

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Muestras de tejido tímico y tejido control.

Las muestras de tejido tímico normal utilizadas en esta tesis se obtuvieron en el curso de intervenciones quirúrgicas de pacientes con anomalía cardíaca congénita en el servicio de cardiología de la Residencia Vall d'Hebró. Las muestras de timos patológicos se obtuvieron de pacientes con MG sometidos a timectomía total, en la Clínica Universitaria de Tübingen (Alemania).

Las muestras de tejido utilizadas como controles fueron esófago, estómago, glándulas suprarrenales, tiroides, hígado y páncreas y se obtuvieron de individuos donantes de órganos. Como control positivo de la expresión de los antígenos del sistema nervioso central se utilizó RNA de cerebro humano (Clonotech laboratories). Como control positivo de la expresión de las subunidades del AChR, se utilizaron muestras de músculo humano. Como control positivo de la expresión de antígenos prostáticos se utilizaron muestras de próstata humana. Se emplearon además como controles adicionales las líneas celulares U937 de origen monocítico (Sundstrom C, et al 1976) y M1 de origen fibroblástico (Roger-Pokora B, et al. 1984) y linfocitos de sangre periférica (PBLs).

El total de las muestras utilizadas fueron distribuidas en tres paneles para su posterior estudio: un panel de tejidos controles, un panel de timos normales, y un panel de 10 timos patológicos. En la tabla I se encuentran enumeradas las muestras utilizadas y las edades respectivas. En la tabla II se listan los pacientes con patología tímica, los títulos de autoanticuerpos, el diagnóstico por anatomía patológica y el grado de Osserman en el caso de los pacientes con Miastenia Gravis.

Los procedimientos de obtención de las muestras fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol (Barcelona) y de la Clínica Universitaria de Tübingen (Alemania).

### 2. Preparación de las muestras y obtención de bloques congelados.

Las muestras de tejido se recogieron en quirófano y se transportaron hasta el laboratorio a 4°C en medio HBSS (Life Technologies Inc., Paisley, Escocia) suplementado con 40 µg/ml de gentamicina (Normon, Madrid, España) y 100 UI/ml de penicilina (Roger, Barcelona, España). Un número representativo de bloques de cada muestra de tejido, de aproximadamente 9 mm<sup>2</sup> fueron congelados por inmersión en isopentano en un baño de acetona enfriada con hielo seco y almacenados a -80°C hasta el momento de ser utilizados para la extracción del RNA.

Número de Muestra	Tejidos Control	Timos Normales (Edad)
1	M1 (fibroblastos)	2 días
2	U937 (monocitos)	8 días
3	PBLs	10 días
4	Esófago	2 meses
5	Estómago	5 meses
6	Glándula Adrenal	1 año
7	Hígado	1 año
8	Tiroides	2 años
9	Cerebro	2 años
10	Páncreas	4 años
11	Timo	4 años
12	Próstata	6 años
13	Músculo	12 años
14		16 años

**Tabla I:** Panel de tejidos control y de muestras tímicas normales utilizadas en los experimentos de amplificación.

### 3. Obtención de las diferentes fracciones celulares tímicas.

Las fracciones celulares tímicas fueron obtenidas tal como se describió previamente (Sospedra et al., 1998). Brevemente, el tejido tímico se limpió de tejido conjuntivo y grasa, y se cortó en piezas pequeñas. Los fragmentos se lavaron con medio HBSS suplementado con 2mM de L-glutamina, 40 µg/ml de gentamicina y 100 UI/ml de penicilina y se sometieron a tres intervalos de digestión de 25 minutos cada uno, a 37°C en agitación continua. El medio de digestión consistió en RPMI 1640 (Whittaker, Walkersville, MD, USA) suplementado con 2 mg/ml de colagenasa (tipo P, act. sp. 2,7 U/mg) y 0,05 mg/ml de DNase (Sigma). Los fragmentos del estroma tímico sin digerir constituyeron la *fracción 1*. Las células obtenidas de la digestión constituyeron la *fracción 2*. Una alícuota de las células de la *fracción 2* se incubó con eritrocitos de carnero previamente tratados con 0,1 U de neuraminidase Type X (Sigma Chemical Co.) con el fin de eliminar los timocitos por formación de rosetas. Las células no formadoras de rosetas fueron separadas de las rosetas mediante un gradiente de Ficoll (Ficoll-Hypaque Lymphoprep, Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia). Tras centrifugación a 700 xg durante 30 minutos, se recogieron en la interfase las

células no formadoras de rosetas, que constituyeron la *fracción 3*. El *pellet* integrado por los timocitos CD2<sup>+</sup>, (células formadoras de rosetas) fueron separados de los glóbulos rojos de carnero mediante lisis de los mismos por shock hipotónico con un *buffer* ACK (NH<sub>4</sub>Cl 0,15M, KHCO<sub>3</sub> y EDTA 0,1mM).y constituyeron la *fracción 4*. En síntesis, de acuerdo al protocolo de fraccionamiento seguido, las fracciones resultantes fueron: la fracción 1, enriquecida en células epiteliales, la fracción 3 enriquecida en macrófagos y células dendríticas, la fracción 4 enriquecida en timocitos, la fracción 2, enriquecida en macrófagos, células dendríticas y timocitos, de la cual derivan las fracciones 3 y 4. Las cuatro fracciones celulares obtenidas se congelaron en nitrógeno líquido en forma de *pellet* seco para posterior extracción de RNA.

Caso N°	Edad (años)	Patología Tímica	Anticuerpos anti-AChR nM	Grado Osseman
1	65	Timoma	Tumor	-
		(Sin MG)	Sin-Tumor	-
2	51	MG con Timoma	150	IIb
3	18	MG con Timoma	17,2	III
4	43	MG con Timoma	60	IIa
5	60	MG con Timitis	53	IIb
6	31	MG con Timitis	42	IIb
7	28	MG con Timitis	++	IIa
8	29	MG con Timitis	27	IIb
9	26	MG con Timitis	950	I

**Tabla II:** Panel de muestras tímicas patológicas utilizadas en los experimentos de amplificación del receptor de acetilcolina.

#### 4. Obtención de células mononucleadas sanguíneas.

Se obtuvieron 30 ml de sangre total heparinizada, y se diluyeron a un volumen igual de medio RPMI suplementado con 10% FCS, 40 µg/ml de gentamicina y 100 UI/ml de

penicilina. Esta suspensión se dispuso sobre Ficoll (Ficoll-Hypaque Lymphoprep, Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia) y se centrifugó a 600 xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células dispuestas en la interfase se recuperaron por aspiración, se lavaron con PBS y se congelaron como *pellet* seco para extracción de RNA.

## **5. Tinción para Inmunofluorescencia.**

**5. 1 Secciones.** A partir de bloques de tejido congelado se obtuvieron secciones de 4 a 5  $\mu\text{m}$  utilizando un criostato Frigocut (Reichert-Jung, Heidelberg, Alemania). Las secciones fueron secadas 30 minutos a temperatura ambiente y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la tinción. Antes de la tinción, las secciones fueron secadas 10 minutos a temperatura ambiente, fijadas durante 5 minutos por inmersión en acetona fría, y nuevamente secadas a temperatura ambiente.

**5. 2 Anticuerpos.** Cada anticuerpo utilizado fue previamente titulado con el fin de obtener la concentración de trabajo adecuada. Los sustratos empleados en la titulación de cada anticuerpo fueron secciones de un tejido control y un tejido positivo para la expresión del antígeno a determinar. Las diluciones del anticuerpo se realizaron con PBS.

**5. 3 Controles.** Se han utilizado como controles de tinción, anticuerpos monoclonales no relacionados, o sea anticuerpos de la misma clase pero con diferente especificidad antigénica, como por ejemplo IA3, una IgG anti-arsenato (Dr. Vilella, Hospital Clinic i Provincial, Barcelona, España.). También se ha utilizado como suero control, suero humano normal de tipo sanguíneo AB.

**5. 4 Anticuerpos secundarios.** Como anticuerpos secundarios se utilizaron IgG de cabra anti ratón marcado con tetrametil rodamina (TRITC) (GAR-TRITC) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA).

**5. 5 Procedimiento de tinción.** Las secciones previamente fijadas y secadas se incubaron en una cámara húmeda con el anticuerpo primario durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron 2 lavados de 10 minutos cada uno en PBS-albúmina y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario marcado con fluorocromo se repitieron los lavados, se retiró el exceso de PBS, se procedió al montaje con medio de montaje, y se sellaron con laca de uñas. En las tinciones de inmunofluorescencia doble para desmina (Coulter Immunotech, Marseille, France) y TE-4, la posible reactividad

cruzada entre reactivos de diferente especie se controló de la siguiente manera: en una tinción control, se suprimieron el primer anticuerpo marcado con fluorocromo y el segundo anticuerpo primario. Esto permitió determinar reactividad cruzada del segundo anticuerpo marcado con fluorocromo con el primer anticuerpo de la tinción. En una segunda tinción control, se suprimieron el primer anticuerpo primario y el segundo anticuerpo secundario marcado con fluorocromo. Esto permitió detectar reacciones cruzadas entre el primer anticuerpo marcado con fluorocromo el segundo anticuerpo de la tinción.

**5. 6 *Análisis de la Tinción.*** Las secciones de criostato teñidas se analizaron en un microscopio Axioskop 2 (Zeiss, Germany) unido a una video-cámara Hamamatsu C5810 (Hamamatsu, Japan). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas utilizando el software de *Openlab* versión 2.2.5 (Improvisation Ltd., England). Se empleó una lente objetivo de 63X y la amplificación total obtenida fue de 630X.

## **6. Microdissección por láser.**

**6. 1 *Secciones.*** Las microdissecciones por láser de las cortezas y médulas tímicas se realizaron en condiciones libres de RNases. Los portaobjetos empleados para recoger las secciones fueron previamente enjuagados con etanol 96% y dejados en estufa a 180°C toda la noche para eliminar las RNases. Se realizaron secciones de criostato de 5 a 7 µm de espesor a partir de bloques congelados, se recogieron en los portaobjetos tratados con etanol 96% y se mantuvieron en hielo seco hasta el momento de la tinción.

**6. 2 *Tinción.*** Las secciones tímicas mantenidas en hielo seco se tiñeron con hematoxilina y eosina de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 1- Etanol 70% durante 30 segundos
- 2- Hematoxilina durante 90 segundos
- 3- Lavado en agua destilada durante 5 segundos
- 4- Etanol 70% durante 60 segundos
- 5- Etanol 95% durante 60 segundos
- 6- Eosina alcohólica durante 30 segundos
- 7- Etanol 95% dos pasajes sucesivos de 120 segundos cada uno
- 8- Etanol 100% 120 segundos
- 9- Xilol dos pasajes sucesivos durante 2,5 minutos cada uno
- 10- Secado al aire a temperatura ambiente durante 10 minutos

Las secciones de criostato teñidas se mantuvieron aptas para ser microdisseccionadas durante 3 horas.

**6. 3 Microdissección por láser.** Las secciones teñidas se microdisseccionaron empleando un microscopio de microdissección (LCM) Acturus Engineering (Mountain View, California). Los parámetros del microscopio fueron ajustados en un extremo de la sección. La potencia del láser utilizada fue de 41 mW con una duración de 5 msegundos. El ancho del láser (spotsize) fue de 30  $\mu\text{m}$ . Se tomaron imágenes de la sección original, de la sección con los disparos realizados con el láser, de la sección microdisseccionada y finalmente de las porciones tímicas capturadas por el láser. Las porciones capturadas se colocaron inmediatamente en TRIzol Reagent (Life Technologies) y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la extracción del RNA.

## **7. Obtención de RNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

**7. 1 Extracción del RNA total.** El RNA total se extrajo según la técnica de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Fueron seleccionados varios bloques de tejidos para la extracción del RNA con el fin de obtener una muestra representativa del total de la glándula. De éstos bloques se realizaron secciones de criostato y se tiñeron con hematoxilina-eosina para comprobar que tanto las cortezas como las médulas tímicas estuvieran presentes en el bloque, y que las áreas de grasa no fueran extensas. Los bloques de tejido fueron homogeneizados en solución de lisis con un homogenizador T25 Ultra Turrax (IKA Labortechnik, Alemania). La solución de lisis empleada consistió en solución desnaturalizante de tiocianato de guanidino (*solución D*: tiocianato de guanidino 4M, citrato de sodio 50 mM pH 4, lauril-sarcosina sódica 0,5% y 2- $\beta$ -mercapto etanol 100nM). A continuación se agregaron 1 ml de fenol saturado con agua, 100  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 2N pH 4 y 200  $\mu\text{l}$  de una mezcla de cloroformo/isoamilalcohol (en proporción 49:1). Las muestras se dejaron en hielo durante 15 minutos para permitir la disociación de los complejos nucleo-proteicos y posteriormente se centrifugaron a 13.000 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos para separar la fase acuosa de la fase orgánica. La fase acuosa se recuperó por aspiración y se procedió a la precipitación del RNA por agregado de un volumen de isopropanol, a -20°C durante 3 horas. Tras una nueva centrifugación a 13.000 r.p.m., a 4°C durante 30 minutos, los *pellets* de RNA fueron resuspendidos en 300 ml de la *solución D* y nuevamente precipitados con un volumen de isopropanol a -20°C durante toda la noche. A continuación, fueron centrifugados durante 30 minutos a 13.000 r.p.m. a 4°C, los pellets de RNA fueron lavados dos veces con etanol 75%, secados y resuspendidos en H<sub>2</sub>O-DEPC (agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (Sigma Chemical Co.) y posteriormente autoclavada).

**7. 2 Extracción de RNA a partir de las microdisecciones.** Tras centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa del TRIzol Reagent (Life Technologies), se añadió glucógeno y se precipitó con 500 µl de isopropanol. El pellet de RNA obtenido se lavó dos veces con etanol 75% y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.

**7. 3 Concentración e Integridad del RNA.** La concentración y la pureza del RNA se midieron por la absorbancia a 260nm y por el cociente de absorbancia a 260nm/280nm respectivamente, en un espectrofotómetro ULTROSPEC III (Pharmacia). La integridad del RNA se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (BrEt), en base a la integridad de las bandas del RNA ribosomal y utilizando RNA ribosomal de *E. coli* (Boehringer Mannheim) como control positivo.

**7. 4 Digestión con DNAsaI.** Para eliminar posibles pequeñas cantidades de DNA genómico, presentes en el RNA, 20 µg de cada muestra de RNA se digirió con la enzima DNAsaI (15U, Pharmacia Biotech) en una reacción que contenía DTT (5mM, BRL, Gaithersburg, MD), First Strand Buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.3, BRL), Glycogen (40mg, Boehringer Mannheim) y el inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin (RNase Recombinant Ribonuclease Inhibitor 20U, BRL). La integridad del RNA digerido se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

**7. 5 Retrotranscripción.** 1µg de RNA desnaturalizado (5 minutos a 68°C y 5 minutos en hielo) se retrotranscribió durante 1 hora a 42°C, en un volumen de 20 µl utilizando First Strand Buffer, proporcionado con la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (100U, BRL) y con dNTPs (1mM, Pharmacia Biotech), Oligo-d(T)<sub>20</sub> (5 µM, Genset, Paris, Francia), agregando el inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin (RNase Recombinant Ribonuclease Inhibitor 20U, BRL). Para inactivar la reacción la muestra se calentó a 96°C durante 5 minutos y a continuación se colocó en hielo durante 5 minutos.

**7. 6 Retrotranscripción del RNA obtenido de las microdisecciones.** El total de RNA obtenido de las microdisecciones por láser se retrotranscribió durante 1 hora a 37°C utilizando el buffer 5X RT (Promega), dNTPs (1mM, Pharmacia Biotech), random hexanucleotides (Pharmacia), rRNasin® (recombinant Ribonuclease Inhibitor, 20U, Amersham) y la retrotranscriptasa M-MLV (Promega).

**7. 7 Cebadores y sondas oligonucleotídicas** Los cebadores fueron diseñados en nuestro laboratorio a partir de secuencias génicas publicadas, utilizando el software de *Oligo* versión 4.0 (MedProbe, Olso, Norway). La especificidad de las secuencias de los oligonucleótidos se

evaluó por FASTA en la base de datos de secuencias nucleotídicas EMBL. Los cebadores fueron diseñados en exones diferentes para poder detectar amplificaciones de DNA genómico. Las secuencias de cada par de cebadores y de las respectivas oligosondas se muestran en la tabla III.

**7. 8 Normalización.** Las muestras de cDNA de tejido tímico, de tejidos control y de las microdisecciones fueron normalizadas usando la expresión del gen constitutivo GAPDH como referencia. Se prepararon diluciones seriadas del cDNA, desde 1/10 hasta 1/100. Se amplificaron 2  $\mu$ l de cada dilución para GAPDH, a 25 ciclos de reacción. Posteriormente, en los experimentos de amplificación, se utilizaron como molde, las diluciones de los cDNA que dieron bandas de intensidad similar en el gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt (0,5  $\mu$ g/ml).

**7. 9 Condiciones de la PCR.** La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 20  $\mu$ l, con una mezcla de reacción que contenía: 2 $\mu$ l del buffer de la enzima Dynazyme II (DZ) (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100), 0,5  $\mu$ M de cada primer (Genset, Paris, France), 2 $\mu$ l de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (0,2 mM, Pharmacia, Biotech) y 0,2  $\mu$ l de la DNA polimerasa Dynazyme II (0,4U Finnzymes Oy, Espoo, Finland). La mezcla anterior se cubrió con aceite mineral (Sigma) y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 (Ermeville CA).

La amplificación del cDNA consistió de un paso de *desnaturalización* a 95°C durante 30 segundos, un paso de solapamiento o *annealing* de 30 segundos a la temperatura óptima para cada par de cebadores, y un paso de *extensión* a 72°C durante el tiempo necesario dependiendo de la longitud de cada amplímero. Estos pasos se repitieron un número de ciclos óptimo para cada par de cebadores, determinado previamente en curvas de reacción en los tejidos control, a fin de evitar que la reacción entre en la fase de plateau de la amplificación. Los parámetros de la reacción de amplificación para cada antígeno estudiado se detallan en la tabla III.

En todos los experimentos de PCR se incluyó un control negativo, consistente en una muestra que contenía todos los reactivos excepto el cDNA, y también un control positivo, que consistió en amplificación de cDNA del tejido del cual procede el antígeno (por ejemplo cerebro como control positivo de amplificación de los antígenos del sistema nervioso central).



Oligonucleótido		Secuencia 5' – 3'	L	Tm °C	Tamaño nt	Ciclos
AChR Alfa	Sense <sub>232</sub> (exón 5)	TGGGCACCTGGACCTAC	17	56	374	45
	Antisense <sub>97</sub> (exón 7)	CGTGGAGGGGATCAGCT	17	56		
	Sonda <sub>184</sub> (exón 6)	TGATGTCCAGGTAGGGGGTGT	21	66		
AChR Beta	Sense <sub>739</sub>	CCGCCGCAAGCCTCTCTTCT	20	59	555	36
	Antisense <sub>1274</sub>	GCCCGGTTTGCACCATCGAT	20	59		
	Sonda <sub>1112</sub>	GGCTCCGGCATCAGGTCTCTC	21	68,6		
AChR Delta	Sense <sub>172</sub>	GGCCCTCACACTCTCCAACC	20	66	375	40
	Antisense <sub>525</sub>	GGGTGATCTCTTTGGCCGTAT	21	64		
	Sonda <sub>447</sub>	CAGAGATGGGGCAGGAGGAGC	21	68,4		
AChR Epsilon	Sense <sub>81</sub> (exón 2)	GAAGTGCCTCTTTATCACCA	20	58	442	40
	Antisense <sub>503</sub> (exón 5)	TACGTCTGAGAGCGGAAAATA	21	68		
	Sonda <sub>771</sub> (exón 4)	GACGACTTTGGGGTATAGAA	21	62		
AChR Gamma	Sense <sub>60</sub> (exón 5)	GGTGGCCCTCTACTGCAA	18	58	758	40
	Antisense <sub>158</sub> (exón 10)	TTCTGTAGCCGGGACTGG	18	58		
	Sonda <sub>220</sub> (exón 7)	CTTCTGGTGGCCTGCTTCCTG	21	68		
GAPDH	Sense <sub>34</sub> (5'no-t)	TCTTCTTTTGCCTCGCCAG	19	53,9	372	22
	Antisense <sub>447</sub> (exón 5)	GGGGGCAGAGATGATGACC	19	53,9		
PLP	Sense <sub>11223</sub> (exón 3)	TGTCATCTATGGAAGTGCCTCT	22	49	512	35
	Antisense <sub>14076</sub> (exón 6)	CAATAAACAGGTGGAAGGTCA	21	49		
	Sonda <sub>13211</sub> (exón 5)	GGACAGAAGGTTGGAGCCACA	21	64,8		
S100 β	Sense <sub>3020</sub> (exón 1)	GAAGGGGTGAGACAAGGAA	19	48,4	320	30
	Antisense <sub>154</sub> (exón 3)	GTTTGGCTGCTTTCTAATCTC	21	48,3		
	Sonda <sub>2982</sub> (exón 1)	GGCGTCGTCTCTGCTGCGGGT	21	66,7		
αB crystalin	Sense <sub>1004</sub> (exón 1)	ATCGCCATCCACCACC	17	52,7	422	30
	Antisense <sub>3838</sub> (exón 3)	GAGGACCCCATCAGATGACAG	21	53		
	Sonda <sub>1129</sub> (exón 1)	GCCGAAGGTAGAAGGGACTCA	21	64,8		
MOG	Sense <sub>1223</sub> (exón 1)	CTCCTCCTCCAAGTGTCTTC	20	62	45	α1: 674 α2: 557 α3: 605 α4: 325
	Antisense <sub>14659</sub> α (exón 7)	GTAGCTCTCAAGGAATTGC	20	58		
	Antisense <sub>15379</sub> β (exón 8)	AGGGCTTCCAGGTGGAAGA	20	60		
PSA	Sonda <sub>10171</sub> (exón 3)	GACGAGGCCAAGAGTGATCTG	21	66	489	35
	Sense <sub>7235</sub> (exón 2)	CTCGTGGCAGGGCAGTCT	18	53,3		
	Antisense <sub>9479</sub> (exón 4)	CTTTTGCCCCCTGTCCA	17	54		
PSM	Sonda <sub>9379</sub> (exón 4)	GTCCACACACTGAAGTTTCTT	21	45,6	414	35
	Sense <sub>10810</sub> (exón 3)	TGGCCTGGATTCTGTTGAGCTA	22	56,2		
	Antisense <sub>25378</sub> (exón 6)	GGACTTCACCCAGGAGCAA	20	56,2		
	Sonda <sub>18328</sub> (exón 4)	GTGAAAGGTGGTACAATATCC	21	45,6		

TABLA III: Cebadores y sondas utilizados en los experimentos de amplificación.

**7. 10 PCR radioactiva.** La PCR radioactiva se llevó a cabo en el cuarto de instalaciones radioactivas con las condiciones de amplificación adecuadas para cada pareja de cebadores como se describió anteriormente. El producto de PCR fue internamente marcado con nucleótidos radioactivos ( $[^{32}\text{P}]$  dNTP) agregando 0,5  $\mu\text{Ci}$  de radioactividad por tubo en el último ciclo de la reacción.

**7. 11 Electroforesis.** Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con BrEt, por electroforesis en buffer TAE 1X (0,04 M Tris-Acetato; 0,001 M EDTA), a 100 V durante 1 h. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV y los tamaños moleculares de los amplificados se compararon con el marcador de tamaño molecular Phi X174 /Rsal.

**7. 12 Electroforesis de los geles radioactivos.** 12  $\mu\text{l}$  de cada producto amplificado mediante PCR radiactiva se separaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con BrEt, por electroforesis en buffer TAE 1X (0,04 M Tris-Acetato; 0,001 M EDTA), a 100 V durante 1 h. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV y los tamaños moleculares de los amplificados se compararon con el marcador de tamaño molecular Phi X174 /Rsal. Los geles se contactaron durante 4 horas en placas radiosensibles (Fujifilm, Fuji photo film co. LTD). Las imágenes se adquirieron y se analizaron en un Phosphorimager (*Personal Molecular Imager*, BIORAD) empleando el programa Quantity One (versión 4.1).

**7. 13 Purificación y cuantificación de los productos amplificados.** Se llevaron a cabo experimentos de titulación con el fin de titular la sensibilidad de cada pareja de cebadores. A tal fin, se obtuvieron los productos de amplificación de cada antígeno a partir del tejido humano del cual procedía (las subunidades del receptor de acetilcolina a partir de músculo humano, antígenos del sistema nervioso central a partir de cerebro y los antígenos prostáticos a partir de próstata) y fueron purificados mediante digestión con la enzima  $\beta$ -Agarasa, según se detalla a continuación. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa *low melting Nusieve-GTG*, se visualizaron en el transiluminador de luz UV y se cortaron las bandas correspondientes al producto amplificado de tamaño esperado. Aproximadamente 80 a 100 mg de cada amplificado, contenido en la sección de agarosa cortada, se incubó toda la noche a 42°C con 5 unidades de la enzima  $\beta$ -agarasa I (Biolabs) y el buffer provisto con la enzima (Neb-buffer, Biolabs). Los productos de amplificación digeridos, se cuantificaron posteriormente en un gel de agarosa al 2% teñido con BrEt, por comparación con el marcador de tamaño molecular Phi X174 /Rsal de 10

ng/ $\mu$ l. La sensibilidad de cada pareja de cebadores se estableció por PCR, colocando diluciones de 1 a  $10^9$  copias del amplificado purificado como molde en la reacción de PCR.

**7. 14 Transferencia a membranas de nylon.** Los productos de PCR, separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt, fueron transferidos por capilaridad con 20X SSC (0,15 M NaCl, 0,013 M citrato sódico) a membranas de nylon (Hybond, Amersham, U.K.) durante 20 h. Posteriormente, las membranas fueron colocadas durante 5 min en Solución de Desnaturalización (1,5M NaCl, 0,5M NaOH), durante 1 minuto en Solución de Neutralización (1,5M NaOH, 0,5M Tris-HCl pH 7.2, 0,001M EDTA) y se fijaron mediante irradiación con luz UV (cross-linking) en cámara de irradiación Stratalinker (Stratagene).

**7. 15 Preparación de las oligosondas.** Las oligosondas se marcaron radioactivamente como se detalla a continuación: 20 pmol de cada sonda oligonucleotídica se desnaturalizaron a 70°C durante 2 minutos, y se enfriaron en hielo. Una vez desnaturalizadas, se marcaron con 30  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}$ P] d-ATP (Amersham) usando la enzima polinucleótido-kinasa T4 y el buffer NE 1X provisto con la enzima (New England Biolabs, BEVERLY, MA. USA). La reacción de marcaje de la sonda se incubó durante 30 minutos a 37°C, y posteriormente la enzima se inactivó con EDTA 10mM. Las sondas marcadas se purificaron en columna de sephadex estándar 25G (Amersham, Pharmacia, BIOTECH).

**7. 16 Hibridación.** Las membranas se pre-hibridaron durante 1 h en 10 ml de Solución de pre-hibridación (1%SDS, 2X SSC, 5X Denhardt's y 150  $\mu$ l DNAss de esperma de salmón (40  $\mu$ g/ml) para reducir la hibridación inespecífica de las membranas. La temperatura de pre-hibridación e hibridación ( $Th$ ), se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Th = Tm - 15^\circ C \text{ donde, } Tm = \text{temperatura de melting}$$

$$Th = 16,6 (\log_{10} Na^+) + 81,5^\circ C + 0,41(\%G+C) - (675/L)$$

$$L = \text{longitud de la sonda y } Na^+ = 0,33 \text{ para SSC 2X.}$$

Las membranas fueron pre-hibridadas a la temperatura calculada durante dos horas en la solución de pre-hibridación. La hibridación se realizó durante 2 horas en la misma solución, previo agregado de 2 pmoles de la oligosonda radio marcada, ( $1 \times 10^6$  cpm/ml).

**7. 17 Lavados y exposición.** Las membranas hibridadas, se lavaron dos veces en SSC 2X durante 5 minutos y a continuación se realizaron dos lavados adicionales de mayor astringencia con la solución de lavado TMAC (TMAC 5M (Sigma), SDS 1% , Tris 25 mM pH 8,5, EDTA 2mM), durante 30 minutos a 61°C, acorde con la longitud de las oligosondas

empleadas (21 nucleótidos). La exposición de las membranas hibridadas se llevó a cabo durante 4 horas en placas radiosensibles (Fujifilm, Fuji photo film co. LTD), se adquirieron y se analizaron en un Phosphorimager (*Personal Molecular Imager*, BIORAD) empleando el programa Quantity One (versión 4.1).

## 8. Secuenciación de amplímeros

**8. 1 Preparación de las muestras.** Los productos de PCR, separados por electroforesis en gel agarosa *low melting* (Nusieve-GTG) al 1% teñido con BrEt, fueron cortados y purificados en columnas GFX (Pharmacia). El amplímero cortado, se incubó con el buffer de captura del DNA (proporción 1  $\mu$ l de buffer por cada 1 mg de gel de agarosa) durante 5 minutos a 60 °C. Una vez fundida la agarosa, se incubó en la columna, 1 minuto a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 1 minuto a 3000xg. Posteriormente, la columna se lavó con el buffer Tris-EDTA y etanol al 80%, se centrifugó a 1 minuto a 3000 xg y finalmente se eluyó el amplímero purificado en 50  $\mu$ l de buffer Epps.EDTA (10:01). La muestra purificada se cuantificó en gel de agarosa al 2% por comparación con el marcador de tamaño molecular Phi X174 /Rsal de 10 ng/ $\mu$ l.

**8. 2 Secuenciación del DNA.** La reacción de secuenciación consistió en la amplificación del DNA purificado y cuantificado, utilizando nucleótidos marcados con fluorocromos (Método BigDye terminator, PE Applied Biosystems). De 90 a 180 ng de DNA se amplificaron por PCR en un volumen de 10  $\mu$ l de reacción con aceite mineral, cebadores específicos (sense y antisense a 0,5  $\mu$ M final), 2  $\mu$ l de TRRM (Terminator Ready Reaction Mix, conteniendo AmpliTaq DNA polimerasa, dinucleótidos, dye terminators y buffer) y H<sub>2</sub>O-DEPC (c.s.p. 10  $\mu$ l). La mezcla de reacción se sometió a 25 ciclos de PCR que consistieron de un paso de desnaturalización, 30 segundos a 96 °C y un paso de annealing- extensión durante 2 minutos a 60 °C en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 (Ermeville CA). El producto amplificado se colocó en hielo hasta el momento de la precipitación.

Los 10  $\mu$ l de la reacción de PCR se recuperaron eliminando el aceite mineral y se precipitaron con 0,1 volumen de acetato de potasio 3M, 10  $\mu$ g de glucógeno y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El DNA precipitado se lavó dos veces con etanol 75%, se resuspendió en 25  $\mu$ l de buffer de secuenciación (TSR, PE Applied Biosystems) y se desnaturalizó mediante incubación a 95 °C durante 2-5 minutos y a 4°C durante 5 minutos antes de secuenciar. Las reacciones de secuenciación se realizaron en un secuenciador automático de sistema capilar (ABI PRISM™ 310, Applied Biosystems) y se analizaron

utilizando el software GeneJockey-II (Biosoft, Cambridge, UK). La homología de las secuencias obtenidas se compararon con el programa FASTA en la base de datos EMBL.



## RESULTADOS

### PRIMERA PARTE: AUTOANTÍGENOS INVOLUCRADOS EN LA MIASTENIA GRAVIS

#### 1. Precauciones

Para asegurar que los resultados de la detección de los diferentes autoantígenos fuesen comparables entre sí, se cuantificó la sensibilidad de cada pareja de cebadores, se hicieron curvas de reacción de PCR, y se tomaron otras precauciones generales que se detallan a continuación:

- Todas las muestras de RNA se trataron con DNaseI para evitar interferencias por DNA genómico
- El diseño de los cebadores se realizó en exones diferentes, flanqueando al menos un intrón. Esta precaución no fue posible para el caso de los autoantígenos cuya estructura génica completa no se encontró disponible en las bases de datos del Gene Bank, como es el caso de las subunidades beta y delta del receptor de acetilcolina
- Todas las muestras de cDNA fueron previamente normalizadas de acuerdo a la expresión del gen constitutivo GAPDH
- Todos los productos de PCR fueron hibridados con una sonda complementaria marcada radioactivamente, que fue diseñada en un exón contenido en medio de la secuencia amplificada
- Algunos productos alternativos de PCR, confirmados por hibridación, fueron además secuenciados para confirmar la especificidad
- Todas las membranas correspondientes a un mismo autoantígeno, es decir, tejidos control, sensibilidad de los cebadores, timos normales y timos patológicos, fueron hibridadas y lavadas en el mismo tubo de reacción, y posteriormente expuestas durante el mismo tiempo en la misma placa radiosensible para evitar posibles errores en la cuantificación debidos a diferentes tiempos de exposición. El experimento de sensibilidad de los cebadores permitió obtener una curva de cpm vs. número de copias que nos permitió extrapolar el número de copias del transcrito en las muestras tímicas
- En cada experimento de amplificación se colocó un tubo control positivo, consistente en una alícuota de cDNA músculo normalizado según el gen constitutivo GAPDH. Los valores de cpm de la cuantificación del control positivo, fueron comparados entre las membranas hibridadas de un mismo autoantígeno con el fin de corregir variaciones debidas a factores intrínsecos de la metodología (como por ejemplo posibles diferencias en la eficacia de la transferencia de los geles a membranas de *nylon*.)
- Se utilizó una escala semicuantitativa previamente descrita (Sospedra et al., 1998) para valorar el nivel de transcripción de cada autoantígeno. Los valores de cpm obtenidos de

la exposición radioactiva en la placa radiosensible, correspondientes a menos de 10 copias por alícuota de cDNA normalizado para GAPDH y amplificado por PCR, se consideraron negativos. Los valores de cpm correspondientes a un número entre 10 y 100 copias se consideraron débilmente positivos. Los valores correspondientes a más de 100 copias se consideraron claramente positivos

- Todas las amplificaciones se realizaron al menos tres veces y las hibridaciones se repitieron al menos una vez.

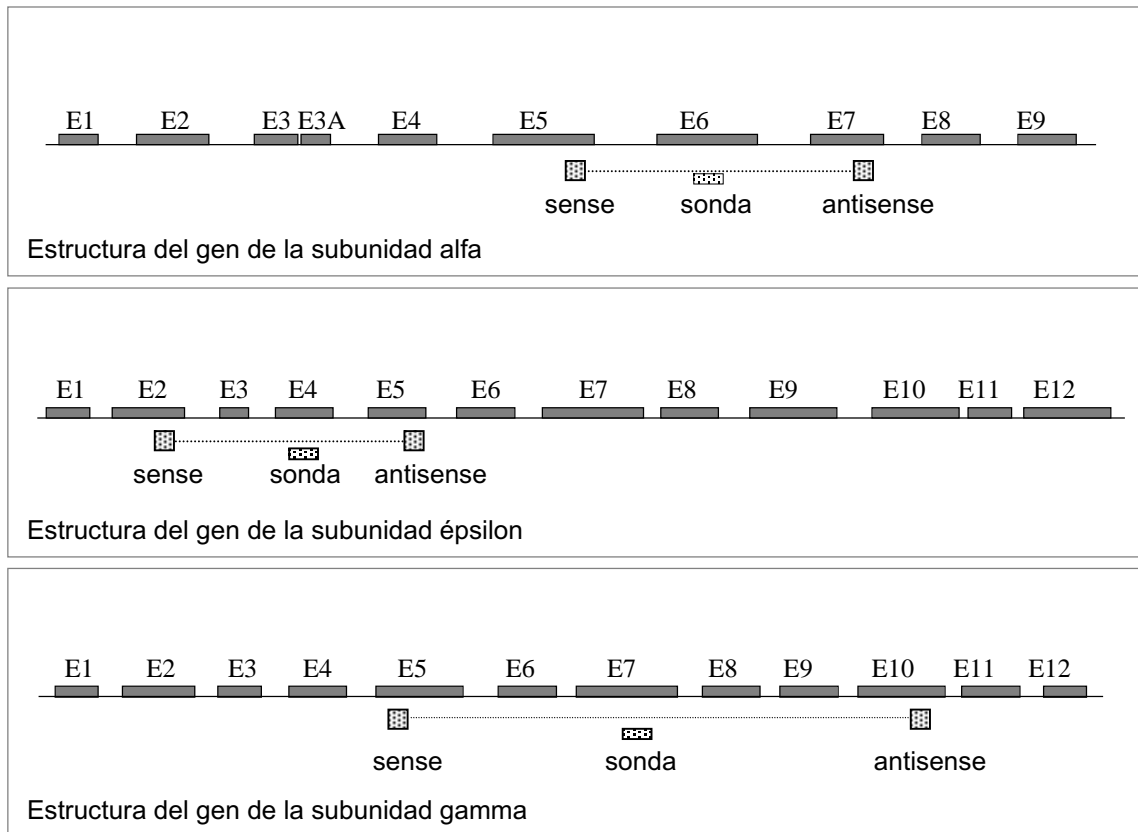
## 2. El diseño de los cebadores

Los receptores de acetilcolina forman parte de una superfamilia de canales de iones gatillados por neurotransmisores, cada uno compuesto por cinco subunidades homólogas organizadas alrededor de un canal central. Dentro de esta superfamilia de genes, los receptores *musculares* de acetilcolina constituyen un grupo y los receptores *neuronaes* de acetilcolina conforman otros dos grupos. Las cinco subunidades que constituyen dichos receptores guardan una alta homología de secuencia entre sí, e incluyen 9 subunidades alfa (numeradas desde la 1 a la 9) cuatro subunidades beta, (numeradas desde la 1 a la 4) y las subunidades delta, gamma y épsilon. Diseñamos cebadores para detectar transcritos de las cinco subunidades que conforman el receptor *muscular* de acetilcolina.

**2.1 Cebadores para detectar la subunidad alfa del AChR.** La subunidad alfa-1 *muscular* del receptor de acetilcolina existe en dos isoformas resultantes de splicing del mRNA. El splicing alternativo del exón P3A, origina una forma corta de la subunidad alfa que no contiene al exón (la isoforma P3A-) y a otra forma más larga que sí contiene el exón (la P3A+) (Beeson et al., 1990). Debido a que la expresión diferencial de las dos isoformas de la subunidad alfa muscular ya han sido examinadas en el timo humano (Talib et al., 1993) (Zheng et al., 1999) y también en el músculo normal y de pacientes con MG (Guyon et al., 1994) decidimos investigar la expresión intratímica de la subunidad alfa-1 mediante amplificación del gen alfa en regiones que no incluyeran el exón 3. Para evitar la amplificación de las formas neuronales de alfa, las cuales además ya han sido descritas en timo, (Mihovilovic et al., 1998; Mihovilovic and Roses, 1993; Navaneetham et al., 1997) las homologías entre las formas alfa muscular y neuronales han sido cuidadosamente evaluadas mediante FASTA en las bases de datos en internet EMBL y GeneBank).

El gen que codifica para la subunidad alfa incluye 9 exones y 8 intrones. Los cebadores fueron diseñados para amplificar la secuencia contenida entre los exones 5 y 7 y la sonda antisense se diseñó en el exón 6. En el gráfico 4 se muestra la estructura genómica del gen alfa y la localización de los cebadores.



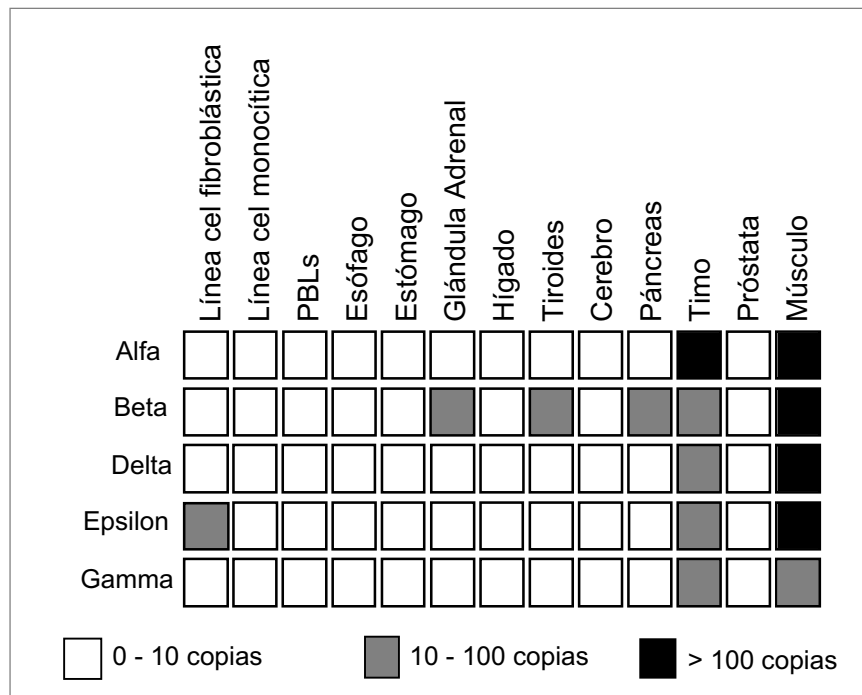


**Gráfico 4:** Equema de la estructura genómica de las subunidades del AChR. E: exones; las líneas punteadas representan el producto amplificado por PCR.

### 3. Titulación de la sensibilidad de los cebadores y curvas de reacción de PCR

Debido a que la RT-PCR es una técnica altamente sensible y dicha sensibilidad está influenciada, en parte, por la cinética reacción de cada pareja de cebadores, decidimos determinar la influencia de los mismos mediante experimentos de titulación. Estos experimentos se realizaron por PCR, amplificando cantidades conocidas de material pre-amplificado. De 0,1 a  $10^9$  copias de cada amplímero obtenido previamente a partir de músculo humano, y posteriormente purificado y cuantificado, se colocaron como molde en la reacción de PCR, obteniéndose umbrales de detección entorno a las 100 copias (Figura 1.1). Este umbral proporciona una referencia relativa, debido a que en las muestras de tejido tímico existen cDNAs competidores que pueden afectar la sensibilidad de la técnica. Hemos realizado dos experimentos de titulación agregando a las cantidades conocidas de amplímero, un volumen igual de cDNA de tejido tímico en el tubo de la reacción para determinar las posibles variaciones en la sensibilidad, y los resultados no han variado de manera significativa. Esto indicaría que los posibles contaminantes presentes en el cDNA tímico tendrían una influencia no significativa en la sensibilidad de la detección.

Los experimentos de titulación se realizaron en forma paralela a las curvas de reacción de PCR. Las curvas de reacción de PCR consistieron en la detección de los autoantígenos en los tejidos control a diferente número de ciclos, con el fin de asegurar que la amplificación no se realizaba en la zona de plateau de la reacción de PCR. (Figura 1.2A y 1.2B). El número de ciclos de amplificación óptimos para cada pareja de cebadores se determinó a partir de las curvas de reacción. Como se aprecia en la figura 1.2A y 1.2B, 35 ciclos de reacción de PCR fueron suficientes para detectar las cinco subunidades del receptor de acetilcolina en el músculo estriado, pero se requirieron 36 y 38 ciclos para detectar las subunidades beta y épsilon respectivamente en el timo. Para detectar las subunidades delta y gamma en timo se necesitaron 40 ciclos, mientras que para detectar la subunidad alfa se requirieron 45 ciclos de amplificación. El mismo número de ciclos fue utilizado posteriormente utilizado en los experimentos de detección de los autoantígenos en las muestras de timos. De acuerdo a éste experimento de amplificación en el panel de tejidos control (figura 1.3A), transcritos correspondientes a las subunidades alfa, delta y gamma se detectaron exclusivamente en músculo y timo, mientras que pequeñas cantidades de beta y épsilon se detectaron también en glándulas adrenales, tiroides, páncreas y próstata. La línea celular fibroblástica M1, también expresó transcritos de alfa, pero esto no es totalmente inesperado en células transformadas. Estos experimentos fueron hibridados con sondas específicas complementarias con el fin de confirmar la especificidad de los transcritos.(Figura 1.3B) Los valores de cpm obtenidos de la hibridación fueron extrapolados a números de copias. Los resultados de la cuantificación se esquematizan en el gráfico 5.



**Gráfico 5:** Niveles de transcripción del AChR en los tejidos control

Figura 1.2 A Curvas de reacción de PCR

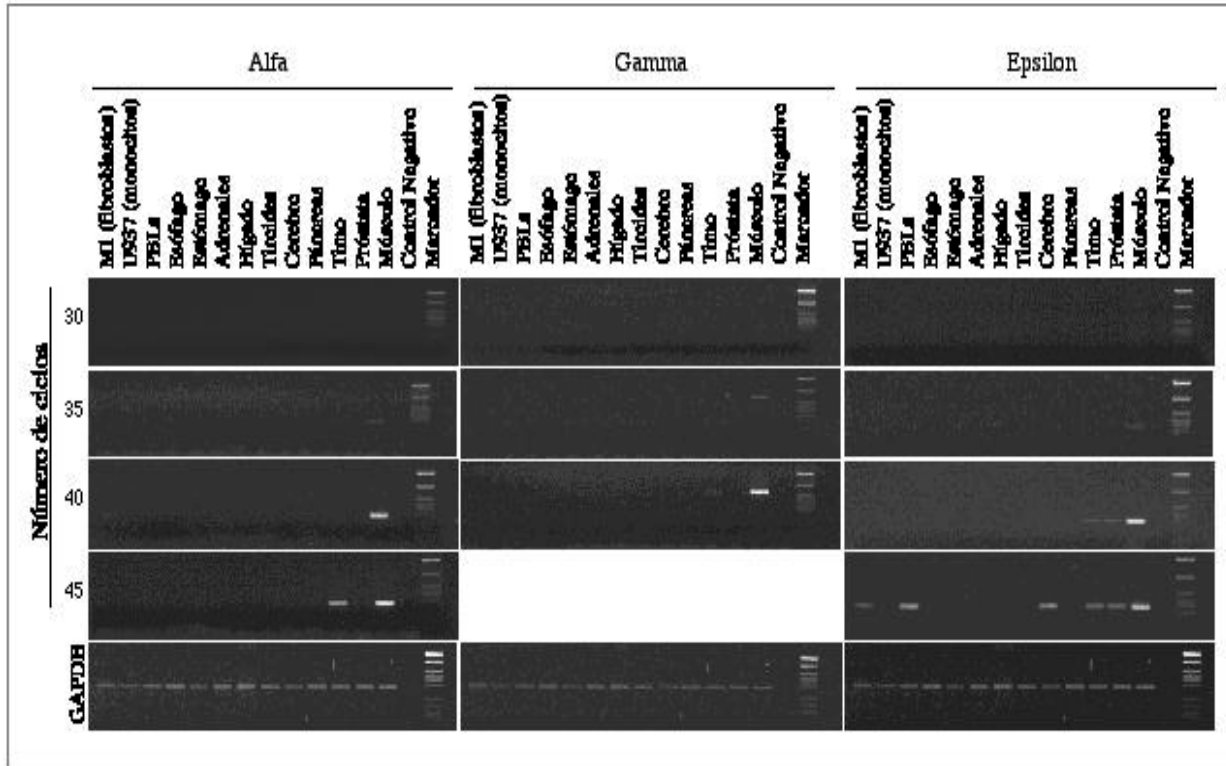


Figura 1.1 Titulación de la sensibilidad de los cebadores

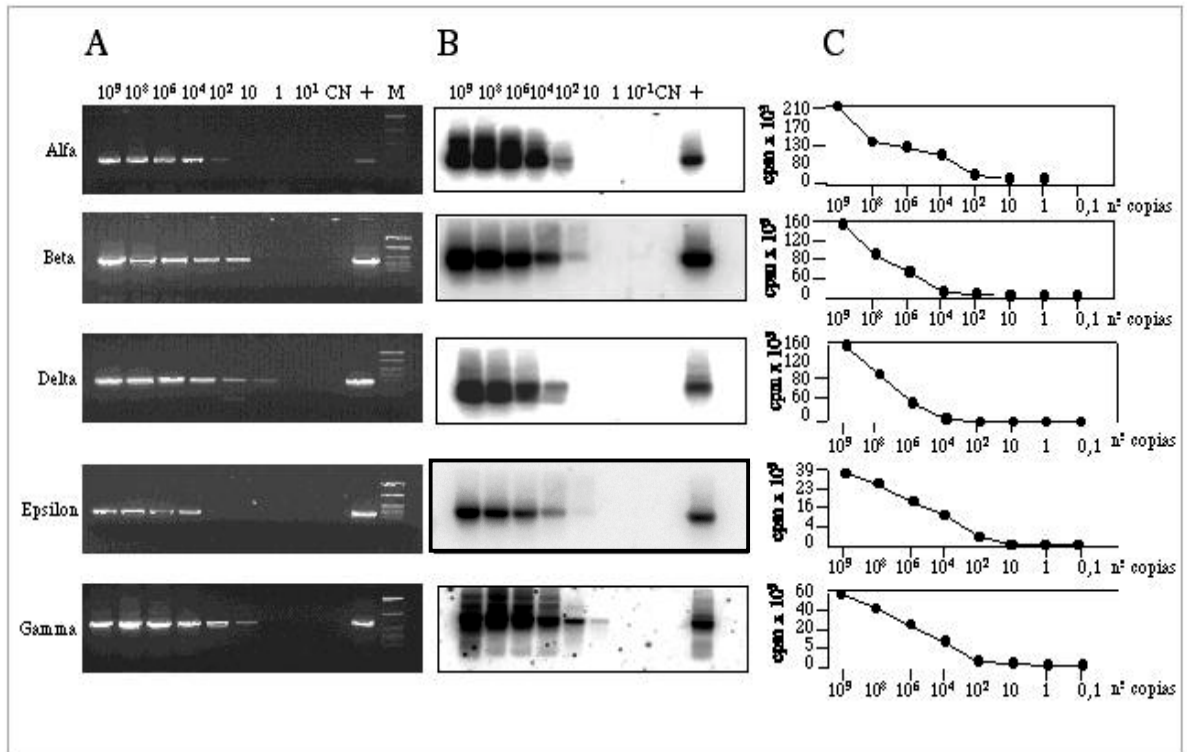


Figura 1.2 B Curvas de reacción de PCR

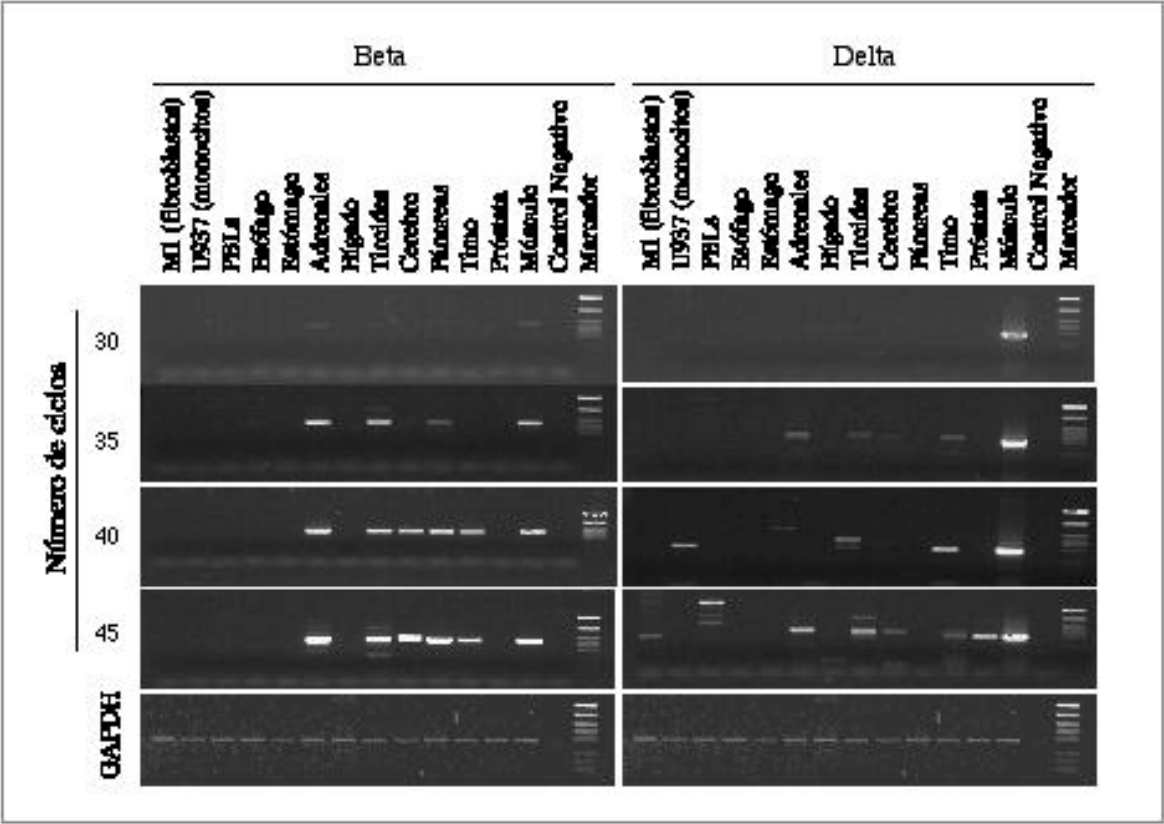
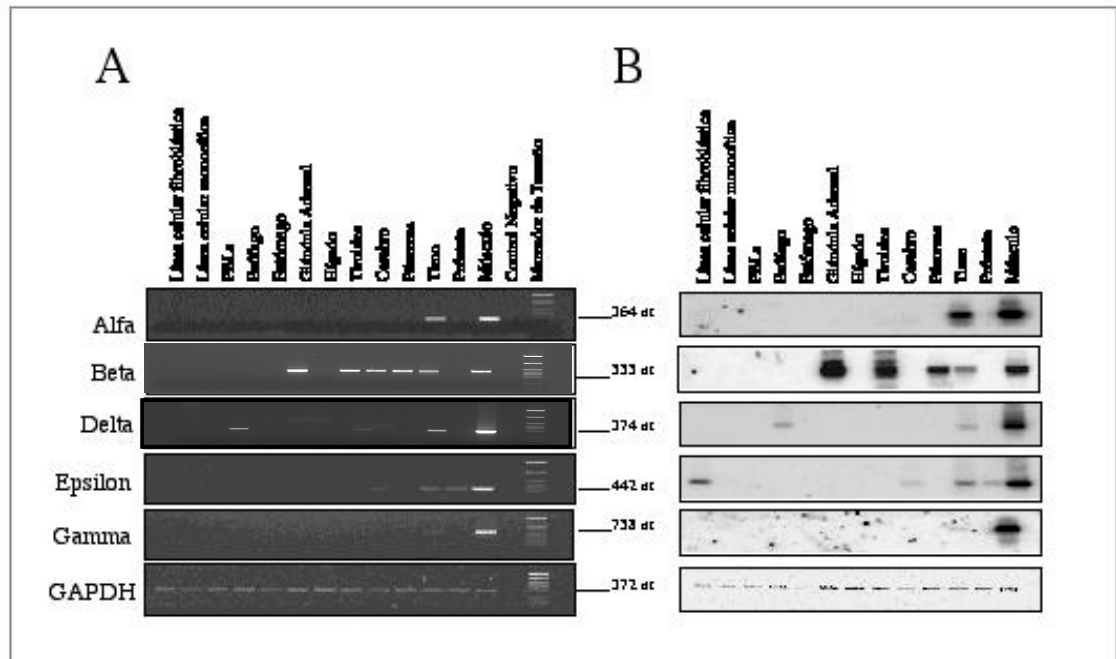


Figura 1.3 Amplificación de las subunidades del AChR en tejidos controles



Expresión de las subunidades del AChR en el panel de tejidos control. A, geles de agarosa teñidos con BrEt. B, hibridación con sondas específicas marcadas con <sup>32</sup>P. El control positivo de la amplificación fue músculo humano normal.

#### **4. Las cinco subunidades del receptor de acetilcolina se expresan en el timo humano.**

Hemos encontrado expresión de transcritos de todas las subunidades del receptor de acetilcolina en los timos humanos normales (Figura 1.4).

La subunidad alfa, que es el principal autoantígeno involucrado en la respuesta autoinmunitaria en los pacientes con MG, se expresó en 10 de las 14 muestras tímicas normales estudiadas. Además, los niveles de expresión de los transcritos de alfa fueron diferentes entre las glándulas, con marcadas variaciones interindividuales que no guardaron relación con la edad. De acuerdo con las categorías definidas para cuantificar el nivel de transcripción, cuatro glándulas fueron positivas y seis fueron débilmente positivas.

La subunidad beta del receptor de acetilcolina fue positiva en todas las glándulas tímicas (14 de 14) y los niveles de transcripción fueron similares para todas.

Para la subunidad delta, solo seis de 14 timos fueron positivos, mostrando además marcadas diferencias interindividuales en el nivel de transcripción, tal como se pudo apreciar por observación directa a la luz UV de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, y como se comprobó posteriormente en los experimentos de hibridación. De acuerdo con las categorías definidas para cuantificar el nivel de transcripción, tres glándulas fueron positivas y otras tres fueron débilmente positivas para los transcritos de la subunidad delta.

Los receptores sinápticos de acetilcolina del músculo fetal, contienen una subunidad gamma que es reemplazada por una subunidad homóloga épsilon durante la primera semana de vida postnatal. Hemos encontrado que la expresión de transcritos de la subunidad gamma guardó una fuerte relación con la edad, quedando restringida exclusivamente a las glándulas de niños pequeños, con edades comprendidas entre los dos días y pocos meses de vida.

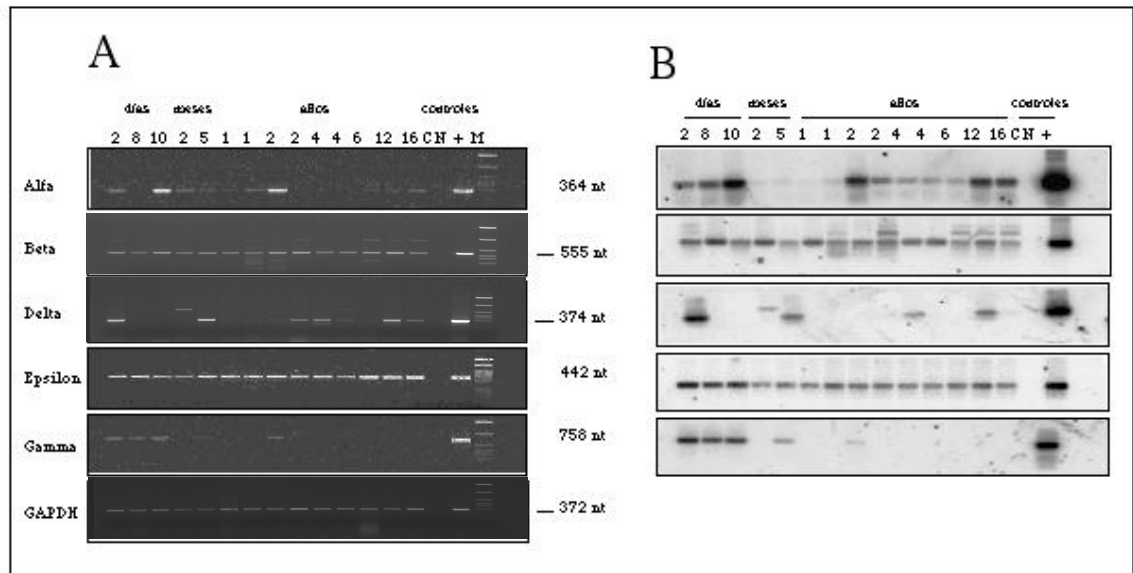
Transcritos de la subunidad épsilon estuvieron expresados en todas las glándulas (14 de 14) tal como se confirmó posteriormente mediante hibridación con la sonda complementaria específica.

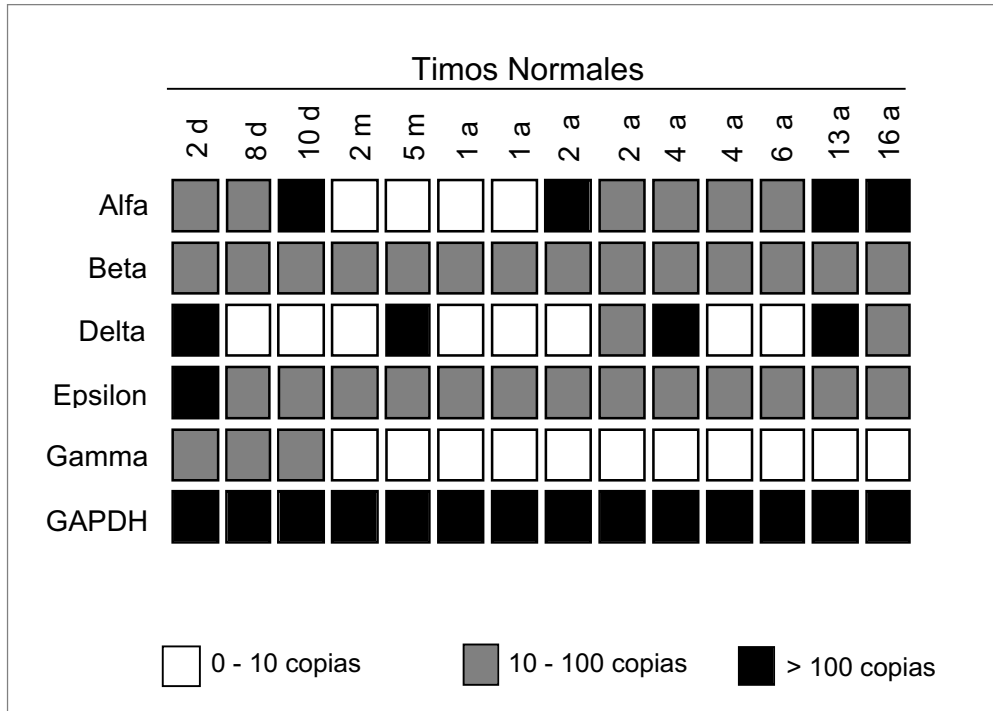
En síntesis, encontramos expresión de las subunidades alfa, beta, delta y épsilon en todas las glándulas tímicas, sin guardar ninguna relación entre dicha expresión y la edad. Sin embargo, la subunidad gamma se expresó solo en las muestras tímicas de neonatos, pudiendo relacionarse con el cambio de la subunidad gamma por la subunidad épsilon durante la inervación del músculo, que tiene lugar en la primera semana de vida postnatal.

Además, la normalización previa de los cDNAs de acuerdo al gen constitutivo GAPDH, nos permitió comparar los niveles de transcripción y observar marcadas diferencias interindividuales en los niveles de expresión de las subunidades alfa y delta. En el gráfico 6 se encuentran esquematizados los resultados de los experimentos de cuantificación en el panel de timos normales.



Figura 1.4 Expresión del AChR en el panel de timos normales





**Gráfico 6:** Niveles de transcripción del AChR en los timos normales

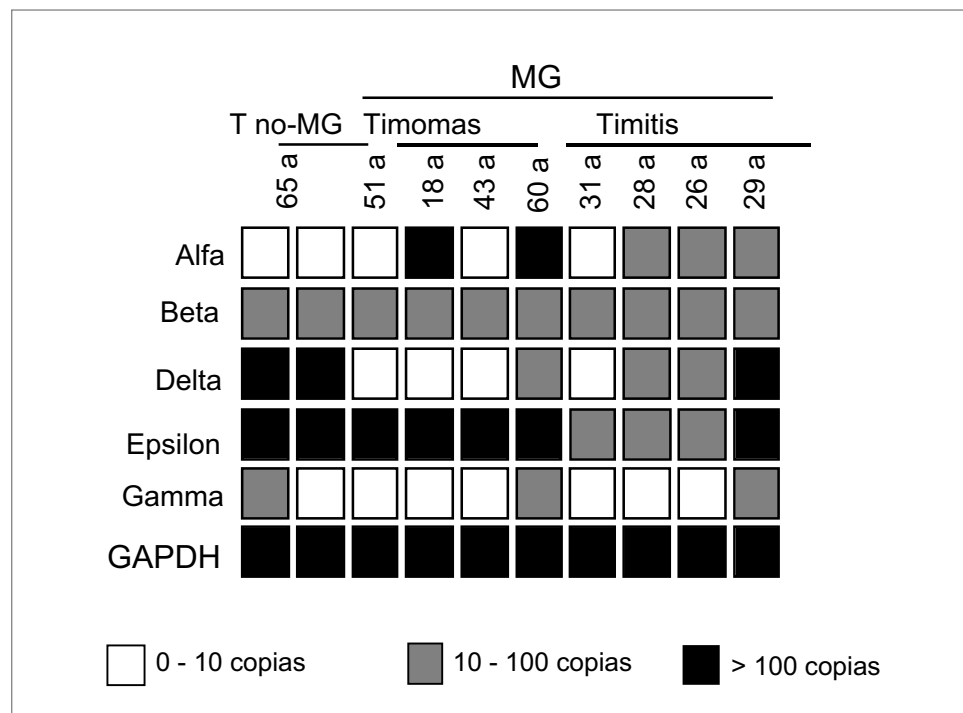
### 5. Las cinco subunidades del receptor de acetilcolina se expresan en los timos patológicos.

También examinamos la expresión de transcritos del receptor de acetilcolina en un panel de 9 glándulas tímicas procedentes de pacientes con anomalía tímica (Figura 1.5). Utilizando las mismas condiciones de amplificación que para el panel de timos normales, encontramos transcritos de alfa en cuatro de cinco muestras procedentes de pacientes con timitis. Solo una muestra procedente de un timoma de un paciente con MG resultó fuertemente positiva para alfa.

Todas las muestras del panel de timos patológicos (10 de 10) fueron positivas para transcritos de beta y épsilon.

Para la subunidad gamma, encontramos que resultaron positivas una muestra procedente de un timoma de un paciente sin MG (una de cuatro muestras) y dos muestras procedentes de pacientes con timitis y MG (dos de cinco muestras).

Para la subunidad delta, seis de 10 muestras fueron positivas: dos muestras procedentes de un timoma de un paciente sin MG; una de tres muestras de timomas de pacientes con MG y tres de cinco muestras procedentes de pacientes con timitis y MG. Estos resultados fueron confirmados por hibridación (Figura 1.5 B) y se encuentran representados en el gráfico 7 y resumidos en la tabla IV.

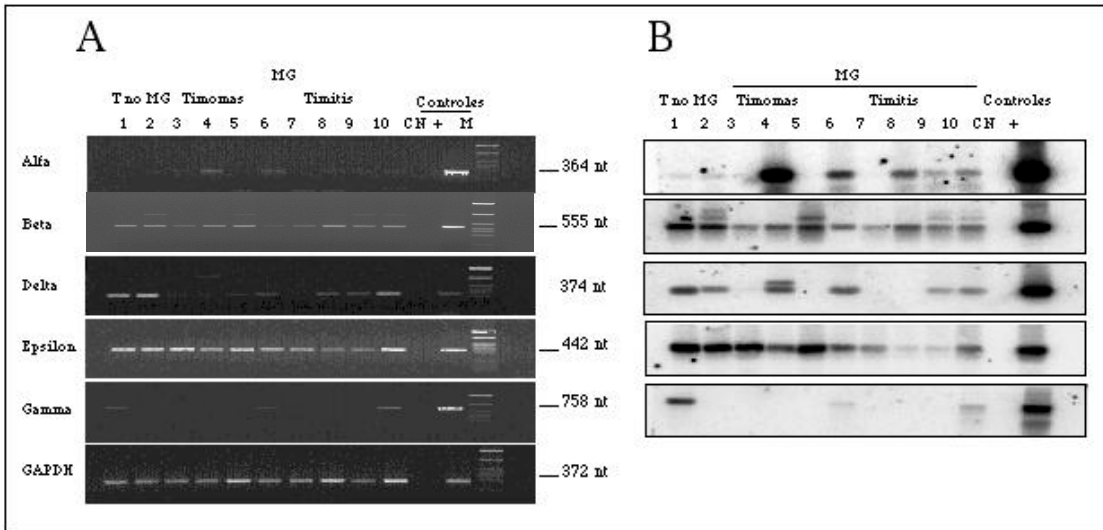


**Gráfico 7:** Niveles de transcripción del AChR en los timos patológicos

Subunidad	Timos normales	Timomas con MG	Timitis con MG	Timomas sin MG	
				Tumor	No tumor
Alfa	10/14	1/3	4/5	-	-
Beta	14/14	3/3	5/5	+	+
Delta	8/14	1/3	3/5	+	+
Epsilon	14/14	3/3	5/5	+	+
Gamma	3/14	0/3	1/5	+	-

Tabla IV. Resumen de la expresión del AChR en las muestras tímicas normales y patológicas.

Figura 1.5 Expresión del AChR en el panel de timos patológicos



## **6. El patrón de expresión tímica del receptor adulto de acetilcolina es cortical y medular.**

Al menos cinco grupos de cortezas y médulas tímicas fueron aisladas por microdissección con láser (Maitra et al., 1999), a partir de diferentes secciones de criostato cada muestra. De cada microdissección, se tomaron imágenes antes de la captura, durante los disparos del láser, después de la captura y finalmente del grupo celular microdisseccionado (Figura 1.6 A). Las microdissecciones se realizaron dejando márgenes entre las áreas de disección, a fin de evitar la mínima contaminación del material procedente de cortezas con células medulares, y viceversa.

Las muestras de cDNA de las microdissecciones, fueron normalizadas según la expresión del gen constitutivo GAPDH para poder comparar los niveles de expresión de los autoantígenos entre las muestras procedentes de cortezas y las procedentes de las médulas tímicas.

Como se puede apreciar en la figura 1.6B, las subunidades beta, delta y épsilon se expresaron igualmente tanto en las cortezas como en las médulas, mientras que la subunidad gamma se expresó exclusivamente en dos médulas tímicas. La subunidad alfa se expresó tanto en las cortezas como en las médulas de todas las muestras, pero una médula mostró niveles de expresión más elevados, de acuerdo a las variaciones interindividuales observadas anteriormente en las muestras tímicas totales.

## **7. Las células mioides se localizan exclusivamente en las médulas tímicas**

Las células mioides, descritas previamente en estrecha asociación con las células interdigitantes en la médula tímica, han sido postuladas como posibles células presentadoras de los autoantígenos del AChR en el timo.

Quisimos comprobar la localización de éste tipo celular en el timo, y correlacionar su distribución en el estroma tímico con los resultados de amplificación de las subunidades en las microdissecciones.

Realizamos análisis por inmunofluorescencia en tinciones simples para desmina y en tinciones dobles para desmina y el anticuerpo monoclonal dirigido contra las células epiteliales medulares, anti-TE4 (Haynes et al., 1984) (Figura 1.7).

Las células desmina positivas se encontraron distribuidas exclusivamente en las médulas tímicas, en la unión cortico-medular y en bajo número (máximo de dos a tres células por médula).

Figura 1.6 Microdissección por láser de cortezas y médulas tímicas

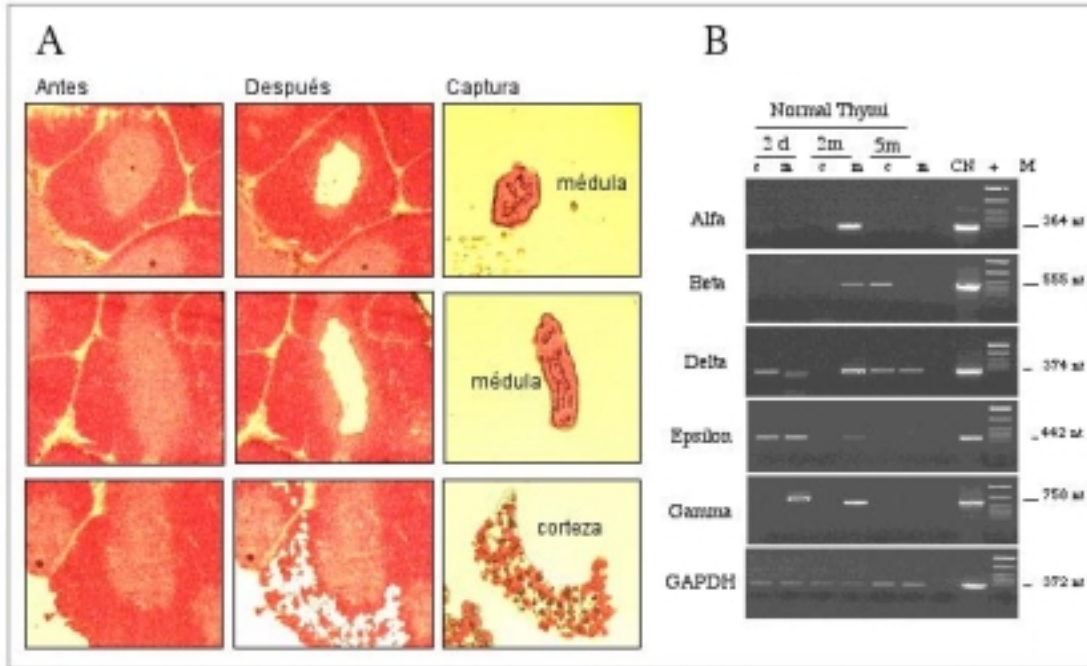
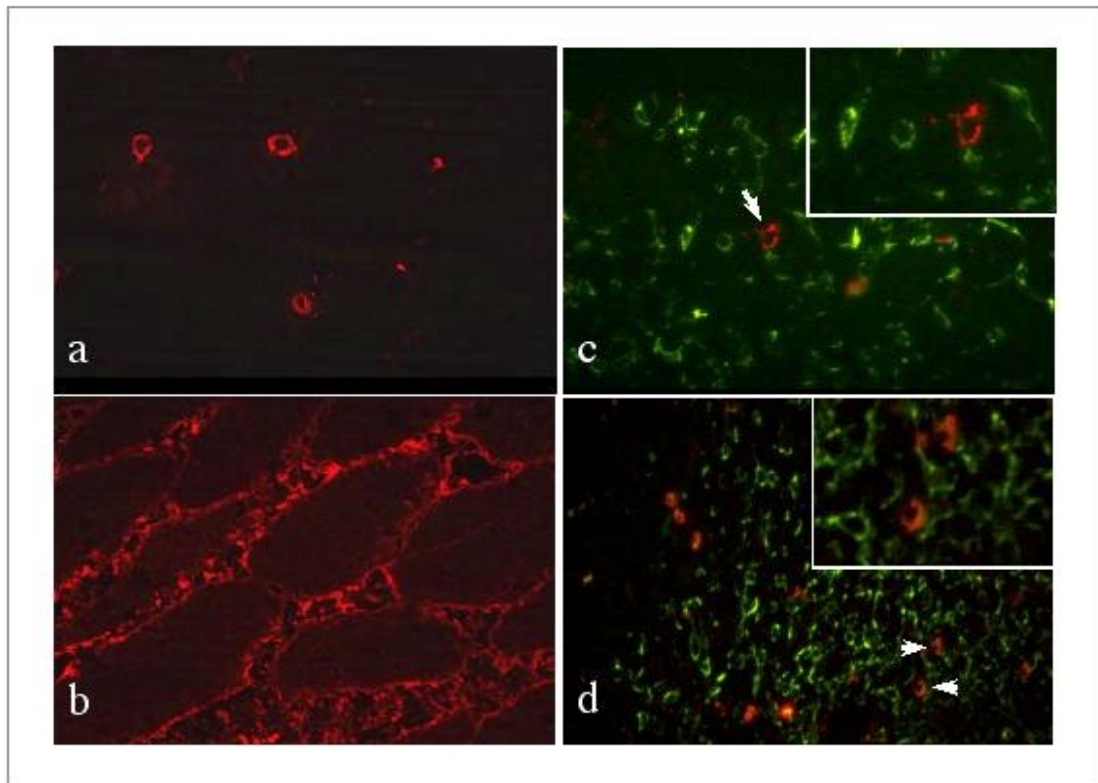
**A**, microdissección por láser; **B**, PCR de las subunidades en las cortezas y médulas microdisseccionadas

Figura 1.7 Tinción de secciones tímicas por inmunofluorescencia



Inmunofluorescencia para la detección de las células mioides en el timo humano. Panel *a*) (en rojo) células mioides positivas para desmina (630X); Panel *b*) control positivo para desmina (músculo humano, 400X); Paneles *c* y *d*) tinción doble para células mioides (desmina positivas, en rojo) y epitelio tímico medular (en verde, 400X). Notar que las células mioides se localizan en la médula tímica o en la unión córtico-medular y no son doble positivas para desmina y el marcador de epitelio tímico.





## DISCUSIÓN Resultados Parte I

El timo humano normal expresa mRNA de todas las subunidades que conforman el receptor de acetilcolina. Esto podría sugerir que la expresión intratímica durante la vida fetal sería importante para inducir tolerancia central.

Entre las muestras tímicas normales, encontramos variaciones interindividuales en los niveles de expresión de las subunidades alfa y delta, las subunidades épsilon y beta se expresaron en todos los timos estudiados, y la subunidad gamma se expresó solo en las muestras tímicas de niños pequeños.

La subunidad alfa del AChR contiene el sitio de unión para su ligando natural, el neurotransmisor acetilcolina (Tzartos et al., 1991) y contiene además una región bien definida en el dominio extracelular, denominada MIR (*main immunogenic region*) frente a la cual está dirigida la respuesta autoinmunitaria humoral en los paciente con MG (Barkas et al., 1988; Beroukhim and Unwin, 1995; Tzartos et al., 1988). Además, la subunidad alfa-1 muscular del AChR existe como dos isoformas resultantes de *splicing* alternativo del exón P3A, que origina una forma corta sin éste exón (P3A-) y una forma larga que incluye el exón (P3A+) (Beeson et al., 1990). Debido a que las dos isoformas de la subunidad alfa-1 muscular ha sido bien caracterizada en el timo humano (Talib et al., 1993; Zheng et al., 1999) y en el músculo (Guyon et al., 1994) decidimos examinar la expresión tímica de la subunidad alfa-1 muscular mediante la amplificación del gen alfa-1 a partir de exones ubicados *downstream* del exón P3A. Para evitar la amplificación de forma neuronales de alfa, las cuales han sido ya descritas en el timo (Navaneetham et al., 1997) (Mihovilovic et al., 1993; Mihovilovic and Roses, 1993) la homología de los cebadores utilizados fue cuidadosamente revisada en las bases de datos de Gene Bank.

Encontramos marcadas variaciones interindividuales en los niveles de expresión tímica de las subunidades musculares alfa y delta, una variabilidad que resultó independiente de la edad. La subunidad alfa muscular había sido previamente demostrada en el timo humano normal (Wakkach et al., 1996) y en timomas procedentes de pacientes con MG (Hara et al., 1991) pero nuestro trabajo es el primero que demuestra variaciones interindividuales en los niveles de expresión tímica, probablemente debido al estudio sistemático y al amplio rango de muestras tímica incluidas en el estudio.

El gen de la subunidad alfa del AChR muscular de individuos normales y de pacientes con MG presenta polimorfismos (Lobos et al., 1989). Se ha descrito que los polimorfismos presentes en el primer intrón del gen alfa confieren riesgo relativo de MG (Garchon et al., 1994). Estos polimorfismos, en combinación con determinados genes de HLA, fueron asociados a susceptibilidad a la enfermedad en un grupo de pacientes con MG (Djabiri et al.,

1997a). Debido a que las variaciones alélicas en éste locus polimórfico dentro del primer exón del gen de la subunidad alfa podría influir en la transcripción del gen, sería interesante investigar en el futuro si las variaciones alélicas se correlacionan con expresión diferencial del mRNA de la subunidad alfa en el timo.

Variaciones interindividuales en los niveles de expresión tímica, independientes de la edad, han sido previamente observadas para otros autoantígenos como TPO e insulina (Sospedra et al., 1998). Además, la expresión de mRNA de insulina en el timo es variable y está asociada a con variaciones alélicas en el gen de la insulina. Alelos de número variable de repeticiones en tandem (VNTR) se correlacionan con diferentes niveles de transcripción del mRNA de insulina en el timo (Pugliese et al., 1997; Vafiadis et al., 1997).

Debido a que altos niveles de expresión de antígenos en el timo se han asociado a tolerancia, mientras que bajos niveles se han asociado a selección positiva, (Oehen et al., 1994; Sebzda et al., 1994) es posible que los niveles intratímicos de la subunidad alfa afecten el establecimiento de la tolerancia durante la vida fetal. Como también hemos encontrado variaciones interindividuales no relacionadas con la edad en la expresión de la subunidad delta, podría especularse que los niveles intratímicos de transcritos de la subunidad delta también afectarían el establecimiento de la tolerancia central, pero el gen delta no ha sido completamente estudiado.

Las subunidades beta y épsilon del AChR se expresan en el timo sin variaciones interindividuales. Hemos encontrado niveles similares de transcritos de beta y épsilon en todas las muestras estudiadas, lo cual podría sugerir que la transcripción de éstos genes en el timo no tiende a decaer con la edad como podría esperarse por la progresiva disminución de la función tímica con la edad, y como se ha observado previamente para otros autoantígenos.

Además, otros autores han estudiado el gen de la subunidad beta, pero no se han encontrado polimorfismos en el gen beta que puedan asociarse con susceptibilidad a la MG (Djabiri et al., 1997b).

La subunidad gamma se encontró expresada solo en glándulas tímicas neonatales con edades comprendidas entre los dos y 5 meses. Nuestros resultados no concuerdan con otros previamente publicados, ya que en dichos trabajos no detectan transcritos de la subunidad gamma en células epiteliales tímicas en cultivo (Wakkach et al., 1996) ni en muestras de tejido tímico total parafinado (Kaminski et al., 1993). Si bien la metodología empleada por estos autores para la detección de los transcritos de gamma es también RT-PCR y Southern Blot, una posible explicación a tal discrepancia podría ser el tipo de muestras empleadas para el estudio, ya que nosotros utilizamos tejido tímico total. Otra posible explicación podría ser la edad de las glándulas tímicas utilizadas, ya que nosotros

incluimos un rango amplio de edades incluyendo timos de pocos días de vida. Por último la sensibilidad de los cebadores utilizados para detectar gamma puede afectar la eficiencia de la amplificación.

Durante el proceso de inervación del músculo, en la forma fetal del receptor de AChR se inactiva la transcripción del gen gamma y se activa la transcripción del gen épsilon muy pronto después del nacimiento (Martinou et al., 1991; Missias et al., 1996; Sanes et al., 1991). Los receptores fetales de acetilcolina que contienen una subunidad gamma en su estructura, son reemplazados por una forma homóloga adulta, que contiene una subunidad épsilon durante la primera semana de vida postnatal (Gu and Hall, 1988; Mishina et al., 1986; Missias et al., 1996). Nuestros resultados sugieren que existiría la misma regulación transcripcional de los genes gamma y épsilon tanto en timo del neonato como en el músculo fetal. De esta manera, cuando el músculo fetal expresa la isoforma fetal del receptor, el timo fetal también expresaría la subunidades que conforman el receptor fetal y por tanto transcritos de gamma. Cuando en el músculo se produce el cambio de la subunidad gamma por la subunidad épsilon para dar la isoforma adulta del receptor, este cambio también afectaría la expresión tímica.

Curiosamente, el gen de la subunidad gamma no se inactiva definitivamente, sino que permanece presente en el adulto, en los músculos extraoculares (Horton et al., 1993). Esto indicaría que el gen gamma continuaría transcribiéndose para constituir los receptores de los músculos exteriores del ojo y podría pensarse que también el gen se regularía en el timo adulto, pero en este trabajo no detectamos su expresión. Debido a que la subunidad gamma es un autoantígeno involucrado en la MG, la desaparición de los transcritos de gamma en el timo con la edad tendría implicancias en la tolerancia. Al no expresarse la subunidad gamma en el timo adulto, pero sí en la periferia, podría haber salida de células autorreactivas contra la subunidad gamma desde el timo hacia la periferia. Esto aumentaría la probabilidad de una respuesta autoinmunitaria a partir de la presentación antigénica de la subunidad gamma en la periferia, y la posterior extensión de la respuesta al resto de las subunidades del receptor.

Se han descrito autoanticuerpos contra la forma fetal del receptor de AChR (Burges et al., 1990; Vernet-der Garabedian et al., 1994; Vincent and Newsom-Davis, 1982) así como altos títulos de anticuerpos capaces de inhibir la función del receptor fetal de AChR han sido detectados en el suero de mujeres con historia clínica de artrogriposis múltiple congénita recurrente (AMC) (Riemersma et al., 1996; Vincent et al., 1995). Debido a que la forma fetal del AChR permanece en los músculos extraoculares adultos (Horton et al., 1993) la pérdida de expresión tímica de la subunidad gamma provee una posible explicación a la aparición de altos títulos de anticuerpos contra el receptor fetal.

Previos estudios han demostrado mediante RT-PCR transcritos específicos de las subunidades que conforman el receptor fetal de acetilcolina en el timo de pacientes con MG (Hara et al., 1993; Hara et al., 1991) y también mediante hibridaciones de dot-blot (Geuder et al., 1992). En cambio, otros autores han demostrado solo transcritos de la forma adulta del receptor en los timos procedentes de pacientes con MG (Kaminski et al., 1993; Wakkach et al., 1996). Nuestros resultados indican que la forma adulta del receptor está expresada en los timos de pacientes con MG, mientras que la forma fetal del receptor está expresada solo en una minoría de casos. La discrepancia podría explicarse, como ya mencionamos, por la sensibilidad de los cebadores utilizados para detectar la expresión de transcritos de gamma y de épsilon.

No encontramos marcadas diferencias en el patrón de expresión de las subunidades del AChR entre los timos normales y los timos patológicos, excepto en la subunidad gamma, que se encontró expresada en algunos timos patológicos de adultos. Si bien esto concuerda con datos previamente publicados por otros autores (Wakkach et al., 1996) y el número de muestras tímicas de pacientes con MG estudiado es bajo, parecería que la expresión intratímica sola no es suficiente para explicar la aparición de la MG.

Se han descrito dos tipos celulares responsables de la expresión del AChR en el timo: las células mioides tímicas y las células epiteliales tímicas. Las células mioides tímicas tienen características de células musculares esqueléticas dentro del timo y expresan proteínas específicas del músculo, como son desmina, troponina T y el AChR (Schluep et al., 1987). Las células mioides tímicas expresan transcritos del receptor fetal de acetilcolina (Geuder et al., 1992; Hara et al., 1993; Nelson and Conti-Tronconi, 1990) mientras que cuando de las inmortaliza en cultivo expresan ambas formas del receptor, tanto adulto como fetal, a nivel de mRNA (Wakkach et al., 1999).

Mediante RT-PCR, otros autores han detectado la forma adulta del receptor, pero no la forma fetal, en las células epiteliales tímicas (TEC) y además la forma proteica del receptor adulto ha sido confirmada en las TECs por western blot y por inmunofluorescencia (Wakkach et al., 1996).

En las amplificaciones de las subunidades del receptor en el panel de timos microdisecionados, no encontramos diferencias entre las cortezas y las médulas en el patrón de expresión para las subunidades beta, delta y épsilon. La subunidad alfa también estuvo presente en cortezas y médulas, pero con mayor nivel de expresión en una médula tímica. Estos resultados son consistentes con los publicados por Wheatley y col., quien encontró expresión de la subunidad alfa en el cDNA procedente de líneas epiteliales corticales y medulares tímicas de ratón (Wheatley et al., 1992).

Para la subunidad gamma, nosotros encontramos expresión solo en dos médulas microdisseccionadas.

La presencia de células mioides positivas para desmina han sido previamente descritas en secciones tímicas de timos normales y de pacientes con MG (Bornemann and Kirchner, 1998; Kirchner et al., 1988; Melms et al., 1988; Schluep et al., 1987) y han sido confirmadas por inmunofluorescencia en esta tesis. Encontramos un número muy bajo de células positivas para desmina y localizadas en las médulas tímicas. Estos resultados, confirman previas publicaciones, que sugieren que la forma fetal del receptor de acetilcolina estaría expresado en las células mioides localizadas en la región medular tímica, mientras que la forma adulta del receptor estaría expresado en las células epiteliales, distribuidas en todo el estoma tímico.

