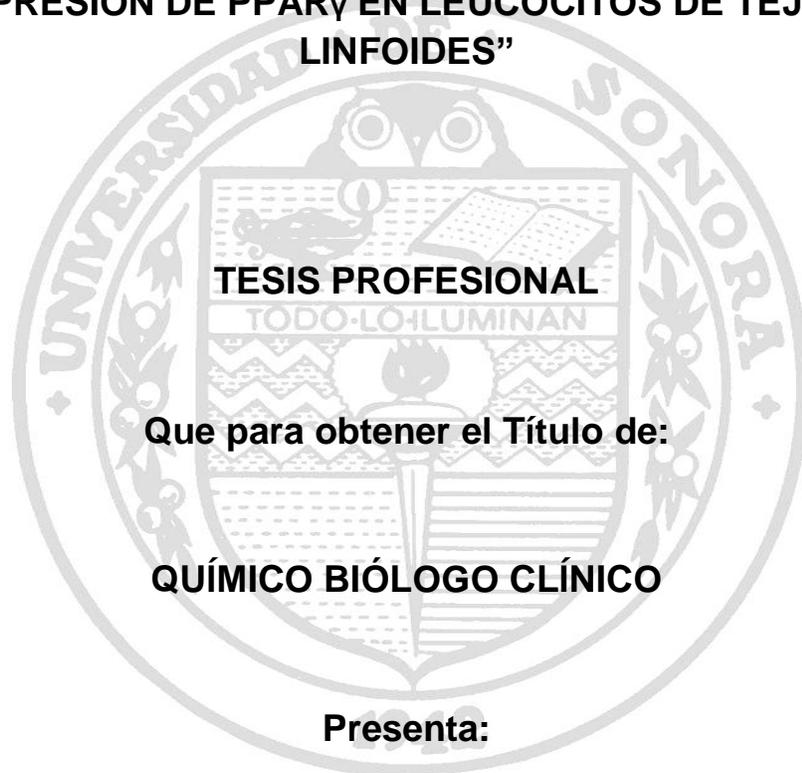


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“EXPRESIÓN DE PPAR γ EN LEUCOCITOS DE TEJIDOS
LINFOIDES”



Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

JOSÉ AGUSTÍN COTA CORONADO

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2013

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

ÍNDICE

FORMA DE APROBACIÓN	I
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	III
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
OBJETIVOS.....	IX
OBJETIVO GENERAL.....	IX
OBJETIVOS PARTICULARES	IX
RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	2
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE PPAR	2
EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PPAR.....	3
ANATOMÍA DEL SISTEMA LINFOIDE EN MAMÍFEROS.....	4
FUNCIÓN DE PPAR GAMMA EN LEUCOCITOS	10
EXPRESIÓN DE PPAR EN CERDO	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
ANIMALES Y OBTENCIÓN DE TEJIDOS.....	15
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE COLON	15
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE PULMÓN.....	16
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE TONSILA, BAZO Y GANGLIOS.....	16
EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	16
RT-PCR.....	17

ELECTROFORESIS.....	17
RT-QPCR	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
ESTANDARIACIÓN DE LA TÉCNICA	20
RT-QPCR	24
SELECCIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO	25
CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PPAR	27
Análisis de la expresión de PPARy por cuantificación relativa	27
EXPRESIÓN DE PPARy EN TEJIDOS LINFOIDES	31
CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE TEJIDOS SIMILARES.....	33
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla	Páginas
Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de PPAR γ	20
Tabla 2. Muestras de los tejidos linfoides disponibles	21

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Localización de los órganos linfoides de humano.....	5
Figura 2. Localización de los órganos linfoides de cerdo.....	6
Figura 3. Organización de ganglio linfático	8
Figura 4. Organización del bazo.....	9
Figura 5. Efectos biológicos de PPAR γ sobre células del sistema inmune.....	11
Figura 6. PCR <i>in silico</i> con iniciadores del gen de PPAR γ 1.....	22
Figura 7. PCR <i>in silico</i> con iniciadores del gen PPAR γ 2.....	23
Figura 8. Electroforesis de los productos de PCR para PPAR γ	25
Figura 9. Selección del gen constitutivo.....	26
Figura 10. Sistema de detección de productos de qPCR con SYBR Green.....	28
Figura 11. Cinética de amplificación de PPAR γ y UBC.....	29
Figura 12. Curva de disociación para PPAR γ	30
Figura 13. Expresión relativa de PPAR γ en tejidos linfoides.....	32
Figura 14. Expresión de PPAR γ en células de lavado broquioalveolar y de macerado de pulmón	33
Figura 15. Expresión de PPAR γ en colon, bazo y tonsila.....	34
Figura 16. Expresión de PPAR γ en ganglios linfáticos.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

- CBP/p300:** Coactivador de unión a proteína p300
- CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica
- Ct:** Ciclo umbral
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- TNF α :** Factor de necrosis tumoral alfa
- IFN γ :** Interferón gamma
- LBA:** Células de lavado bronquioalveolar de pulmón
- NA:** Células no adherentes de macerado de pulmón
- NCoR:** Correpresor de receptores nucleares
- NFAT:** Factor nuclear de células T activadas
- PPAR:** Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas
- PPIA:** Peptidilprolil Isomerasa A
- RIP140:** Proteína de interacción del receptor nuclear 140
- RPL32:** Proteína L32 60S ribosomal
- RT-qPCR:** Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- SRC:** Receptor de esteroides coactivador
- TRAP 220:** Complejo proteínico del receptor asociado a tiroides 220
- UBC:** Ubiquitina C

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) en leucocitos procedentes de colon, pulmón, tonsila, bazo y ganglios linfáticos porcinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener leucocitos a partir de colon, pulmón, tonsila, bazo y ganglios linfáticos porcinos.
- 2) Cuantificar la expresión genética del PPAR γ mediante RT-qPCR.

RESUMEN

El receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ), es un factor de transcripción que participa en la regulación de procesos importantes para el funcionamiento celular, que interviene en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y el sistema inmune. En el presente trabajo se evaluó la expresión de transcritos de ARNm de PPAR γ en leucocitos procedentes de colon, pulmón, tonsila, bazo y ganglios linfáticos porcinos. Para esto se utilizaron muestras de tejidos linfoides provenientes de 4 cerdos para la obtención de poblaciones de leucocitos. A partir de estas células se aisló ARN total y se cuantificó la expresión relativa de PPAR γ utilizando como referencia el gen constitutivo Ubiquitina C (UBC) mediante la retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). En los resultados obtenidos se encontró una expresión diferencial de PPAR γ en los diferentes tejidos, observándose en mayor grado en células de lavado bronquioalveolar de pulmón (constituido principalmente de macrófagos). Los tejidos con una fuerte expresión fueron bazo > células no adherentes de macerado de pulmón (NA) > ganglio mesentérico > ganglio inguinal > tonsila > ganglio submaxilar; con una expresión media fueron colon ascendente > ganglio mediastínico > colon transverso > ganglio retrofaríngeo. En conclusión se observó que la expresión de PPAR γ es diferencial en los leucocitos de tejidos linfoides porcinos, esto probablemente es explicado por la localización de los tejidos linfoides, por la población celular que reside *in situ* de mayor abundancia, y el estado de activación de la respuesta inmune en ese tejido.

INTRODUCCIÓN

El receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR), es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de receptores hormonales nucleares, el cual se expresa a través del organismo en diversas poblaciones celulares. Se ha observado la expresión de sus tres isoformas (α , β y γ) en células como adipocitos, hepatocitos, cardiomiocitos, esplenocitos, eritrocitos, entre otras (Lemberger y cols, 1996), cumpliendo principalmente funciones de señalización celular y metabolismo (Su y cols, 2007). Sin embargo en los últimos años se ha estudiado con mayor interés la expresión de PPAR en células del sistema inmune, debido a su participación en la regulación de respuestas inflamatorias; disminuyendo la producción de citocinas proinflamatorias; aumentando la respuesta humoral y celular; propiciando una captura más efectiva de antígenos; y disminuyendo los niveles de mediadores de la inflamación en las diversas células del sistema inmune que participan en el proceso inflamatorio (Széles y cols, 2007).

Las funciones que cumplen estas células dependen de la localización y del tipo de antígeno con el que tienen contacto, por lo que su distribución en los tejidos es diversa. Se ha realizado la cuantificación de la expresión de PPAR en diferentes órganos y sistemas que no pertenecen al sistema linfóide (Lemberger, 1996; Su y cols, 2007) y se ha observado que su expresión se ha relacionado a actividades de regulación de la lipogénesis y absorción de ácidos grasos en modelos murinos (Tontonoz y Spiegelman, 2008) y en humanos una reducción de la resistencia a la insulina por mecanismos ligando-dependientes. Sin embargo es escasa la información disponible sobre los niveles de expresión basal de PPAR γ en diferentes tejidos linfoides que constituyen el sistema organizado de defensa contra patógenos y que se localizan en partes estratégicas del organismo para realizar una respuesta efectiva.

El sistema linfóide de mamíferos tiene similitudes anatómicas y funcionales entre especies (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006), por lo que el cerdo puede ser empleado como un buen modelo experimental de investigación biomédica y básica, además de ser una especie de importancia económica. Por lo anterior, el análisis de la expresión de PPAR en cerdo aportará conocimiento básico sobre la distribución de este receptor nuclear.

ANTECEDENTES

Características bioquímicas y moleculares de PPAR

El PPAR o receptor activado por proliferadores de peroxisomas, es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares. Su nombre deriva de la observación de que ciertos compuestos químicos que inducían el aumento en el número y tamaño de peroxisomas en roedores, podían activarlo. Se conocen tres subtipos α , γ (isoformas γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4) y β/δ , los cuales comparten una estructura molecular muy parecida. Para realizar sus funciones el PPAR se heterodimeriza obligadamente con los receptores X de retinoides (RXR), y posteriormente se une a secuencias específicas de ADN de los genes diana. La proteína correspondiente al PPAR se compone de cuatro dominios. En la región N-terminal se encuentra el dominio-A/B que contiene la función activadora independiente de ligando 1 (AF-1), el dominio-C, que es el dominio de unión a ADN (DBD), el dominio D que es la región de la bisagra y el dominio E denominado como dominio de unión a ligando o LBD. En los tres subtipos de PPAR los dominios A/B y D son poco conservados, mientras que el C y el E comparten un alto grado de homología en su secuencia y estructura (Bugge, 2010).

La estructura altamente conservada del dominio DBD le permite a los isotipos unirse a una pequeña secuencia de ADN localizada en la región promotora del gen, denominada elemento de respuesta a PPAR (PPRE), la cual se compone de dos hexámeros (5'AGGTCA3') que se encuentran separados por un nucleótido. La unión de ligandos específicos promueve la transcripción de diversos genes que están involucrados en procesos como el metabolismo de lípidos, los mecanismos de respuesta inmune y la inhibición en la proliferación de ciertos tipos de células cancerosas. La expresión y activación de este factor de transcripción ha sido ampliamente estudiada, pues es conocido que tiene un papel central en diversos procesos metabólicos y la regulación de la insulina.

Recientemente se ha observado que el PPAR γ realiza funciones importantes en los diferentes componentes del sistema inmune, mediando la señalización entre células y en la producción de citocinas, que intervienen en la respuesta inmune del hospedero contra diversos patógenos. La expresión de PPAR es inducida por ligandos lipídicos como el 15-desoxi- Δ prostaglandina-J2 (15-d-PGJ2), producidos en la célula, y que a su vez pueden funcionar como activadores/ligandos de la proteína (Diab y cols, 2002). Existen genes que intervienen en las

respuestas inflamatorias que son regulados por PPAR γ . Por ejemplo, la interacción proteína-proteína de PPAR γ con los factores de transcripción NF- κ B y NFAT, bloquea sus funciones, inhibiendo la actividad de NF- κ B y NFAT de unirse al promotor de TNF α e IL-2, respectivamente, regulando negativamente la transcripción. Se hipotetiza que la habilidad de PPAR γ para controlar la producción de interferón- γ (IFN γ) puede deberse a su actividad de inhibición del mitógeno-activador de proteína cinasa p38 (producido en respuestas ante estrés como LPS) y así suprimir la transcripción de genes como T-bet, el cual es un potente transactivador del gen que codifica IFN γ (Marx y cols, 2000). Por lo que el PPAR γ tiene efectos de supresión en el desarrollo de la respuesta inmune.

En otro estudio Remels y colaboradores (2009), encontraron que la activación de PPAR γ por el ligando GW-1929 (con actividad semejante a la rosiglitazona), inhibe fuertemente la producción de citocinas proinflamatorias en músculo esquelético. Se asoció que la activación de PPAR γ con rosiglitazona/ GW-1929, reprime la activación de NF- κ B en otras células como células T *in vitro* (Rossi y cols, 2000). También el PPAR γ puede reprimir la activación de macrófagos modificando la expresión de varios genes relacionados con la inflamación (Moraes y cols, 2006).

La unión de ligandos al PPAR γ ocasiona diversos efectos biológicos, entre ellos, la regulación de la transcripción de genes en el núcleo (Tugwood y cols, 1996). El proceso de transcripción también está regulado por proteínas coactivadoras como CBP/p300, la familia SRC, TRAP 220 y correpresores como SMART, NCoR, y RIP140 (Tontonoz y Spiegelman, 2008). Los ligandos/activadores de PPARs se clasifican en base a su origen en dos grandes grupos: de origen natural o sintético (Escher y Wahli, 2000). Los naturales son los leucotrienos, eicosanoides y ácidos grasos de cadena corta, mientras que ejemplos de ligandos sintéticos como la rosiglitazona y pioglitazona son específicos y actúan como agentes sensibilizantes a la insulina reduciendo los niveles de glucosa en pacientes con diabetes tipo 2 (Lehman y cols, 1995).

Expresión y localización de PPAR

La expresión de las isoformas de PPAR es diferente entre diversos órganos y esto puede estar relacionado con sus funciones pleiotrópicas. Lemberger y colaboradores (1996), hicieron un estudio donde evaluaron la expresión de las tres isoformas de PPAR en ratas Sprague-Dawley adultas con el fin de observar la participación de este factor de transcripción en procesos

hormonales y metabólicos, observando que el PPAR α se expresa en gran cantidad en tejido adiposo marrón, hígado, corazón, riñón, músculo y estómago. Se observó que el PPAR β/δ se expresa en alto grado en epidermis, riñón, bazo y placas de Peyer, mientras que el PPAR γ se expresa principalmente en tejido adiposo, células del sistema inmune, colon y bazo, participando activamente en la homeostasis lipídica (Michalik y cols, 2002). Se ha identificado la expresión de las cuatro isoformas del PPAR γ (γ 1- γ 4) en humano, encontrándose el PPAR γ 1, PPAR γ 3 y PPAR γ 4 en células endoteliales, células de músculo liso vascular, macrófagos y cardiomiocitos, mientras que el PPAR γ 2 se ha encontrado en adipocitos (Rangwala y Lazar, 2004).

Anatomía del sistema linfoide en mamíferos

El sistema linfoide en mamíferos se encuentra organizado por tejidos y órganos los cuales contienen linfocitos, células accesorias (macrófagos y células dendríticas) y células epiteliales (Yang y Chaplin, 1999). Los órganos y tejidos se clasifican por su función en primarios (centrales), y secundarios (periféricos) (Figura 1 y 2). En los centrales es donde las células se diferencian a partir de la célula madre totipotencial (médula ósea y timo) y después las células migran a tejidos secundarios. En estos últimos es donde se propicia un ambiente que promueve la interacción entre células y antígenos, para realizar funciones efectoras (Reinhard, 2007). Los órganos secundarios son el bazo, ganglios linfáticos y tejidos asociados a mucosa (MALT por sus siglas en inglés). El bazo realiza las funciones efectoras contra los antígenos provenientes de sangre, mientras que los ganglios actúan contra los antígenos que existen en la linfa, procedentes de órganos internos o de superficie como la piel.

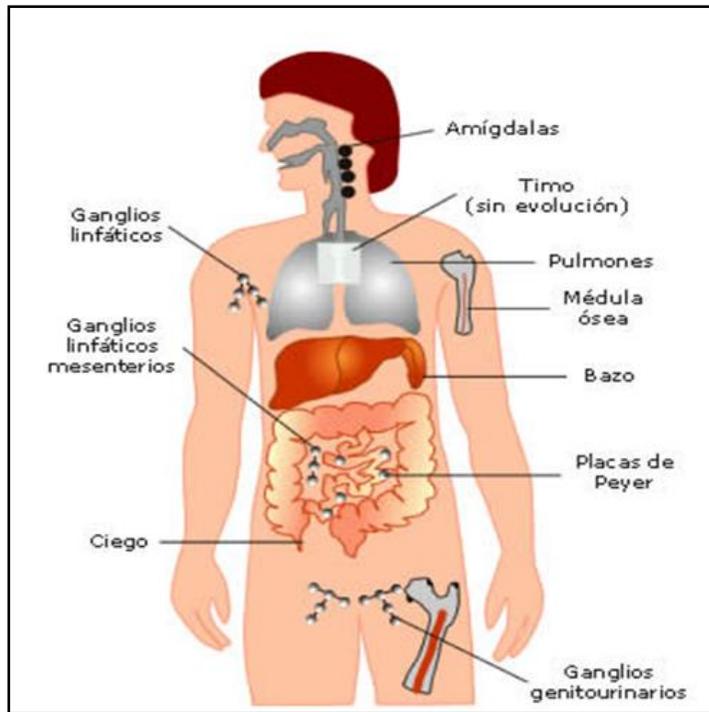


Figura 1. Localización de los órganos linfoides de humano. Se muestran los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y secundarios (ganglios, bazo y tejido asociado a mucosas).

Fuente: http://recursos.cnice.mec.es/biologia/bachillerato/segundo/biologia/ud08/02_08_04_02_05.html

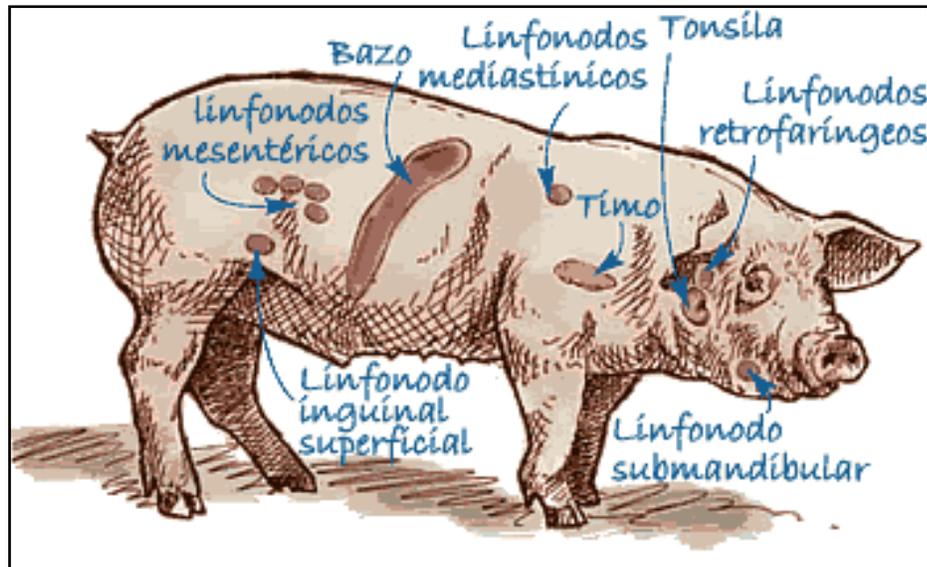


Figura 2. Localización de los órganos linfoides de cerdo

Fuente: http://www.3tres3.com/especial_circovirus/patogenia-de-la-infeccion-por-pcv2_4162/

Los ganglios linfáticos de los mamíferos en general, tienen una estructura oval, donde se denota una parte deprimida denominada hilio. Está formado por un estroma, el cual está constituido por una cápsula de tejido conectivo que rodea al ganglio y una red de fibras reticulares (Figura 3). Dentro del estroma está el parénquima que se constituye por nódulos o ganglios linfáticos, localizados a nivel de la corteza. Éstos, se forman por una zona central clara (centro germinal) donde existen poblaciones de macrófagos, linfocitos, y células dendríticas. Es en estos centros germinales, donde se realiza la selección de los linfocitos B de alta afinidad para reaccionar con antígenos. A nivel de la zona medular, existe una red de fibras reticulares y de células reticulares que encierran linfocitos pequeños, células plasmáticas maduras y macrófagos. Entre estas fibras se encuentran los denominados senos medulares. Los senos del ganglio se denominan como seno marginal o subcapsular, que es un espacio claro entre la cápsula y los nódulos linfáticos compuesta de linfocitos y macrófagos en su mayoría. También por senos laterales o corticales, donde se observan linfocitos y macrófagos (Tizard, 2004).

Los órganos linfoides en el cerdo doméstico son similares a los de otras especies de mamíferos, sin embargo difieren en ciertas estructuras, como la estructura interna de los ganglios linfáticos. La corteza de cada ganglio linfático está orientada hacia el centro, mientras que la médula se encuentra en la periferia, lo cual es contrario a la disposición dentro del ganglio linfático en humanos (Binns y Pabst, 1994). Otra diferencia que se presenta, es en las tonsilas o amígdalas en los animales de granja, pues tienen características típicas de la

especie, y el tamaño depende de la edad pero su estructura es similar (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). Mientras que los roedores no cuentan con estas estructuras (amígdalas), por lo que tienen un tejido linfoide puntualmente localizado en la base dorsal de la nariz (Kuper y cols, 1992), denominado tejido nasal asociado a mucosas (por sus siglas en inglés NALT).

Cuando los patógenos invaden el tejido, las células dendríticas residentes migran a los ganglios linfáticos donde están acumuladas en la zona paracortical y cortical. Ahí forman una red donde los antígenos tienen que pasar, son capturados y presentados a los linfocitos T. Las células T se activan en el área paracortical, mientras que los linfocitos B se encuentran distribuidos en los folículos primarios. Las dos poblaciones celulares, migran a los bordes de los folículos, donde interactúan. Posteriormente la producción de anticuerpos se estimula y las células B van hacia la médula y comienzan a secretar anticuerpos. Algunas de estas células B activadas se van por la linfa eferente y se establecen en otros nódulos o ganglios. La adherencia de las células dendríticas foliculares es la mayor manifestación de que un antígeno ha sido capturado, una vez que el organismo ha sido expuesto a él. Como respuesta secundaria a la exposición a un antígeno, los centros germinales no realizan tanta actividad y activan células de memoria que migran por la linfa eferente. Una vez terminado el proceso, los centros germinales regresan a su estado inicial (Tizard, 2004).

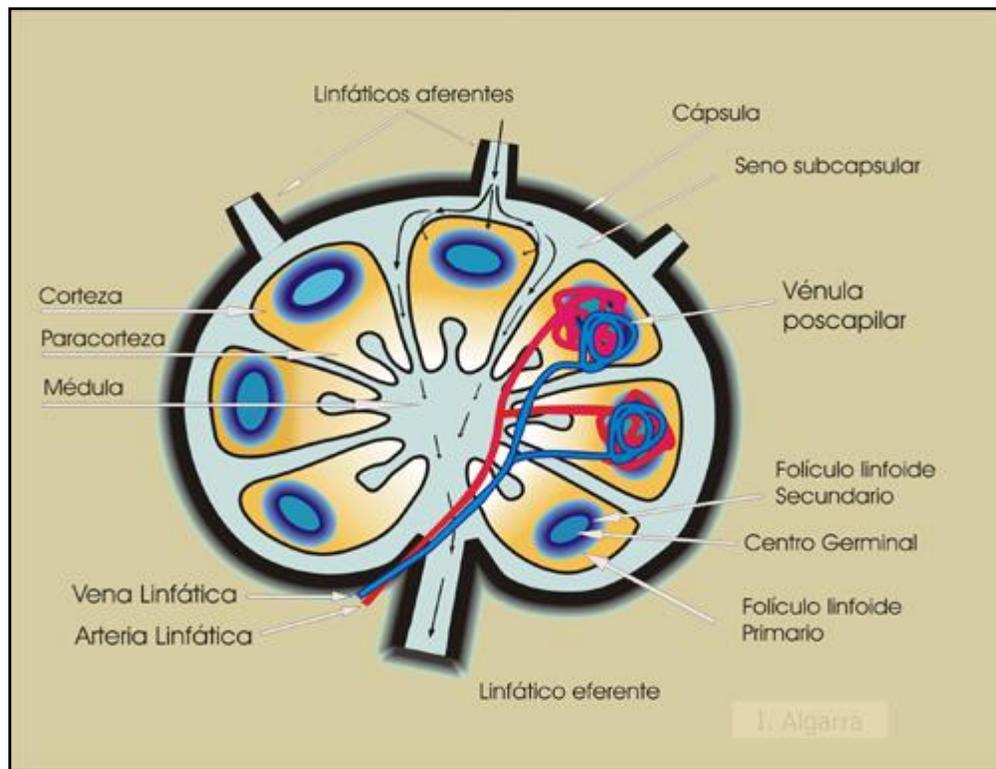


Figura 3. Organización de ganglio linfático

Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.mx/2008/01/sistema-linfatico.html>

El bazo realiza una función parecida a los ganglios, pues filtra antígenos provenientes de torrente circulatorio. Se divide en dos compartimientos: uno para el almacenamiento de eritrocitos denominada pulpa roja y otro para la captura del antígeno denominado pulpa blanca, que es rica en linfocitos y es ahí donde se presentan las respuestas inmunes (Figura 4). Está compuesto de varias venas que atraviesan este órgano, existe una arteria esplénica que tiene una gran cantidad de células T, alrededor de ella existen folículos primarios, que consisten en gran cantidad de células B. La pulpa roja está separada de la blanca por medio de un seno marginal y una zona marginal de células. Esta zona marginal, es rica en células dendríticas y células B. La mayoría de la sangre que entra al bazo es liberada en los senos marginales y fluye a través de la zona marginal antes de regresar a la circulación. Esto asegura que las células dendríticas y las células B se encuentren con cualquier antígeno circulante.

El bazo responde a los antígenos atrapándolos por las células dendríticas de las zonas marginales. Después de la captura, los llevan a los folículos primarios de la pulpa blanca, donde pocos días después las células B productoras de anticuerpos migran. Las células B colonizan la

zona marginal y la pulpa roja y comienzan a producir una gran cantidad de anticuerpos formándose los centros germinales activos (Tizard, 2004).

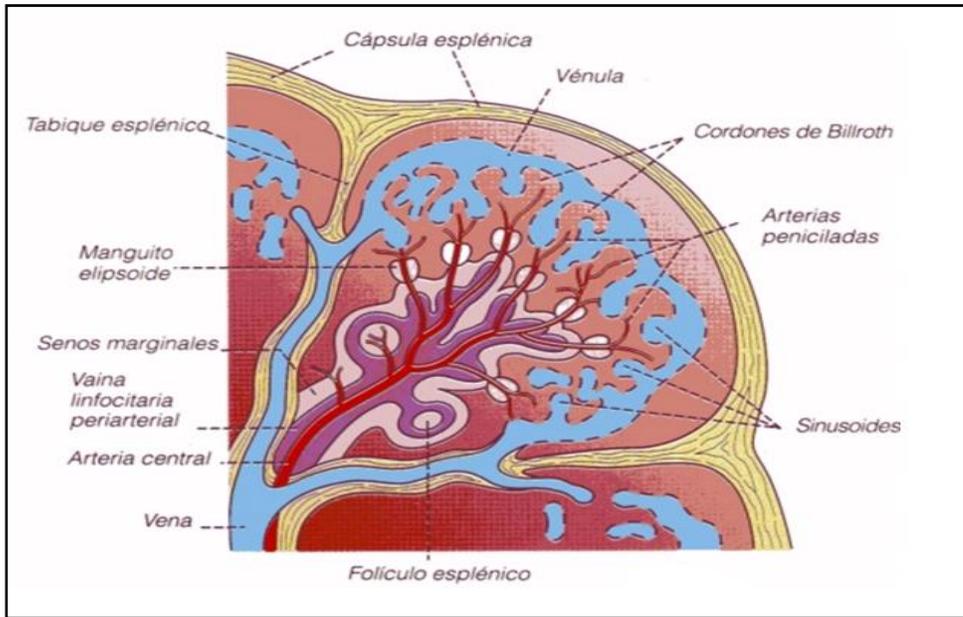


Figura 4. Organización del bazo. Se observan los sitios por donde los antígenos son capturados y presentados para una respuesta humoral posterior

Fuente: <http://.morningstarferrets.com>

Por otra parte el sistema de mucosas, ejerce una protección permanente contra antígenos que entran a través de los epitelios mucosos como primer sitio de contacto. Existen tejidos linfoides asociados a superficies del tracto intestinal (GALT), el tracto respiratorio (BALT) y al tracto genitourinario (Randall y cols, 2008). En estos tejidos las células se encuentran como agregados. En tejidos de mucosas como los epitelios, respiratorio, genitourinario y digestivos también existen células del sistema inmune como las células dendríticas intraepiteliales, que capturan y transportan antígenos hacia los ganglios linfáticos regionales (von Andrian y Mempel, 2003). En la lámina propia del intestino delgado y colon se encuentran linfocitos T, linfocitos B y células plasmáticas, estas últimas secretan IgA que atraviesan las células epiteliales y llegan al lumen intestinal. Otros linfocitos denominados intraepiteliales (IEL) presentan características fenotípicas distintas a los otros linfocitos. Éstos pertenecen a la subpoblación CD45RO donde fungen como células de memoria, liberan IFN γ e IL-5, teniendo principalmente una actividad antiviral (Muller y Lipp, 2003).

Función de PPAR gamma en leucocitos

Tradicionalmente el receptor nuclear PPAR γ se había asociado principalmente a su participación en el metabolismo de lípidos. Ahora se conoce que desempeña un papel importante en la biología de las células del sistema inmune (Figura 5). Por ejemplo en monocitos/macrófagos y en células espumosas derivadas de lesiones ateroscleróticas de humano, se ha encontrado una elevada expresión de PPAR γ (Ricotte y cols, 1998). Además se ha observado que la activación de PPAR γ por ligando en células T inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como el IFN γ y TNF α , y promueve un aumento de la enzima hemo oxigenasa-1 en humanos (enzima antiinflamatoria). También se ha reportado que algunos ligandos de PPAR γ pueden controlar los procesos de maduración y diferenciación en células dendríticas (Széles y cols, 2007).

En las células B la mayoría de los estudios indican que la principal función del PPAR γ , es la inducción de la apoptosis en células normales y células B de linfoma, mediante la activación producida por ligandos sintéticos y naturales. En otras células como mastocitos y eosinófilos, la activación de PPAR γ reduce la producción de gránulos citotóxicos y la quimiotaxis (Széles y cols, 2007). En otros estudios se encontró, que las células mononucleares de sangre periférica como los linfocitos y monocitos/macrófagos, también expresan PPAR α . La activación de PPAR α en estas células se ha empleado para distinguir entre un estado patológico o sano mediante el perfil de la expresión genética de estas células (Maas y cols, 2002).

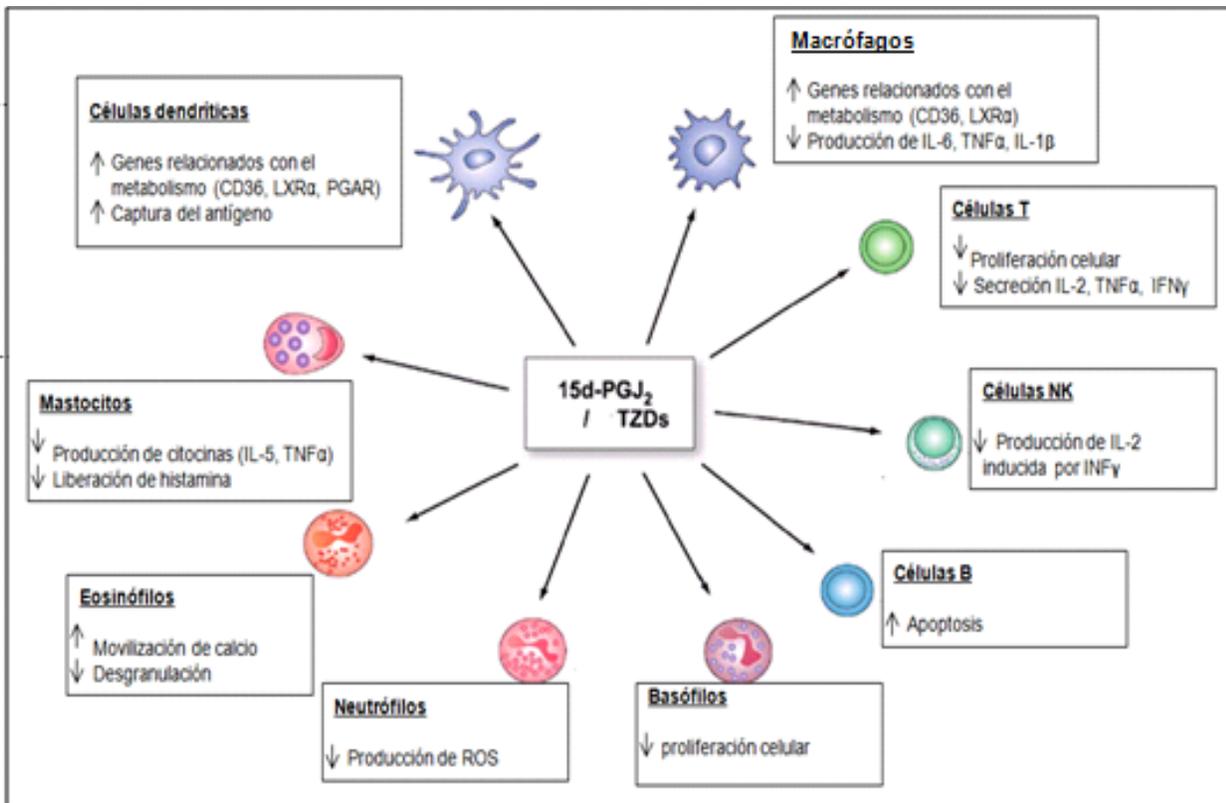


Figura 5. Efectos biológicos de PPARγ sobre células del sistema inmune

Fuente: Adaptado de Széles y cols, 2007

Expresión de PPAR en cerdo

Los estudios en cerdo han evaluado principalmente la actividad de PPAR como un modulador de la cantidad de tejido adiposo, importante en términos de producción de carne. Se ha observado una elevada expresión de PPAR α a nivel de ARNm en hígado tanto en modelos murinos como porcinos (Jones y cols, 1995). Por otra parte se ha visto que la expresión de PPAR α , es mayor en riñón e hígado en la etapa madura del cerdo, mientras que al compararlos con lechones, la distribución tisular es exclusiva de hígado y corazón (Sundvold y cols, 2001). Ding y colaboradores (2000), encontraron que PPAR α y PPAR γ son altamente expresados en tejido adiposo, donde regulan la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos en cerdos de las razas Newsham-sired y Duroc-sired, observando a nivel de ARNm una expresión muy similar en ambas poblaciones. Estudios recientes sugieren que la expresión del PPAR α en endometrio porcino es un importante marcador del desarrollo del feto, en la etapa temprana de la gestación (Bogacka y Bogackith, 2011).

Recientemente, Liu y colaboradores (2008), evaluaron la expresión de PPAR γ en timo, bazo, ganglios mesentéricos y leucocitos de sangre periférica en cerdos estimulados, con un reto inmunológico causado por lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*. Observaron que los niveles de expresión de PPAR γ entre estos órganos linfoides y después de la exposición a LPS se incrementan y es diferente en cada tejido evaluado, el incremento de la expresión es mayor en leucocitos pertenecientes a sangre periférica. Esto indica que al momento de que los cerdos están sometidos a estrés inmunológico existe un incremento significativo de la expresión de PPAR γ en órganos linfoides y en leucocitos. Este incremento significativo, se asocia con un papel de la expresión de PPAR γ como un modulador de la respuesta inmune y la inflamación (Széles y cols, 2007). Por lo que se considera pertinente realizar más estudios para conocer el papel de este receptor nuclear en el sistema inmune de este modelo de investigación.

JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios muestran una expresión diferencial de PPAR γ en órganos por su participación clave en el metabolismo de lípidos, y en los últimos años se ha observado que este receptor interviene de manera importante en la regulación de la respuesta inmune. Sin embargo hay poca información sobre expresión de PPAR γ en tejidos linfoides y en menor grado en modelos porcinos, importantes en la investigación biomédica y en la industria alimentaria.

HIPÓTESIS

La expresión basal de PPAR γ en leucocitos depende del tejido linfoide de procedencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de este estudio se proporcionaron muestras de órganos linfoides y otros tejidos de cuatro cerdos aparentemente sanos de 4-7 semanas de edad, provenientes de granjas libres de virus PRRS y Aujeszki, y mantenidos para protocolos de investigación en ejecución del Dr. Jesús Hernández (Laboratorio de Inmunología de CIAD, A.C). Los cerdos se sacrificaron por electroinsensibilización, y desangrado por corte en vena cava craneal, siguiendo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999, y se observaron los protocolos aprobados para su mantenimiento en granja experimental.

Obtención de células de colon

Las muestras de 10 cm de colon ascendente y 10 cm de colon transversal se lavaron en PBS con antibióticos y posteriormente se trabajaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (LABCONCO®). Se hicieron cortes de 1 cm y se colocaron en un matraz con 100 mL de HBSS (pH 7.2, 0.94 M DTT, 1.25 mM EDTA, anfotericina B y 10,000 UI/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina). Se agitaron por 15 min, después se retiró el sobrenadante mediante filtración con organza estéril repitiendo en dos ocasiones este paso. Se añadieron 100 mL de RPMI-1640 sin suero fetal bovino y se incubaron en el agitador orbital a 150 rpm por 30 min. Posteriormente se procedió a filtrar de nuevo con organza estéril y se hicieron cortes más pequeños de la mucosa. Después se resuspendió el tejido en 100 mL de solución de enzimas (colagenasa y DNasa I). Se incubó en el agitador orbital a 150 rpm a 37° C por 75 min y luego las células liberadas y el tejido, se pasaron por un filtro de 100 µm, se filtró de nuevo con organza estéril y fue centrifugado a 1100 rpm x 10 min, finalmente se resuspendió en 40 mL de RPMI-1640. Se evaluó la viabilidad de las células y se realizó el conteo celular con azul de tripano (dilución 1:10).

Obtención de células de pulmón

Las células provenientes de este tejido fueron proporcionadas como producto de otro estudio que estaba en ejecución, por lo que la metodología sólo se describirá brevemente. Se obtuvo lavado bronquioalveolar de pulmón con PBS estéril, se centrifugó el lavado colectado a 1100 rpm x 10 min y se colectó y contó el botón celular. Las células no adherentes de pulmón (NAP) se obtuvieron a partir de macerados de pulmón los cuales se hicieron pasar por filtros de 100 µm y se incubaron con una solución de enzimas (digestión enzimática). Después se realizó una separación de células mononucleares con Ficoll y finalmente otra separación en placas de Petri por adherencia durante la noche (López-Robles y cols, 2013, datos no publicados).

Obtención de células de tonsila, bazo y ganglios linfáticos

La obtención de células a partir de tejidos linfoides secundarios se realizó mediante macerados de bazo, tonsila y de los ganglios: submaxilar, mediastínico, mesentérico, y retrofaríngeo, con PBS estéril en filtros de 100 µm. El filtrado se centrifugó a 1100 rpm x 10 min (Eppendorf Centrifuge®), se decantó el sobrenadante y se recuperó el botón celular. Posteriormente se resuspendió el botón celular con el remanente de PBS en el tubo, y se añadió buffer de lisis de eritrocitos (NA₂EDTA.2H₂O 0.1 mM, KHCO₃ 10mM NH₄Cl 0.15 M), incubándose por 5 min. Posteriormente se lavó con 10 mL de PBS estéril, y centrifugó a 1100 rpm por 10 min. Se decantó y se colocaron las células en 1 mL de Trizol® (Invitrogen, USA) para los análisis posteriores.

Extracción de ARN total

Se empleó una suspensión celular de 1 mL (con una densidad de aproximadamente 5 millones de células), se centrifugó a 3500 rpm (Eppendorf Centrifuge® 5417R, E.U.A) por 5 min, y se decantó el sobrenadante. Después se añadió al botón celular 1 mL de Trizol® (Invitrogen) y se mezcló por 5 min. Se añadieron 200 µL de cloroformo (SIGMA ALDRICH®) y después se centrifugó por 10 min a 12000 rpm. Se separó la fase acuosa utilizando una pipeta, evitando perturbar las capas inferiores con detrito celular. El volumen recuperado se pasó a otro tubo y se agregó 500 µL de isopropanol para precipitar el ARN. Se mezcló por inversión del tubo en varias ocasiones y se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente durante 10 min, a 12000 rpm, se decantó el sobrenadante, se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 75%, y posteriormente la última centrifugación 5 min a 12000 rpm. Se

eliminó el sobrenadante y el botón (ARN) se dejó secando en la campana unos segundos. Finalmente el botón se resuspendió en 20 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ARN se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop, E.U.A) empleando la relación de absorbancia 260/280.

RT-PCR

Se obtuvo ADNc a partir de ARN total de dos muestras una de lavado bronquioalveolar de pulmón y otra de leucocitos de colon siguiendo el protocolo del kit First Strand cDNA Synthesis Using M-MLV RT and PCR Reaction (Invitrogen®). Para la síntesis de ADNc se añadió 1 μ L de oligo (dT)12-18(500 μ g/mL), después 100 ng de ARN total, también se agregó 1 μ L de 10 mM de mezcla de dNTPs y se ajustó a un volumen final de 20 μ L con agua libre de nucleasas. Después se incubó a una temperatura de 65°C por 5 min., se colocó en hielo y se centrifugó. Después se agregó 4 μ L de 5X First-Strand Buffer, 2 μ L de DTT 0.1 M y 1 μ L de RNase OUT (40 UI/ μ L). Se incubó la mezcla a 37°C por 2 min, y posteriormente se añadió 1 μ L de M-MLV Transcriptasa reversa (Invitrogen®, USA), se mezcló ligeramente y se incubó 50 min a 37°C. La reacción se inactivó por calentamiento a 70°C por 15 min.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó colocando en un tubo de reacción: 5 μ L de MgCl₂ (50mM), 5 μ L de Buffer 5X, 5 μ L de mezcla de dNTPs (2.5mM), 1.5 μ L de iniciadores sentido (10 μ M) y antisentido (10 μ M) respectivos para PPAR γ : PPAR γ Fw, 5'-TCCCGCTGACCAAAGCAAAGGC-3' y PPAR γ -Rv 5'-CCACGGAGCGAAACTGACACCC-3' y así como del gen constitutivo (GAPDH). Posteriormente se añadieron 0.25 μ L de la Taq ADN Polimerasa recombinante (Invitrogen®, USA.), 2 μ L de ADNc, y se ajustó a un volumen final de reacción de 50 μ L, con agua libre de nucleasas. Para la amplificación se usaron las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg; 55°C por 30 seg; 72°C por 1 min, realizando una extensión final a 72°C por 10 min en un termociclador (GeneAmp® PCR System, E.U.A).

Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X-SYBR Safe (Invitrogen®). Se fundió la agarosa en un microondas a potencia media, por 35 s, se enfrió un poco y se vertió sobre el molde. Se colocó el peine para realizar los pocillos (8 ó 12 pocillos), se retiraron las burbujas

existentes y se dejó gelificar durante 20 min. Posteriormente se llevó a la cámara previamente llenada con el nivel de buffer TAE 1X. Se prepararon las muestras para cargarlas en el gel de agarosa de la siguiente forma: se colocó en papel parafilm 2 μ L de buffer de carga (azul de bromofenol + glicerol) y se mezcló con 8 μ L del producto de PCR. Se colocaron las muestras y el marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 pb Invitrogen®), en los pocillos correspondientes, se tapó la cámara de electroforesis (Electro Techware PS250-1 Sigma®) y se ajustó el voltaje en un rango de 70-90 V (volts). Se detuvo la corrida aproximadamente a un centímetro del final del gel y se procedió a visualizar en el fotodocumentador de UV (Vilber Lourmat®, E.U.A).

RT-qPCR

Para evaluar la expresión en términos cuantitativos se procedió a realizar ensayos de RT-qPCR. Esta herramienta es una variación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa estándar, la cual se emplea para la cuantificación de ARNm en una muestra. Se utilizaron iniciadores específicos (mencionados anteriormente) para medir el número de transcritos de ARNm del gen PPAR γ que contuvieran las muestras. Teóricamente en cada ciclo se duplica la cantidad de producto: donde el producto (ADN de doble cadena) aumenta exponencialmente con el número de ciclos de PCR y el producto de PCR depende del número de copias inicial del molde de ADNc. Se detectó la acumulación de producto durante la reacción (tiempo real), por medio de la fluorescencia emitida por el SYBR®, la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto y se representó gráficamente un análisis de cuantificación de la cantidad de fluorescencia en cada ciclo: fluorescencia vs. ciclo de amplificación de PCR, la cuantificación de producto se realizó en la fase exponencial de amplificación, por lo que se obtuvo una mayor precisión.

Se amplificaron los genes de interés con el sistema comercial Brilliant II SYBR® Green RT-qPCR Master Mix Kit, 1-Step (STRATAGENE®, E.U.A) según las especificaciones del fabricante. Se utilizó un volumen de 12.5 μ L de master mix, 1.0 μ L de Strata block RT, 1.5 μ L de iniciador sentido y antisentido previamente mencionados. A esta mezcla se añadieron 2 μ L de ARN (200 ng de ARN total) y se ajustó a un volumen final de reacción de 25 μ L. El programa de termociclado fue: un ciclo de 50°C por 30 min, un ciclo de 95.0°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 30 s. Finalmente se realizó una etapa post amplificación para generar la curva de disociación de ADN a 95°C por 15 min, 60°C por 1 min y 95°C por 15 min, el equipo

utilizado fue un termociclador para PCR tiempo real (StepOne Real-time PCR System AB Applied BioSystems®).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de la técnica

Se obtuvieron muestras de cuatro cerdos sanos, de 4-7 semanas de edad y se realizaron varios preliminares para establecer las condiciones del ensayo. El primero de ellos fue con el propósito de probar los iniciadores con los que se contaba previamente para la amplificación de PPAR γ , siendo estos diseñados en base a la secuencia de PPAR γ de ratón.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de PPAR γ

	PPAR γ
Fw	5'-TCCCGCTGACCAAAGCAAAGGC-3'
Rv	5'-CCACGGAGCGAAACTGACACCC-3'

Las muestras empleadas en el ensayo pertenecen a la especie de cerdo doméstico *Sus scrofa*, y debido a que los oligonucleótidos empleados para la amplificación de PPAR γ , fueron diseñados en base a la secuencia de ratón, se realizó un análisis del porcentaje de identidad de las secuencias de ambas especies con el conocimiento previo de que existen regiones conservadas en la secuencia de PPAR. Se obtuvieron las secuencias de los genes de PPAR γ 1 y 2, de *Mus musculus* y *Sus scrofa* de GenBank, posteriormente se realizó un análisis de homología de las secuencias nucleotídicas interespecie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homology/homoloGene>. Por último se hizo un PCR *in silico* con las secuencias de los iniciadores de PPAR γ con las secuencias de las regiones codificantes del gen PPAR γ de *Mus musculus* y *Sus scrofa* con los iniciadores diseñados para *Mus musculus* (Zhang y cols, 2000). En el análisis de PCR *in silico* se observó que los oligonucleótidos sentido y antisentido tuvieron una identidad de 100% con la secuencia de referencia y definieron una secuencia de 151 pb para PPAR γ .

Tabla 2. Muestras de los tejidos linfoides obtenidos a partir de cuatro cerdos sanos

Cerdo 1	Cerdo 2	Cerdo 3	Cerdo 4
Colon Ascendente	Colon Ascendente	Retrofaríngeo	Retrofaríngeo
Mediastínico	Mediastínico	Submaxilar	Submaxilar
Tonsila	Colon trans.	Tonsila	Tonsila
Inguinal		Inguinal	Inguinal
Mesentérico		Mediastínico	Mesentérico
Bazo		Bazo	Bazo
LBA	LBA	LBA	
NA	NA	NA	

LBA: lavado bronquioalveolar; NA: células no adherentes

GCGCTCGGGTCGGCCGCTCGGACACCGGAGCTGGACGCCAGGCCACCACCGCAGATTTGGTGGAAGCCAACCTCTAAGCCACTAACAT
ACAGGAAGGTTGTTTCCTTAAACGAAGAGTCATCTTTTAGCGAGGTGACCATGGTTGACACCGAGATGCCGTTTTGGCCACCAACT
TTGGGATCAGCTCTGTGGACCTGTGCGGTGATGGACGACCACTCCCACTCCTTTGACATCAAGCCCTTACCACCTGTTGATTTCTCCA
GCATTTCCACTCCACACTATGAAGACATCCCATTCCCGAGAGCTGATCCAATGGTTGCAGATTATAAGTACGACCTGAAGCTCCAGG
ACTACCAAAGTGCCATCAAAGTGGAGCCTGTGTCCCGCCTTATTATCTGAAAAGACTCAGCTGTACAACAAACCTCACGAAGAGC
CTTCCAACCTCCCTCATGGCAATTGAATGCCGTGTCTGTGGGGATAAAGCCTCGGGTTCCACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGAT
GCAAGGTTTCTTCCGGAGGACTATCAGATTGAAGCTTATTTATGATAGGTGCGATCTTAACTGTCCGATCCACAAAAAAGTAGAA
ATAAATGTCAGTACTGTCGGTTTCAGAAATGCCTTGCTGTGGGGATGCTCATAACGCCATCAGGTTTGGGCGGATGCCACAGGCTG
AGAAGGAGAAGCTGTTGGCAGAGATCTCCAGTGATATCGACCAGCTGAACCCAGAGTCTGCTGACCTCCGCGCCCTGGCAAAGCACT
TGTATGACTCATAATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAAGCAAAGGCAGGGCGATCTTGACAGGAAAGACCACAGACAAATCACCC
TTTGTCATCTATGACATGAATTCCTTAATGATGGGAGAAGATAAAATCAAGTTCAAACACATCACCCCTGCAGGAGCAGAGCAA
GAGGTGGCCATTTCGCATCTTTCAGGGGTGTCAGTTTCGCTCCGTGGAGCCGTGCAGGAGATCACAGAGTATGCCAAGAACATCCC
TGGGTTTGTAACCTTGACCTGAATGACCAAGTAACCTCCTAAAGTATGGCGTCCACGAGATCATTACACCATGCTGGCCTCCTT
GATGAATAAAGACGGGGTCTCATCTCCGAGGGCCAAGGATTCATGACAAGGGAGTTTCTAAGGAGCCTGAGAAAACCTTTGGTGA
CTTTATGGAGCCCAAGTTCGAGTTTGCTGTGAAGTTCAACGCACCTGGAATTAGATGACAGCGACCTGGCGATATTTATAGCTGTCAT
TATTCTCAGTGGAGACCGCCACGTTTGCTGAATGTGAAGCCATCGAGGACATTCAAGACAATTTGCTGCAAGCCTTGGAGCTGCA
GCTCAAGTTGAACCACCCAGAGTCTCCAGCTCTTTGCTAAGCTGCTCCAGAAAATGACAGACCTCAGACAGATTGTGACAGAGCA
CGTGACGCTGCTGCAAGTAATAAAGAAGACAGAGACGGACATGAGCCTTCAACCCCTCTACAGGAAATATAACAAGGACTTGTACTA
GCAAAGAAGTCCACGTTACCGACAACATTCTCCTTCTTCCAATTGCACTATTATTTGGGGGAAA

Figura 6. PCR *in silico* de los iniciadores con el gen PPAR γ 1. Producto de 151 nucleótidos. Se observan la secuencia de los iniciadores en la región del recuadro.

CAGTGTGAATGACAGCAAACCCCTGTTCCATGCTGTTCATGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCTTATTGACCCAGAAAGCGATGCCTT
CGACACGCTGTCTGCAAACATTTACAAGAGGTGACCATGGTTGACACCGAGATGCCGTTTTGGCCCACCAACTTTGGGATCAGCTC
TGTGGACCTGTCCGGTATGGACGACCCTCCCACTCCTTTGACATCAAGCCCTTCACCACTGTTGATTTCTCCAGCATTCCACTCC
ACACTATGAAGACATCCCATTTCCCGAGAGCTGATCCAATGGTTGCAGATTATAAGTACGACCTGAAGCTCCAGGACTACCAAAGTGC
CATCAAAGTGGAGCCTGTGTCCTCCCGCCTTATTATTCTGAAAAGACTCAGCTGTACAACAAACCTCACGAAGAGCCTTCCAACCTCCT
CATGGCAATTGAATGCCGTGTCTGTGGGGATAAAGCCTCGGGGTTCCTACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTTTCTT
CCGGAGGACTATCAGATTGAAGCTTATTTATGATAGGTGCGATCTTAACTGTCCGGATCCACAAAAAAGTAGAAATAAATGTCAGTA
CTGTCCGGTTTCAGAAATGCCTTGTCTGTGGGGATGTCTCATAACGCCATCAGGTTTGGGCGGATGCCACAGGCTGAGAAGGAGAAGCT
GTTGGCAGAGATCTCCAGTATATCGACCAGCTGAACCCAGAGTCTGCTGACCTCCGCGCCTGGCAAAGCACTTGTATGACTCATA
CATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAAGCAAAGGCAGGGCGATCTTGACAGGAAAGACCACAGACAAATCACCCCTTTGTCATCTATG
ACATGAATTCCTTAATGATGGGAGAAGATAAAATCAAGTTCAAACACATCACCCCTGCAGGAGCAGAGCAAAGAGGTGGCCATTC
GCATCTTTCAGGGGTGTCAGTTTCGCTCCGTGGAGGCCGTGCAGGAGATCACAGAGTATGCCAAGAACATCCCTGGGTTTGTAAAC
CTTGACCTGAATGACCAAGTAACTCTCCTAAAAGTATGGCGTCCACGAGATCATTTACACCATGCTGGCCTCCTTGATGAATAAAGAC
GGGTCCCTCATCTCCGAGGGCCAAGGATTCATGACAAGGGAGTTTCTCAAGAGCCTGAGAAAGCCCTTTGGTGACTTTATGGAGCCC
AAGTTCGAGTTTGTGTGAAGTTCAACGCACTGGAATTAGATGACAGCGACCTGGCGATATTTATAGCTGTCATTATTCTCAGTGGA
GACCGCCAGGTTTGTGAATGTGAAGCCATCGAGGACATTCAAGACAATTTGCTGCAAGCCTTGGAGCTGCAGCTCAAGTTGAAC
CACCCAGAGTCCCTCCAGCTCTTTGCTAAGCTGCTCCAGAAAATGACAGACCTCAGACAGATTGTGACAGAGCACGTGCAGCTGCTG
CAAGTAATAAAGAAGACAGAGACGGACATGAGCCTTACCCACTCCTACAGGAAATATACAAGGACTTGTACTAG

Figura 7. Alineamiento de los iniciadores diseñados para PPAR γ con el gen PPAR γ 2. Producto de 151 nucleótidos. Se observan los iniciadores en la región sombreada.

Se conoce que los porcentajes de identidad de las secuencias nucleotídicas entre PPAR γ es de 92% para ganso y otras cinco especies, y de 97% en su secuencia de aminoácidos. Estos resultados demostraron que estos genes se han conservado a través de la evolución y que cumplen con una función importante de crecimiento y desarrollo en aves y mamíferos (Meng y cols, 2004).

Estos resultados respaldan lo encontrado en el ensayo bioinformático (Figuras 6 y 7) que se realizó, pues se compararon las secuencias de los genes de PPAR γ en las especies *Mus musculus* (ratón) y *Sus scrofa* (cerdo doméstico) y se observó una similitud entre secuencias de nucleótidos mayor al 90%, porcentaje parecido al encontrado en el trabajo de Meng y cols (2004). Sin embargo para la secuencia de aminoácidos se observa una similitud entre el 92-94%. También se realizó un ensayo de homología entre las isoformas de PPAR γ 1 y PPAR γ 2 de *Sus scrofa* para probar si los iniciadores podían amplificar ambas isoformas y se obtuvo una similitud entre secuencias de aminoácidos de 99%, mostrando que existe una mínima variación entre ellas.

RT-qPCR

Posteriormente se realizó un primer ensayo para amplificar los genes PPAR γ por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de punto final. Se emplearon dos muestras: una de leucocitos de colon y leucocitos del lavado bronquioalveolar (LBA). Se realizó la visualización de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa. Los patrones electroforéticos mostraron bandas correspondientes al tamaño de amplicón esperado para PPAR γ , de 151 pb (Figura 8).

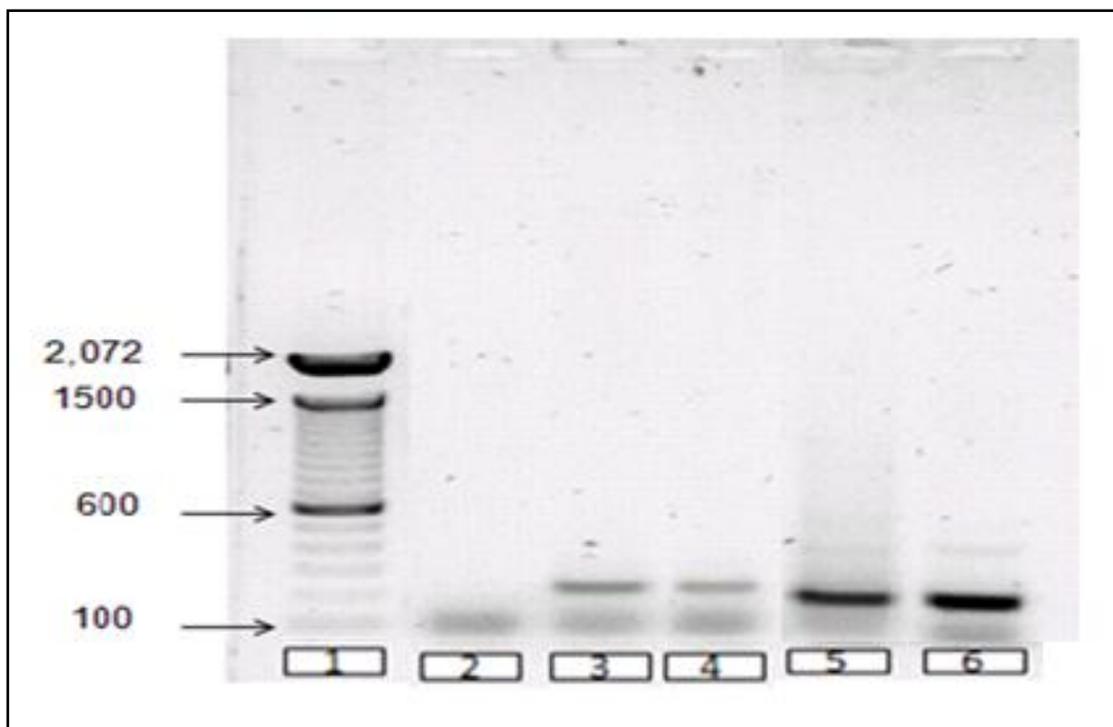


Figura 8. Electroforesis de los productos de PCR para PPAR γ . 1) Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder, 2) GAPDH (-), 3) GAPDH LBA, 4) GAPDH colon, 5) PPAR γ LBA, 6) PPAR γ colon

Selección del gen constitutivo

Este ensayo se realizó con el propósito de seleccionar el gen constitutivo más adecuado para utilizarlo en la normalización de los datos de expresión de PPAR γ de las muestras de leucocitos de tejido linfoide disponibles de los cuatro cerdos. Se emplearon tres muestras: leucocitos de colon, leucocitos de ganglio mediastínico y la de una población enriquecida de macrófagos alveolares de pulmón (LBA). Se probaron los iniciadores de cuatro genes constitutivos de cerdo, UBC, RPL32, PPIA y β -actina, así como el PPAR γ .

El gen constitutivo más adecuado se determinó en base dos parámetros: que tuviera poca variabilidad entre las muestras y que sus valores fueran comparables. Así, se hizo un análisis donde se graficó el valor del ciclo umbral (Ct) medio observado en las tres muestras y su desviación estándar (Figura 9) para observar la variabilidad en los niveles de expresión de cada gen constitutivo y PPAR γ entre las muestras. Se observa que RPL32, PPIA y β -actina tienen valores de Ct por encima de 25, y tienen una variabilidad más alta que el del gen UBC, el

cual fue el constitutivo que presentó menor variabilidad entre las muestras de leucocitos de diferentes tejidos. Por lo que se seleccionó el gen de UBC como constitutivo para los análisis de expresión de genes por cuantificación relativa.

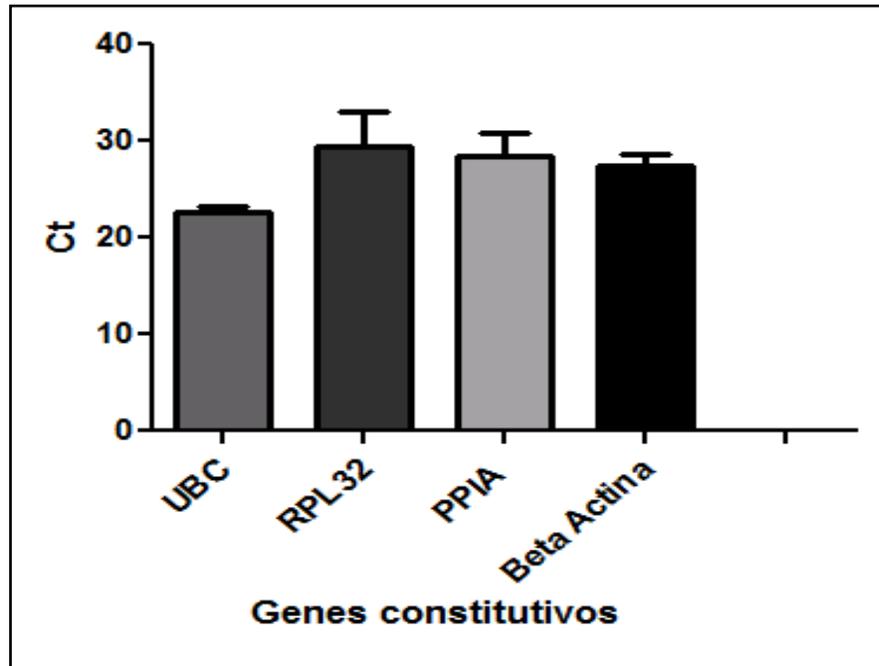


Figura 9. Selección del gen constitutivo. Ensayo donde se obtuvo el valor de la $X \pm DE$ del valor de ciclo umbral (Ct) de las tres muestras de ARN total de leucocitos de colon, leucocitos de ganglio mediastínico y macrófagos de lavado bronquioalveolar de pulmón (LBA).

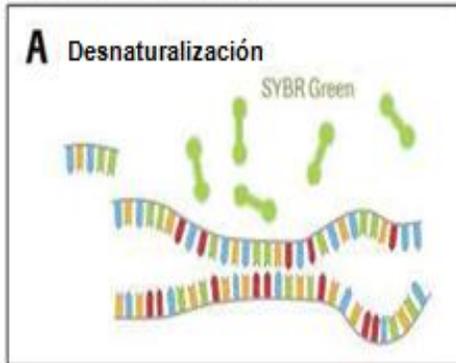
Cuantificación de la expresión de PPAR

Análisis de expresión de PPAR γ por cuantificación relativa

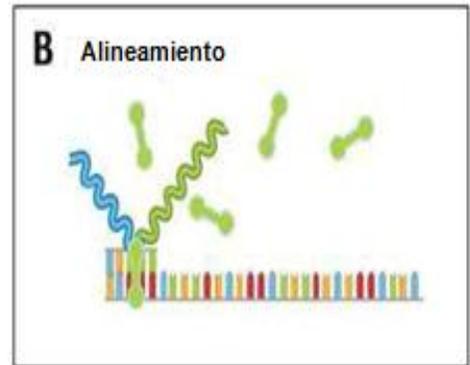
La cuantificación relativa se utilizó para comparar la expresión del gen de interés (PPAR γ) con un gen de expresión constitutiva (UBC) y, observar el comportamiento de expresión de PPAR γ en los leucocitos de los diferentes tejidos linfoides porcinos. Para este análisis, el equipo de PCR tiempo real, contiene un lector de fluorescencia, que permite cuantificar la cantidad de ARN mensajero respecto a cada cierto número de ciclos (tiempo real). La emisión de la señal fue dada por el SYBR® Green (Figura 10) y es proporcional a la cantidad de producto. La emisión de fluorescencia de fondo es la fluorescencia basal (Treshold) y la fluorescencia que proporcionaron las muestras, a una amplificación positiva se denomina Ct (cycle threshold o ciclo umbral). Por lo que la fórmula que se utilizó para comparación de la expresión: [Ct del gen de interés- Ct gen constitutivo] = Δ Ct, siendo $2^{-\Delta$ Ct el incremento relativo (Figura 11).

El SYBR® Green puede unirse inespecíficamente a productos de PCR de doble cadena, como dímeros de iniciadores. Para verificar esto se realizó un análisis post-amplificación, conocido como curva de disociación que permite analizar la especificidad de la amplificación, obteniendo un valor de Tm en °C. Esta curva muestra un pico en la temperatura de disociación específica para el producto de amplificación de PPAR γ y UBC en las muestras linfoides (Figura 12).

SYBR Green



SYBR Green libre



Pequeños dsDNA, unión SYBR Green

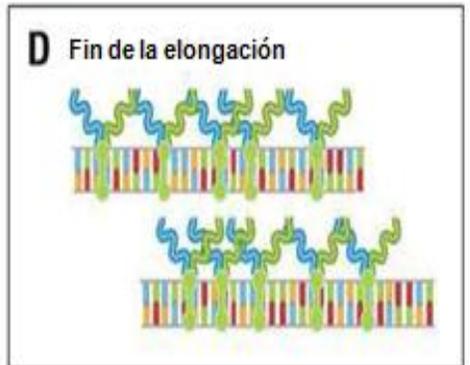
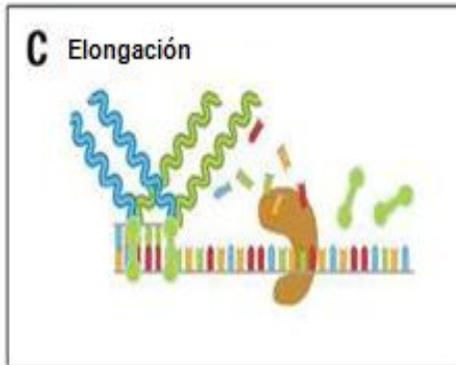


Figura 10. Sistema de detección por fluorescencia de SYBR Green, agente intercalante a doble cadena de ADN.

Fuente: <http://1.bp.blogspot.com/-CXN3jJBQYCg/UIhnc5cFrsl/AAAAAAAAAFI/PC-eurQsOQI/s1600/Imagen3.jpg>

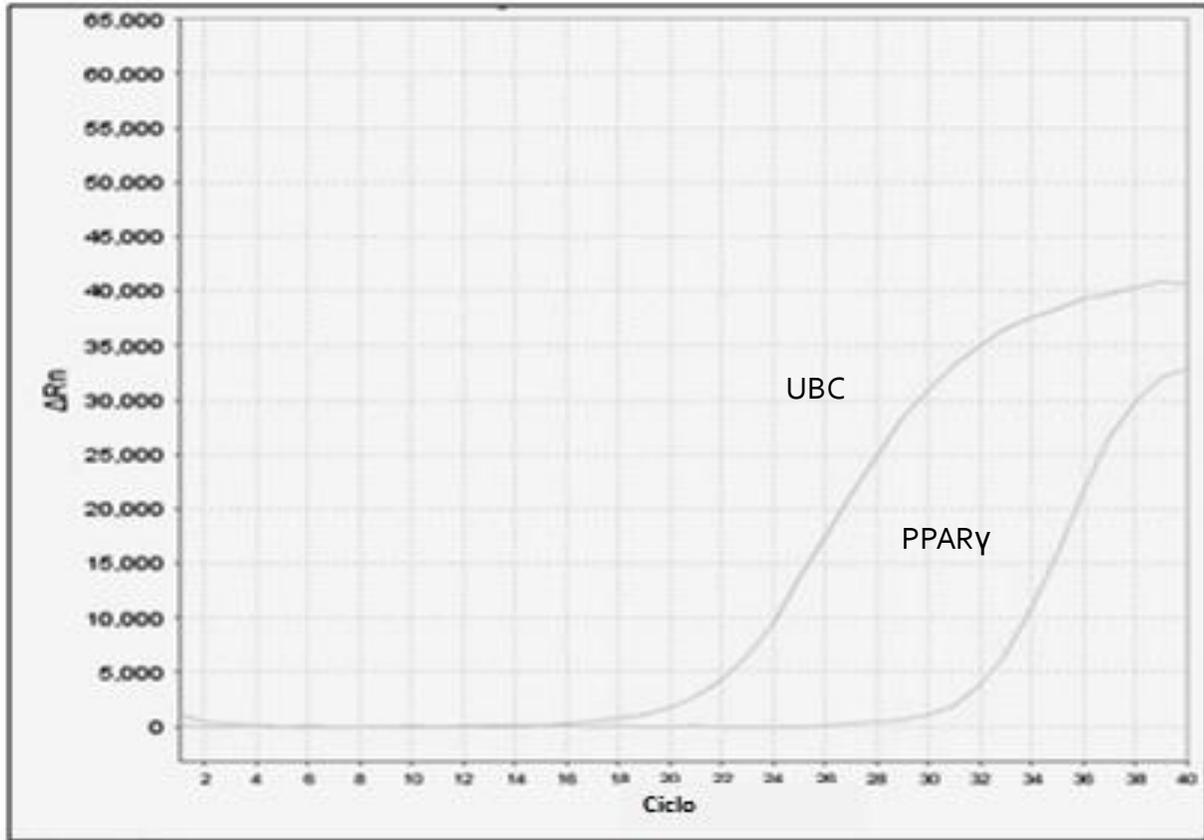


Figura 11. Gráfica de la cinética de amplificación de PPARγ y UBC. Muestra de ARN total de leucocitos por RT-qPCR, donde se observan las Ct (ciclo umbral) de ambos.

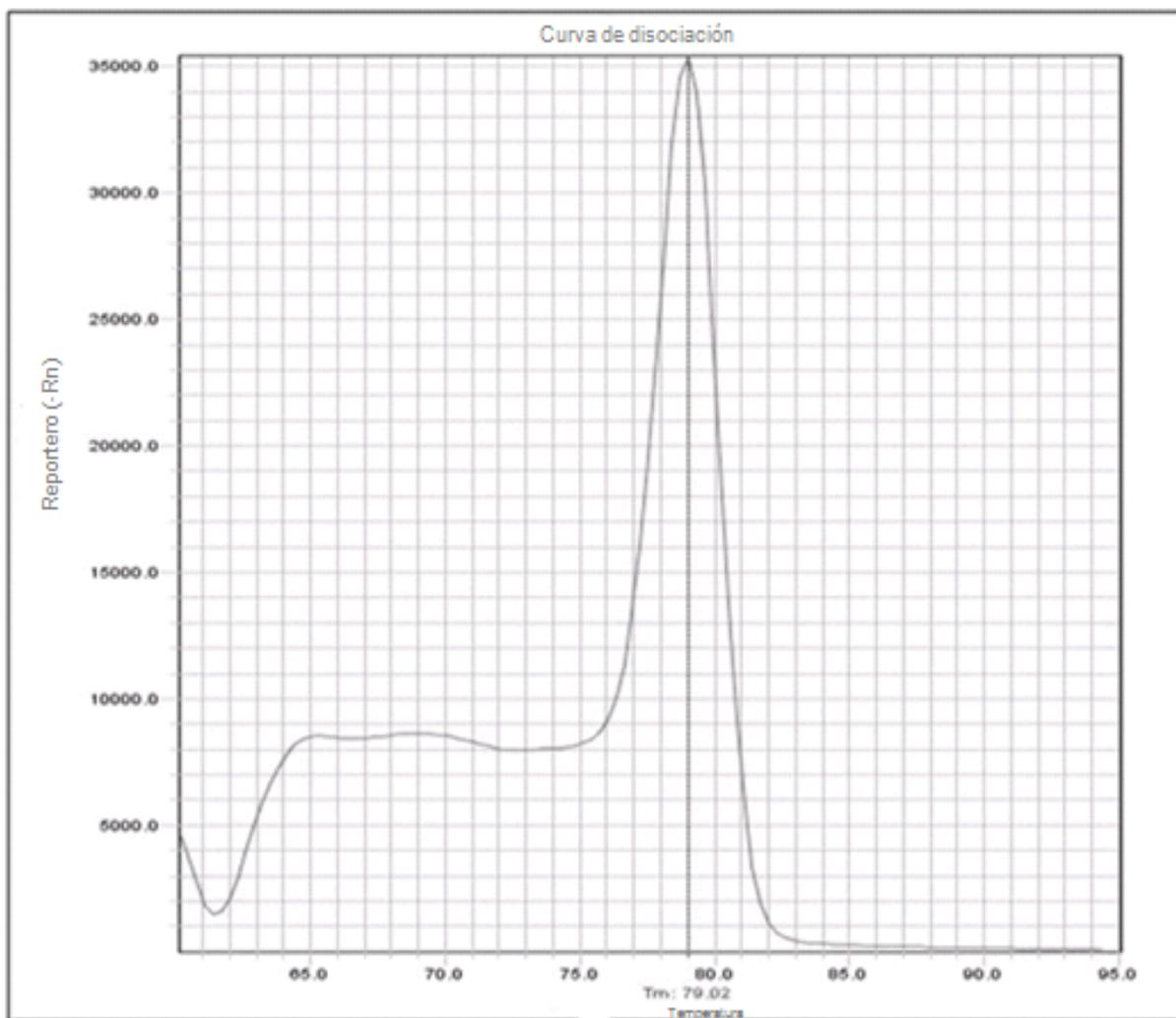


Figura 12. Curva de disociación para PPAR γ .

Expresión de PPAR γ en tejidos linfoides

La mayor expresión de PPAR γ se obtuvo en la muestra enriquecida en macrófagos alveolares de pulmón (LBA) obtenidos de lavado bronquioalveolar, y se utilizó como un control positivo de expresión. Los tejidos con una fuerte expresión fueron: bazo > células no adherentes de macerado de pulmón (N.A) > ganglio mesentérico > inguinal > tonsila > submaxilar. Con una expresión media fueron colon ascendente > ganglio mediastínico y con una baja expresión: colon transversal > retrofaríngeo (Figura 13).

Se observó que todos los tejidos expresan PPAR γ y existe una tendencia de mayor expresión en leucocitos de LBA y en células no adherentes (NA), como los ganglios y el bazo. La separación de poblaciones provenientes de pulmón permitió obtener muestras con poblaciones enriquecidas en macrófagos por el método de obtención del lavado bronquioalveolar (muestras enriquecidas >90%) y una muestra de poblaciones enriquecidas en linfocitos B, T y células dendríticas en el tejido pulmonar por el tratado con el método de Ficoll y adherencia en placa. Se conoce que ambas poblaciones por sus funciones expresan elevadamente PPAR γ (macrófagos y células dendríticas)

El bazo y los ganglios linfáticos se maceraron en malla, donde se retiraron las células epiteliales, más los filtrados, que se trataron con el buffer de lisis de eritrocitos. Esto permitió aislar las poblaciones de leucocitos, relativamente puras. Las poblaciones celulares obtenidas son mezclas de poblaciones leucocitarias, pues no se encuentran enriquecidas en alguna población en especial. Sin embargo se observa que la expresión de PPAR γ también es elevada.

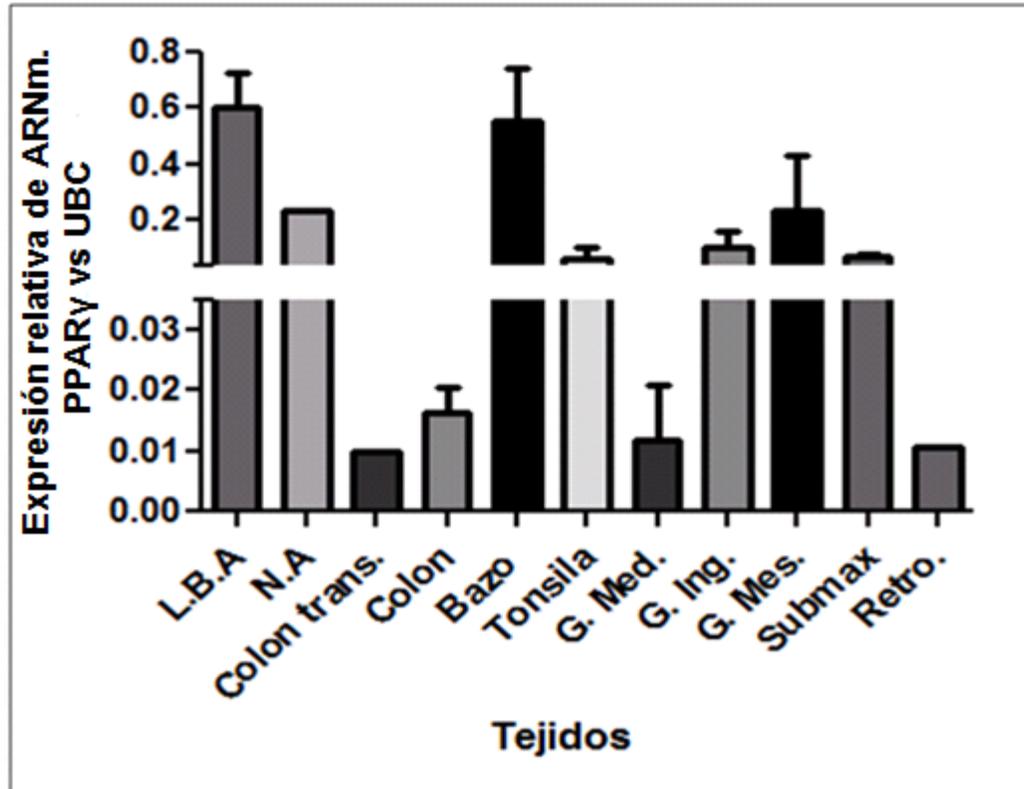


Figura 13. Expresión relativa de PPAR γ en tejidos linfoides. Expresión de ARNm de PPAR γ en leucocitos de tejidos linfoides de cerdo (n=3). LBA (macrófagos alveolares de pulmón del lavado bronquioalveolar), NA (células de pulmón no adherentes), colon transverso, colon ascendente, ganglio mediastínico, ganglio inguinal, ganglio mesentérico, bazo, tonsila, ganglio submaxilar y ganglio retrofaríngeo. Se empleó LBA como control positivo de la expresión.

Cuantificación relativa de PPAR γ en tejidos similares

Se realizaron análisis de expresión para la expresión relativa de PPAR γ de los tejidos pertenecientes a la misma naturaleza y realizar una comparación más detallada del nivel de expresión. Los análisis realizados se dispusieron de la siguiente forma: 1) LBA vs NA por ser poblaciones enriquecidas; 2) bazo vs colon y 3) ganglios vs ganglios. En el primer análisis, se observó que las muestras de LBA expresan tres veces más PPAR γ que las NA, coincidiendo con los estudios de Chawla y colaboradores (2001). Probablemente esta diferencia de expresión se atribuya a la gran participación que tienen los macrófagos en la homeóstasis lipídica, siendo el PPAR γ el principal orquestador del proceso (Figura 14). Sin embargo la expresión de PPAR γ en células no adherentes de pulmón también es de las mayores registradas en todas las muestras, debido a que el PPAR γ en células dendríticas también tiene participación en metabolismo de lípidos y en la expresión de receptores asociados al transporte de antígenos que pueden ser de carácter lipídico o migración (Széles y cols, 2007).

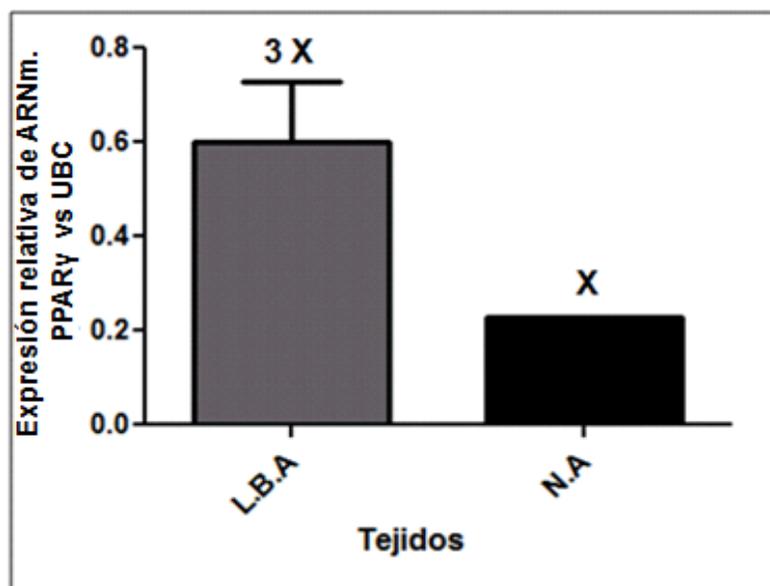


Figura 14. Expresión de PPAR γ en LBA y NA. Expresión relativa de Ct para el RNA total perteneciente a las muestras de LBA (macrófagos alveolares de pulmón) y NA (células no adherentes de pulmón).

En el segundo análisis se agruparon bazo y colon, observándose una diferencia muy marcada en los niveles de expresión. El bazo expresa diez veces más PPAR γ que la tonsila, la cual fue la segunda muestra de mayor expresión. También comparado con colon ascendente, el bazo expresa 32 veces más, mientras que en comparación con colon transverso, en el bazo es 55 veces mayor la expresión (Figura 15). Estos resultados coinciden con lo publicado por Lemberger y cols. (1996), de expresión de PPAR en diversos tejidos de ratón Sprague-Dawley, pues obtuvieron una fuerte expresión de PPAR γ en bazo y menor en colon, como lo encontrado en este estudio.

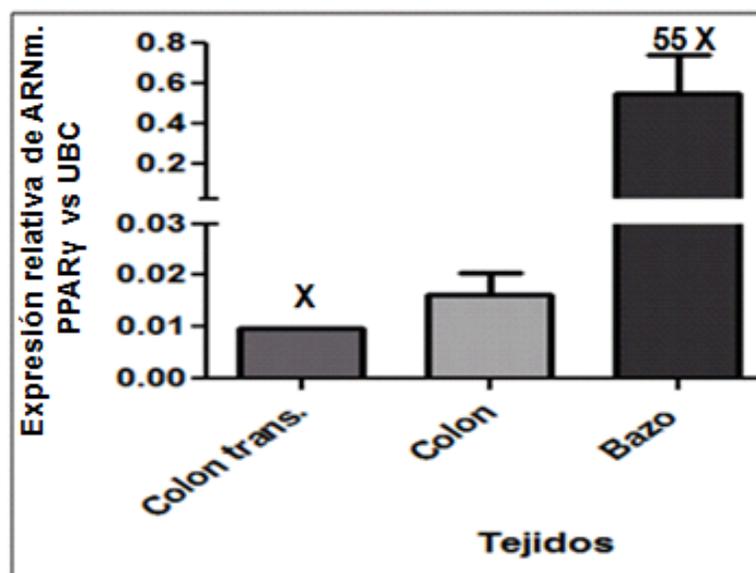


Figura 15. Expresión de PPAR γ en colon y bazo. Incremento relativo de la expresión de PPAR γ en leucocitos de bazo, colon ascendente y colon transverso.

También está elevada expresión en bazo, coincidiendo con el trabajo de Liu y colaboradores en el 2008, pues al cuantificar la expresión de PPAR γ basal y después de un reto inmunológico con LPS, observaron una expresión diferencial entre órganos linfoides obteniendo para el nivel basal un orden de expresión de bazo>timo>ganglio mesentérico>leucocitos de sangre periférica.

La expresión elevada de PPAR γ en bazo se asocia con las funciones inmunes que realiza, y por ser un órgano metabólicamente muy activo. Este órgano lleva a cabo una regeneración de células de la sangre, y mantiene contacto con los antígenos transportados por la misma. En los

folículos primarios y secundarios que alberga, llevándolos a las zonas ricas en linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y macrófagos (Reinhard, 2007).

De colon se midió la expresión en dos secciones, se observa que la expresión en colon ascendente o proximal es 1.7 veces mayor que en la de colon transverso, con lo que concuerda con el trabajo de Su y colaboradores en el 2007, donde obtuvieron que el colon proximal expresa tres veces más PPAR γ que en colon distal. Estos autores, mediante microarreglos y RT-PCR, clasificaron la función de los genes activados por PPAR γ en colon proximal y distal en ratones, empleando como agonista el compuesto RS5444. Encontraron que los principales genes diana que se activaban se relacionaban con metabolismo, señalización y adhesión. Con respecto a la distribución en colon, observaron por métodos inmunohistoquímicos que el PPAR γ se expresa en todas las células de las criptas proximales de colon de una manera moderada, incrementándose en colon proximal.

El colon es parte del sistema de mucosas más grande del organismo que alberga una gran cantidad de células del sistema inmune. Además está en contacto constante con la microbiota, siendo en esta región la más colonizada por microorganismos simbiotes. La función del sistema de mucosas es servir de barrera contra el ingreso de patógenos y mantener la homeostasis en este ambiente. (Higgins, 1999). Posiblemente exista mayor expresión en el colon ascendente, debido a que en esta región hay una mayor diversidad de bacterias que en las siguientes secciones. En tonsila la expresión de PPAR γ es tres veces mayor que en colon ascendente, pues las tonsilas cumplen con funciones cien por ciento inmunológicas y están estratégicamente colocadas sublingualmente y alrededor de la garganta. Por lo que hacen frente a antígenos de las vías nasofaríngeas. La población se compone de linfocitos T y es rica en linfocitos B, productores de inmunoglobulinas (Zuccolo y cols, 2009).

En el último análisis se incluyeron las muestras de los ganglios para comparar el nivel de expresión (Figura 16). Los ganglios se pueden encontrar en regiones superficiales, como cuello, axila, ingles, mediastino y cavidad abdominal, o profundas como mucosas respiratoria, digestiva y genitourinaria (Reinhard, 2007). A su vez su población está dividida en una región de linfocitos T, una región de linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos. También existen células dendríticas interdigitantes que expresan MHC de clase II (Yang y Chaplin, 1999). Se observa que el de mayor expresión es el ganglio mesentérico, en el cual el PPAR γ se expresa 23 veces más, que en el retrofaríngeo de menor expresión.

Las diferencias son notorias en la expresión elevada de mesentérico, inguinal y submaxilar y tonsila, comparados con la de retrofaríngeo y mediastínico. La expresión mayor en bazo y menor en ganglio mesentérico coincide con lo obtenido por Liu y colaboradores en el 2008. Sin embargo en ese estudio no se incluyeron ganglios de otras regiones anatómicas. La asociación de la expresión mucho más elevada en ganglio mesentérico puede deberse a que es la región que se encuentra en el área gastrointestinal y tiene contacto recurrente con antígenos de la región intestinal. Algo similar se observó en el ganglio inguinal donde no se esperaría tan alta expresión. Sin embargo fue el segundo ganglio con nivel elevado de expresión y puede deberse al contacto con patógenos de la zona genitourinaria. El ganglio submaxilar expresa también elevadamente PPAR γ , pues tiene contacto con los antígenos que ingresan por la vía oral, y se encuentran dispuestos a realizar respuestas inmunes rápidas. Por ser una de las vías más inmediatas de entrada de antígenos, se encuentran dispuestas poblaciones de linfocitos B y T (Zuccolo y cols, 2009). Los ganglios mediastínico y retrofaríngeo tuvieron la menor expresión comparado con los otros ganglios.

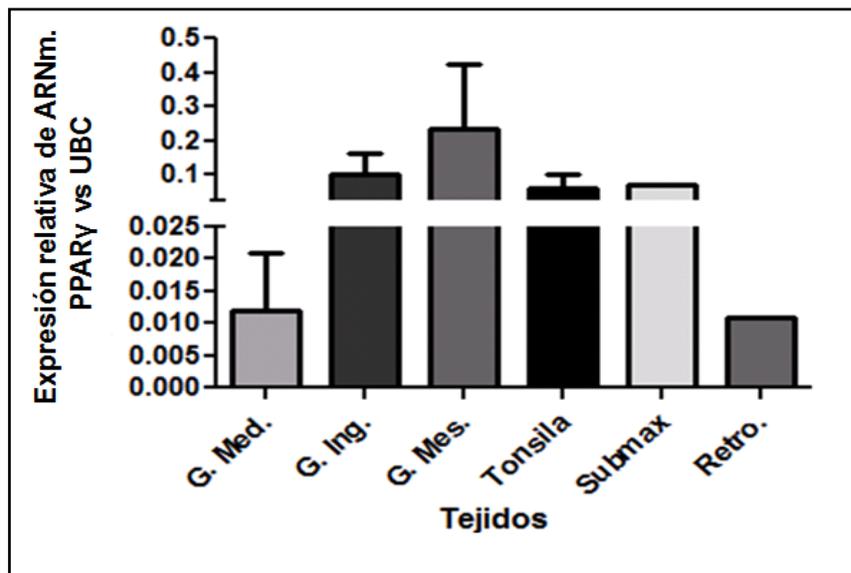


Figura 16. Expresión de PPAR γ en ganglios linfáticos. Expresión relativa de PPAR γ vs UBC en las muestras de ganglios, mediastínico, inguinal, mesentérico, submaxilar y retrofaríngeo.

CONCLUSIÓN

El PPAR γ se expresa de manera diferencial en los leucocitos de los órganos linfoides de cerdo. Esto puede relacionarse con la ubicación del tejido de procedencia, las células y el estado de activación de la respuesta inmune presente en el tejido.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados generados, se propone realizar lo siguiente:

- Realizar un análisis más fino de separación celular, para observar la expresión diferencial a nivel de subpoblaciones.
- Aumentar el tamaño de muestra para observar la variabilidad intrapoblacional.
- Evaluar la producción de proteína para conocer si coincide con los niveles de transcritos observados en las poblaciones leucocitarias de cada tejido.

BIBLIOGRAFÍA

Binns RM, Pabst R, 1994. Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43: 79-87.

Bogacka I, Bogackith M, 2011. Quantitative Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) Genes in Porcine Endometrium Through the Estrous Cycle and Early Pregnancy. *J. Physiol. Pharmacol.* 62:559-565.

Bugge A, Mandrup S, 2010. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res*, vol. 2010, Article ID 169506, 12 pages, 2010. doi:10.1155/2010/169506.

Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans R, 2001. PPAR gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation, *Nat. Med.* 7: 48–52.

Diab A, Deng C, Smith J, Hussain R, Phanavanh B, Lovett-Racke A, Drew P, Racke M, 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 168: 2508–2515.

Ding ST, Schinckel AP, Weber TE, Mersmann HJ, 2000. Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. *J. Anim. Sci.* 78: 2127–2134.

Escher P, Wahli W, 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat. Res.* 448: 121–138.

Higgins LM, Frankel G, Douce G, Dougan G, MacDonald TT, 1999. *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 67: 3031–3039.

Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJB, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland N G, Bell DR, 1995. Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur. J. Biochem.* 233: 219-226.

Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, et al., 1992. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today.* 13:219–24.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA, 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *JBC.* 22:12953-12956.

Lemberger T, et al., 1996. PPAR Tissue Distribution and Interactions with Other Hormone-Signaling Pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804:231-51.

Lemberger T, et al., 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 335-63

Liebler-Tenorio EM, Pabst R, 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* 37: 257–80.

Liu Y, et al., 2008. Increased expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the immune system of weaned pigs after *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15;124(1-2):82-92.

Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM, 2002. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J. Immunol.* 169:5-9.

Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD, 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells, *J. Immunol.* 164: 6503–6508.

Meng H, Li H, Wang XY, 2004. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding PPAR from goose. *Yi Chuan.* 26:469-72.

Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini R, Wahli W, 2002. PPAR expression and function during vertebrate development. *Int. J. Dev. Biol.* 46:105-14.

Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D, 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol. Rev.* 371–385.

Muller G, Lipp M, 2003. Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 217-224.

Randall T, Carragher D, Moreno J, 2008. Development of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 26:627-650.

Rangwala SM, Lazar MA, 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends. Pharmacol. Sci.* 25: 331–336.

Reinhard P, 2007. Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs what are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunol. Lett.* 112:8.

Remels AHV, et al., 2009. PPAR γ inhibits NF- κ B-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:E174-E183.

Ricotte M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK, 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* 391: 82-86.

Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG, 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 403: 103–108.

Su W, Bush CR, Necela BM, Calcagno SR, Murray NR, Alan PF, E. A. Thompson, 2007. Differential expression, distribution, and function of PPAR in the proximal and distal colon. *Physiol. Genomics* 30:342-353.

Sundvold H, Grindflek E, Lien S, 2001. Tissue distribution of porcine peroxisome proliferators-activated receptor α : detection of an alternatively spliced mRNA. *Gene* 273:105–113.

Széles L, Torocsik D, Nagy L, 2007. PPAR- γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim. Biophysica.* 1771:1014-1030.

Tizard I, 2004. *Veterinary Immunology: An introduction.* Seventh edition. Texas. Saunders p. 84-88.

Tontonoz P, Spiegelman BM, 2008. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR. *Annu. Rev. Biochem.* 77:289–312.

Tugwood JD, Aldridge TC, Lambe KG, McDonald N, Woodyatt NJ, 1996. Peroxisome Proliferator-activated Receptors: Structures and Function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804:252-65.

von Andrian UH, Mempel T, 2003. Homing and Cellular Traffic in Lymph Nodes. *Nat. Rev. Immunol* 3: 867-878.

Yang F, Chaplin D, 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17:399-433.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W, 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput. Biol.* 7(1-2):203-14.

Zuccolo J, Unruh T, Deans J, 2009. Efficient isolation of highly purified tonsil B lymphocytes using RosetteSep with allogeneic human red blood cells. *BMC Immunology* 10:30.