del RNAt de las muestras Control (C) de ventrículo izquierdo.

Muestra de RNA	Concentración (ng/ μ L)	260/280
1	1341.5	2.06
2	365.3	2.04
3	779.3	2
4	339.53	1.95
5	338.9	2
6	164	2

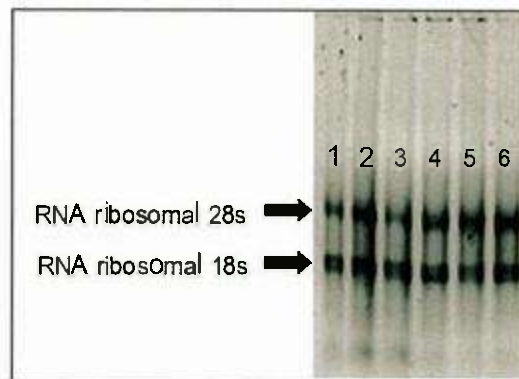


Figura 2. Análisis de la integridad de las muestras de RNAt de ventrículo izquierdo en un gel de agarosa al 1% teñido con Syber Safe.

Diseño de oligonucleótidos para cada una de las citocinas

Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas para diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de las citosinas utilizando la herramienta bioinformática Clustal Omega (Figura 2, 3 y 4). Los oligonucleótidos fueron diseñados en base a las regiones no conservadas presente en los alimenamientos, mientras que las características de cada uno de ellos fue revisada utilizando el software OligoCalc (Tabla 3). Con lo anterior, se demuestra que los oligonucleótidos a utilizar cumplen con las características optimas para amplificar de manera especifica cada una de las citocinas.

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos utilizados de las citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicon (pb)	Número de acceso al GeneBank
Th1			
IFN-γ			
IFNgFw1	CTTGGTTTTGCAGCTCTGC	155 pb	NM_138880.2
IFNgRv1	GATATCTGGAGGAACTGGC		
TNF-α			
TNFaFw1	GGAAGTGGCAGAGGAGGCG	216 pb	NM_012675.3
TNFaRv1	GGAGAAGTTCCCAAATGGGC		
TNF-β			
TNFbFw1	GTCTCCACCTCCTGAGGG	196 pb	NM_080769.2
TNFbRv1	CCTTGTTGGGTACCCAGC		
IL-1β			
IL1bFw1	GCTAGTGTGTGATGTTCCCA	214 pb	NM_031512.2
IL1bRv1	GCCTCAAGGGGAAGAATCTA		
Th2			
IL-4			
IL4Fw1	CGGTATCCACGGATGTAACG	208 pb	NM_201270.1
IL4Rv1	TGTACCTCCGTGCTTGAAG		
IL-6			
IL6Fw1	CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT	193 pb	NM_012589.2
IL6Rv1	GAGAAAAGAGTTGTGCAATGGC		
IL-10			
IL10Fw2	GCTGCCTTCAGTCAAGTGAA	244 pb	NM_012854.2
IL10Rv2	GCCAAGCCTTGTCAGAAATG		
Th17			
IL-17a			
IL17aFw2	TTCAGTGTGTCCAAACGCCG	194 pb	NM_001106897.1
IL17aRv2	AAAGTCCTCAACTCCCTTAGC		

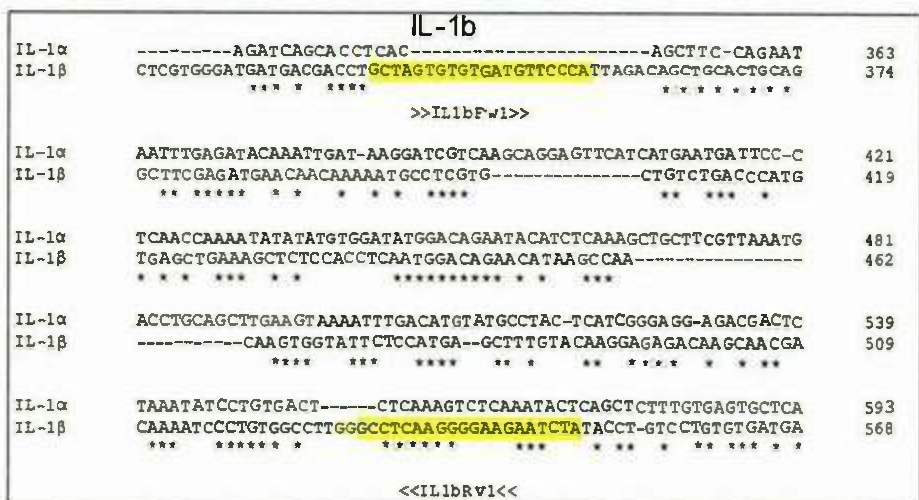
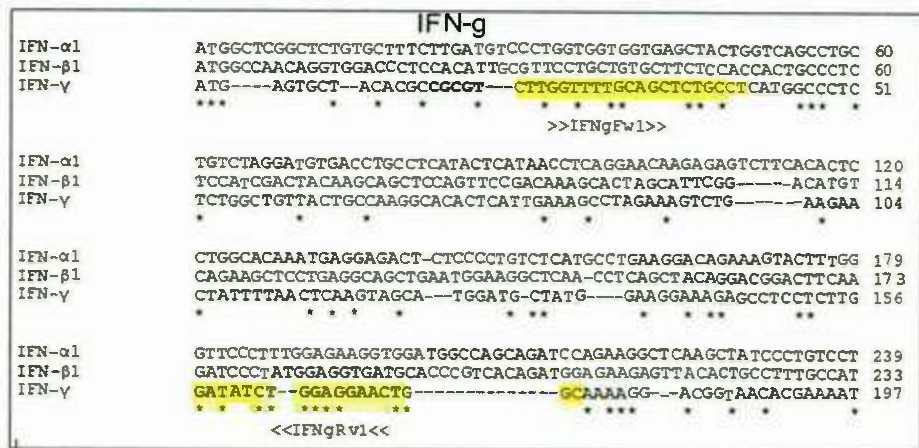
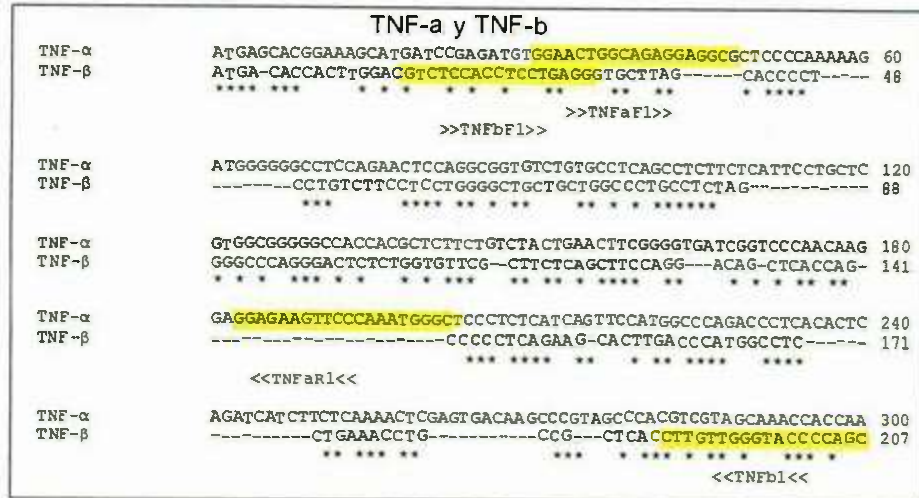


Figura 3. Alineamientos múltiples de secuencias nucleóticas de las citosinas Th1. En amarillo se indica la secuencia de nucleótidos usada para el diseño de oligonucleótidos específicos y los asteriscos indican las regiones conservadas entre secuencias.

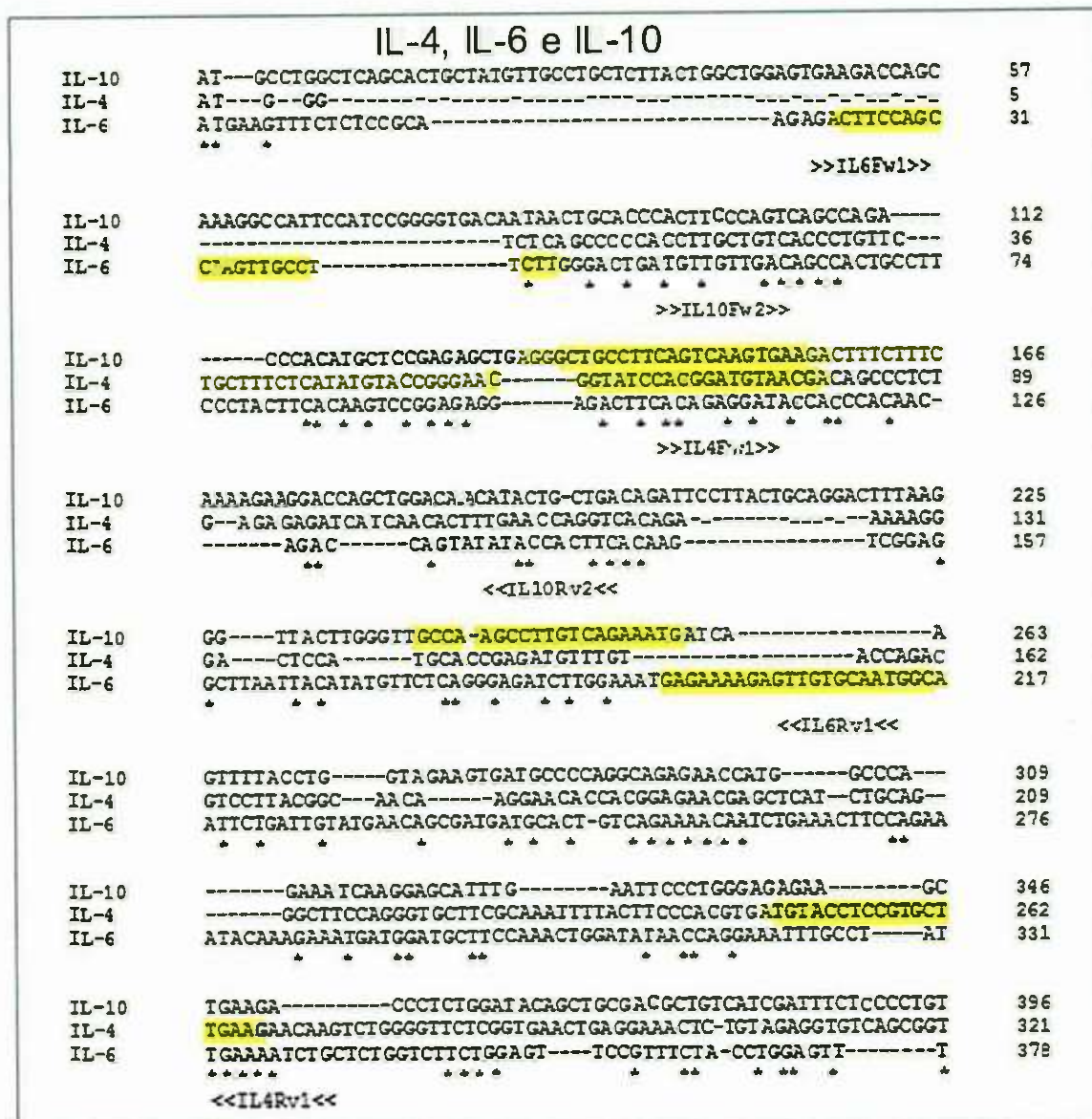


Figura 4. Alineamientos múltiples de secuencias nucleóticas de las citosinas Th2. En amarillo se indica la secuencia de nucleótidos usada para el diseño de oligonucleótidos específicos y los asteriscos indican las regiones conservadas entre secuencias.

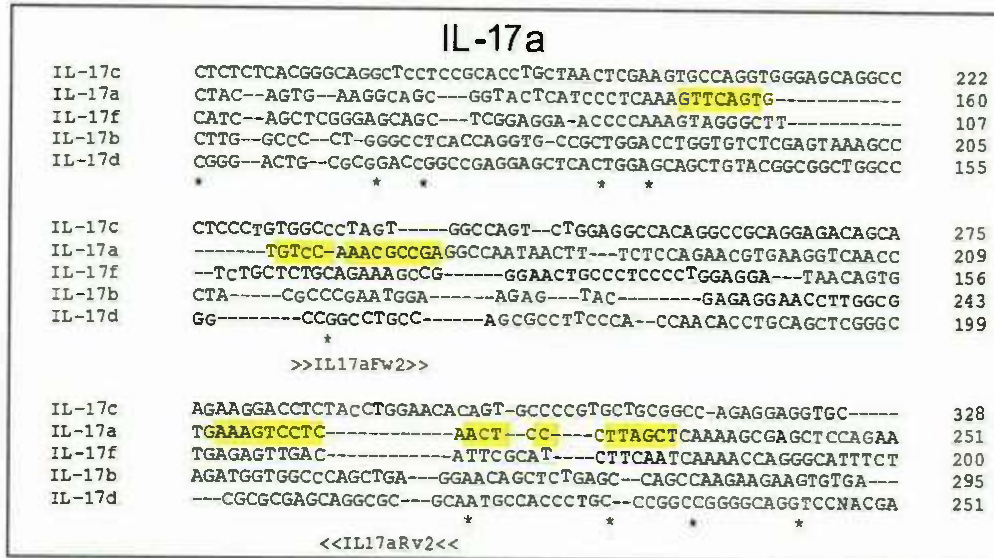


Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencia nucleotídica de la citosina Th17. En amarillo se indica la secuencia de nucleótidos usada para el diseño de oligonucleótidos específicos y los asteriscos indican las regiones conservadas entre secuencias.

Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos para cada una de las citosinas

La especificidad de los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada una de las citosinas se realizó por qPCR utilizando los productos de PCR purificados para cada una de ellas. Los productos obtenidos para las citosinas Th1 (TNF α , TNF β , IFN γ y IL1 β), Th2 (IL6) y Th17 (IL17a) presentan una sola temperatura de desnaturalización de 86.18 °C de los productos amplificados (Tabla 4 y Figura 6). Para las citosinas TNF α , IL6 y IL17a se observa un solo pico de amplificación, mientras que para TNF β , IFN γ y IL1 β se observa un pequeño pico adicional con una temperatura de ~75 °C (Figura 7). Los picos adicionales con temperaturas ~75 °C se atribuye a la formación de dímeros de oligonucleótidos, lo cual no afecta los resultados obtenidos debido a que las muestras presentan un solo pico y una temperatura de disociación en promedio de 86.18 °C para los productos esperado de ~200 pb. A pesar de que las curvas de disociación muestran un pequeño pico adicional, los resultados muestran la especificidad de los oligonucleótidos utilizados además su precisión y reproducibilidad experimental.

Tabla 4. Temperaturas de disociación de las citosinas de la respuesta Th1, Th2 y Th17

Citosina	Temperatura de disociación (Tm)	No. de picos
Th1		
TNF- α	88.12°C	1
TNF- β	88.44°C	1
IFN- γ	83.64°C	1
Th2		
IL-6	83.79°C	1
Th17		
IL-17a	88.27°C	1

A)

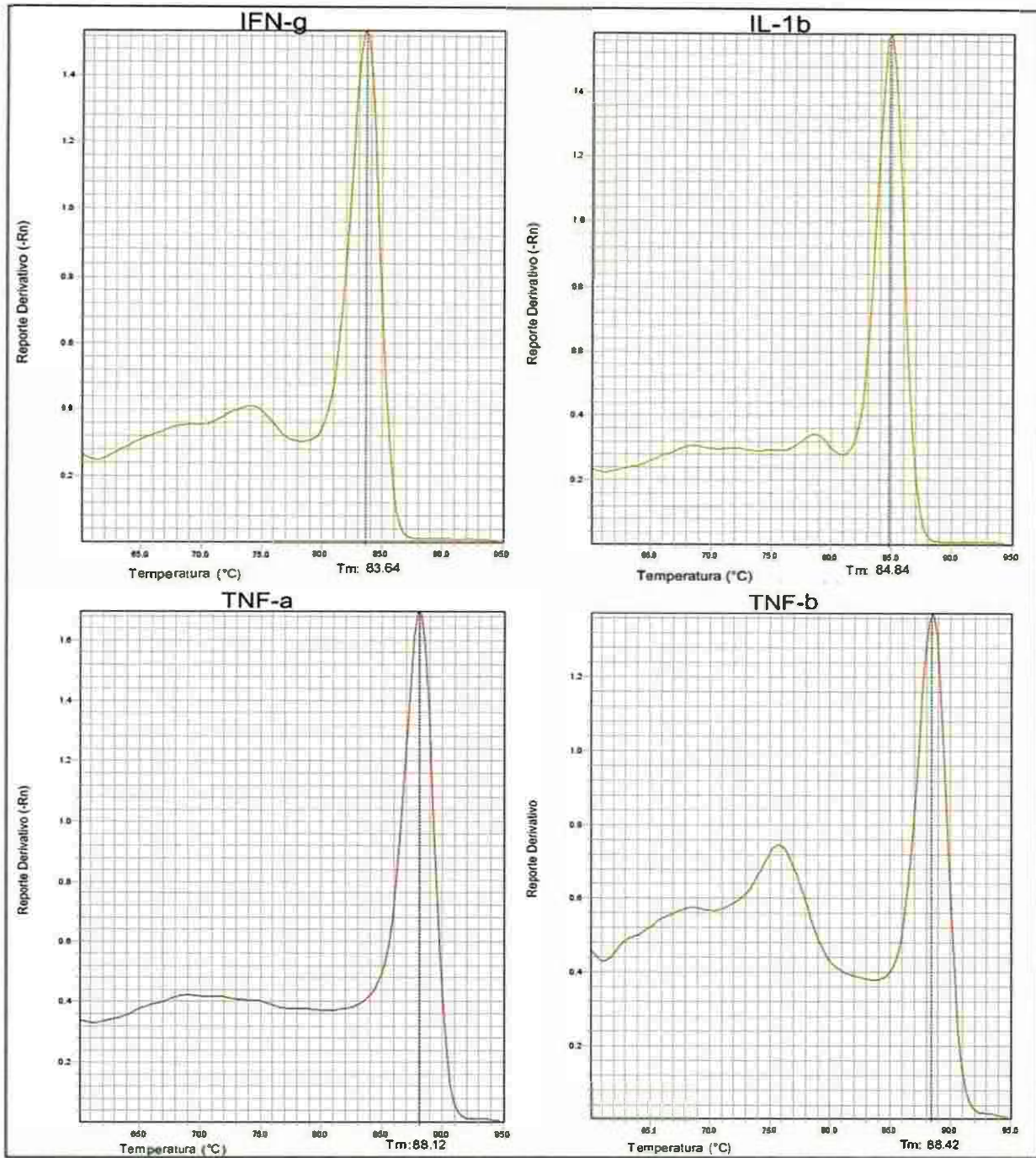


Figura 6a. Diagramas de temperaturas de disociación de las citosinas Th1 (A), en donde cada gráfico muestra la amplificación específica de un solo fragmento de DNA.

B)

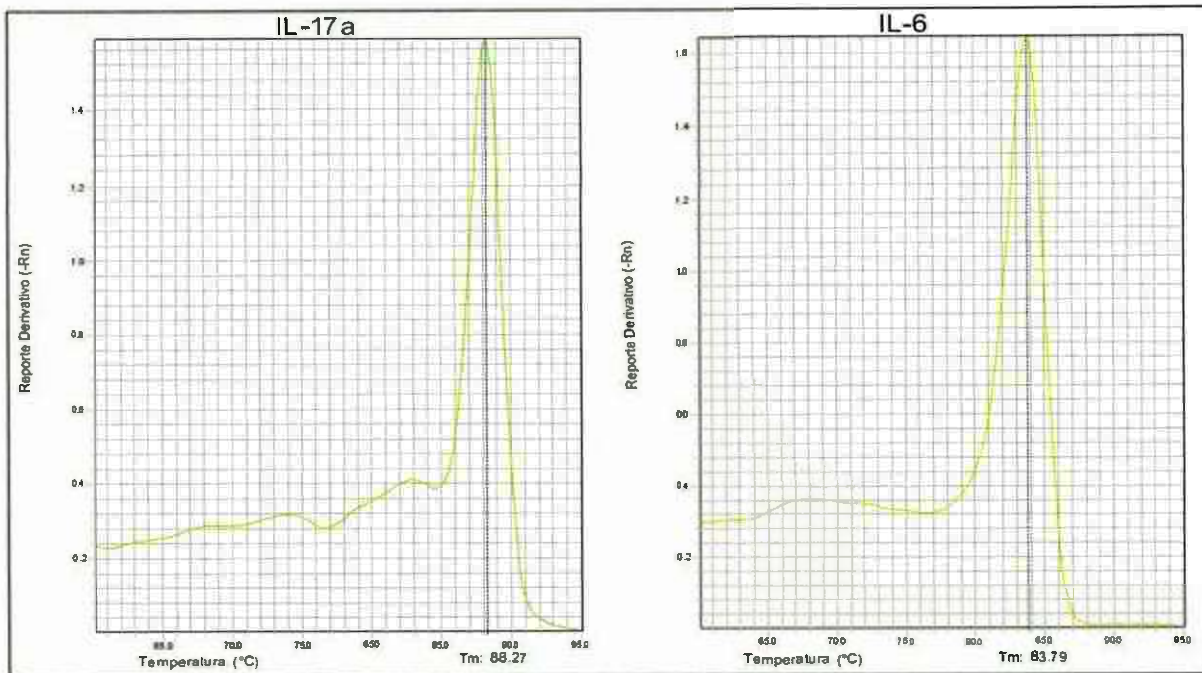


Figura 6b. Diagramas de temperaturas de disociación de las citosinas Th2 (B) y Th17 (B), en donde cada gráfico muestra la amplificación específica de un solo fragmento de DNA.

Expresión de las citosinas en ventrículo izquierdo

La expresión de cada una de las citosinas fue evaluada por PCR punto final utilizando uno de los cDNA's previamente sintetizados y los oligonucleótidos correspondientes para cada una de ellas. En la Figura 7 se muestran los productos de PCR purificados para cada una de las citosinas, y los cuales tienen un tamaño de ~200 pb. Las citosinas Th1 (TNF α , TNF β , IFN γ y IL1 β) y Th17 (IL17a) fueron amplificadas en ventrículo izquierdo, mientras que las citosinas Th2 solo amplificó la IL6.

Se ha demostrado en estudios con modelos de rata (Kasama y col., 1995; Chaudhry y col., 2011) que las citosinas no amplificadas, como IL-10, hay una expresión de IL-10 durante etapas tempranas de una respuesta inflamatoria en tejido del intestino grueso e hígado, mientras que en estadios normales no hay una expresión de esta interleucina (Moore y col., 2001). Estudios demostraron que, en ratas con daño en el miocardio IL-10 juega un papel muy importante ya que regula la infiltración de neutrófilos y el incremento de TNF- α en

plasma (Yang y col., 2000). Krishnamurthy y su grupo de estudio demostraron que la expresión de IL-10 atenúa la producción de citosinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α post infarto al miocardio en el ventrículo izquierdo de rata. También se ha demostrado que en corazón de ratón un incremento de IL-4 puede inducir a la sobre expresión de mastocitos y a su vez causar fibrosis cardiaca (Peng y col., 2015). Por otro lado, estudios en mujeres embarazadas se ha comprobado IL-4 presenta un leve aumento en suero durante etapas tempranas de un embarazo normal y disminuye a medida que el embarazo avanza (Omu y col., 1999; Vélchez y col., 2000), demostrando así que una expresión de IL-10 e IL-4 en corazones normales de rata puede significar un daño importante en el músculo cardiaco.

Estudios en modelos de rata con infarto al miocardio, hipertrofia del ventrículo izquierdo e isquemia, han mostrado que los genes expresados para las citosinas Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) tuvieron un ligero aumento en la expresión en comparación a las ratas control (Ono y col., 1998). Mientras que en un modelo de humanos con enfermedades cardiacas crónicas se encontró un desequilibrio de TNF- α , que puede desencadenar una producción excesiva de TNF- β (Asselbergs y col., 2007). Por otro lado, estudios realizados por Sato y col., (1999), corroboran que la expresión de IL-6 en plasma sanguíneo de humanos aumenta considerablemente durante daños al corazón producido en el ventrículo izquierdo, mientras que, en pacientes que no han sufrido ningún daño, esta citosina permanece en condiciones moderadas sin producir Proteína C reactiva. Se ha demostrado también, que en musculo cardiaco infartado de rata IL-17a aumenta su expresión regulando el incremento de IL-6 durante este padecimiento, mientras que en músculo cardiaco no infartado IL-17a, se muestra en niveles normales (Ávalos y col., 2012).

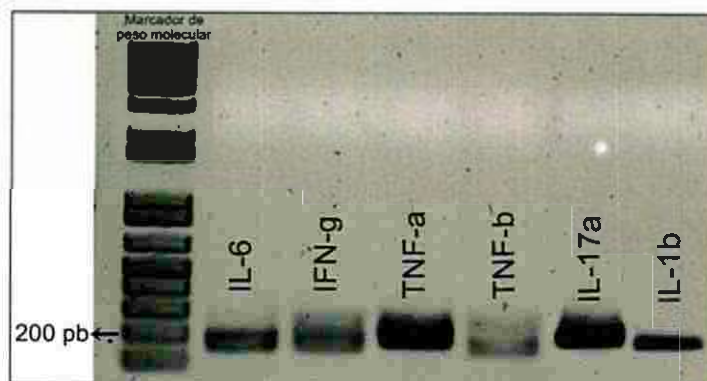


Figura 7. Productos de PCR obtenidos para cada una de las citosinas. Gel de agarosa al 1.5% teñido con SybrSafe.

CONCLUSIÓN

Las citosinas de la respuesta Th1 (TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1 β), Th2 (IL-6) y Th17 (IL-17a) se expresan en ventrículo izquierdo de rata sugiriendo que el corazón necesita de estas para su función normal. Con lo anterior, se puede evaluar el perfil de dichas citosinas en ventrículo izquierdo en un modelo experimental de rata como lo es la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por el embarazo, y su proceso reversible el posparto.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2015). Cellular and Molecular of Immunology, 7. 7 vols, Elsevier/Saunders.
- Albelo, A. L. N., Tallet, L. A. V., Lastre, J. E. P. & Villafranca, R. C. (2013). Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. *Revista Cubana de Medicina* 52, 118-127.
- Alemayehu, S., Feghali, K. C., Cowden, J., Komisar, J., Ockenhouse, C. F. & Kamau, E. (2013). Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malaria Journal* 12, 1-8.
- Asselbergs, F. W., Pai, J. K., Rexrode, K. M., Hunter, D. J. & Rimm, E. B. (2007). Effects of Lymphotoxin- α Gene and Galectin-2 Gene Polymorphisms on Inflammatory Biomarkers, Cellular Adhesion Molecules and Risk of Coronary Heart Disease. *Biochemical Society* 112, 291-298.
- Ávalos, A. M., Apablaza, F. A., Quiroz, M., Toledo, V., Peña, J. P., Michea, L., Irrázabal, C. E., Carrión, F. A. & Figueroa, F. E. (2012). IL-17A Levels Increase in the Infarcted Region of the Left Ventricle in a Rat Model of myocardial infarction. *Biological Research* 45, 193-200.
- Barbara, J. A., Ostade, X. V. & Lopez, A. F. (1996). Tumour Necrosis Factor-Alpha (TNF- α): The Good, the Bad and Potentially Very Effective. *Immunology and Cell Biology* 74, 434-444.
- Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ: British Medical Journal*, 321(7258), 424.
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J.-M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Brünig, J. C., Müller, W. & Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 34, 566-578.
- Chung, E. & Leinwand, L. A. (2014). Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular Research* 101.

- Damsker, J. M., Hansen, A.M., & Caspi, R. R. (2010). Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183, 211–221.
- Didion, S. P., Kinzenbaw, D. A., Schrader, L. I., Chu, Y. & Faraci, F. M. (2009). Endogenous Interleukin-10 Inhibits Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction. *Hypertension* 54, 619-624
- Dinarello, C. A. (2007). Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol.* 37, 1-19.
- Filella, X., Molina, R. & Ballesta, A. (2002). Estructura y Función de las Citocinas. *Medicina Integral* 39 (2), 63-71.
- Flores-García, Y. & Talamás-Rohana, P. (2012). Interleucina 17, Funciones Biológicas y su Receptor. *REB* 31, 6.
- Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L. P. (1975). Wall Stress and Patterns of Hypertrophy in the Human Left Ventricle. *Journal of Clinical Investigation* 56, 56-64.
- Gullestad, L., Ueland, T., Vinge, L. E., Finsen, A., Yndestad, A. & Aukrust, P. (2012). Inflammatory Cytokines in Heart Failure: Mediators and Markers. *Cardiology* 122, 23-30.
- Hernández, A. S. (2009). Células Colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y Regulatoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología clínica* 5, 1-5.
- Iyer, S. S. & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol.* 32, 40.
- Johnson, G. L., Bibby, D. F., Wong, S., Agrawal, S. G. & Bustin, S. A. (2012). A MIQE-Compliant Real-Time PCR Assay for *Aspergillus* Detection. *PLoS ONE* 7, e40022.
- Kanellakis, P., Ditiatkovski, M., Kostolias, G. & Bobik, A. (2012). A Pro-Fibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Pressure Overload. *European Society of Cardiology*, 77-85.
- Kasama, T., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Burdick, M. D. & Kunkel, S. L. (1995). Interleukin-10 Expression and Chemokine Regulation During the Evolution of Murine Type 11 Collagen-induced Arthritis. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.* 95, 2868-2876.
- Khan, M. M. (2008). Cytokines. In *Immunopharmacology* (Media, S. S. B., ed.), pp. 33-59. Business Media.

- Kleiner, G., Marcuzzi, A., Zanin, V., Monasta, L. & Zauli, G. (2013). Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. *Mediators of Inflammation* 2013, 1-6.
- Krishnamurthy, P., Rajasingh, J., Lambers, E., Qin, G., Losordo, D. W. & Kishore, R. (2009). IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT-3 and suppression of HuR. *Circulation* 104 (2), 9-18.
- Lahera Juliá V., Garrido Astray C. 2009. Sistema cardiovascular. Anatomía y Fisiología del Cuerpo Humano. 1ª ed. México (Mex). McGraw-Hill. 112 p.
- Lona, J. M. F., Martínez, M.S., Alarcón, G. V., Rodas, A. B. & Bello, J. R. (2013). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México* 149, 521-531.
- Mata-Espinosa, D. A. & Hernández-Pando, R. (2008). Interferón gamma: Aspectos Básicos, Importancia Clínica y Usos Terapéuticos. *Revista de Investigación Clínica* 60, 10.
- Mehra, V. C., Ramgolam, V. S. & Bender, J. R. (2005). Cytokines and cardiovascular disease *Journal of Leukocyte Biology* 78, 805-818.
- Moore K.L, Daley A.F & Agur A.M.R. (2010) Anatomía con Orientación Clínica. 6ta ed. Baltimore (Phil): Lippincott Williams and Wilkins. 143 p.
- Moore, K. W., Maefyt, R. d. W., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765.
- Moseley, T. A., Haudenschild, D. R., Rose, L. & Reddi, A. H. (2003). Interleukin-17 Family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14, 155-174.
- Nian, M., Lee, P., Khaper, N. & Liu, P. (2004). Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation Research* 94, 1543-1553.
- Omu, A. E., Al-Qattan, F., Diejomaoh, M. E. & Al-Yatama, M. (1999). Differential Levels of T Helper Cytokines in Preeclampsia: pregnancy, labor and puerperium. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 78, 675-680.
- Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furukawa, Y. & Sasayama, S. (1998). Cytokine Gene Expression After Myocardial Infarction in Rat Hearts, Possible Implication in Left Ventricular Remodeling. *American Heart Association* 98, 149-156.

- Paulus, W. J. (1999). How are Cytokines Activated in Heart Failure? *European Journal of Heart Failure* 1, 3.
- Pelliccia, A., Maron, B. J., Spataro, A., Proschan, M. A. & Spirito, P. (1991). The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *The New England Journal of Medicine* 324, 295-301.
- Ramirez, F. J. R. (2009). Fisiología cardíaca. *Revista Médica MD* 1, 1-4.
- Ramírez, P., Vásquez, G. M. & Naranjo L. A. (2010). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? *Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. Iatreia* 24, 9.
- Romagnani, S. (2000). T-cell Subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy, Asthma and Immunology* 85, 9-18.
- S. Taylor, M. Wakem, G. Dijkman, M. Alsarraj & Nguyen, M. (2010). A Practical Approach to RT-qPCR—Publishing Data that Conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50, 1-5.
- Salman A. N. & Salih, H. H. (2015). Interleukin-6 and Interleukin-17 Levels of Asthmatic Patients in THI-QAR PROVINCE. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2 (7), 1-4.
- Sato, Y., Takatsu, Y., Kataoka, K., Yamada, T., Taniguchi, R., Sasayama, S. & Matsumori, A. (1999). Serial Circulating Concentrations of C-Reactive Protein, Interleukin (IL)-4, and IL-6 in Patients with Acute Left Heart Decompensation *Clinical Cardiology* 22, 811-813.
- Scott P. Levick & Goldspink, P. H. (2014). Could Interferon-Gamma be a Therapeutic Target for Treating Heart Failure? *Heart Fail Rev.* 19, 227-236.
- Sriskandan, S., Moyes, D., Lemm, G. & Cohen, J. (1996). Lymphotoxin- α (TNF- β) During Sepsis. *Cytokine.* 8, 933-937.
- Tan, Q., Hu, J., Yu, X., Guan, W., Lu, H., Yu, Y., Yu, Y., Zang, G. & Tang, a. Z. (2016). The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration. *BioMed Research International* 2016, 1-6.
- Tortora G. J, Derrickson B. (2011) *Principios de Anatomía y Fisiología.* 13a ed. México D.F. (Mex). Editorial Médica Panamericana. 765 p.

- Vilchez, R. M., Adrián, T. R., Ruiz, A., Heredia, W., Atencio, R. & Taborda, J. L. (2000). Interleucina 4 en el Suero de Embarazadas Normales y Preeclámpticas. *Sociedad Obstetricia y Ginecología de Venezuela* 60, 77-80.
- Yang, Z., Zingarelli, B. & Szabó, C. (2000). Crucial Role of Endogenous Interleukin-10 Production in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 101, 1019-1026.
- Zamorano, J., Rivas, M. D. & Pérez-G, a. M. (2003). Interleukin-4: A Multifunctional Cytokine. *Inmunología* 22, 7.