

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA**

**DESARROLLO DE UNA VACUNA PREVENTIVA
CONTRA EL VIH, BASADA EN BCG
RECOMBINANTE**

**TESIS DOCTORAL: ELIAS B. PEZZAT SAID
21 DE JUNIO DE 2005**

IV. RESULTADOS

Resultados

IV-1 DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN: pMV261:HIV-1gp120, pJH222:HIV-1gp120 y pJH223:HIV-1gp120

El fragmento de ADN, que codifica la proteína entera de la envoltura del VIH-1 denominada gp120 de la cepa HXBc2 (1578pb), se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa una banda de 1578 pb, correspondiente al fragmento de ADN en estudio (figura 1). El fragmento de ADN resultante previa extracción y purificación a partir del gel de electroforesis, fue digerido con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, para clonarlo en el plásmido pMV261 (4488pb), digerido también con las mismas enzimas de restricción (figura 2). Una vez purificados los fragmentos de ADN correspondientes al vector y al inserto, se procedió a la ligación enzimática de ambos (figura 2). El inserto de ADN se clonó en el vector pMV261, bajo el control del promotor de BCG denominado heat shock protein (hsp60). El ADN plasmídico que contiene el gen gp120 VIH-1 fue cedido por **N.Letvin** y el ADN plasmídico parental de los diferentes vectores de expresión micobacteriano fue cedido por **B. Bloom y W. Jacob**,

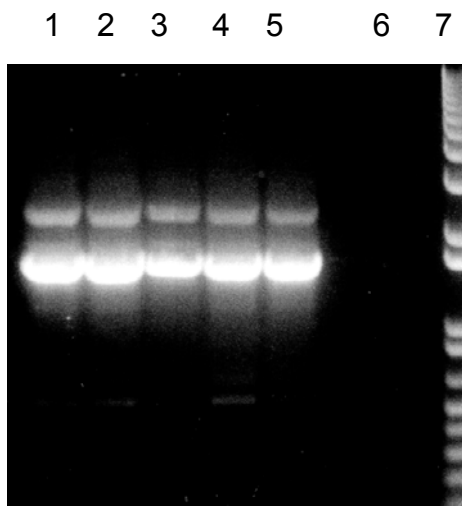


Figura 1. PCR ADN inserto, HIV-1gp120 (1578 pb) carriles: 1-5, 6 control (-) y 7 maracador de peso (DNA ladder)

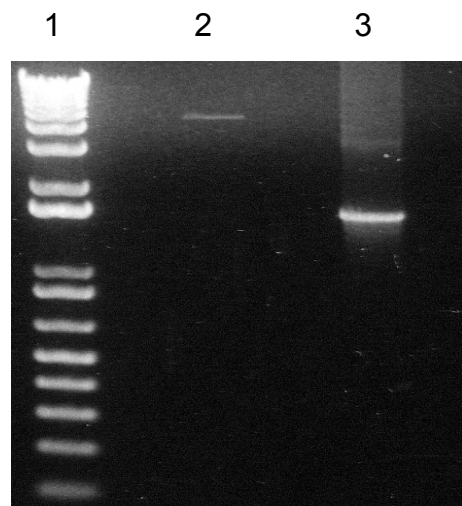


Figura 2. Digestión vector-inserto, carriles: 1 marcador de peso, 2 vector pMV261, 3 inserto HIV-1gp120 con enzimas (HindIII/Bamchl), 4480 pb y 1578 pb respectivamente, control para ligar.

Resultados

Los vectores pJH222:VIH-1gp120 y pJH223:VIH-1 se construyeron siguiendo la misma metodología, pero en la PCR del fragmento del ADN heterólogo o inserto, se crearon diferentes sitios de restricción, específicos para cada vector de expresión (tabla 1)

Vector	sitios de restricción
pMV261	(4480 pb): HindIII(4346) / BamHI(4326)
pJH222	(6423 pb): HindIII(335) / PstI(341)
pJH223	(6313 pb): HindIII / HindIII(2134)

tabla 1. Vectores de expresión con los sitios de restricción creados, para la clonación de ADN heterólogo.

IV-2 TRANSFORMACIÓN DE *E.coli* CON EL ADN PLASMÍDICO CORRESPONDIENTE A LOS VECTORES MICOBACTERIANOS DE EXPRESIÓN 261:HIV-1gp120, 222:HIV-1gp120 Y 223:HIV-1gp120

Se transformaron las células *E.coli* JM109 termocompetentes, con los diferentes vectores de expresión micobacteriano. Enseguida cultivamos las bacterias transformadas y se picaron varias de las colonias seleccionadas por su resistencia a la kanamicina. Se extrajo el ADN plasmídico por la técnica miniprep (QIAGEN), para confirmar la presencia del ADN inserto (1578pb). Realizamos la digestión del ADN plasmídico con las enzimas de restricción usadas en la clonación del ADN inserto para cada vector de expresión (tabla 1). El ADN plasmídico digerido lo analizamos por electroforesis en un gel de agarosa para detectar la presencia del ADN inserto en las clonas evaluadas (figura 3).

Resultados

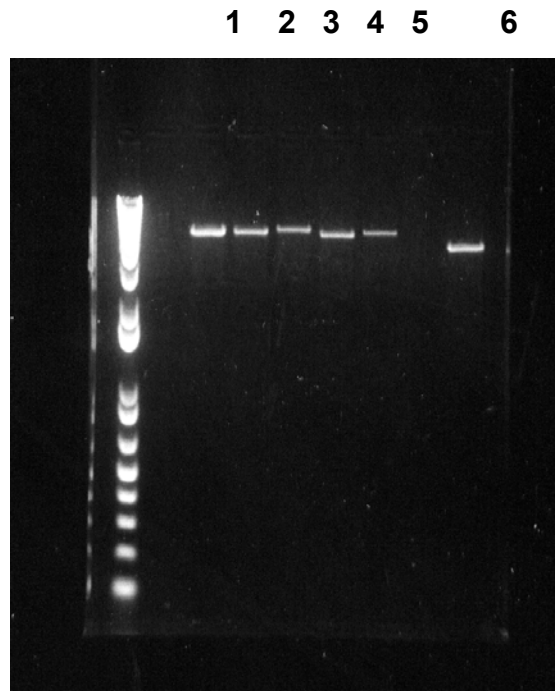


Figura 3. Digestión enzimática ADN 261:FIHIV-1gp120 (plasmido+inserto) de miniprep, digerido con *Ban*h I, carriles 1-5 (6038 pb), ADN 261(solo plasmido) digerido con la misma enzima (4488 pb) carril, notese diferencia de bandas que confirman la transformación de *E.coli*.

IV-3 Confirmación de la clonación del ADN codificante de gp120 del VIH-1, en los diferentes vectores de expresión micobacterianos pMV261, pJH222 y pJH223.

Extrajimos el ADN plasmídico de las cepas de *E.coli*, que contenían el vector más el inserto heterólogo, a partir de células cultivadas en 100 ml de medio LB líquido, suplementado con kanamicina. Realizamos la extracción del ADN plasmídico maxiprep (QIAGEN anexos) para obtener mayor cantidad del mismo (300-500 ug). Obtenido el ADN plasmídico, realizamos la digestión seriada con distintas enzimas de restricción específicas (figuras 4,5 y 6) suficientes para confirmar definitivamente la presencia del vector correspondiente (261,222 o 223) y el fragmento de ADN del gen HIV-1gp120 (1578 pb). En todos los casos se confirmó correctamente mediante electroforesis en gel de agarosa, los diferentes patrones de restricción enzimática correspondientes a la clonación del gen VIH-1gp120 en los distintos vectores de expresión.

Resultados

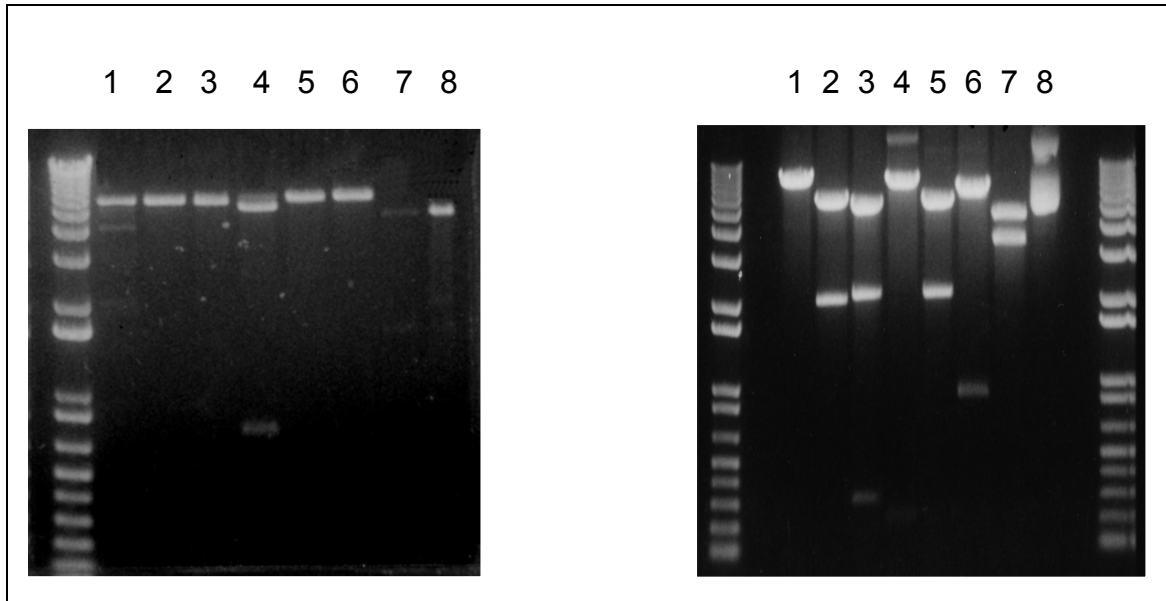


Figura 4. ADN maxiprep pMV261:HIV-1gp120 digestión seriada con diferentes enzimas de restricción (1.PvuII, 2. HpaI, 3 KpnI, 4. NheI, 5. Sall 6. NdeI, 7.HindIII y 8. vector/BamHI) para confirmar la clonación y de transformar BCGwt.

Figura 5. ADN maxiprep pJH222:HIV-1gp120 digestión seriada con diferentes enzimas de restricción (1.BamchI, 2.HpaI, 3.KpnI, 4.NdeI, 5.Xb-al, 6.ApaI, 7.EcoRI y 8.vector sin digerir) para confirmar la clonación y transformar BCGIsA-

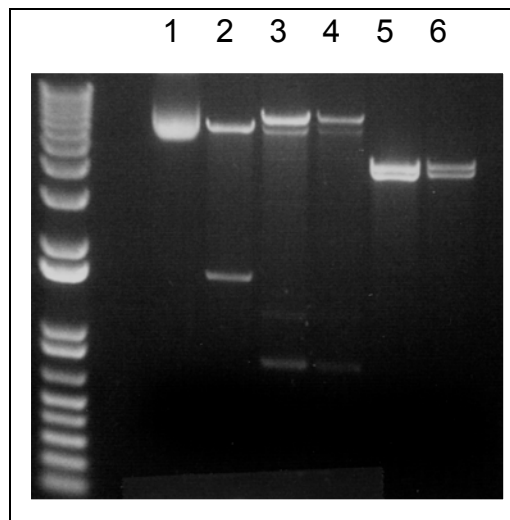


Figura 6. ADN maxiprep pJH223: HIV-1gp120 digestión seriada con diferentes enzimas de restricción (1.vector sin digerir, 2.Hindi, 3-4.PvuII, 5-6. HpaI) para confirmar clonación antes de transformar BCGIsA-

IV-4 Confirmación del marco de lectura del gen que codifica la proteína entera gp120 del VIH-1 (HXBc2)

Después de confirmar la presencia de ADN plasmídico correspondiente a los distintos vectores de expresión en las clonas de *E.coli*, procedimos a verificar que en las construcciones 261, 222 y 223 el inserto del ADN codificantes de **VIH-1gp120**, estuviera correctamente clonado. Para esto secuenciamos el ADN correspondiente al fragmento a partir del codon de iniciación ATG del gen hsp60 de BCG. Confirmando que el fragmento de ADN del gen gp120 del VIH-1, mantenía el marco de lectura correcto, para la expresión de la proteína gp120 del VIH-1.

IV-5 Transformación de BCG, con el ADN plasmídico de los diferentes vectores de expresión 261:HIV-1gp120, 222:HIV-1gp120 y 223:HIV-1gp120

Para la transformación se usaron células electrocompetentes de BCG (cepa salvaje) para el vector pMV261 y BCGLisA- (cepa auxotróficas) para los vectores pJH 222 y 223. La transformación se realizó por electroporación y posteriormente se cultivaron en medio líquido 7H9GAT. Seleccionamos por su resistencia a la kanamicina las cepas recombinantes en medio 7H10 GATK agar, de acuerdo a los protocolos (anexos pag. 131). El crecimiento de colonias de BCG fue más lento de lo habitual para micobacterias, en el caso de las cepas de BCG salvaje y el vector pMV261. Nos llamo la atención la baja eficiencia transformadora, que se evidencio por las pocas y pequeñas colonias de cepas recombinantes desarrolladas en el medio 7H10. El lento crecimiento de esta cepa, posiblemente se asocie al tamaño del propio ADN inserto, a la toxicidad de la proteína que expresa o posiblemente tambien el tipo de promotor usado, en este caso hsp60 del vector 261, se asocie con inestabilidad. Por el contrario la eficiencia transformadora para el caso de las cepas de BCGLis-, transformadas con los vectores de expresión pJH222 y pJH223, fue notablemente mayor permitiendo el crecimiento normal de las cepas transformadas de BCGLis- auxotróficas.

IV-6 Confirmación de la presencia del inserto FLHIV-1gp120 en las distintas cepas de BCGr

Para confirmar la presencia y estabilidad del ADN plasmídico correspondiente al vector de expresión pMV261:HIV-1gp120, se realizó un análisis por PCR usando como templado el ADN plasmídico extraído de las micobacterias. Al realizar el examen por electroforesis del ADN amplificado en dicha PCR detectamos una diferencia de tamaño en las bandas al comparar este ADN plasmídico con el control positivo, representado por la PCR del plásmido original antes de transformarse en BCG (figura 7).

Este hecho nos hizo pensar inicialmente en una posible mutación del fragmento de ADN heterólogo, por reajuste genético en algunas de las cepas evaluadas. Posteriormente analizamos por PCR 14 colonias más de BCGr:261VIH-1gp120, para demostrar si se reproducía el mismo fenómeno (figura 8). Al observar el gel confirmamos que se repite el patrón electroforético del ADN de las cepas evaluadas. Dicho fenómeno genético no se observó en el análisis electroforético del ADN/PCR de las cepas BCGlis- auxotróficas transformadas con las construcciones 222:HIV-1gp120 y 223:HIV-1gp120. En este caso el patrón electroforético fue igual al control (+) original. Por lo tanto se confirmó la estabilidad del ADN plasmídico cuando es transformado en estas cepas, (PCR BCGr261, BCGr 222 y 223, figura 9).

Resultados

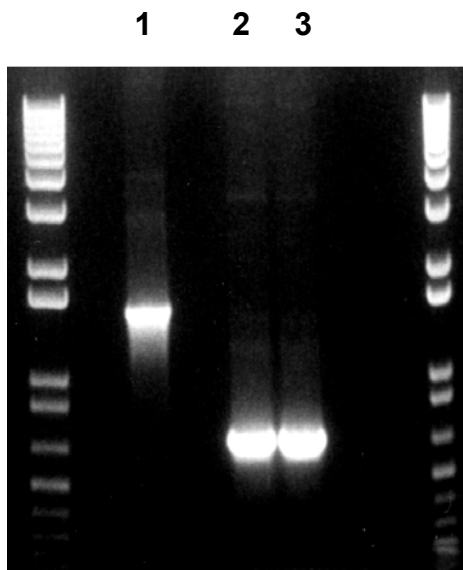


Figura 7 . carril carril 1 DNA del inserto clonado, como control positivo y carriles 2-3 DNA miniprep de BCGr:261HIV-1gp120, delecionado aproximadamente (900pb) notese diferencia con las --- bandas del templado original de 1578 bps

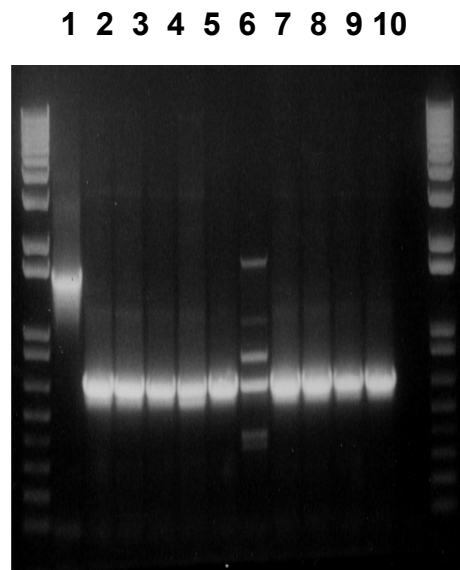


Figura 8. Carril 1 ADN del inserto clonado control positivo de PCR ADN miniprep de cultivos, carriles 2-10 BCGr:261HIV-1gp120, se repite el fenomeno anterior, 1578 y 900 pb respectivamente, extremos ADN ladder (marcador)

Para la caracterización genética de este reajuste genético, diseñamos los siguientes experimentos:

1. PCR inserto ADN heterólogo, antes y después de transformar BCG con el ADN plasmídico de los diferentes vectores. 261:HIV-1gp120, 222:HIV-1gp120 y 223:HIV-1gp120. como se observa en la figura 9, en el caso del vector pMV261:HIV-1gp120, se observa la deleción del ADN heterólogo después transformar BCG (cepa salvaje), en dicho plásmido. En cambio cuando se transformo BCG lisina autotrófica con los vectores pJH222:VIH-1gp120 y pJH223:VIH-1gp120 no se observo dicho reajuste genético, ver (figura 9).

Resultados

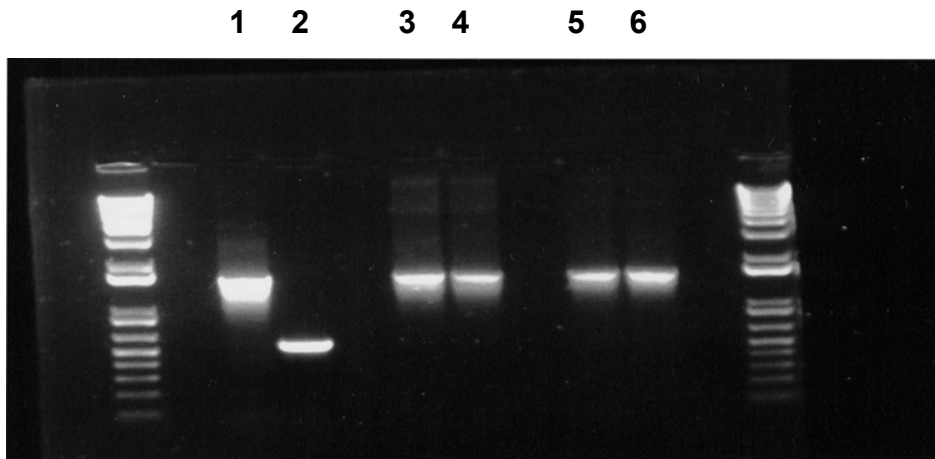


Figura 9. PCR ADN-maxiprep/cultivos de BCGr: carriles 1-2 PCR del ADN inserto FLHIV-1gp120 1578 pb, (control+) de maxiprep 261:FL y BCGr:261 (900 pb deleción) por reacomodo genético ver diferencia de bandas , carriles 3-4 de maxiprep 222-FL y BCGr:222, carriles 5-6 de maxiprep 223:FL y BCGr 223, que conservan integro el inserto, extremos ADN ladder (marcador).

2. Digestión enzimática del vector pMV261 con el inserto de ADN heterólogo, antes y después de transformar BCG (cepa salvaje) con dicho plásmido. También se realizó la digestión enzimática del vector pJH222:HIV-1gp120 antes y después de transformar BCG lisina auxotrófica con dichos plásmidos. Como se observa en la figura 10 el patrón enzimático es igual antes y después de transformar BCG (cepa salvaje) con pMV261 cuando no contenía el inserto de ADN heterólogo . En cambio cuando existía un reajuste genético no se observó el mismo patrón enzimático de restricción antes y después de transformar BCG (cepa salvaje) con pMV261:VIH-1gp120.

Por otra parte, no se detectó ninguna diferencia en el patrón enzimático de restricción en el caso pJH222:VIH-1gp120 (cepa BCG lisina auxotrófica), ver (figura 10).

Resultados

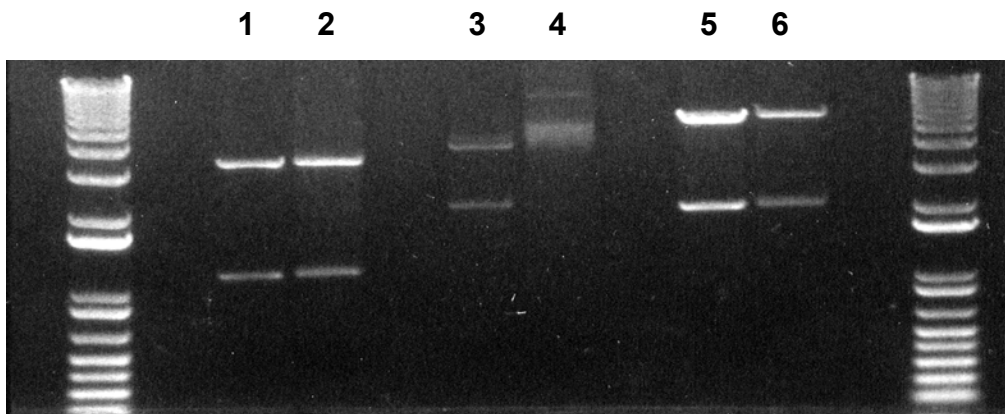


Figura 10. Digestión del ADN plasmídico, pre y post transformación: carriles 1 (maxiprep pMV261) y 2 (miniprep pMV261 de BCGwt/E.coli) con Bgl II, carriles 3 (maxiprep pMV261-FLHIV-1gp120 clonado) y 4 (miniprep pMV261-FLHIV-1 de BCGr) con Sac II, carriles 5 (maxiprep pJH222-FLHIV-1gp120) y 6 (miniprep pJH222-FLHIV-1gp120 de BCGlisA-r).

Notese banda extraña de ADN en carril 4, sin digerir como consecuencia de la deleción que elimina la diana de SacII, extremos (ADN marcador).

Ante las evidencias observadas de toxicidad de la proteína heteróloga gp120 en BCGr:261 que condicionó el reajuste genético y la deleción del gen gp120 del VIH-1, decidimos caracterizar genéticamente este fenómeno y para ello secuenciamos los fragmentos de ADN delecionados de las 10 colonias de BCG mutantes.

IV-7 Caracterización y secuenciación del gen HIV-1gp120

Diseñamos ocho primers (iniciadores), para la secuenciación del fragmento delecionado del gen VIH-1gp120, en cada una de las 10 cepas de BCG mutantes. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias del fragmento ADN delecionado de las 10 colonias de BCGr y se compararon con la secuencia de nucleótidos del gen gp120 del VIH-1 (ver esquema inferior).

Resultados

```
catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gatttataaa tgtaataata agacgttcaa tggaacagga ccatgtacaa
atgtcagcac agtacaatgt acacatggaa ttaggccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa
gaagaggtag taattagatc tgtcaatttc atggacaatg ctaaaccat aatagtacag ctgaacacat ctgtagaat
taattgtaca agaccagca acaatacaat aaaaagaatc cgtatccaga gaggaccagg gagagcattt gttacaatgg
gaaaaatagg agatatgaga caagcacatt gtaacattag tagagcaaaa tggaataaca cttaaaaca gatagctagc
aaattaagag aacaatttgg aaataataaa acaataatct ttaagcaatc ctcaggaggg gaccagaaa ttgtaacgca
cagtttaat tgtggagggg aatttttcta ctgtaattca acacaactgt ttaatagtag tgggttaat agtacttga gactgaagg
gtcaaataac actgaaggaa gtgacacaat caccctcca tgcagaataa aacaaattat aaacatgtgg cagaaagtag
gaaaagcaat gtatgccct cccatcagtg gacaaattag atgttcatca aatattacag ggctgctatt aacaagagat
ggtgtaaag gcaacaatga gtccgagatc ttcagacctg gaggaggaga tatgaggac aattggagaa gtgaattata
taaatataaa gtagtaaaaa tgaaccatt aggagtagca cccaccaagg caagagaag agtgggtcag agagaaa
```

Parental:TTTCACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-
TTCTACCC-G TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C1: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C2: TTACACAGGC CTGGCCAAAG GTATCCTTGG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-
G TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C3: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG gAATTCATCtTTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C4: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGGnCTACCC GTACGACGTG

C5: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C6: TTTACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C7: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C8: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCCaG
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C9: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-CTACCC GTACGACGTG

C10: TTACACAGGC CTGTCCAAAG GTATCCTTTG AGCCAATTC-AAG -AATTCATC-TTCTACCC-G
TACGACGTGC CGGACTACGC CGG-NTACCC GCACGACGNG

La secuencia de nucleótidos del fragmento deleciónado corresponde estructuralmente al core de la gp 120 que contiene, 3 sitios de glicosilación y las regiones variables V3, V4 y V5 de la envoltura del VIH. Esta estructura es de gran importancia para su unión con los linfocitos CD4 y posteriormente su infección (figuras a,b y c).

Resultados

Los resultados obtenidos descartaron a la cepa recombinante BCGr:261HIV-1gp120, de los ensayos preclínicos de inmunogenicidad en ratones, debido a que el fragmento de ADN deletado incluía el ADN codificante del péptido 18 (epítipo CTL inmunodominante de la envuelta del VIH-1), en estudio. En las 10 colonias mutantes secuenciadas, el marco de lectura se encontraba intacto desde el codon ATG (comprobado por secuenciación). Esto nos permitió confirmar la expresión de la proteína truncada en una de las BCG mutantes. Por otra parte las secuencias nucleotídicas del gen VIH-1gp120, en las cepas recombinantes de BCGLis- (BCGr:222 y BCGr:223), permanecieron intactas.

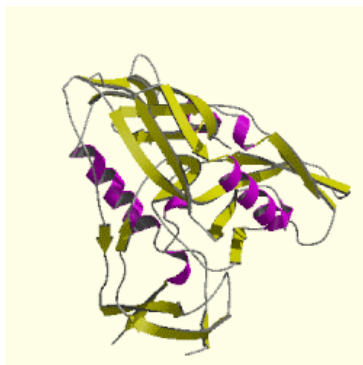


Figura a. Crialización de la estructura correspondiente A los epítopos V3, V4 y V5 de la envoltura del VIH-1 (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/catch>)

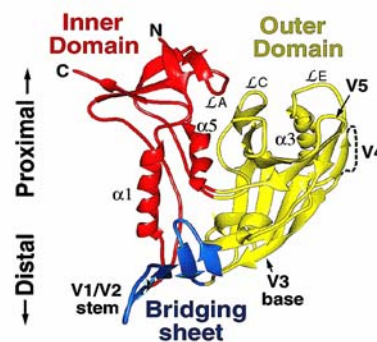


Figura b. Centro de la estructura gp120 señalando en rojo el dominio interno y en amarillo el externo (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/catch>)

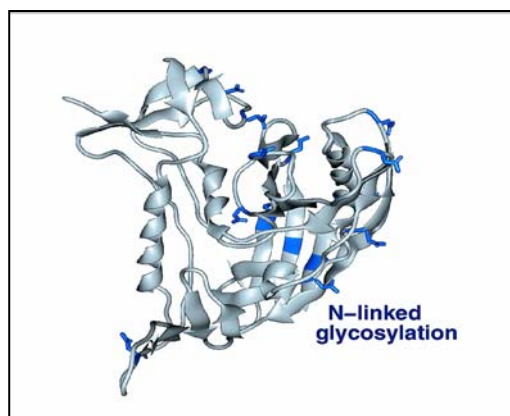


Figura c. Estructura de la gp120 señalando en azul losResiduos de aspargina modificados por la n-glicosilación (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/match>)

Resultados

IV-8 Análisis de la expresión de la proteína gp120 del VIH-1 en las cepas recombinantes de BCG (261 ,222 y 223), por la técnica de Western blot

Los extractos proteícos obtenidos a partir de los cultivos de cada cepa de BCGr, se analizaron por medio de la separación de las muestras en gel de poliacrilamida SDS page y posteriormente procedimos a analizar los extractos proteícos, de los lisados celulares por Western blot. Usamos como control negativo el extracto proteíco proveniente de las cepas salvajes de BCG sin transformar. La expresión de la proteína gp120 del VIH-1, fue confirmada en todas las cepas recombinantes, mediante este ensayo. Como era de esperar en el extracto de BCG (cepa salvaje no recombinante, sin plásmido de expresión micobacteriano), no observamos ninguna banda. En el extracto de la cepa de BCGr:261VIH-1gp120, detectamos una banda de aproximadamente 20 Kda (proteína truncada), En las cepas recombinantes 222 y 223 observamos la banda de una proteína de 67 KDa correspondiente a la gp120 del VIH-1 (figura 11). También se detectaron varias bandas correspondientes a productos de degradación por las proteasas micobacterianas.

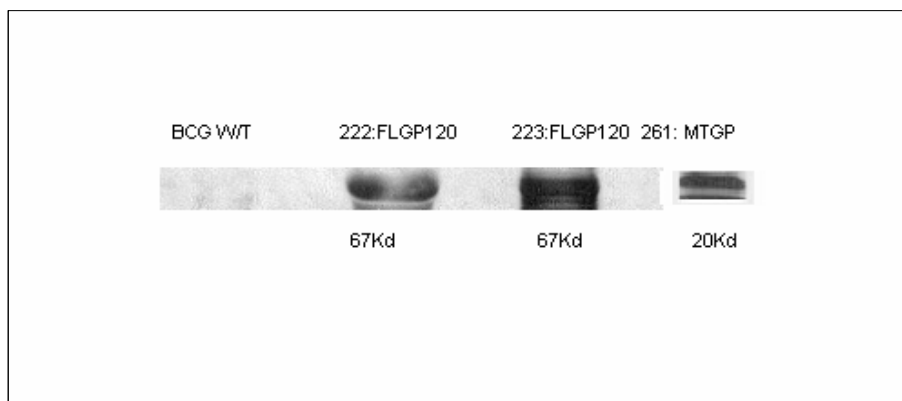


Figura 11. La proteína recombinante gp120 aparece en las construcciones 222 y 223, en cambio en 261, por el reajuste genético y la mutación aparece una proteína truncada de 20 kDa.

Resultados

IV-9 Evaluación *in vivo* de la respuesta inmune celular específica anti VIH, utilizando un modelo animal murino.

En un primer ensayo se inmunizaron 16 ratones, con una dosis de 10^7 ufc de las cepas vacunales BCGwt, BCGr:222VIHA*, BCGr:223VIHA* y 10^6 pfu de VAM:VIHA*, se aplicó una sola inoculación por la vía subcutánea para BCG e intramuscular para VAM:VIHA. A los 15 días se evaluó la respuesta inmune celular T CD8+ específica, frente al VIH-1 mediante la técnica de la tinción de los tetrameros. En todos los ratones inmunizados con las cepas BCGr:222VIHA y BCGr:223VIHA, detectamos células T CD8+, que reconocieron específicamente al péptido p18 presentado por los tetrameros. Esta respuesta fue de igual magnitud que la detectada en los ratones inmunizados con el VAM:VIHA (figura 12).

Resultados

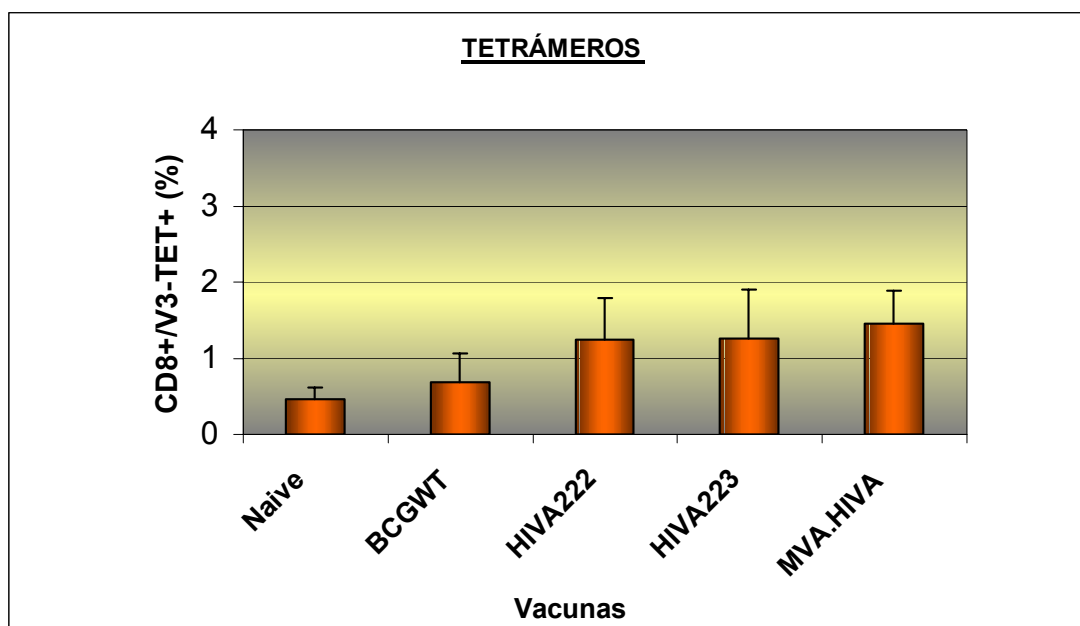


Figura 12. Respuesta de células T (24-48 hrs), en las muestras de células de bazo provenientes de ratones inmunizados con las vacunas BCGr:HIVA.222 y BCGr:HIVA.223 respondieron al péptido P18 versus la vacuna VAM (control positivo biológico) por medio de los tetrámeros en fresco.

En un segundo ensayo y siguiendo el régimen inducción-refuerzo, evaluamos la respuesta inmune celular específica frente al VIH-1 en 13 ratones, inmunizados con 10^7 cfu de cada una de las cepas vacunales (BCGcs, BCGr:222VIHA, BCGr:VIHA), vía subcutánea y a los 15 días con una dosis de refuerzo de 10^6 ufp de (VAM:VIHA), vía intramuscular. El análisis de la respuesta inmune celular específica frente al VIH-1 se realizó a los 15 días después de la dosis de refuerzo con VAM:VIHA y se efectuó mediante la técnica de tinción intracelular de IFN- γ . Los esplenocitos de los ratones vacunados con la cepa experimental BCG:222.VIHA, reforzada con el VAM:VIHA, respondieron con la producción de IFN-g al estímulo del péptido p18, mientras que las muestras de los ratones vacunados con la cepa BCG:223.VIHA, no respondió al estímulo del péptido p18 (figura 13)

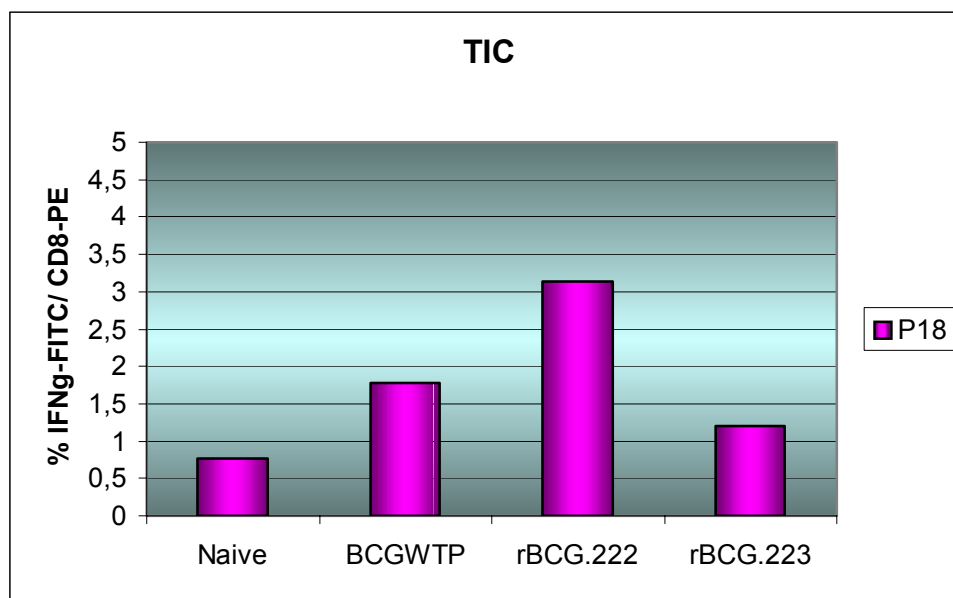


Figura 13: Detección de IFN- γ , la respuesta fue positiva en las células provenientes de los ratones inmunizados con la vacuna BCGr:222 y VAM como refuerzo por tinción intracelular de citocinas), no así para la vacuna BCGr:223 y VAM.

IV-10 Detección del ARNm de IFN- γ de ratón mediante RT-PCR

Debido a la dificultad para diferenciar la producción del IFN- γ , usando la técnica del Elispot, decidimos poner en marcha un método de análisis más sensible para la determinación de IFN- γ , específico frente al VIH, mediante la evaluación de la expresión génica de ARNm del IFN- γ , de ratón por la técnica de RT-PCR. En un primer ensayo, inmunizamos ratones con VAM:VIHA, posteriormente cultivamos sus esplenocitos y extrajimos el ARN total, transcribimos a ADNc y por ultimo amplificamos este ADN por PCR con primers específicos del IFN- γ , de ratón. Al evaluar este ADN por electroforesis, observamos la banda correspondiente al fragmento ADN de IFN- γ , en el gel de agarosa de todos los tubos de la PCR, incluidos los del ARN proveniente de los esplenocitos de ratones ratones sin inmunizar. Y estimulados solo con el medio de cultivo de este ensayo como muestra la (figura14). Estos falsos positivos, posiblemente obedecen a la misma inespecificidad de la producción del IFN- γ y a la variedad de células con diferente estado de activación del órgano de donde se obtuvieron en este caso del bazo de los ratones estudiados.

Resultados

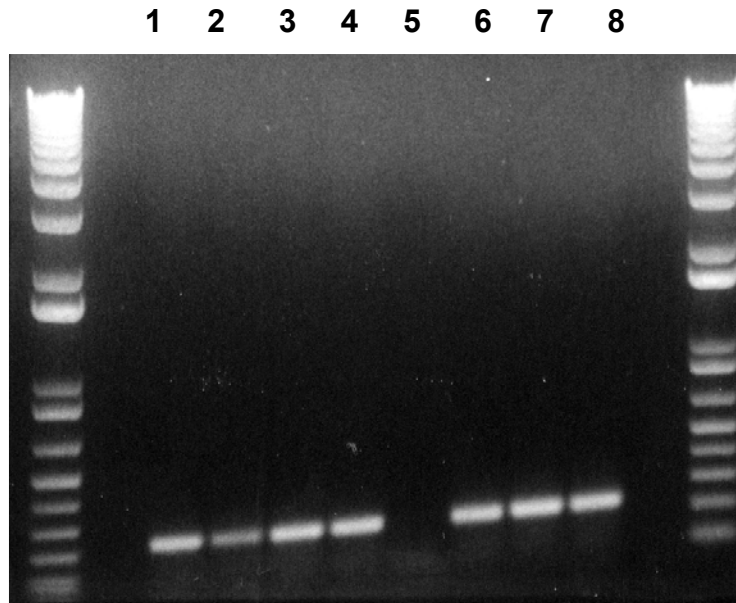


Figura 14 : PCR ADN/IFN- γ a partir de diferentes ratones; carriles 1,2 ec naive + medio; 3,4 ec naive+ ConA control positivo; 5 control negativo PCR; 6,7 ec inmunizados con VAM + medio/ConA control positivo y 8 ec inmunizados con VAM + p18, notese bandas semejantes de ADN en todos los casos, excepto carril 5 control negativo de la PCR, extremos ADN ladder marcador. (ec: esplenocitos, ConA: concanavalina A)

En un segundo ensayo, analizamos la expresión de ARNm del IFN- γ , en las células de los ganglios linfáticos mesentéricos, provenientes de ratones sin inmunizar. Por medio del análisis electroforético en gel de agarosa, del ADN del IFN- γ , observamos las bandas esperadas de dicho ADN en los carriles provenientes de las células estimuladas con ConA, También observamos por medio de este análisis la banda correspondiente al ADN IFN- γ , en los carriles con las muestras provenientes de esplenocitos en las mismas condiciones. Como era esperado la banda no se detectó en el carril correspondiente a la muestra de linfocitos solo con medio de cultivo (figura 15).

Resultados

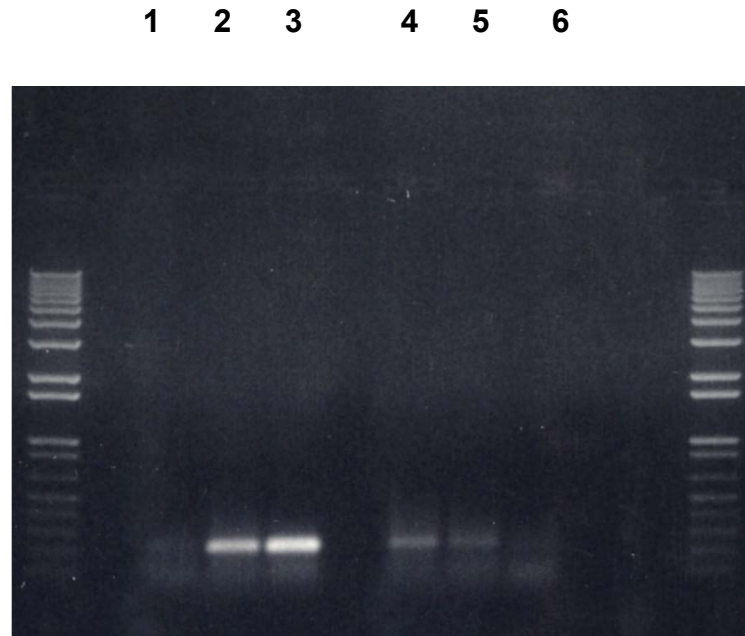


Figura 15 : RT-PCR para detección IFN- γ ; carril 1 linf + medio control negativo; carriles 2 y 3 ec + ConA 72 /120 hrs; carriles 4 y 5 linf + ConA 72/120 hrs, por ultimo el carril 6 control negativo de la PCR, notesé la diferencia entre las bandas de ADN de ec y linf., extremos ADN marcador.