



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**AUTOINMUNIDAD COMO UNA CAUSA DE
SUSCEPTIBILIDAD SELECTIVA A
INFECCIONES MICOBACTERIANAS EN
HUMANOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :
**GUADALUPE ANAID FERNÁNDEZ
RAMÍREZ**



Tutor: DRA. GABRIELA BARCENAS
MORALES

MÉXICO, D. F.

Septiembre 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Gabriela Barcenas Morales en el Laboratorio de Inmunología, en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Gabriela Barcenas Morales	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Rainer Döffinger, del Department of Clinical Biochemistry and Immunology del Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K., en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de citometría de flujo.

Se reconoce la donación de reactivos y la asesoría técnica del Dr. Rainer Döffinger y la Q.F.B. Lourdes Cerón Gutiérrez en los experimentos de citometría de flujo.

El presente trabajo fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT, con clave SALUD-2004-C01-092.

Reconozco el soporte por parte del CONACYT al otorgarme una beca durante los estudios de Maestría y la realización de la presente tesis, así como el apoyo por parte del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas para la realización de una estancia académica en el extranjero.

Esta tesis fue sustentada en el examen presentado el mes de Noviembre del año 2006, reconociendo la labor por la revisión del presente escrito realizada por el Jurado del examen de Maestría, constituido por los siguientes miembros:

Presidente	Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Clara I. Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Carlos Rosales Ledezma	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la donación de muestras séricas al Dr. Rainer Döffinger del Department of Clinical Biochemistry and Immunology en el Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.; al Dr. Javier Cabiedes Contreras del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México; y al Dr. Eduardo Sada Díaz del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México.

Agradecemos a los miembros del laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán el habernos permitido el uso de sus instalaciones para la impresión y revelado del material fotográfico empleado en el trabajo experimental.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis, producto de varios años de formación y esfuerzo, a las dos personas que con su amor y disciplina me formaron desde el hogar, quienes siempre me han apoyado y respaldado, quienes soportaron conmigo los buenos y malos tiempos; a ellos, a mis padres, con los que estaré eternamente agradecida, les dedico este trabajo.

Esta tesis también la dedico a mis abuelitos Carmen y Agustín, que aún tengo la fortuna de tener conmigo, y a mis abuelitos José Guadalupe y Gudelia, así como a mi tío *Pin*, quienes se adelantaron en el camino pero que yo sé que de alguna manera están compartiendo conmigo esta alegría.

GRACIAS...

A la familia Döffinger-Barcenas por la confianza, dirección y apoyo.

A mis padrinos, Andrea y Alfredo, porque de una u otra forma siempre me han mostrado su apoyo.

A *Nash*, por tu maravillosa amistad a lo largo de tantos años y por recordarme que la risa hasta en las situaciones más difíciles sigue siendo el mejor aderezo para acompañar la vida. Tu amistad es una de las mejores cosas que me ha sucedido.

A Lety y a Maru, por su amistad y por todo el soporte técnico, mágico, cómico y musical. También por su disposición para sacarme de uno que otro apuro que no faltó por ahí.

Al clan egresado de la FES-Cuautitlán: Marlene, Magos, Edgar, Gaby, David y Silver. Sus visitas al lugar de trabajo son siempre muy reconfortantes.

A los compañeros de la Maestría: Andrea, Luciano, Alejandra, Ámbar y Jenny. Por formar los utilísimos círculos de estudio y por las anécdotas tan divertidas que pasamos juntos.

Y, claro, gracias a mi amada y gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México y a todos los profesores que directa o indirectamente han contribuido a mi formación como persona y profesionista.

¡De todo corazón, GRACIAS!

*¡Sujeta bien el tiempo! Protégelo, vigílalo, Cada hora, cada minuto.
Si no lo tienes en cuenta, se desvanece ... Considera sagrado cada
momento. Dale a cada uno claridad y significado, a cada uno el peso
de tu atención, a cada uno su verdadero y merecido logro.*

THOMAS MANN

*El conocimiento y el poder humanos son lo mismo, pues cuando
la causa no se conoce, el efecto no se produce. Para dominar la
naturaleza es preciso obedecerla... la sutilidad de la naturaleza
es mucho mayor que la sutilidad de los sentidos y la comprensión.*

FRANCIS BACON

*El cielo estrellado encima de mí y la ley moral dentro de mí,
son para mí pruebas de que hay un Dios por encima de mí y
un Dios dentro de mí.*

IMMANUEL KANT

ÍNDICE

Resumen	i
Summary	iii
Lista de abreviaturas	v
1. Introducción	1
1.1. Respuesta inmune del hospedero.	3
1.2. Citocinas y receptores involucrados en la resistencia a infecciones micobacterianas.	5
1.2.1. Interleucina 12.	5
1.2.2. Interferón gamma.	6
1.2.3. Factor necrótico tumoral alpha.	7
1.2.4. Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos.	8
1.2.5. Interleucina 6.	10
1.2.6. Interleucina 1 beta.	10
1.2.7. Interleucina 18.	11
1.2.8. Interleucina 10.	11
1.3. Autoinmunidad hacia citocinas.	12
2. Planteamiento del Problema	18
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Metas	20
5. Materiales y Métodos	22
5.1. Muestras y pacientes.	22
5.2. Colección y tratamiento de las muestras.	23
5.3. Estandarización y condiciones de la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos para la detección de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas empleando un método colorimétrico (IFMA-C).	23
5.4. Estandarización y condiciones de la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos utilizando un sustrato quimioluminiscente (IFMA-Q) para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas.	26

5.5. Técnica de ELISA para la determinación del título de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas.	28
5.6. Estandarización de la técnica de citometría de flujo para la detección de la expresión del receptor para IFN γ (IFN γ R1 e IFN γ R2) en líneas celulares.	30
5.6.1. Descripción de las líneas celulares.	30
5.6.2 Detección de la expresión de la cadena IFN γ R1 del receptor para IFN γ en las líneas celulares L929 y LhgR.	30
5.6.3. Estandarización de la técnica de citometría de flujo para la detección de la expresión de la cadena IFN γ R2 del receptor para IFN γ en las líneas celulares B-EBV Comar e IFN γ R2 -/.	31
5.6.4. Estandarización de la técnica de citometría de flujo para la detección de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 en muestras séricas.	32
6. Resultados	34
6.1 Colección de muestras séricas.	34
6.2. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas mediante la técnica de IFMA-C.	34
6.3. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas mediante la técnica de IFMA-Q.	35
6.3.1. Determinación de la concentración óptima de las citocinas.	35
6.3.2. Análisis de las muestras séricas.	39
6.4. Determinación del título de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas mediante la técnica de ELISA.	47
6.4.1. Sueros incluidos en el análisis.	47
6.4.2. Análisis de las muestras séricas mediante la técnica de ELISA.	49
6.5. Detección de autoanticuerpos contra el receptor para IFN γ (IFN γ R1 e IFN γ R2) en líneas celulares mediante la técnica de citometría de flujo.	53
6.5.1. Detección de la expresión de las subunidades IFN γ R1 e IFN γ R2 del receptor para IFN γ en líneas celulares mediante la técnica de citometría de flujo.	53
6.5.2. Condiciones finales de la técnica de citometría de flujo para la detección de autoanticuerpos anti- IFN γ R1 en muestras séricas.	55
6.5.3. Detección de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 en muestras séricas mediante la técnica de citometría de flujo.	55
7. Discusión	68
8. Conclusiones	75
9. Perspectivas	77
10. Referencias	79

ANEXO I: Tablas

ANEXO II: Soluciones y reactivos

ANEXO III: Presentaciones en congresos

RESUMEN

Las infecciones diseminadas causadas por micobacterias no tuberculosas (MNT) o BCG han sido descritas en pacientes con inmunodeficiencias. Particularmente, individuos con defectos en la vía de IL-12 dependiente de IFN γ son altamente susceptibles a infecciones micobacterianas y salmonelosis. Recientemente se han descrito casos de susceptibilidad adquirida a infecciones micobacterianas debidas a autoanticuerpos anti-IFN γ de alta afinidad.

OBJETIVO: Investigar la autoinmunidad específica hacia citocinas y receptores de la vía de IL-12/IFN γ en pacientes con infecciones atípicas recurrentes y/o diseminadas causadas por *M. tuberculosis* (Mtb) o MNT en el ambiente.

METODOLOGÍA: Se estandarizó la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA) comparando un sustrato colorimétrico y uno quimioluminiscente. Las muestras séricas incluidas en el estudio pertenecen a los siguientes grupos: MNT o infección diseminada por Mtb (n=62), TB pulmonar (n=25), lupus eritematoso generalizado (LEG)/TB pulmonar (n=54), LEG (n=10), vasculitis/TB pulmonar (n=37), vasculitis (n=10), salmonelosis (n=5), infecciones recurrentes con microorganismos oportunistas (n=15), enfermedades autoinmunes distintas a LEG (n=21), pacientes tratados con anti-TNF α (n=4), individuos sanos (n=60). Los autoanticuerpos contra IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40 e IL-18 se detectaron mediante IFMA. Las muestras de pacientes tratados con anti-TNF α se incluyeron como control del sistema. Los niveles de autoanticuerpos en las muestras positivas fueron confirmados por ELISA. La detección de anticuerpos anti-IFN γ R1 se realizó por citometría de flujo empleando fibroblastos murinos transfectados con la subunidad R1 del receptor para IFN γ .

RESULTADOS: Mediante la técnica de IFMA empleando un sustrato quimioluminiscente (IFMA-Q) se obtuvieron mejores resultados que empleando un sustrato colorimétrico; esta técnica demostró ser una prueba de tamiz rápida, sencilla y poco costosa. Las concentraciones óptimas de los antígenos fueron de 5 μ g/ml para IL-6, IL-12p40 e IFN γ (PeproTech), de 3 μ g/ml para IL-18 e IFN γ (Imukin), de 2 μ g/ml para GM-CSF y de 10 μ g/ml para IL-10 y TNF α . Mediante esta técnica se detectaron autoanticuerpos contra IL-6 (3 casos), IL-10 (8 casos), IL-12p40 (2 casos), IFN γ (5 casos), TNF α (2 casos) y GM-CSF (2 casos), mientras que en individuos sanos no se hallaron autoanticuerpos contra las citocinas analizadas. Los niveles de los autoanticuerpos anti-IFN γ , anti-GM-CSF y anti-TNF α resultaron más elevados que aquellos que

presentaron los individuos controles. Por otra parte, se detectaron 16 casos de pacientes que presentaron autoanticuerpos anti-IFN γ R1 de los cuales 14 pertenecen al grupo de TB pulmonar.

CONCLUSIÓN: Los autoanticuerpos anti-citocinas y anti-receptores se encuentran presentes en pacientes con infecciones atípicas recurrentes y/o diseminadas causadas por Mtb, MNT o microorganismos oportunistas y podrían estar involucrados en el desarrollo de una susceptibilidad tardía a este tipo de infecciones. La detección de estos autoanticuerpos en pacientes, en los que se han descartado inmunodeficiencias primarias y secundarias, es de gran importancia. Las técnicas de IFMA-Q y citometría de flujo se recomiendan como pruebas de tamiz, útiles para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas y anti-receptores de citocinas en este tipo de pacientes.

SUMMARY

Systemic infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM) or BCG have been described in patients with immunodeficiency. In particular, individuals with defects in the IL-12 dependant IFN γ pathway are selectively highly susceptible to mycobacteria and Salmonella. Recently, cases of acquired susceptibility to mycobacterial infection due to high affinity auto-antibodies to IFN γ have been described.

OBJECTIVE: Our goal was to further investigate specific auto-immunity to cytokines and some receptors involved in the IL-12 / IFN γ pathway in patients with atypical recurrent and/or disseminated infections by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) or environmental NTM.

METHODS: The Multiple Antigen Fix Immunoassay was standardized while comparing a colorimetric and a chemiluminescent substrate. Sera samples included in this study belong to the following groups: NTM or Mtb disseminated infection (n=62), pulmonary TB (n=25), systemic lupus erythematosus (SLE)/pulmonary TB (n=54), SLE (n=10), vasculitis/pulmonary TB (n=37), vasculitis (n=10), salmonellosis (n=5), recurrent infections due to other opportunistic microorganisms (n=15), non-related autoimmune diseases (n=21), patients on anti-TNF α treatment (n=4), healthy individuals (n=60). Cytokine specific autoantibodies against IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12p40 and IL-18 were screened by MAFI. Samples from patients on anti TNF α treatment (Infliximab) were included as control of our system. Titer of autoantibodies in positive samples were confirmed by ELISA. Detection of anti-IFN γ R1 was done by FACs, employing murine fibroblasts transfected with the R1 subunit of the IFN γ receptor.

RESULTS: The best results were obtained by IFMA technique employing a chemiluminescent (IFMA-Q) substrate than employing a colorimetric substrate. This technique demonstrated to be was quick, easy and cheap sieve test. The best concentrations for the antigens were 5 μ g/ml for IL-6, IL-12p40 and IFN γ (PeproTech), 3 μ g/ml for IL-18 and IFN γ (Imukin), 2 μ g/ml for GM-CSF, and 10 μ g/ml for IL-10 and TNF α . By this technique auto-antibodies against IL-6 (3 cases), IL-10 (8 cases), IL-12p40 (2 cases), IFN γ (5 cases), TNF α (2 cases), and GM-CSF (2 cases) were detected. In healthy individuals no auto-antibodies to the analyzed cytokines were detected. Levels of autoantibodies anti-IFN γ , anti-GM-CSF and anti-TNF α were higher than those detected in controls. In other way, 16 cases of patients presenting autoantibodies anti-IFN γ R1 were detected. From these, 14 patients belong to the pulmonary TB group.

CONCLUSION: Autoantibodies anti-cytokines and anti-receptors are present in patients with atypical recurrent and/or disseminated infections caused by Mtb, environmental NTM or oportunistic microorganisms, and may be involved in the development of a late on-set susceptibility to this kind of infections. Detection of these autoantibodies in these patients, where primary and secondary immunodeficiencies have been discarded, is of main importance. MAFI-Q and flow cytometric assays are recommended as sieve tests useful for detection of autoantibodies anti-cytokines and anti-cytokine receptors in this kind of patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAN = Autoanticuerpos naturales

ASB = Albúmina sérica bovina

BCC = Buffer de carbonatos

BCG = Bacilo Clamette-Guérin

CPA = Célula presentadora de antígeno

D.O. = Densidad óptica

ELISA = Ensayo inmunenzimático ligado a una enzima

FACs = Análisis por citometría de flujo

Fc = Fracción cristalizable

Fc γ R = Receptor de la fracción cristalizable de IgG

FITC = Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF = Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

HLA-II = Antígeno leucocitario humano tipo II

IFMA = Inmunoensayo de fijación de múltiples antígenos

IFMA-C = IFMA por método colorimétrico

IFMA-Q = IFMA con sustrato quimioluminiscente

IFN α = Interferón alpha

IFN γ = Interferón gamma

IL = Interleucina

IL-1Ra = Receptor antagonista de IL-1

IMA = Infección micobacteriana atípica

IMF = Intensidad media de fluorescencia

iPAP = Proteinosis pulmonar-alveolar idiopática

IVC = Inmunodeficiencia variable crónica

LEG = Lupus eritematoso generalizado

LPS = Lipopolisacárido

MBP = Proteína de unión a manosa

MHC-II = Complejo principal de histocompatibilidad tipo II
MNT = Micobacterias no tuberculosas
Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*
NC = Nitrocelulosa
NF κ B = Factor nuclear kappa B
NK = Natural killer
NO = Oxido nitroso
NRAMP = Proteína de resistencia natural asociada a macrófagos
NY = Nylon
PAP = Proteinosis pulmonar-alveolar
PBMC = Células mononucleares de sangre periférica
PBS = Buffer de fosfatos
PE = Ficoeritrina
PBS-T = Buffer de fosfatos adicionado con Tween-20
PPDtb = Derivado protéico purificado de *M. tuberculosis*
RFLPs = polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción
SNP = Polimorfismos de un nucleótido sencillo
STAT-1 = Transductor de señales y activador transcripcional - 1
TB = Tuberculosis
TCR = Receptor de células T
TH1 / TH2 = Célula T cooperadora tipo 1/ célula T cooperadora tipo 2
TLRs = Receptores tipo Toll
TNF α = Factor de necrosis tumoral alfa
 λ = longitud de onda
 μ g = microgramo
 μ l = microlitro
mg = miligramo
ml = mililitro
h = hora
min = minuto
nm = nanómetros

1. INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium* comprende un grupo único de bacterias caracterizadas por una pared rica en lípidos que contiene ácido N-glucolilneuramínico. Las micobacterias son microorganismos no móviles, no esporulados, débilmente Gram-positivos, aerobios o microaerofílicos, en forma de bastón ligeramente curvo; algunas micobacterias presentan forma de cocobacilos, filamentosas o ramificadas (Good y Shinnick, 1998).

La mayoría de las especies de este género se encuentran en el ambiente viviendo como saprófitos en la tierra o en el agua; sin embargo, poco se conoce acerca de sus requerimientos metabólicos en su nicho ecológico. Otras especies son patógenos obligados. Dentro de estas especies se incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium simiae* (Good y Shinnick, 1998).

El género *Mycobacterium* puede dividirse en dos categorías: en el complejo *M. tuberculosis* (Mtb) y en micobacterias no tuberculosas (MNT). Ambas categorías a su vez se subdividen en bacterias de crecimiento rápido y lento (Döffinger *et al.*, 2005).

La mayoría de las especies de MNT son ubicuas, por lo que la exposición a estas bacterias es muy alta desde los primeros años de vida. La transmisión de un individuo a otro no es una ruta de transmisión significativa en las infecciones causadas por MNT. La infección causada por MNT presenta principalmente 5 síndromes clínicos: enfermedad pulmonar; linfadenitis; infecciones en tejidos blandos, esquelético y piel; infecciones en torrente sanguíneo relacionadas con el uso de catéteres; y enfermedad diseminada (Döffinger *et al.*, 2005).

Mtb es el agente causal de la tuberculosis (TB) y se considera como el patógeno humano más exitoso ya que históricamente la tuberculosis ha sido una de las principales causas de muerte de la especie humana. Actualmente existen 8 millones de nuevos casos y de 2 a 3 millones de muertes anuales por tuberculosis, siendo ésta la segunda causa de muerte relacionada con enfermedades infectocontagiosas a nivel mundial. Por otra parte, se estima que un total de 225 millones de nuevos casos y 79 millones de muertes ocurrirán entre 1998 y 2030 (Pedral-Sampaio *et al.*, 2003; Murray y Salamon, 1998).

Mtb es un patógeno intracelular facultativo de lento crecimiento que sobrevive dentro de los macrófagos. Las distintas cepas de Mtb pueden ser distinguidas unas de otras mediante el polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP). El método de RFLP más comúnmente empleado está basado en el polimorfismo y número de copias de la secuencia IS6110 que es relativamente estable y que se inserta en distintos sitios a lo largo del cromosoma. El genoma de Mtb mide 4.41 Mb y contiene alrededor de 4000 genes que codifican para proteínas de las cuales el 52% tiene una función asignada. Solo 376 proteínas parecen no tener homología con otras proteínas conocidas y ser únicas de Mtb (North y Jung, 2004).

La TB es una infección crónica producida fundamentalmente por Mtb y en algunas ocasiones por *M. bovis* o *M. avium*. Los individuos se contagian por inhalación, en algunas ocasiones por ingestión o de forma excepcional por inoculación cutánea. La infección primaria (*primo* infección) suele ser asintomática, aunque en un porcentaje reducido de casos cursa con síntomas clínicos (Ausina Ruiz, 1992).

Las infecciones micobacterianas fueron algunas de las primeras afecciones en las que se evidenció lo siguiente:

- 1) Se encuentran relacionadas con la región HLA del genoma (Hill, 2001).
- 2) Se identificó el gen de IFN γ R1 como un locus asociado a la susceptibilidad a infecciones atípicas causadas por micobacterias no patógenas y BCG (Cunningham *et al.*, 2000; Casanova y Abel, 2002; Döffinger *et al.*, 2002; Döffinger *et al.*, 2005).
- 3) Algunas mutaciones en el gen que codifica para IL-12R β 1 se han asociado con el fenotipo anterior y con la susceptibilidad a infecciones con *Salmonella* (Altare *et al.*, 1998; Döffinger *et al.*, 2005).
- 4) Susceptibilidad a padecer tuberculosis ligada al sitio 2q35 (Greenwood *et al.*, 2000; Hill, 2001).
- 5) Mayor frecuencia de tuberculosis en varones africanos ligada al cromosoma X (Hill, 2001).

De todos los individuos expuestos a Mtb solamente del 10 al 30% se infecta, lo que indica que algunos de ellos son capaces de prevenir el establecimiento del patógeno en los pulmones. De este porcentaje de individuos infectados, alrededor 90% no desarrollan la tuberculosis, lo que significa que son capaces de resolver la *primo* infección completamente o que la mantienen en un nivel subclínico; del 10% de individuos restante únicamente la mitad desarrolla la enfermedad al cabo de un año, mientras la otra mitad la desarrolla como consecuencia de una reactivación. Lo expresado anteriormente da pauta a la posibilidad de que la susceptibilidad / resistencia hacia Mtb se encuentre asociada a un trasfondo genético (North y Jung, 2004).

Los polimorfismos en genes como el de la proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural (NRAMP1), receptor de vitamina D y proteína de unión a manosa (MBP), sugieren una relación con la susceptibilidad a infecciones micobacterianas. La tuberculosis se manifiesta como un enfermedad sistémica severa en individuos con mutaciones recesivas en los genes que codifican para la cadena de unión a ligando en el receptor de interferón gamma (IFN γ), la subunidad de interleucina 12p40 (IL-12p40) y la cadena β 1 del receptor de IL-12 (North y Jung, 2004; Hill, 2001).

El diagnóstico molecular de pacientes que sufren infecciones severamente diseminadas y/o recurrentes con micobacterias de baja virulencia o con el bacilo Clamette-Guérin (BCG) a edades muy tempranas ha revelado mutaciones en varios genes que codifican para proteínas de la vía del IFN- γ dependiente de IL-12, incluyendo mutaciones en los receptores α y β para IFN- γ , receptor β 1 para IL-12 y la IL-12 (Döffinger *et al.*, 2005). Estos reportes y otros estudios indican que la vía del IFN- γ mediada por IL-12 es importante para el control de Mtb y otros patógenos intracelulares (Altare *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 2002; Caragol *et al.*, 2003; Fieschi *et al.*, 2003).

1.1. Respuesta inmune del hospedero

Considerando que *M. tuberculosis* vive dentro de las células, principalmente macrófagos, los mecanismos efectoras de células T, más que anticuerpos, son requeridos para el control y eliminación de la bacteria. La inmunidad a TB involucra interacciones complejas entre varias poblaciones celulares para el control y detención de la infección, además de prevenir la reactivación; sin embargo, esta respuesta también puede contribuir al daño tisular. Los mecanismos inmunes mediados por células proporcionan protección y originan hipersensibilidad de tipo retardado en la que las células T son los mediadores de la respuesta y los macrófagos son las células efectoras (Ottenhoff y Mutis, 1995).

Una vez que los bacilos llegan a los compartimentos alveolares son reconocidos por receptores del complemento y de manosa sobre la superficie de los macrófagos alveolares, originando que los bacilos sean fagocitados (Russel, 1995). Se cree que la ingestión de Mtb por los macrófagos depende del contacto con los receptores en la superficie de la célula, incluyendo los receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs en los macrófagos y células dendríticas reconocen algunos patrones moleculares en las bacterias, lo que asegura que se genere una respuesta inmune apropiada. Hay evidencia de que estos receptores son esenciales para poder resistir la infección por Mtb en ratones, siendo TLR2 y TLR4 los más importantes (North y Jung, 2004).

Tras el contacto con un microorganismo patógeno, el macrófago alveolar expresa una serie de citocinas que influyen en el desarrollo del proceso inflamatorio así como en el reclutamiento y activación de células que participan en la respuesta inmune adaptativa de manera selectiva (Fig.1). Desde esta perspectiva, las citocinas producidas por los macrófagos funcionan como importantes eslabones entre la respuesta inmune innata y la adaptativa a nivel pulmonar. Además, los macrófagos alveolares también presentan antígenos procesados a los linfocitos, dando como resultado la producción de inmunoglobulinas (Igs) que bien pueden opsonizar algunos patógenos (Berclaz *et al.*, 2002).

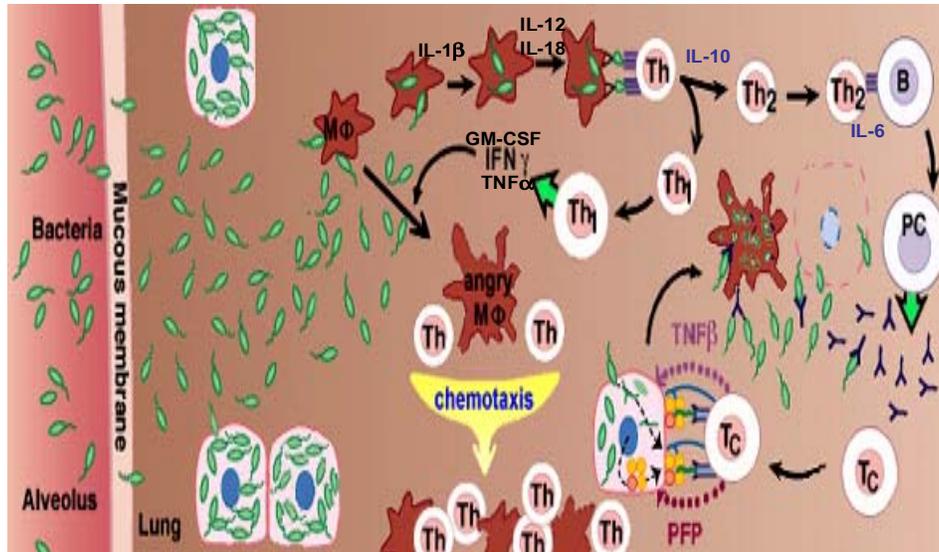


Fig. 1. Respuesta inmune celular. Tras la ingestión de un microorganismo patógeno, el macrófago alveolar (vía NF-κB) expresa una serie de citocinas y quimiocinas que participan en el desarrollo del proceso inflamatorio, así como en el reclutamiento y activación de células involucradas en la respuesta inmune adaptativa.

La ingestión de Mtb por los macrófagos desencadena, vía factor nuclear kappa B (NF-κB), la activación transcripcional de numerosos genes que codifican para citocinas proinflamatorias y quimiocinas, iniciando así la cascada inflamatoria necesaria para la extravasación de leucocitos al sitio de infección (North y Jung, 2004).

La secreción de citocinas proinflamatorias, interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y quimiocinas secretadas por los macrófagos tras haber engullido al bacilo estimulan la diferenciación de los linfocitos T y participan en el proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria hacia este patógeno es necesaria para el control de la infección, sin embargo, puede contribuir a que la infección se vuelva crónica, así como a la aparición de las lesiones características de la enfermedad (Janeway y Travers, 1997).

De forma paralela a las actividades del macrófago, ésta y otras células presentadoras de antígeno (CPAs) involucradas en el control de la infección comienzan a liberar una serie de citocinas que conducen hacia la diferenciación y maduración de células TH1, principales células efectoras de la inmunidad contra Mtb. El contacto entre las células T CD4⁺ y las CPAs se da mediante la interacción del ligando CD40 (CD40L) presente en las primeras y su receptor (CD40) en la superficie de las segundas, dando como resultado el incremento de la actividad co-estimuladora y presentación del antígeno (Clarke, 2000; Kalams y Walker, 1998; Flynn y Chan, 2001).

También se ha observado que la activación de los macrófagos se puede dar mediante la interacción del factor de necrosis tumoral alpha o beta (TNF- α , TNF- β) con el receptor CD40. Entre las citocinas de mayor relevancia y estudiadas que se ven involucradas en la respuesta inmune a TB se encuentran IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF- α (Janeway y Travers, 1997)

1.2. Citocinas y receptores involucrados en la resistencia a infecciones micobacterianas.

1.2.1. Interleucina 12

La IL-12 es una proteína heterodimérica que consta de dos subunidades, p40 y p35, unidas por puentes disulfuro. Es secretada por macrófagos y células dendríticas las cuales son consideradas inductoras primarias de la producción de IFN- γ , incrementan la secreción de IFN- γ y dirigen la diferenciación de las células T hacia TH1. La infección por *M. tuberculosis* induce la producción de las dos subunidades que forman a IL-12: p35 y p40. El receptor funcional para esta citocina es expresado principalmente en células T activadas y células NK, y está constituido por dos cadenas: IL-12R β 1 e IL-12R β 2 (Pine, 2002; Trinchieri, 1998; De Jong *et al.*, 1998, Cooper *et al.*, 1995).

La diseminación idiopática de infecciones micobacterianas debida a especies no patógenas (*M. fortuitum*, *avium*, *chelonei*, *smegmatis*) o a la cepa BCG se ha descrito en pacientes con antecedentes de inmunodeficiencias. En algunos casos, las células mononucleares de sangre periférica son deficientes en la producción de IFN γ mientras que en otros se ha reportado la producción deficiente de IL-12 (De Jong *et al.*, 1998). También, deficiencias en la expresión de IL-12 p40 han sido descritas en pacientes con infecciones causada por MNT (Höflich *et al.*, 2004).

La susceptibilidad selectiva a infecciones micobacterianas y *Salmonella* hace patente que las citocinas del perfil TH1 son esenciales para el control de estos patógenos y que ningún otro mecanismo

puede compensar las deficiencias en la producción o reconocimiento de estas citocinas (De Jong *et al.*, 1998; Rose, 2001).

1.2.2. Interferón gamma

El IFN- γ es producido tanto por células T (CD4⁺ y CD8⁺) como por células NK en respuesta a una serie de estímulos inflamatorios y/o autorregulación inmune. Esta citocina es considerada clave en el control de la infección contra Mtb ya que estimula el desarrollo y función de células efectoras y es requerida para la producción de NO por el macrófago, además de favorecer la producción de citocinas pro-inflamatorias (Flynn y Chan, 2001). Sin embargo, la producción únicamente de IFN- γ es insuficiente para el control total de la infección por M. tuberculosis ya que se ha observado que la respuesta inmune también es determinada y potenciada por otras citocinas (IL-12, TNF- α) y por la expresión correcta de los receptores correspondientes (Orme *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1993; Lalvani *et al.*, 1998; Micallef *et al.*, 1996; Flynn y Chan, 2001).

Casi todos los tipos celulares expresan receptores de IFN- γ . El receptor funcional para esta citocina es un tetrámero compuesto de dos proteínas: dos moléculas IFN- γ R1 (cadena γ , cadena de unión a ligando o CD119w) y dos proteínas IFN- γ R2 (cadena γ , cadena de señal de transducción o factor accesorio-1) (Bach *et al.*, 1997).

El IFN γ juega un papel muy importante en la defensa del hospedero a través de efectos pleiotrópicos tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Por ejemplo, esta citocina estimula la activación del macrófago y potencia la fagocitosis mediada por los receptores de la región Fc de las inmunoglobulinas unidas a un patógeno (Fc γ Rs) al incrementar los niveles de estos receptores (Berclaz *et al.*, 2002).

IFN γ también influencia la proliferación de células TH1/TH2 así como su función. La infección con agentes patógenos estimula la producción de IFN γ en varias poblaciones celulares como las células NK y TH1. La producción de esta citocina por dichas células es estimulada también por IL-12 e IL-18 las cuales conforman un sistema de retroalimentación (feedback) que potencia la opsonofagocitosis vía Fc γ R en el transcurso de la infección (Berclaz *et al.*, 2002).

Algunas mutaciones en los genes que codifican para cualquiera de las cadenas del receptor para IFN γ (R1 ó R2) son la causa de una respuesta celular ineficiente y, subsecuentemente, de infecciones micobacterianas atípicas diseminadas, BCGosis diseminada o TB, lo que hace patente la importancia de la

inmunidad mediada por IFN γ contra patógenos intracelulares. Estos defectos en el receptor se traducen en una activación ineficiente de los macrófagos y en una deficiente producción de TNF α y otras citocinas proinflamatorias en respuesta al IFN γ o a endotoxinas. Así mismo, la expresión de moléculas de MHC-II se ve mermada y en consecuencia la habilidad de presentar antígenos a las células T disminuye. Las consecuencias terapéuticas de los defectos en los receptores de IFN- γ depende de que estos defectos sean parciales o totales. Los pacientes con defectos parciales pueden responder favorablemente al tratamiento con antibióticos y a la administración de IFN- γ , mientras que los pacientes con defectos totales necesitan un trasplante de médula ósea (Höflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005).

Además de los defectos en la expresión de los receptores para IFN- γ , se han reportado anomalías en el transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT-1), receptores de IL-12 y en la expresión de IL-12 p40 en pacientes con infecciones causada por NTM (Höflich *et al.*, 2004).

1.2.3. Factor de necrosis tumoral alpha

TNF- α es secretado por macrófagos, células dendríticas y células T, para el control de la infección aguda por *M. tuberculosis* (Henderson *et al.*, 1997; Barnes *et al.*, 1998; Serbina y Flynn, 1999).

La función principal del TNF- α en la respuesta inmune antimicobacteriana es favorecer la activación de los macrófagos y coordinar la formación del granuloma y mantener aislados a los macrófagos infectados ya que regula la producción de quimiocinas y de sus receptores correspondientes (Garcia *et al.*, 1997; Flynn y Chan, 2001). TNF- α también permite la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). Su sobreexpresión se asocia al desarrollo de artritis reumatoide (Roitt *et al.*, 2002).

Las citocinas de la familia TNF se unen a receptores de Tipo III que se caracterizan por tener dominios extracelulares ricos en cisteína. Esta familia incluye los receptores para TNF- α , TNF- β , CD40, CD27 y las moléculas Fas (CD95, DR4 y DR5) (Roitt *et al.*, 2002).

La respuesta inmune a la TB en ratones es mediada por linfocitos TH1, los cuales activan macrófagos, incrementan la producción de TNF α y potencian el desarrollo de células T citotóxicas (CTLs). Las mismas citocinas son cruciales en la respuesta inmune que se presenta en humanos; individuos con receptores defectuosos para IFN γ e IL-12 o pacientes que han sido tratados con anticuerpos dirigidos contra

el TNF α son susceptibles a infecciones micobacterianas o *Salmonella* (De Jong *et al.*, 1998; Rook *et al.*, 2004).

Para el tratamiento de la enfermedad de Crohn y de la artritis reumatoide es común el uso del Infliximab, un anticuerpo quimérico anti-TNF α . El exceso de TNF α en pacientes con tuberculosis ocasiona la pérdida de peso y la sudoración nocturna. En modelos animales esta citocina confiere cierta protección. Sin embargo, en un estudio realizado por Keane y colaboradores, se observó que algunos pacientes que recibieron terapia con Infliximab desarrollaron tuberculosis pulmonar o extrapulmonar (en la mayoría de los casos). La mayor parte de los pacientes que desarrollaron tuberculosis provenían de ciudades con una baja incidencia de esta infección. La frecuencia de tuberculosis asociada a la terapia con Infliximab fue mayor en comparación con la frecuencia de otras infecciones causadas por microorganismos oportunistas asociada con el uso de este medicamento (Keane *et al.*, 2001).

Bajo algunas circunstancias, las células T reguladoras (T reg) expresan IL-4 además de otras citocinas reguladoras clásicas como IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Paradójicamente, se ha observado que en la infección progresiva con *M. tuberculosis*, IL-4 causa un incremento (más que disminución) en la inmunopatología. TNF α es una citocina crucial en la protección contra TB en animales, incluyendo al humano. Sin embargo, en la infección progresiva (al igual que en ratones Balb/c) puede ser tóxico y los fármacos que disminuyen el tiempo de vida media del RNAm que codifica para TNF α ayudan a aliviar los síntomas y a recuperar peso. Considerando que los niveles de IL-4 se elevan durante la infección progresiva, existe la posibilidad de que se encuentre involucrada en la toxicidad de TNF α (Rook *et al.*, 2004).

1.2.4. Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos.

El factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) es una pequeña glicoproteína producida por monocitos/macrófagos, células T activados, células endoteliales y fibroblastos. Los receptores para esta citocina se encuentran presentes en células progenitoras de la línea mieloide así como en monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células dendríticas. La unión del GM-CSF con su receptor en la superficie del macrófago resulta en una mayor producción de mediadores de la inmunidad (ej., citocinas), incluyendo al TNF α y el anión superóxido (Carraway *et al.*, 2000).

Los macrófagos también secretan GM-CSF en respuesta a la estimulación con lipopolisacárido (LPS) y otras moléculas efectoras de la respuesta inmune. En humanos, las concentraciones de GM-CSF en suero y

en tejido alveolar se reportan en un rango de pg/ml. Sin embargo, en los lavados alveolares de pacientes que cursan un proceso inflamatorio a nivel pulmonar se puede observar un incremento en la concentración de esta citocina (Carraway *et al.*, 2000).

GM-CSF activa distintas vías de señalización que son críticas en los procesos de proliferación, diferenciación y maduración de las células mieloides. Además, es responsable de la proliferación de los macrófagos, participa en el estallido respiratorio y potencia las funciones efectoras tanto de granulocitos como de fagocitos mononucleares. También tiene un rol crítico en la homeostasis de proteínas surfactantes y en la respuesta inmune a nivel pulmonar en el hospedero (Berclaz *et al.*, 2002; Gaynor, 2003).

El GM-CSF tiene un efecto indirecto sobre la producción de IFN γ en células T in vivo, probablemente mediante la regulación de la expresión de un "factor de secreción de IFN γ ". IL-12 e IL-18 son candidatas para ser dicho factor pues ambas son secretadas por macrófagos alveolares tras la exposición a adenovirus; ambos estimulan fuertemente la producción de IFN γ en células T; finalmente, el bloqueo de la señalización de IL-12 e IL-18 resulta en la deficiente producción de IFN γ y, consecuentemente, en la infección pulmonar por adenovirus (Berclaz *et al.*, 2002).

En un estudio *in vivo* realizado en un modelo murino, se observó que el GM-CSF recombinante de humano (rhu-GM-CSF) es capaz de activar macrófagos para inhibir el crecimiento intracelular y "eliminar" bacilos del complejo *Mycobacterium avium*, acción que se ve potenciada en la presencia de TNF- α . Por otra parte, en macrófagos de origen humano cultivados *in vitro* se observó que el rhu-GM-CSF reduce el crecimiento de *M. tuberculosis* de forma independiente a la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (Pedral-Sampaio *et al.*, 2003).

Se ha observado que los ratones deficientes en GM-CSF (GM -/-) presentan una eliminación deficiente de patógenos pulmonares y sufren de mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas o fúngicas (Berclaz *et al.*, 2002). La proteinosis pulmonar-alveolar (PAP) es un desorden pulmonar caracterizado por la excesiva acumulación de lípidos surfactantes y proteínas en los alveolos, dando como resultado un deficiente intercambio de gases e insuficiencia respiratoria. Clínicamente la PAP se divide en tres formas: congénita, secundaria e idiopática (iPAP), esta última forma comprende el 90% de los casos. La iPAP tiene un curso clínico variable que va desde la remisión espontánea hasta la falla respiratoria y puede complicarse con infecciones secundarias, frecuentemente causadas por microorganismos oportunistas. Hasta la fecha no se han reportado alteraciones genéticas relacionadas con el GM-CSF en pacientes con iPAP. Recientemente se ha demostrado que pacientes con iPAP (mas no PAP primaria o secundaria) desarrollan anticuerpos

policlonales con actividad neutralizante anti-GM-CSF del isotipo IgG₁ e IgG₂ (Kitamura *et al.*, 1999; Bonfield *et al.*, 2002; Trapnell *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2004).

1.2.5. Interleucina 6

La IL-6 es producida por células T (principalmente las T cooperadoras tipo 2, TH2), macrófagos, células B, fibroblastos y células endoteliales (en glándulas adrenales y pituitaria). Interviene en la maduración de granulocitos, monocitos, eritrocitos y megacariocitos. En timo favorece la maduración de células T y la expresión del receptor para IL-2 (IL-2R) en su superficie. Además, induce la diferenciación de células B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos por lo que también se le conoce como factor de diferenciación de células B (Roitt *et al.*, 2002).

Junto con IL-1 β , la IL-6 es un modulador bidireccional en la regulación neuroendocrinoinmunológica. Tienen efecto directo sobre el hipotálamo por lo que contribuyen directamente a la regulación de la temperatura corporal; funcionan como factores estimulantes de la producción de proteínas de fase aguda en los hepatocitos; junto con IL-1 β favorece la liberación de hormona corticotrópica y por lo tanto la producción de corticosteroides en glándulas adrenales (Roitt *et al.*, 2002).

El receptor de IL-6 pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas Tipo I que se caracteriza por una región extracelular del receptor que muestra alta homología estructural de aproximadamente 200 residuos aminoácidos. Algunos miembros de esta familia son los receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, GM-CSF y G-CSF (Roitt *et al.*, 2002).

1.2.6. Interleucina 1

La función más importante de la IL-1 β es como mediadora de la respuesta inflamatoria del hospedero. Las principales células productoras de esta citocina son los fagocitos estimulados con productos bacterianos, como los lipopolisacáridos (LPS), o por citocinas derivadas de los macrófagos (TNF α e IL-1). La síntesis de IL-1 es diferente de la de TNF en dos aspectos. Primero, que las células T son más efectivas que el LPS en la estimulación de monocitos para la producción de IL-1 β y, segundo, que esta citocina puede ser sintetizada por diversos tipos celulares como son las células epiteliales y endoteliales, las cuales constituyen fuentes locales que aseguran la producción de la citocina en ausencia del infiltrado rico en macrófagos (Abbas *et al.*, 2004).

Los efectos biológicos de la IL-1 β dependen de la cantidad en la que se encuentre esta citocina. En bajas concentraciones actúa como mediador de la inflamación local e inductor de la síntesis de IL-6, mientras que en altas concentraciones puede causar fiebre, induce en los hepatocitos la síntesis de proteínas de fase aguda y provoca caquexia (Abbas *et al.*, 2004).

Recientemente se ha reportado la relevancia de las variaciones genéticas de IL-1 en la susceptibilidad a sufrir enfermedades infecciosas. En un estudio acerca de las regiones polimórficas de IL-1 se halló evidencia que permite relacionar las variaciones en este gen con la infección crónica con *H. pylori*. Dos estudios más han dado a conocer evidencia de que los polimorfismos en los genes que codifican para IL-1 β y su receptor antagonista (IL-1Ra) pueden predisponer a la manifestación clínica de la tuberculosis (Hill, 2001).

1.2.7. Interleucina 18

Originalmente descubierta como un factor inductor de IFN- γ , la IL-18 activa la producción de IFN- γ en células NK y TH1; además, promueve la actividad citotóxica de las células NK. La IL-18 no inicia *per se* el desarrollo de las células TH1 pero sí potencia la respuesta causada por IL-12, preferentemente. Esta citocina contribuye directamente a la resistencia a la infección con *M. tuberculosis* aunque su efecto es menos pronunciado que el de la IL-12p40 (Kinjo *et al.*, 2002).

La IL-18 también estimula la producción de citocinas del perfil TH2 en células NK y células T *in vitro* aunque con menor intensidad que la respuesta TH1. Su administración *in vivo* resulta en el aumento de IL-4 e IgE en suero (Kinjo *et al.*, 2002).

1.2.8. Interleucina 10

IL-10 es un péptido producido por células TH2. Esta citocina favorece el incremento de moléculas de MHC-II en linfocitos B. La población de células B.1 se mantiene continuamente en división en sitios periféricos como las cavidades pleural y peritoneal, proceso que requiere tanto de la estimulación del BCR como de IL-10. Esta citocina también actúa como modulador negativo de la respuesta inmune celular pues inhibe la producción y liberación de citocinas en los macrófagos (principalmente IL-12 e IFN γ) así como las funciones de las células TH1 (Janeway *et al.*, 1997).

Algunos autores sugieren que la respuesta TH1 es incapaz de resolver la infección por Mtb porque ésta podría ser modulada negativamente y de manera prematura por la respuesta TH2. Sin embargo, se ha observado que ratones con respuesta TH2 defectuosa no son más capaces que los silvestres para controlar la infección. Esto significa que, aunque IL-10 sea inhibidora de la función de macrófagos y células TH1, su presencia o ausencia no afecta el crecimiento intracelular de Mtb en estos animales (North y Jung R., 2004).

Tres polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) en el promotor del gen para IL-10 y polimorfismos en los microsatélites adjuntos se han relacionado con algunos desordenes autoinmunes (Hill, 2001).

Las células T activadas secretan una serie de citocinas como las mencionadas anteriormente, lo que resulta en la activación de macrófagos y en el reclutamiento de monocitos circulantes para iniciar la formación del granuloma crónico (Vankayalapati *et al.*, 2000).

1.3. Autoinmunidad hacia citocinas

El término de “anticuerpos naturales” se refiere a aquellos anticuerpos que se encuentran presentes en el suero de individuos sanos en ausencia de inmunización deliberada con un antígeno. Los autoanticuerpos son inmunoglobulinas que reaccionan con, por lo menos, un antígeno propio, independientemente de que sean producidos por individuos sanos o enfermos. La importancia de los anticuerpos naturales reactivos con antígenos propios (autoanticuerpos naturales, AAN) fue relegada pues se pensaba que la tolerancia a los antígenos propios dependía exclusivamente de la eliminación de clonas autorreactivas durante la ontogenia. Actualmente se sabe que tanto los autoanticuerpos como las células B autorreactivas se encuentran en individuos sanos y que los repertorios autorreactivos se seleccionan predominantemente durante el período fetal (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998).

Los AAN pertenecen a los isotipos IgM, IgG e IgA. El isotipo IgM fue el primero en reportarse en ratones y se encontraron de manera predominante sobre los otros isotipos en el período neonatal. Así, las IgM de cordón umbilical de ratón y humano son predominantemente, aunque no exclusivamente, autorreactivas. En el adulto la mayoría de los AAN son del isotipo IgG pero los mecanismos que activan el cambio de isotipo de la cadena μ a γ no son del todo claros, particularmente en lo que respecta al procesamiento y presentación de antígenos propios a las células T (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998).

Tanto en humanos como en ratones, se ha demostrado que los AAN se unen a un amplio conjunto de antígenos de superficie celular, intracelulares y circulantes, que se han conservado evolutivamente. Los AAN reaccionan con antígenos propios que son también blancos de autoanticuerpos asociados a enfermedades autoinmunes, por ejemplo, tiroglobulina, antígenos citoplásmicos de neutrófilos, factor intrínseco, factor VIII, etc. Sin embargo, la fina especificidad en los epítomos de los AAN difiere de aquella relacionada con los autoanticuerpos patogénicos (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998).

Se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en individuos sanos aunque en pequeñas cantidades y que tienden a ser del isotipo IgM de baja afinidad. El aumento de estos anticuerpos en pacientes con TB o enfermedades inmunoinflamatorias puede ser una consecuencia de la elevada producción de las citocinas después de la infección como una manifestación normal del proceso inmunorregulatorio y sirve para limitar la intensidad y duración de la respuesta inmune o para evitar que se presenten efectos patofisiológicos. Sin embargo, la producción de autoanticuerpos del isotipo IgG anti-IFN- γ puede ser estimulada durante el curso de la infección con *M. tuberculosis*, alcanzando niveles mayores a los observados en individuos sanos (Patel *et al.*, 2005; Meager *et al.*, 2003; Madariaga *et al.*, 1998).

En teoría, todo individuo es tolerante a su repertorio de sustancias potencialmente antigénicas. Cuando los mecanismos de tolerancia fallan entonces se abre paso a la enfermedad autoinmune. Aún se ignora como es que se puede inducir la formación de autoanticuerpos contra ciertas citocinas pero ya que la participación de las células T es necesaria para la producción de inmunoglobulinas de alta afinidad se piensa que la pérdida de la tolerancia de células T está involucrada en los eventos que llevan a la inducción de estos anticuerpos. Una posibilidad consiste en que la citocina se comporte como hapteno y se una a un acarreador producido por un microorganismo (Bendtsen *et al.*, 1998). Un virus puede actuar como adyuvante a través de la estimulación de la respuesta inata para modular positivamente la expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC, y la producción de citocinas. Si el background genético del individuo lo hace susceptible al desarrollo de la autoinmunidad, entonces la enfermedad se considera un fenómeno secundario a una respuesta inmune efectiva contra el patógeno a través de la proporción TH1/TH2, incrementando la sensibilidad en los órganos blanco o alterando el perfil de citocinas, por mencionar algunos ejemplos (Fairweather *et al.*, 2001).

La enfermedad autoinmune se desarrolla cuando una clona autorreactiva escapa a los mecanismos de tolerancia y es activada. Aunque el mecanismo a través del cual esto ocurre no se conoce del todo, se cree que la autoinmunidad es el resultado de una combinación de factores genéticos, ambientales (ej. Infección) y estocásticos (Rioux y Abbas, 2005) (Figura 2).

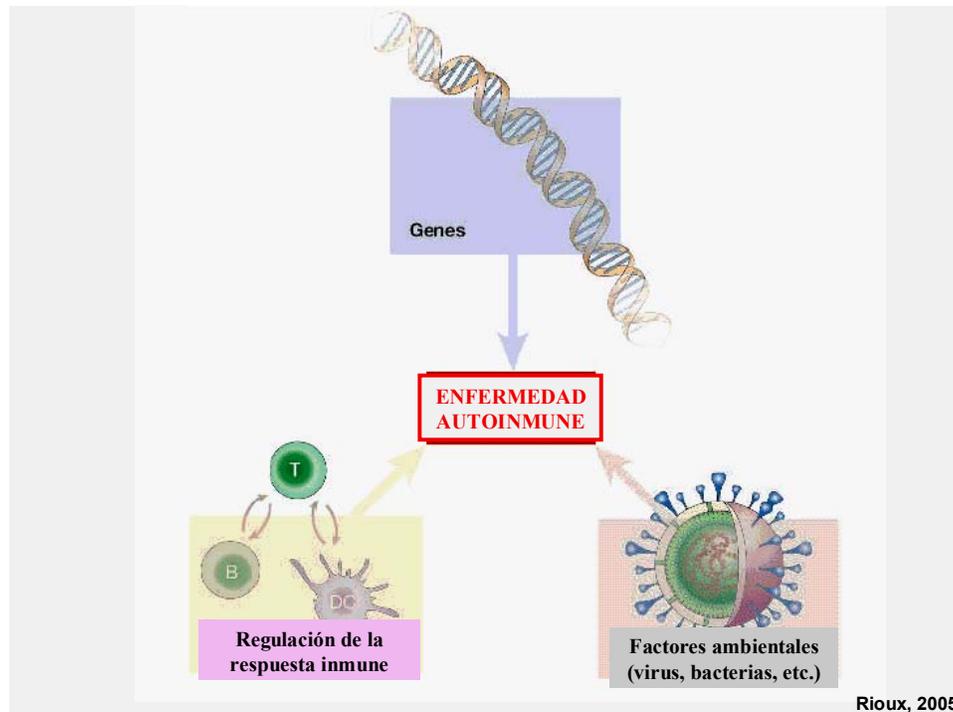
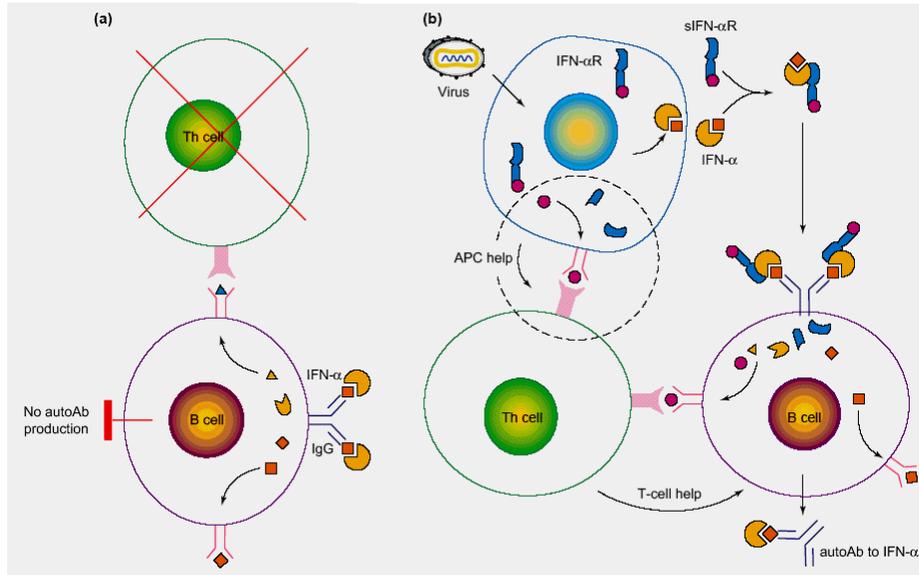


Fig. 2. Origen de la enfermedad autoinmune. La enfermedad autoinmune se desarrolla cuando una clona autorreactiva escapa a los mecanismos de tolerancia y es activada. Aunque el mecanismo a través del cual esto ocurre no se conoce del todo, se cree que la autoinmunidad es el resultado de una combinación de factores genéticos, ambientales (ej., infección) y estocásticos (ej., embarazo).

Otra posibilidad es la activación de células B y T autorreactivas iniciada por moléculas en el ambiente o producidas por algunos microorganismos (mimetismo molecular) (Bendzen *et al.*, 1998). Tal es el caso de la proteína de choque térmico HSP65 producida tanto por *M. bovis* como por *M. tuberculosis*. Las HSP son antígenos inmunodominantes en la respuesta humoral y HSP65 se ha visto relacionada con la patogénesis de la artritis reumatoide en ratones. Esta proteína posee 50% de homología con HSP60 de origen humano (Fourneau *et al.*, 2003; Karopoulos *et al.*, 1995).

En un principio la hipótesis del mimetismo molecular parecía limitada pues se consideró que requeriría de secuencias completamente idénticas entre los determinantes antígenicos propios y del patógeno. Posteriormente, la demostración de que los receptores de células T (TCRs) pueden reconocer estructuras idénticas (epítomos conformacionales) en vez de secuencias idénticas indicó que el fenómeno de mimetismo, al menos a nivel de reconocimiento de células T, puede tener un impacto mayor. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado ampliamente que algunas proteínas miméticas purificadas o péptidos antígenicos pueden activar linfocitos autoespecíficos y, en algunos casos, inducir patologías autoinmunes (Fig. 3). Sin embargo, los modelos en los que una secuencia mimética producida por un patógeno natural, en vez del

antígeno purificado y administrado con adyuvante, puede activar linfocitos autorreactivos son raros (Founeau *et al.*, 2003; Kohm *et al.*, 2003).



Bentzen, 1998

Fig. 3. Modelo de inducción de autoanticuerpos anti-IFN α . (a) En condiciones normales, las células B reactivas a IFN α existen, pero las células T capaces de reaccionar con epítopos de IFN α están ausentes o son tolerantes. (b) Células infectadas con virus liberan receptores solubles para IFN α (sIFN α R) codificados por el virus. La misma infección induce la producción de IFN α . Las células B reactivas a epítopos de IFN α en los complejos IFN α -sIFN α R presentan el péptido IFN α R específico del virus a las células T cooperadoras (Th), las cuales ayudan a la diferenciación de las células B hacia células plasmáticas productoras de autoanticuerpos anti-IFN α . Las células T se activan de manera más efectiva cuando las células infectadas con las mismas que presentan el antígeno (CPA), es decir, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B.

Algunos péptidos microbianos con homología relativamente limitada con la proteína básica de la mielina (MBP) son capaces de activar a células T autorreactivas. Debido a las diferencias en la topología del sitio de unión, distintas moléculas de MHC-II pueden exponer diferentes alineamientos (estructuras) de la MBP. Por lo tanto, el reconocimiento por las células T es altamente degenerado por lo que la secuencia primaria de un péptido no es un parámetro exclusivo para que exista mimetismo molecular (Rose, 2001).

Para que una enfermedad autoinmune se ajuste al esquema de mimetismo molecular se requiere demostrar lo siguiente:

- 1) El patógeno asociado debe poseer estructuras que hagan mimetismo con un antígeno propio del individuo.
- 2) Activación de las respuestas innata y adaptativa mediante la reacción de inflamación por la infección, combinada con la liberación del antígeno desde las lesiones tisulares inducidas por el patógeno. (Fourneau *et al.*, 2003)

Se han reportado múltiples antígenos propios en la mayoría de las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, se han propuesto más de diez autoantígenos relacionados con la diabetes tipo I y más de cinco para la esclerosis múltiple (Fourneau *et al.*, 2003).

La evidencia epidemiológica sugiere que el concepto de mimetismo molecular se encuentra involucrado en una amplia variedad de desórdenes autoinmunes. Sin embargo, ya que algunas infecciones virales o bacterianas son eventos fugaces no dejan indicadores claros después de que ocurren y, por lo tanto, no se observan pruebas directas de que el mimetismo molecular sea el iniciador de la autoinmunidad o el acelerador de una condición autoinmune subclínica preexistente (Christen y Von Herat, 2004; Rose, 2001).

Se han reportado anticuerpos naturales contra TNF- α , quimiocinas α y β , G-CSF, IL-1 α y β , IL-2 e IFN γ . Estos anticuerpos se unen a sus correspondientes citocinas recombinantes y en muchos casos a sus citocinas naturales con gran avidéz (Kd 10^{-10} – 10^{-12}). Desafortunadamente, en la mayoría de los casos se desconocen las características de estas uniones, por lo que es difícil predecir su función biológica (Bendtzen *et al.*, 1998).

Existen reportes de anticuerpos detectados de manera esporádica hacia IFN y algunas otras citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, GM-CSF y TNF- α en varias enfermedades autoinmunes o virales y ocasionalmente en individuos sanos. Algunos de estos autoanticuerpos son capaces de neutralizar su respectiva citocina *in vitro* mientras que *in vivo* sus efectos continúan siendo una incógnita (Meager *et al.*, 2003). Así mismo, se han reportado anticuerpos anti-IFN- γ en pacientes con enfermedades virales, con tuberculosis y en individuos sanos pero el impacto patogénico potencial de estos anticuerpos no se ha establecido hasta ahora (Döffinger *et al.*, 2004).

Los autoanticuerpos contra IL-6 se encuentran elevados en pacientes con artritis reumatoide o con esclerosis múltiple. La presencia de estos mismos anticuerpos se relaciona con la disminución de las probabilidades de vida en pacientes con cirrosis hepática (Bendtzen, 1998).

En un estudio realizado en individuos con miastenia gravis y timoma, Meager *et al.* describen la prevalencia de autoanticuerpos en un título elevado contra IL-12 e IFN- γ con actividad neutralizante, mientras que los autoanticuerpos detectados contra GM-CSF se encontraron en menor cantidad y sin actividad neutralizante (Meager *et al.*, 2003).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se han reportado pacientes con una deficiencia adquirida en la inmunidad mediada por IFN- γ , caracterizada por la presencia de autoanticuerpos con alta afinidad y actividad neutralizante contra esta citocina. Döffinger y colaboradores describieron a un paciente con infección diseminada causada por *M. tuberculosis* y *M. chelonae* que posteriormente falleció por la misma razón. El paciente también desarrollo diabetes autoinmune (tipo I) e hipotiroidismo primario. El suero presentó un alto título de IgG anti-IFN- γ capaz de bloquear *in vitro* la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores normales hacia esta citocina (Döffinger *et al.*, 2004).

Por otra parte, el grupo de Höflich reportó el caso de un paciente adulto que en un inició presentó infecciones graves con *Burkholderia cocovenenans* y subsecuentemente con *M. chelonae*. Más tarde, el paciente falleció debido a una severa sepsis. Los autores encontraron una alta afinidad anti-IFN- γ inhibitoria en el plasma del paciente e identificaron un autoanticuerpo dirigido contra el IFN- γ con fuerte actividad neutralizante (Höflich *et al.*, 2004).

Los anticuerpos anti-IFN γ pueden ser funcionales ya que pueden bloquear la producción de TNF α en respuesta a una endotoxina o la expresión de genes inducida via IFN γ . También pueden inhibir la expresión de HLA-II en PBMCs (Kampmann *et al.*, 2005). Estas observaciones sugieren que los autoanticuerpos contra IFN- γ pueden inducir una susceptibilidad de inicio tardío a infecciones micobacterianas diseminadas que puede ser refractaria a la quimioterapia.

Los autoanticuerpos anti-citocinas son de interés clínico por las siguientes razones:

- Su inapropiada producción y/o funcionamiento puede relacionarse con la patogénesis de enfermedades infecciosas o inmunoinflamatorias.
- Los anticuerpos anti-citocinas inducidos durante la terapia con citocinas humanas recombinantes pueden provocar la pérdida de la respuesta al tratamiento y, probablemente, alteraciones crónicas de la función inmune, incluyendo la respuesta a agentes infecciosos y tumores malignos.
- Pueden interferir con ensayos biológicos e inmunométricos *in vitro* (Bendtzen, 2004).

Por lo tanto, el interés del presente estudio es demostrar que la presencia de autoanticuerpos con alta afinidad contra algunas citocinas y/o receptores involucrados en la inmunidad mediada por IFN γ e IL12, puede

causar incremento en la susceptibilidad de inicio tardío en infecciones micobacterianas diseminadas. La información obtenida será de gran impacto para el diagnóstico y tratamiento adecuado de pacientes con ese tipo de infecciones causadas principalmente por cepas de micobacterias no patógenas o poco virulentas y sensibles al tratamiento con antibióticos pero que llegan a causar el fallecimiento de este tipo de pacientes.

3. HIPÓTESIS

La presencia de autoanticuerpos capaces de reconocer citocinas y/o receptores involucrados en la inmunidad mediada por IFN- γ e IL 12 causan un incremento en la susceptibilidad de inicio tardío a infecciones micobacterianas diseminadas en humano.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Detectar la presencia de autoanticuerpos con alta afinidad hacia citocinas involucradas en la vía del IFN- γ mediada por IL-12 (y algunos de sus receptores) en pacientes susceptibles a infecciones micobacterianas de inicio tardío.

4.2. Metas:

4.2.1. Obtener sueros de pacientes con las características clínicas correspondientes a una susceptibilidad de inicio tardío a infecciones micobacterianas diseminadas, así como de sueros de individuos sanos.

4.2.2. Estandarizar la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA) en membranas de nitrocelulosa (NC) para la detección de autoanticuerpos contra citocinas (IL-1 β , IL-6 , IL-10, IL-12p40, IL-18, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF).

4.2.3. Comparar la sensibilidad de un sustrato colorimétrico contra uno quimioluminiscente en el paso de revelado de la técnica de IFMA para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas.

4.2.4. Estandarización de la técnica de ELISA para determinar el título de autoanticuerpos anti-citocinas presentes en las muestras séricas de los pacientes positivos por la técnica de IFMA.

4.2.5. Estandarizar la técnica de citometría de flujo para la detección de la expresión del receptor para IFN- γ (IFN- γ R1, IFN- γ R2) en líneas celulares.

4.2.6. Detectar la presencia de autoanticuerpos contra los receptores para IFN- γ (IFN- γ R1, IFN- γ R2) utilizando la técnica de citometría de flujo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestras y pacientes.

Se colectaron 243 muestras de pacientes con las características clínicas pertenecientes a la susceptibilidad de inicio tardío a infecciones micobacterianas diseminadas (ej., tuberculosis extrapulmonar), pacientes con tuberculosis pulmonar (TB pulmonar) y/o pacientes con infecciones causadas por otros microorganismos oportunistas; muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus, vasculitis y otras); así como 60 muestras de individuos sanos no relacionados con los pacientes, logrando una colección de 303 muestras en total que fueron clasificadas dentro de los siguientes grupos:

- 1) Pacientes con infección diseminada o recurrente causada por MNT o Mtb (n=62).
- 2) Pacientes con TB pulmonar (n=25)
- 3) Pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) y TB pulmonar (n=54)
- 4) Pacientes con LEG (n=10)
- 5) Pacientes con vasculitis y TB pulmonar (n=37)
- 6) Pacientes con vasculitis (n=10)
- 7) Pacientes con salmonelosis (n=5)
- 8) Pacientes con infecciones recurrentes con microorganismos oportunistas (n=15)
- 9) Pacientes con desórdenes autoinmunes o inflamatorios distintos a LEG y otros (n=21)
- 10) Pacientes que reciben terapia con anticuerpos anti-TNF α (Infliximab) (n=4)
- 11) Individuos sanos (n=60)

De acuerdo a los grupos que se mencionaron anteriormente se diseñaron las Tablas de la 1 a la 11 (ver Anexo I), en las que se hace una descripción completa de las muestras colectadas indicando la clave asignada a cada una de ellas, el sitio de procedencia y el diagnóstico clínico de cada uno de los pacientes.

Los individuos que presentaron causas de inmunodeficiencias primarias, secundarias o infección con VIH fueron descartados.

5.2. Colección y tratamiento de las muestras.

En cada caso se colectaron dos tubos con aproximadamente 5 ml de sangre, uno con heparina (20 U/ml) y otro sin anticoagulante. La muestra de sangre heparinizada fue diluida 1:11 con medio de cultivo celular estéril RPMI 1640 suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mM) (Sigma; UK), estas muestras fueron trabajadas dentro de un período de 2 horas después de su colección. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas en un gradiente de densidad empleando Lymphoprep (Axis Shield; 1114545) para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC aisladas fueron lavadas dos veces en buffer de fosfatos (PBS) (ver Anexo II), pH 7.2, y resuspendidas en medio RPMI 1640 (Gibco; 61870-010) enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 2% de L-Glutamina 200 mM y piruvato de sodio 100 mM (Sigma; S8636); y adicionado con 1% de Penicilina/estreptomicina. Estas células se conservaron a -70°C para análisis posteriores mediante la técnica de citometría de flujo.

Las muestras de sangre sin heparina fueron incubadas durante 30 min a 37° C. Posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 min en una centrifuga modelo Biofuge PrimoR (Heraeus). Los sueros se distribuyeron en alícuotas y se conservaron a -20° C.

5.3. Estandarización y condiciones de la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos para la detección de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas empleando un método colorimétrico (IFMA-C).

Para la realización de los experimentos mediante la técnica de IFMA-C se emplearon diversos antígenos (citocinas) diluidos en PBS en concentraciones previamente establecidas en un ensayo piloto, en dicho ensayo se compararon concentraciones en un rango de 0.0023 µg/ml a 50 µg/ml como se muestra en la Tabla 12 (ver Anexo I). Los antígenos se fijaron sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore Immobilon-P, HAHY 00010; USA) de 15 cm x 15 cm en las concentraciones reportadas en la Tabla 13 empleando una cámara Miniblotter 45 (Immunetics, USA).

TABLA 13. Concentraciones óptimas de los antígenos recomendadas para la técnica de IFMA-C.

CITOCINA	LABORATORIO (No. catálogo)	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/ml}$)
IL-1 β	CLB-ELISA	0.0023
IL-6	PeptoTech (200-06)	5
IL-10	CLB-ELISA y PeptoTech (200-10)	10
IL-12p40	PeptoTech (200-12p40)	10
IL-18	Medical Biological Laboratories Co. LTD (B001)	5
IFN- γ	PeptoTech (300-02)	5
Imukin (IFN- γ 1b) solución de uso parenteral	Boehringer Ingelheim France (40919/FR/1)	30
TNF- α	PeptoTech (300-01)	10
GM-CSF	PeptoTech (300-03)	2

Brevemente, para fijar los antígenos sobre las membranas de nitrocelulosa (NC) se depositaron 135 μl de cada dilución por carril y se incubaron en agitación durante 2 h a 37°C para después mantenerlas a 4°C toda la noche. Posterior al periodo de incubación los antígenos de cada carril fueron retirados empleando una bomba de vacío (Siemens; México) y se realizó una serie de 5 lavados con buffer de fosfatos tween 20 (PBS-T 0.05%) (ver Anexo II); a continuación, las membranas se sumergieron en solución bloqueadora de albúmina sérica bovina (ASB) al 3% en PBS-T 0.05% durante 2 h en agitación (condiciones establecidas en ensayos piloto).

Las membranas se introdujeron nuevamente en la cámara Miniblotter 45, ésta vez en posición transversal a la dirección en la que fueron fijados los antígenos. Se prepararon diluciones dobles (1:100 - 1:1600) en PBS-T 0.05% de cada uno de los sueros problema y se depositaron 135 μl por carril de cada dilución, incubando durante un periodo de 1 h a 37°C con agitación. Transcurrido este tiempo se retiraron los sueros con ayuda de una bomba de vacío y se realizó la misma serie de lavados.

Posteriormente, los carriles con muestras séricas se enfrentaron a conjugados anti-Ig humana de diversas casas comerciales como se muestra en la Tabla 14 (ver Anexo I) y en distintas diluciones con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de trabajo. De los diversos conjugados anti-Ig humana

empleados en el proceso de estandarización de la técnica se seleccionaron los anticuerpos anti-Ig humana biotinilados anti-IgG + IgM (Pierce, 31776; UK) y monoclonal murino anti-IgG (Sigma, B3773;UK) en dilución 1:3000 ya que mostraron mayor sensibilidad en la detección de estas inmunoglobulinas en las muestras séricas. El sistema se incubó durante 1 h a 37°C con agitación y en obscuridad; repitiéndose la operación de lavado posterior a la incubación.

Como controles positivos del sistema se emplearon los siguientes anticuerpos anti-citocinas en dilución 1:100 (previamente determinada) en PBS-T 0.05%, con incubación de 1 h a 37°C con agitación y en obscuridad:

- Anti-IL-1 β humana biotinilado (CLB).
- Anti-IL-6 humana biotinilado.
- Anti-IL-10 humana biotinilado (CLB).
- Anti-IL-12p40 humana biotinilado.
- Anti-IL-18 humana producida en conejo (PeproTech, 500-P08; USA).
- Anti-IFN γ humana biotinilado (Sanquin Plesmanlaan, M193304; Amsterdam).
- Anti-TNF α humana biotinilado
- Anti-GM-CSF humano producido en conejo (PeproTech, 500-P33; USA).

Debido a que los anticuerpos anti-IL-18 y anti-GM-CSF no se hallaban biotinilados fue necesario emplear un conjugado con peroxidasa anti-IgG de conejo (Sigma, A-6154; USA) en dilución 1:5 en PBS-T 0.05%. Los controles que se enfrentaron a este conjugado se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación y en obscuridad.

Los carriles correspondientes a los conjugados biotinilados fueron incubados con estreptavidina peroxidasa (Sigma, S-2438; USA) en dilución 1:1000 durante 30 min (condiciones previamente estandarizadas). Las membranas se retiraron de la cámara Miniblotter 45 y se realizó la serie de lavados.

La reacción de reconocimiento se reveló utilizando una solución de α -cloronaftol con peróxido de hidrógeno al 50%, volumen suficiente para cubrir las membranas durante 15 min o hasta la apreciación de bandas color violeta. La reacción de revelado se detuvo lavando la membrana con agua destilada.

5.4. Estandarización y condiciones de la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos utilizando un sustrato quimioluminiscente (IFMA-Q) para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas.

En los experimentos mediante la técnica de IFMA-Q se emplearon antígenos (citocinas) diluïdos en PBS en concentraciones previamente establecidas, como se muestra en la Tabla 15 (ver Anexo I), para ser fijados sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore Immobilon-P, HAHY 00010; USA) de 15 x 15 cm en las concentraciones reportadas en la Tabla 16 (ver Anexo I), empleando una cámara Miniblotter 45 (Immunitics, USA).

TABLA 16. Concentraciones óptimas de los antígenos recomendadas para la técnica de IFMA-Q.

ANTÍGENO	LABORATORIO (No. catálogo)	CONCENTRACIONES (µg/ml)
IL-1β	CLB-ELISA	ND
IL-6	PeptoTech (200-06)	5, 2
IL-10	PeptoTech (200-10)	10
IL-12p40	PeptoTech (200-12p40)	5, 2
IL-18	PeptoTech (200-18)	3, 1
IFN-γ	PeptoTech (300-02)	5, 2
Imukin (IFN-γ1b) solución de uso parenteral	Boehringer Ingelheim France (40919/FR/1)	3, 1
TNF-α	PeptoTech (300-01)	10
GM-CSF	PeptoTech (300-03)	2, 1
PPD tb*	Donado por la Dra. Iris Estrada (ENCB)	25

* Control de fijación de los antígenos.

ND: no determinado.

Brevemente, se depositaron 135 µl de cada antígeno diluido en PBS por carril y se incubaron en agitación durante 2 h a 37°C y posteriormente a 4°C durante toda la noche. Posterior al período de incubación los antígenos fueron retirados empleando una bomba de vacío (Siemens; México) seguido de una serie de 5 lavados con PBS-T 0.05%; las membranas se sumergieron en solución bloqueadora de ASB 3% en PBS-T 0.05% (condiciones establecidas en

ensayos piloto) (ver Anexo II) durante 2 h en agitación; transcurrido el período de incubación se realizó otra serie de lavados. Las membranas se introdujeron nuevamente en la cámara Miniblotter 45 en posición transversal a la dirección en la que fueron fijados los antígenos y se depositaron diluciones 1:200 y 1:1000 en solución diluyente (previamente determinada) de ASB 1% en PBS-T 0.05% (ver Anexo II) de cada uno de los sueros problema, incubándolos durante un período de 90 min a 37°C con agitación. Nuevamente se retiraron los sueros y se realizó una serie de 8 lavados con PBS-T 0.05%.

Posteriormente, los carriles con muestras séricas se enfrentaron a distintas diluciones de conjugados anti-Ig humana biotinilados de diversas casas comerciales, como se muestra en la Tabla 17 (ver Anexo I), con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de trabajo. De acuerdo a los resultados de estos experimentos se determinó que los conjugados biotinilados más adecuados para realizar la detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas fueron el Monoclonal murino anti-IgG (Fc) humana (Sigma, B3773; UK) y anti-IgG+IgM humanas (Pierce, 31776;UK) en diluciones 1:6000 y 1:12000, respectivamente, con incubación de 1 h a 37°C en agitación y en obscuridad; repitiéndose la operación de lavado posterior a la incubación.

Como controles positivos del sistema se probaron los anticuerpos anti-citocinas descritos a continuación, ya sea de forma individual en diluciones 1:200, 1:800, 1:1500 o en pool a una dilución final de 1:800 en solución diluyente de ASB 1% en PBS-T 0.05%, con incubación de 3 h a 37°C con agitación y en obscuridad (condiciones previamente estandarizadas):

- Anti-IL-1 β humana biotinilado (CLB).
- Anti-IL-6 humana biotinilado.
- Anti-IL-10 humana biotinilado (CLB).
- Anti-IL-12p40 humana biotinilado.
- Anti-IL-18 humana producida en conejo (PeproTech, 500-P08; USA).
- Anti-IFN γ humana biotinilado (Sanquin Plesmanlaan, M193304; Amsterdam).
- Anti-TNF α humana biotinilado
- Anti-GM-CSF humano producido en conejo (PeproTech, 500-P33; USA).

Tomando en cuenta los resultados de estos ensayos y para emplear un menor número de carriles en la cámara Miniblotter para los controles positivos, las anti-citocinas se emplearon en pool con una

dilución final de 1:800 para cada uno de ellos, incubándose por aproximadamente 3 h; con excepción de las anticitocinas producidas en conejo, cuyo uso se detalla a continuación.

Debido a que los anticuerpos anti-IL-18 y anti-GM-CSF producidos en conejo no se encontraban biotinilados, éstos se enfrentaron a sus citocinas correspondientes en un período de 90 min y posteriormente se empleó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Amersham, NA9340; USA) en dilución 1:20000 en solución diluyente de ASB 1% en PBS-T 0.05%, con el cual se incubaron durante 90 min a 37°C con agitación y en obscuridad. Transcurrido este tiempo se repitió la operación de lavado de las membranas.

Los carriles correspondientes a los conjugados biotinilados fueron incubados con estreptavidina peroxidasa (Invitrogen, SA100-01; USA) en dilución 1:20000 en PBS-T 0.05% durante 30 min con agitación en obscuridad (condiciones determinadas en ensayos piloto). Las membranas se retiraron de la cámara Miniblotter 45 y se realizó una serie de 8 lavados con PBS-T y dos más con PBS.

La reacción de reconocimiento se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL PLUS Western Blotting Detection System (Amersham, RPN2132; USA), según las instrucciones del proveedor. Una vez evidenciada la reacción de reconocimiento, se hicieron impresiones de 3 min y 5 min sobre películas radiográficas BioMax Light Film (Kodak, 8761520; USA) para obtener la imagen en negativo. Las placas radiográficas fueron tratadas con solución reveladora HC-110 (Kodak, 140 8988; USA) según las especificaciones del proveedor.

5.5. Técnica de ELISA para la determinación del título de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos mediante la técnica de IFMA-Q, se prepararon diluciones en PBS equivalentes a 2 µg/ml (condiciones determinadas en ensayos piloto) de las citocinas que fueron reconocidas por los sueros de pacientes enfermos y se fijaron en placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface, 439454; USA) depositando 50 µl de dilución en cada pozo. Los antígenos (citocinas) se incubaron durante 2 h a 37°C y posteriormente se mantuvieron a 4°C toda la noche. Las citocinas se retiraron de la placa y se realizó una serie de 3 lavados con PBS-T 0.05%.

Con el fin de disminuir la unión inespecífica de algunos componentes del suero con las placas de ELISA, y de esta forma también disminuir el fondo que esto genera, se utilizaron 300 μ l por pozo de solución bloqueadora, previamente determinada, de ASB 5% en PBS-T 0.05% (ver Anexo II) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizó una serie de 5 lavados con PBS-T 0.05%.

Los sueros que se incluyeron en los ensayos de ELISA fueron aquellos que resultaron positivos a la detección de anticuerpos anti-citocinas por el método de IFMA-Q. Empleando ASB 1% en PBS-T 0.05% como diluyente se hicieron diluciones dentro del rango de 1:300 a 1:10,000 de estos sueros y se depositaron 50 μ l de cada dilución por pozo, incubando durante 90 min con agitación a temperatura ambiente. Después de este período se repitió la operación de lavado y se añadió el anticuerpo monoclonal murino anti-IgG humana Biotinilado (Sigma, B-3773; UK) en dilución 1:5000 en PBS-T 0.05% (condiciones previamente estandarizadas), incubando las placas durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se repitió la serie de 5 lavados con PBS-T 0.05%.

Los conjugados anti-citocinas biotinilados que funcionaron como controles positivos para estos experimentos se emplearon en dilución 1:200 en ASB 1% en PBS-T 0.05% (ver Anexo II) utilizando 50 μ l de cada dilución por pozo e incubando por aproximadamente 3 hr a temperatura ambiente para posteriormente repetir la operación de lavado. Para detectar la señal de los conjugados biotinilados, tanto anti-citocinas como anti-IgG humana, se empleó estreptavidina peroxidasa (Invitrogen, SA100-01; USA) en dilución 1:20000 en ASB1% en PBS-T 0.05%. Se emplearon 50 μ l de estreptavidina por pozo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Debido a que el anticuerpo anti-GM-CSF producido en conejo no se encontraba conjugado con biotina, se utilizó el conjugado con peroxidasa anti-IgG de conejo producido en burro (Amersham, NA9340; USA) en dilución 1:4000 (condiciones establecidas en ensayos piloto), incubando durante 1 h con agitación a temperatura ambiente.

Como control negativo del sistema se emplearon pozos sin antígeno a los cuales se les adicionaron solamente 300 μ l de solución fijadora de antígeno durante toda la noche. Estos pozos recibieron el mismo tratamiento que aquellos en los que se depositaron muestras séricas.

La reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo se desarrolló con 75 μ l K-Blue (Neogen, 300177; UK) por pozo y 25 μ l de solución Red-Stop (Neogen, 301475; USA). La lectura de las microplacas

se realizó en un lector de ELISA modelo 450 marca BioRad (USA) utilizando un filtro de lectura de 655nm y como referencia el filtro de 450 nm.

5.6. Estandarización de la técnica de citometría de flujo para la detección de la expresión del receptor para IFN- γ (IFN- γ R1 e IFN- γ R2) en líneas celulares.

5.6.1. Descripción de las líneas celulares.

Para la realización de la detección del receptor 1 para IFN- γ (IFN- γ R1) se emplearon las siguientes líneas celulares:

- **L929:** células silvestres, fibroblastos murinos.
- **LhgR:** fibroblastos murinos transfectados establemente con la cadena α del receptor humano para IFN γ (IFN- γ R1) unido al gen myc.
- **IFN- γ R2^{-/-}:** linfocitos B humanos, knock out para IFN- γ R2.
- **B-EBV Comar:** linfocitos B humanos, IFN- γ R2 +/+.

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco; 61870-010) complementado con 10% de suero fetal bovino, 2% de L-Glutamina 200 mM y piruvato de sodio 100 mM (Sigma; S8636); y adicionado con 1% de Penicilina/Estreptomicina. En el caso de la línea LhgR, a la preparación anterior se le añadió micomicina G418 0.5 mg/ml (Gibco; 11811-031).

5.6.2. Detección de la expresión de la cadena IFN- γ R1 del receptor para IFN- γ en las líneas celulares L929 y LhgR.

Se cosecharon las células empleando el medio RPMI descrito anteriormente y se colectaron en tubos cónicos para ser centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en buffer para citometría de flujo (FACs buffer) (ver Anexo II) para nuevamente centrifugar la muestra en las mismas condiciones. Finalmente, el paquete celular se resuspendió en 5 ml de FACs buffer. Con 10 μ l de esta suspensión celular se practicó una tinción con azul de tripan para realizar el conteo celular y calcular la viabilidad de las células. En cada experimento, la suspensión celular se ajustó para distribuir un mínimo de 2×10^5 células en 300 μ l.

Para verificar la expresión o ausencia de la cadena IFN- γ R1 en las líneas celulares LhgR y L929, respectivamente, se emplearon 50 μ l del anticuerpo monoclonal murino anti-IFN- γ R α (CD119) humano (con actividad neutralizante) (BD Pharmigen, 557531; UK) en dilución 1:50 en FACs buffer, incubando durante 20 min en hielo. Como anticuerpo secundario se emplearon 50 μ l del conjugado caprino anti-IgG murina acoplado a ficoeritrina (PE) (Beckman Coulter, PN IM0855; UK) en dilución 1:50 en FACs buffer, incubando durante 15 min en hielo y en la oscuridad. Debido a que el anticuerpo anti-IFN γ R1 fue producido en ratón fue necesario incluir en el ensayo un control IgG1 murina acoplada a PE (IgG1-PE) (Immunotech, PN IM0670; UK), 50 μ l en dilución 1:50 en FACs buffer, incubando durante 15 min en hielo y en la oscuridad.

El adecuado funcionamiento de los anticuerpos empleados en la realización de estos experimentos se verificó con el uso de PBMCs de individuos sanos sometidos al mismo proceso que las células L929 y LhgR, descrito en el párrafo anterior.

Entre cada paso de la técnica se realizaron 2 lavados con 1 ml de FACs buffer y centrifugando las muestras durante 3 min a 1400 rpm a 4°C.

Los controles negativos para este ensayo consistieron en: una muestra de suspensión celular a la que no se le añadió ningún conjugado, una muestra de suspensión celular a la que se le añadió exclusivamente el conjugado anti-IFN γ R1 producido en ratón, una muestra de suspensión celular a la que se le añadió el conjugado caprino anti-IgG murina-PE y una muestra de suspensión celular con el control de isotipo (IgG caprina-PE).

La lectura de las muestras realizó en un citómetro de flujo modelo Coulter Epics XL (Beckman Coulter; UK) para lo cual se seleccionó la región correspondiente a las células viables.

5.6.3. Estandarización de la técnica de citometría de flujo para la detección de la expresión de la cadena IFN- γ R2 del receptor para IFN- γ en las líneas celulares B-EBV Comar e IFN γ R2-/-.

Se cosecharon las células B-EBV Comar e IFN γ R2^{-/-} y se realizó el conteo celular empleando azul del tripan, como se mencionó anteriormente. Finalmente se ajustó la suspensión celular a 2×10^5 células en 300 μ l.

Para verificar la expresión o ausencia de la cadena IFN γ R2 en las líneas celulares B-EBV Comar e IFN γ R2^{-/-}, respectivamente, se emplearon dos presentaciones comerciales del anticuerpo murino anti-IFN γ R2 (R&D Systems y PBL; UK) 50 μ l de ambas en dilución 1:50 en FACs buffer. Las muestras con estos anticuerpos fueron incubadas durante 20 min en hielo y en la oscuridad.

En el caso del conjugado monoclonal murino anti-IFN γ R2 biotinilado (R&D Systems, BAF773; UK) la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo se evidenció mediante el uso de estreptavidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Beckman Coulter, PN IM3324; UK), 50 μ l, en dilución 1:10, incubando en hielo durante 20 min en la oscuridad.

Por otra parte, para el anticuerpo IgG monoclonal murino anti-IFN γ R2 humano no conjugado (PBL Biomedical Lab., 21585-1; UK) se emplearon 50 μ l del anticuerpo secundario caprino anti-IgG murina conjugado con FITC (Beckman Coulter, PN IM0819; UK) en dilución 1:50 en FACs buffer, incubando en hielo durante 20 min y en la oscuridad.

Como control de isotipo de ambos sistemas se empleó IgG1 murina acoplada a FITC (Immunotech, PN IM0639; UK) en dilución 1:10 en FACs buffer, incubando en hielo durante 20 min, en la oscuridad.

Entre cada paso de la técnica se realizaron 2 lavados con 1 ml de FACs buffer y centrifugando durante 3 min a 1400 rpm a 4°C.

Los controles negativos para este ensayo consistieron en: una muestra de suspensión celular a la que no se le añadió ningún conjugado, una muestra de suspensión celular a la que se le añadió exclusivamente el conjugado anti-IFN γ R2, una muestra de suspensión celular a la que se le añadió el conjugado caprino anti-IgG murina-FITC.

La lectura de estas muestras se llevó a cabo en un citómetro de flujo modelo Coulter Epics XL (Beckman Coulter, UK) para lo cual se seleccionó la región correspondiente a las células viables.

5.6.4. Estandarización de la técnica de citometría de flujo para la detección de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 en muestras séricas.

Se cosecharon las células L929 y LhgR como se describe en el punto 5.6.1, se realizó el conteo celular empleando azul del tripan y se ajustó la suspensión celular a 2×10^5 células en 300 μ l. Paralelamente se trabajaron PBMCs de individuos sanos con el fin de verificar el correcto funcionamiento de los reactivos empleados en la realización de esta técnica.

Las alícuotas de suspensión celular depositadas en los tubos para citometría fueron centrifugadas durante 3 min / 1400 rpm / 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron alícuotas de 50 μ l de suero de los pacientes incluidos en este estudio. Se comparó el uso de los sueros en dos diluciones, 1:10 y 1:200. Una vez añadido el suero, las muestras se incubaron en hielo durante 1 hr. Pasado este tiempo, las muestras fueron lavadas agregando 1 ml de FACs buffer y centrifugando durante 3 min/ 1400 rpm/ 4°C. La operación de lavado se realizó por duplicado entre cada paso de esta técnica.

A continuación se añadieron 50 μ l del conjugado anti-IgG humana acoplado a FITC producido en conejo (DakoCytomation, F0056; UK) en dilución 1:25. Las muestras se incubaron durante 20 min en hielo. Al terminar esta incubación se realizaron dos lavados y finalmente la muestra se resuspendió en 1 ml de FACs buffer para hacer la lectura en el citómetro de flujo. La lectura de las muestras se llevó a cabo en un citómetro de flujo modelo Coulter Epics XL (Beckman Coulter, UK) para lo cual se seleccionó la región correspondiente a las células viables.

Como controles del sistema de detección de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 se incluyeron: una muestra de suspensión celular a la que no se le añadió ningún conjugado, una muestra de suspensión celular a la que se le añadió exclusivamente el conjugado anti-IgG humana acoplado a FITC producido en conejo y una muestra de suspensión celular a la que se le añadió el isotipo control F(ab')₂ de conejo acoplada a FITC (DakoCytomation, X0929; UK).

6. RESULTADOS

6.1. Colección de muestras séricas.

Los pacientes de interés para este estudio fueron aquellos donde causas de inmunodeficiencia primaria y secundaria, incluyendo infección con HIV, fueron descartadas. Se colectaron 243 muestras de pacientes con las características clínicas pertenecientes a infecciones diseminadas causadas por MNT o Mtb (n=62), TB pulmonar (n=25), LEG complicado con TB pulmonar (n=54), LEG (n=10), vasculitis con TB pulmonar (n=37), vasculitis (n=10), salmonelosis (n=5), infecciones recurrentes con microorganismos oportunistas (n=15), desórdenes autoinmunes distintos de LEG (n=21) y muestras de pacientes en tratamiento con anticuerpos anti-TNF α (n=4). Además, se colectaron 60 muestras de individuos sanos no relacionados con los pacientes (n=60); logrando una colección de 303 muestras séricas.

6.2. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas mediante la técnica de IFMA-C.

Una vez estandarizada la técnica de IFMA-C se analizaron las 303 muestras séricas. De las 243 muestras de pacientes que fueron procesadas, solamente 1 resultó positiva a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ y aunque mostró una débil señal de reconocimiento hacia esta citocina.

En la Figura 4 se muestra la reacción de reconocimiento de cada anticuerpo utilizado como control positivo con su respectiva citocina en la concentración óptima y la reacción de las muestras séricas de un individuo sano y un paciente con TB en diferentes diluciones al enfrentarlos con IFN- γ , GM-CSF, IL-1 β (PeproTech) e IL-18. Las muestras se hicieron reaccionar con los conjugados humanos biotinilados o conjugado anti-conejo peroxidado en la dilución apropiada y revelados con α -cloronaftol.

Con el fin de incrementar la sensibilidad de la técnica de IFMA y de eliminar la posibilidad de reportar falsos negativos se decidió implementar el uso de un sustrato quimioluminiscente y de esta misma forma se verificaron los resultados obtenidos por IFMA-C.

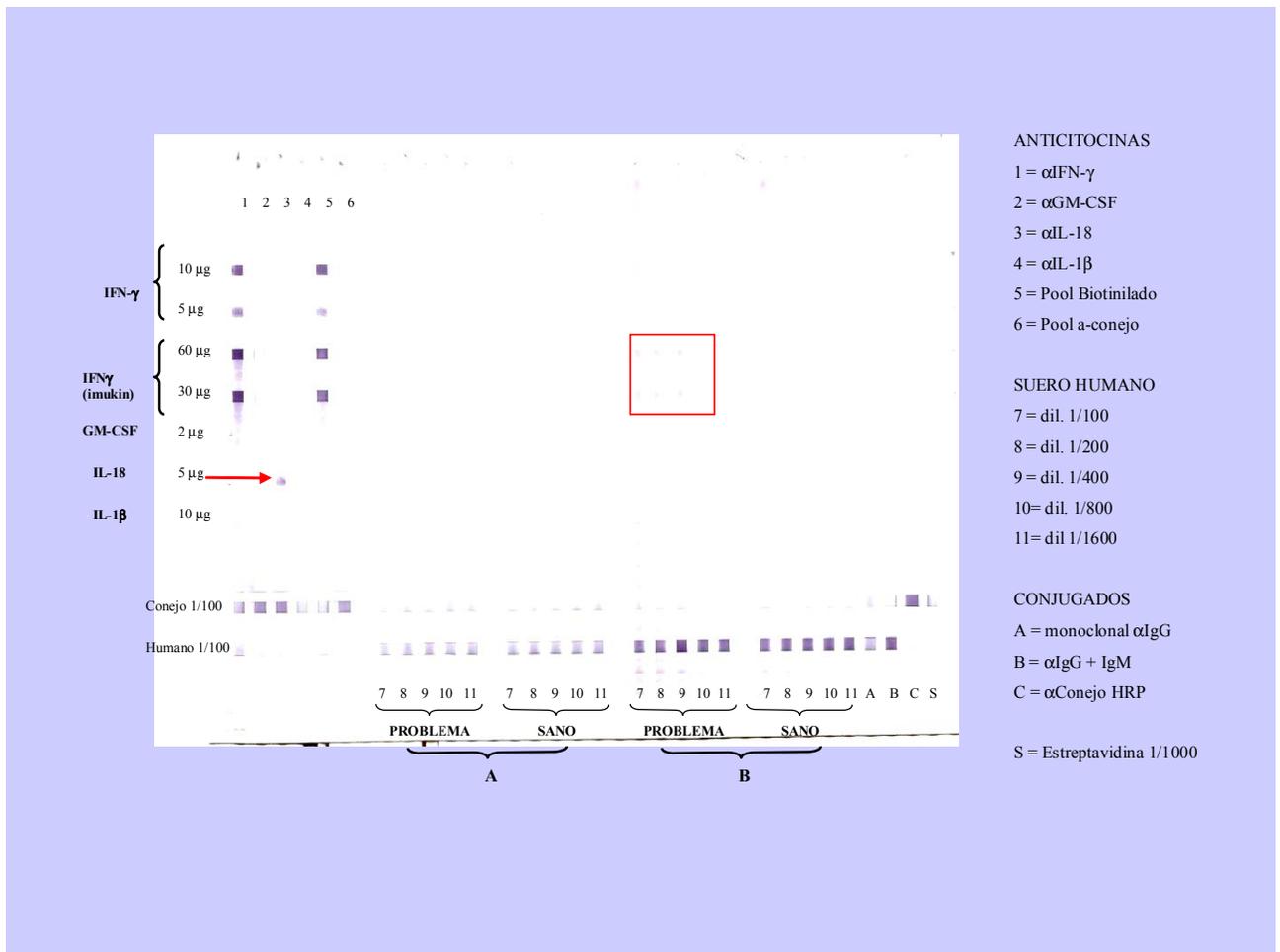


Fig. 4. Reacción de reconocimiento específico de los anticuerpos anti-citocinas y autoanticuerpos anti-IFN γ en un paciente con LEG y TB pulmonar mediante la técnica de IFMA-C. Los anticuerpos biotinilados utilizados como controles positivos anti-IFN- γ (carril 1) y anti-IL-1 β (carril 2) se emplearon individualmente y pool de los mismos (carril 5) a una dilución de 1:100. Los anticuerpos no biotinilados, anti-IL-18 (carril 3) y anti-GM-CSF (carril 4) y pool de los mismos (carril 6) a una dilución de 1:100 se les añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. En el recuadro en rojo se enmarcan las bandas correspondientes al reconocimiento de IFN- γ en un paciente con LEG complicado con TB pulmonar utilizando como anticuerpo secundario el conjugado biotinilado anti-IgG + IgM.

6.3. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas mediante la técnica de IFMA-Q.

6.3.1. Determinación de la concentración óptima de las citocinas.

No fue posible estandarizar el sistema para la detección de autoanticuerpos dirigidos contra IL-1 β debido a las reacciones inespecíficas que se presentaron con esta citocina. A pesar de que se compararon dos marcas de dicha citocina y de haber absorbido tanto los conjugados como la estreptavidina con cada una de estas preparaciones, fue imposible eliminar el reconocimiento inespecífico hacia esta citocina en todos los carriles. Además, el control positivo, es decir, la anti-citocina correspondiente no reconoció a su antígeno

correspondiente fijado en la membrana (Figura 5). Cabe mencionar que con el método colorimétrico, a diferencia de IFMA-Q, el control positivo sí funcionó empleando 0.0023 $\mu\text{g/ml}$ de la citocina y su conjugado biotinilado en dilución 1:100, sin presentarse problemas de inespecificidad.

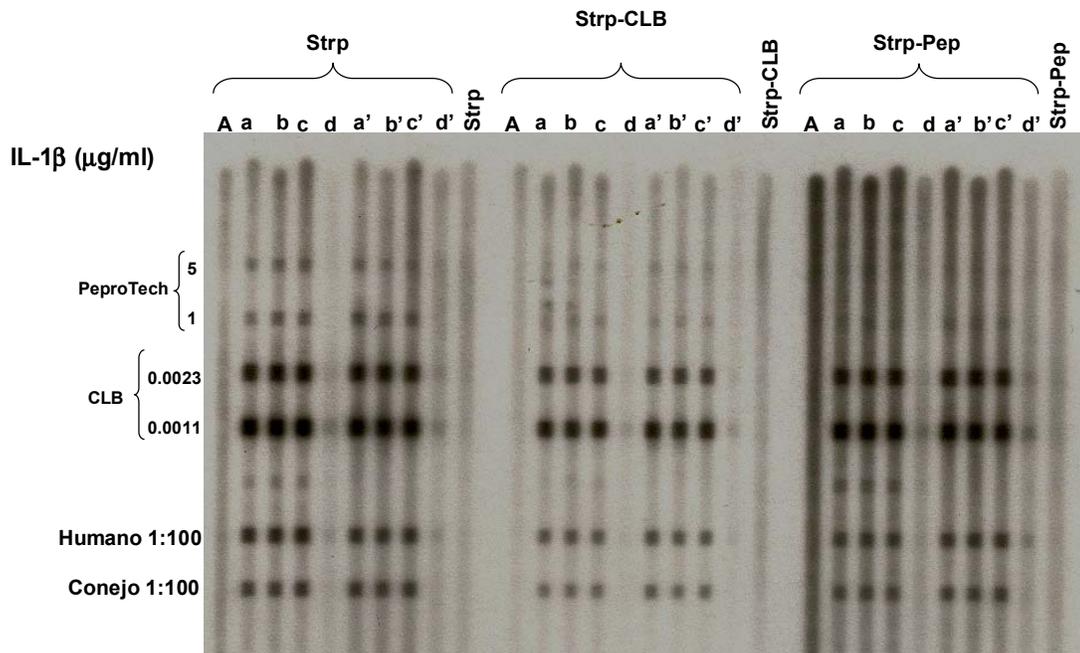


Fig. 5. Reacción inespecífica detectada por IFMA-Q de las dos preparaciones de IL-1 β (CLB y PeproTech) con los demás componentes del sistema. Con el fin de eliminar la reacción inespecífica que presentó la IL-1 β con los demás componentes del sistema (sueros, conjugados anti-IgG humana, estreptavidina) se comparó el efecto de dos marcas de dicha citocina así como su comportamiento frente a su anti-citocina correspondiente (**A**), frente al conjugado anti-IgG humana (**a**), el mismo conjugado absorbido con la citocina marca CLB (**b**) o PeproTech (**c**) y frente a proteína A-peroxidasa (**d**) en presencia (**a, b, c, d**) o ausencia (**a', b', c', d'**) de muestras séricas. También se comparó el uso de estreptavidina-peroxidasa (**Strp**), que a su vez se probó absorbida con ambas marcas de la citocina (**Strp-CLB y Strp-Pep**).

En la Figura 6 se muestran imágenes del proceso de estandarización del control positivo correspondiente a IFN- γ . Inicialmente se tomaron en cuenta las concentraciones de la citocina que fueron empleadas para IFMA-C (30, 20, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$) y se enfrentaron a su anti-citocina conjugada correspondiente, la cual se empleó más diluída (1:200 y 1:800) que aquélla utilizada para el método de revelado colorimétrico (1:100) (Figura 2 Panel A).

Ya que la reacción se evidenció satisfactoriamente aún empleando bajas concentraciones del antígeno y una dilución considerable de la anti-citocina, se decidió probar una dilución aún mayor de ésta

última (1:1500) con las concentraciones más bajas de IFN- γ (Figura 6 Panel B). Debido a que sí se observó una disminución en la intensidad de las bandas sobre las membranas se optó por emplear el conjugado en dilución 1:800. Tomando en cuenta esta experiencia, se decidió emplear las demás anti-citocinas biotiniladas en la misma dilución.

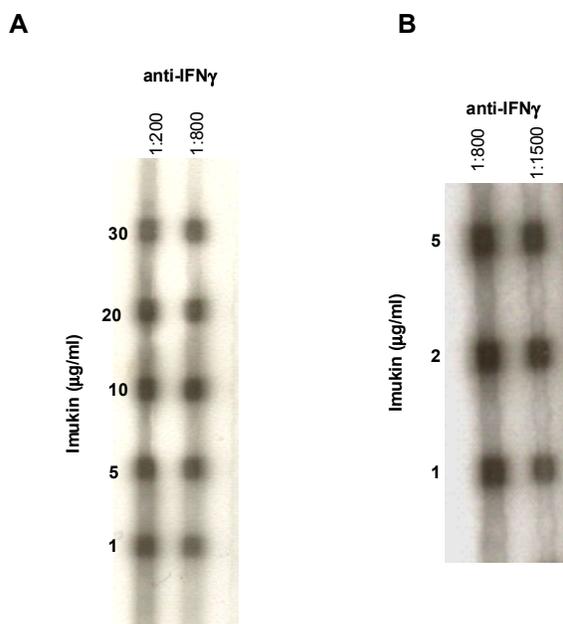


Fig. 6. Proceso de estandarización del control positivo de IFN- γ . **A:** reacción de reconocimiento observada al enfrentar el conjugado anti-citocina en diluciones 1:200 y 1:800 contra el IFN- γ de uso parenteral (Imukin) previamente fijado en membranas de NC en concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$. **B:** reacción de reconocimiento observada al enfrentar el conjugado anti-IFN γ en diluciones 1:800 y 1:1500 contra la citocina previamente fijada en membranas de NC en concentraciones de 1, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, los anticuerpos dirigidos contra IL-18 y GM-CSF no se hallaban conjugados y considerando que fueron producidos en conejo, fue necesario emplear un conjugado peroxidado anti-IgG de conejo. De este anticuerpo se prepararon diluciones 1:10000 y 1:20000, las cuales se enfrentaron a las anti-citocinas ya sea de manera individual o en pool, ambas en dilución 1:800. Los mejores resultados se observaron con la dilución 1:20000 del conjugado peroxidado anti-IgG de conejo (Figura 7).

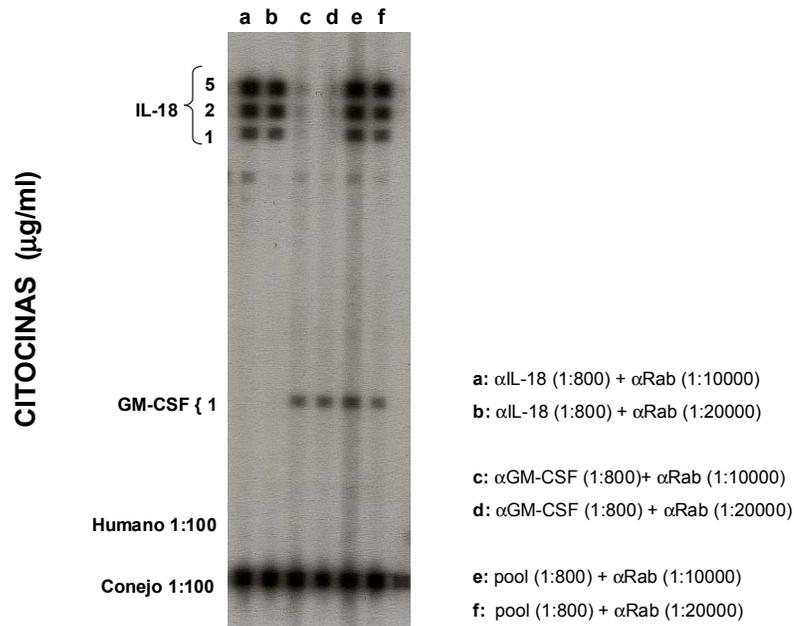


Fig. 7. Titulación del conjugado peroxidado anti-IgG de conejo producido en burro, el cual se empleó para la detección de las anti-citocinas anti-IL-18 y anti-GM-CSF.

Debido al amplio número de muestras séricas que debían analizarse mediante ésta técnica se optó por emplear los conjugados anti-citocinas en pool y de esta manera ocupar el menor número posible de carriles para los controles positivos del sistema, los cuales debían ser incluidos en cada corrida del ensayo. Se trabajó con un pool de anti-citocinas biotiniladas (que incluía las anti-citocinas dirigidas contra IL-6, 10, 12p40, IFN γ y TNF α) y otro pool de anticuerpos no conjugados producidos en conejo dirigidos contra IL-18 y GM-CSF. Ambas mezclas contenía una dilución final 1:800 de cada anti-citocina. El pool no biotinilado fue enfrentado posteriormente con el conjugado peroxidado anti-IgG de conejo (Figuras 7 y 8).

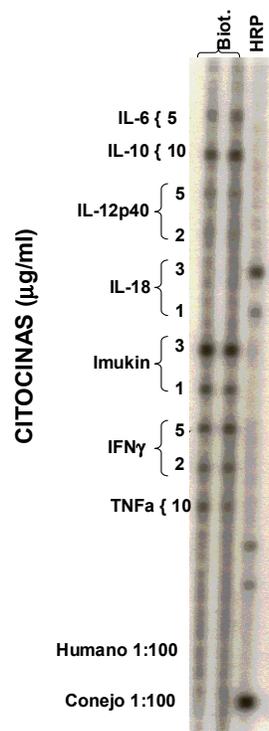


Fig. 8. Estandarización de los controles positivos anti-citocinas en pool. **Biot:** pool de conjugados biotinilados anti- IL-6, 10, 12p40; IFN- γ y TNF α . **HRP:** pool de anticuerpos anti-IL-18 y anti-GM-CSF producidos en conejo.

De acuerdo a estos resultados, las anti-citocinas biotiniladas que sirvieron como controles positivos funcionaron en forma individual y en pool, así como los anticuerpos no conjugados producidos en conejo.

En todos los casos, los controles internos para los conjugados utilizados en el sistema fueron los sueros humano y de conejo fijados como antígenos (diluidos 1:500). El derivado protéico purificado de *M. tuberculosis* (PPDt_b) también se utilizó para verificar el funcionamiento del sistema aunque es sabido que los individuos sanos vacunados poseen anticuerpos capaces de reconocerlo y que algunos pacientes tuberculosos pueden no reconocerlo.

6.3.2. Análisis de las muestras séricas.

Una vez estandarizada la técnica de IFMA-Q fue posible procesar las 303 muestras séricas. De las muestras procedentes del Hospital Addenbrookes se desconocían la descripción de las mismas al momento de realizar el ensayo con excepción de algunos controles negativos (individuos sanos).

De las 243 muestras de pacientes que fueron procesadas, 20 resultaron positivas mostrando una clara señal de reconocimiento hacia alguna de las citocinas fijadas como antígeno; 16 muestras más dieron una señal ambigua, por lo que se les consideró como sospechosas. De las 60 muestras de individuos sanos, solamente una muestra presentó una débil señal de reconocimiento a IL-10. En todos los casos la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo (citocina-anticitocina) fue evidenciada con el conjugado biotinilado monoclonal murino anti-IgG mientras que con el conjugado biotinilado anti-IgG+IgM no se detectó señal alguna.

De las 20 muestras positivas a la detección de autoanticuerpos anti-citocinas, 3 de ellas reconocieron IL-6. Estas 3 muestras corresponden al grupo de pacientes con vasculitis y TB pulmonar (3/37).

El mayor número de sueros positivos a la detección de autoanticuerpos anti-citocinas corresponde al reconocimiento de IL-10. Un total de 8 muestras positivas y 14 muestras sospechosas conforman este grupo. De las muestras positivas, 3 corresponden al grupo de pacientes con infecciones diseminadas o recurrentes causadas por Mtb o MNT (3/62); 1 al grupo de salmonelosis (1/5), 1 al grupo de individuos con LEG y TB pulmonar (1/54), 2 al grupo de desórdenes autoinmunes o inflamatorios distintos a LEG (2/21) y 1 individuo sano (1/60). De los 14 sueros sospechosos, 3 pertenecen al grupo de infecciones diseminadas o recurrentes causadas por Mtb o MNT (3/62); 7 al grupo de LEG y TB pulmonar (7/54), 3 al grupo de desórdenes autoinmunes o inflamatorios distintos a LEG (3/21); y 1 al grupo de infecciones causadas por microorganismos oportunistas (1/15).

En la Figura 9 se muestra como ejemplo, las señales de una reacción positiva a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-10 observada en algunas muestras séricas de humano. Las flechas indican los sitios en los que se detectó la reacción antígeno-anticuerpo. Como se puede apreciar, todas las bandas coinciden con el carril en el que se fijó IL-10 en concentración de 10 µg/ml.

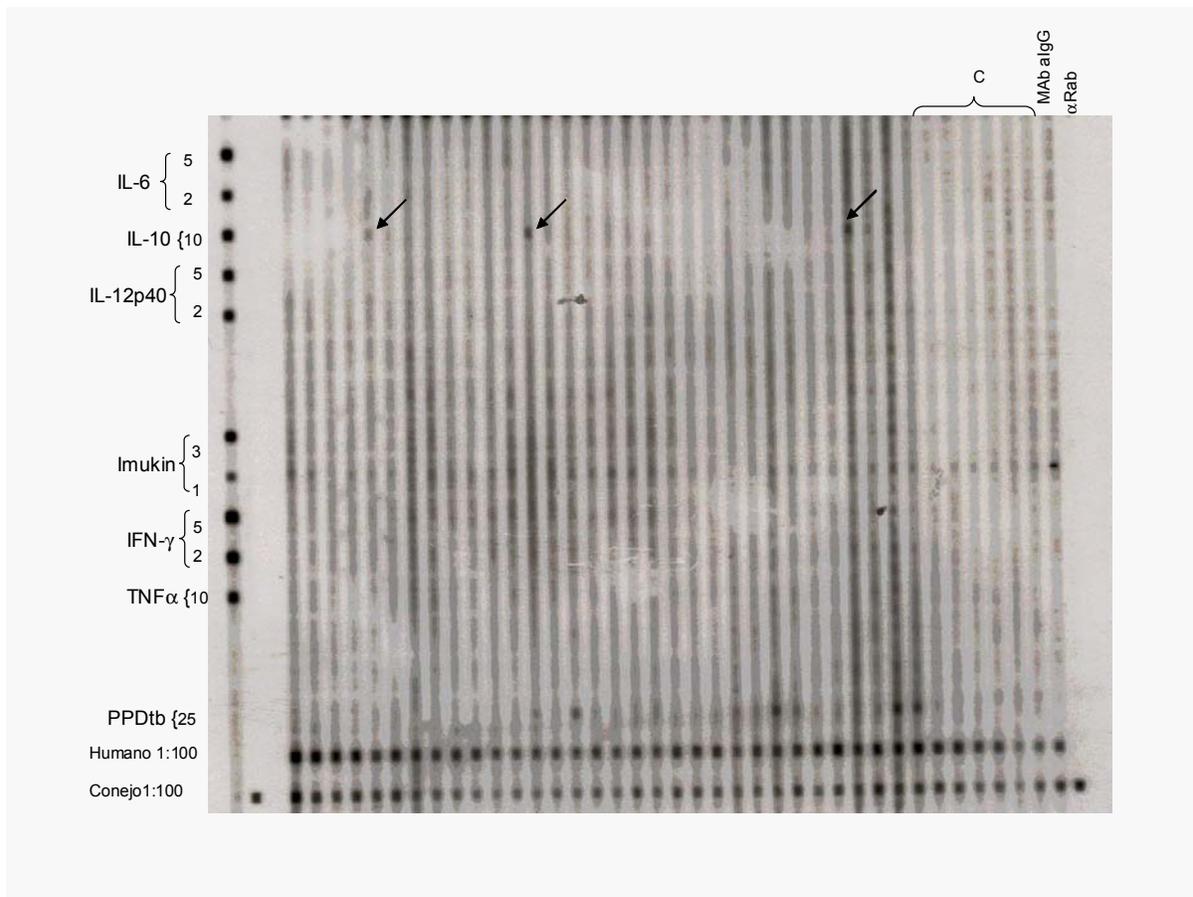


Fig. 9. Detección de autoanticuerpos anti-IL10 mediante la técnica de IFMA-Q. Se fijaron las diversas citocinas (IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- γ y TNF- α) sobre membranas de NC y se enfrentaron a diluciones 1:200 y 1:1000 de los sueros. Las flechas indican los sitios donde se apreció la reacción de reconocimiento hacia IL-10 de la cual se emplearon 10 μ g/ml para realizar el ensayo.

Se registraron 2 casos en los que las muestras séricas reconocieron IL-12p40; en ambos casos también se observó el reconocimiento del IFN γ recombinante tanto de uso clínico como el de uso en el laboratorio (Imukin y PeproTech, respectivamente). Ambas muestras corresponden a pacientes con infecciones micobacteriana atípicas causadas por *M. chelonae* (2/62). Por otra parte, se registraron 3 casos de individuos que reconocieron IFN γ exclusivamente, los cuales corresponden al grupo de infecciones diseminadas o recurrentes con MNT (3/62). Finalmente, se detectaron 2 casos sospechosos, de los cuales una de las muestras coincide en formar parte del grupo de infecciones diseminadas o recurrentes con MNT. La integración de estos resultados, como se muestra en la Tabla 18, sugiere que podría existir una relación entre la presencia de estos autoanticuerpos anti-IFN γ y el desarrollo o recurrencia de las infecciones causadas por MNT.

TABLA 18. Integración de los resultados obtenidos del análisis de muestras séricas mediante la técnica de IFMA-Q.

AUTOANTICUERPOS ANTI-CITOCINAS	CASOS DETECTADOS / TOTAL DE GRUPO	DESCRIPCIÓN DEL GRUPO
Anti-IL-6	3/37	Vasculitis y TB pulmonar
Anti-IL-10	3/62	Infecciones diseminadas o recurrentes causadas por MNT o Mtb.
	1/54	LEG y TB pulmonar
	1/5	Pacientes con salmonelosis
	2/21	Desórdenes autoinmunes o inflamatorios distintos a LEG y otros
	1/60	Sanos
Anti-IL-12p40 / anti-IFN- γ	2/62	Infecciones diseminadas o recurrentes causadas por MNT o Mtb.
Anti-IFN- γ	3/62	Infecciones diseminadas o recurrentes causadas por MNT o Mtb.
Anti-TNF- α	2/4	Pacientes que reciben terapia con anticuerpos anti-TNF α
Anti-GM-CSF	1/62	Infecciones diseminadas o recurrentes causadas por MNT o Mtb.
	1/15	Infecciones recurrentes con microorganismos oportunistas

Por otra parte, es importante mencionar que al momento de realizar los ensayos para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas no se conocía la historia médica de los pacientes. Los cuatro sueros que conformaron el grupo de individuos con tratamiento anti-TNF α (Infliximab) sirvieron para validar la técnica de IFMA-Q. Las muestras anteriores y posteriores al tratamiento con Infliximab resultaron negativas a la presencia de anticuerpos anti-TNF α , mientras que las muestras correspondientes al período de tratamiento con Infliximab resultaron positivas. Incluso, la intensidad del reconocimiento aumentó después veinte días de haber colectado la primera muestra (Figura 10).

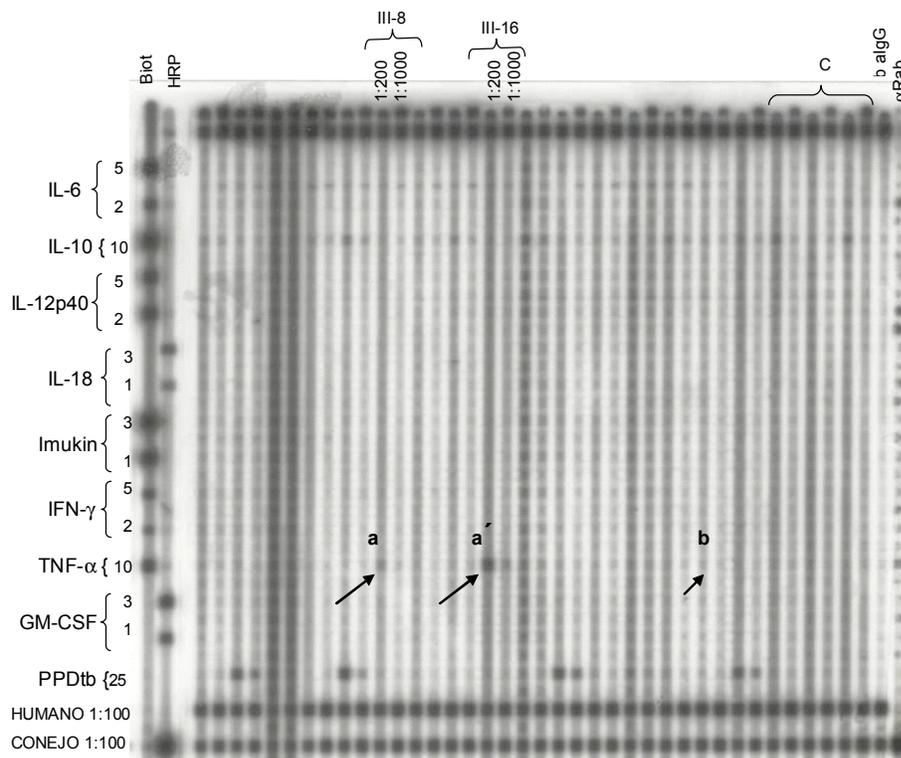


Fig. 10. Validación de la técnica de IFMA-Q y detección de anticuerpos anti-TNF α . **(a)** Primera muestra sérica correspondiente a un paciente bajo tratamiento con anticuerpos anti-TNF α . **(a')** Segunda muestra (20 días después) correspondiente al mismo paciente aún bajo régimen terapéutico. **(b)** Muestra del período post-tratamiento. En la imagen se muestran también las señales obtenidas con el pool de anti-citocinas biotilado (**Biot**) y el pool de anti-citocinas conjugadas con peroxidasa (**HRP**) utilizadas como controles positivos.

Dos sueros resultaron positivos a la presencia de anticuerpos anti-GM-CSF (Figura 11). Uno de ellos corresponde a un paciente con infección con MNT mientras que el otro corresponde a un paciente con infección debida a *Nocardia*. El GM-CSF es responsable de la proliferación de los macrófagos y participa en el estallido respiratorio. Como un comentario general de estos casos se podría mencionar que si la nocardiosis se asocia al debilitamiento del sistema inmune, tal vez la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra esta citocina es la responsable del estado de enfermedad de los pacientes.

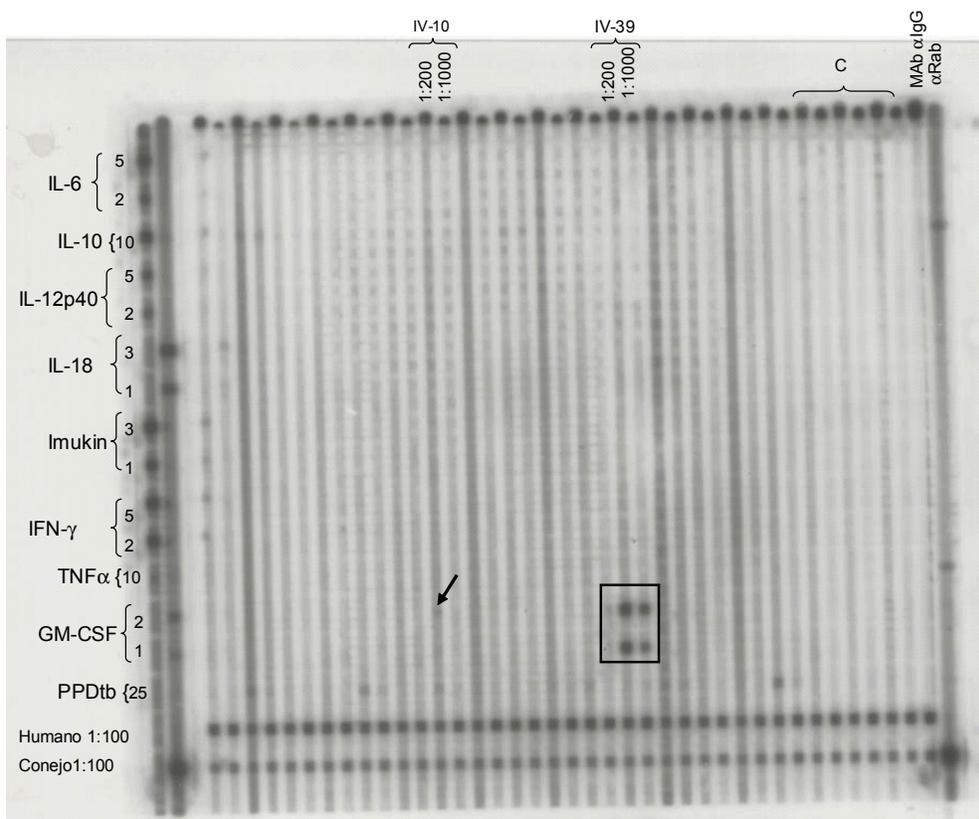


Fig. 11. Detección de autoanticuerpos anti-GM-CSF en las muestras séricas de pacientes con infección producida por micobacterias no tuberculosas (IV-10) y por *Nocardia* (IV-39). Cada suero se trabajó en dos diluciones (1:200 y 1:1000) y se enfrentó a las citocinas fijadas en la membrana. La flecha apunta a la señal débil de reconocimiento hacia GM-CSF que presentó un individuo con infección producida por MNT mientras que el recuadro enmarca la fuerte señal de reconocimiento hacia esta citocina en un paciente con nocardiosis.

En la Tabla 19 se resumen los sueros que resultaron positivos a la detección de autoanticuerpos contra alguna(s) citocina(s), descritos anteriormente, donde se especifica la dilución utilizada de cada suero, la intensidad con que se da el reconocimiento del antígeno (determinada cualitativamente) y su relación con el padecimiento del paciente, así como el reconocimiento del PPDtb. De la misma forma, en la Tabla 20 se resumen las observaciones hechas respecto a los sueros sospechosos.

TABLA 19. Descripción de los sueros positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas detectados mediante la técnica de IFMA-Q empleando anticuerpos monoclonales anti-IgG humana biotinilados.

SUERO	PROCED.	DESCRIPCIÓN	ANTI-CITOCINA DETECTADA	DIL.	INTENSIDAD	OBSERVACIONES
105	INCMNSZ	Vasculitis y TB pulmonar	Anti-IL-6	1:200	+	PPDtb (-)
135	INCMNSZ	Vasculitis y TB pulmonar	Anti-IL-6	1:200	+	PPDtb (-)
159	INCMNSZ	Vasculitis y TB pulmonar	Anti-IL-6	1:200	+	PPDtb (-)
I - 42	AH	<i>S.paratyphy</i> , linfadenitis	Anti-IL-10	1:200	++	PPDtb (-)
I - 94	AH	Control	Anti-IL-10	1:200	++	PPDtb (-)
				1:1000	+	
II - 21	AH	Desorden inflamatorio	Anti-IL-10	1:200	++	PPDtb (-)
				1:1000	+	
II - 22	AH	Mtb diseminada	Anti-IL-10	1:200	++	PPDtb (+)
				1:1000	+	
III - 37	AH	<i>M. malmoense</i>	Anti-IL-10	1:200	+	PPDtb (-)
III - 46	AH	<i>M. kansasii</i>	Anti-IL-10	1:200	+	PPDtb (+)
III - 71	AH	Granuloma múltiple, TB?	Anti-IL-10	1:200	+	PPDtb (+)
2250	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+	PPDtb (-)
I - 59	AH	Diagnóstico desconocido	Anti-IL-12p40	1:200	+	PPDtb (-)
			Anti-IFN γ (Imukin, Peprotech)	1:200	+	
II - 1	AH	Fibrosis quística, IMA	Anti-IL-12p40	1:200	+	PPDtb (-)
			Anti-IFN γ (Imukin, Peprotech)	1:200	+	
I - 51	AH	Mtb diseminada	Anti-IFN γ (Imukin, Peprotech)	1:200	+	PPDtb (+)
				1:1000	++	
I - 53	AH	Mtb, <i>M. chelonae</i>	Anti-IFN γ (Imukin, Peprotech)	1:200	+++	PPDtb (+)
I - 57	AH	<i>M. chelonae</i>	Anti-IFN γ (Imukin, Peprotech)	1:200	+++	PPDtb (+)
III - 8	AH	Tratamiento anti-TNF α (primera toma)	Anti-TNF α	1:200	+++	PPDtb (-)
III - 16	AH	Tratamiento anti-TNF α (segunda toma)	Anti-TNF α	1:200	+++	PPDtb (-)
IV - 10	AH	IMA, linfopenia	Anti-GM-CSF	1:200	++	PPDtb (+/-)
IV - 39	AH	<i>Nocardia</i>	Anti-GM-CSF	1:200	+++	PPDtb (-)

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis* TB: tuberculosis IMA: infección micobacteriana atípica LEG: lupus eritematoso generalizado
+ bandas de baja intensidad ++ bandas de intensidad media +++ bandas de alta intensidad +/- : señal ambigua

TABLA 20. Descripción de los sueros sospechosos a la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas detectados mediante la técnica de IFMA-Q empleando anticuerpos monoclonales anti-IgG humana.

SUERO	PROCED.	DESCRIPCION	AUTORREAC.	DILUCIONES	INTENSIDAD	OBS.
I – 47	AH	Fibrosis quística, <i>M. chelonae</i> , <i>Aspergillus</i>	Anti-IFN γ (Imukin)	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (-)
I – 49	AH	Diagnóstico desconocido	Anti-IFN γ (Imukin)	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (-)
II-18	AH	<i>M. kansasii</i>	Anti-IL-10	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (+++)
II-19	AH	Meningitis por pneumococo	Anti-IL-10	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (-)
II-28	AH	IVC, terapia anti-TNF α	Anti-IL-10	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (+)
II-35	AH	IMA, <i>Salmonella</i>	Anti-IL-10	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (+)
II-39	AH	Síndrome Hiper-IgE	Anti-IL-10	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (+/-)
II-41	AH	Síndrome Hiper-IgE	Anti-IL-10	1:200, 1:1000	+/-	PPDtb (+/-)
V – 1	AH	MNT, <i>Salmonella</i> , IL-12Rb1 deficiente, terapia con IFN γ	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb(+)
2173	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb (-)
2180	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb (-)
2196	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb (-)
2249	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb (-)
2288	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb (-)
2332	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb (-)
2334	INCMNSZ	LEG y TB pulmonar	Anti-IL-10	1:200	+/-	PPDtb (-)

IVC: inmunodeficiencia variable crónica

IMA: infección micobacteriana atípica

LEG: lupus eritematoso generalizado

+ bandas de baja intensidad

++ bandas de intensidad media

+++ bandas de alta intensidad

+/- : señal ambigua

6.4. Determinación del título de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas mediante la técnica de ELISA.

6.4.1. Sueros incluidos en el análisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo cualitativo de IFMA-Q, resumidos en la Tabla 21, los sueros que resultaron positivos a la presencia de autoanticuerpos contra una o más de las citocinas incluidas en este estudio se analizaron por técnica de ELISA para determinar el título de anticuerpos anti-citocinas presentes en ellos y compararlos con muestras séricas de individuos sanos.

TABLA 21. Total de sueros que resultaron positivos a la detección de autoanticuerpos anti-citocinas mediante la técnica de IFMA-Q.

Autoanticuerpos α -citocinas	Sueros Positivos
α -IL-6	3
α -IL-10	8
α -IL-12p40 / α -IFN γ	2
α -IFN- γ	3
α -TNF- α	2
α -GM-CSF	2
α -IL-18	0
TOTAL	20

Mediante la técnica de IFMA-Q se detectaron dos sueros positivos a la presencia de anticuerpos anti-TNF α correspondientes a un paciente que recibió tratamiento con Infliximab (anticuerpos anti-TNF α). Estas muestras fueron muy útiles para la estandarización y validación de la técnica de ELISA utilizada en la titulación de anticuerpos anti-citocinas en los sueros de los pacientes incluidos en el estudio. Cabe mencionar que, debido a que ambas muestras corresponden al mismo paciente, se optó por analizar solamente la muestra correspondiente a un estado avanzado del tratamiento con Infliximab.

En la Tabla 22 se muestra la relación de sueros de pacientes incluidos en los ensayos de ELISA, la procedencia de las muestras, el diagnóstico correspondiente a cada paciente y los anticuerpos anti-citocinas que fueron detectado en ellos mediante la técnica de IFMA-Q. Los controles negativos incluidos en estos

ensayos corresponden a sueros de individuos sanos que no presentaron autoanticuerpos anti-citocinas mediante la técnica de IFMA-Q.

TABLA 22. Descripción de cada uno de los sueros positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas detectados mediante la técnica de IFMA-Q.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	Anticuerpo α -citocina
105	INCMNSZ	Vasculitis + TB	α IL-6
135	INCMNSZ	Vasculitis + TB	α IL-6
159	INCMNSZ	Vasculitis + TB	α IL-6
I-42	AH	S. paratyphy, linfadenitis	α IL-10
I-94	AH	Control	α IL-10
II-21	AH	Desorden inflamatorio	α IL-10
II-22	AH	Mtb diseminada	α IL-10
III-37	AH	M. malmoense	α IL-10
III-46	AH	M. kansasii	α IL-10
III-71	AH	Granuloma multiple, TB?	α IL-10
2250	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar	α IL-10
I-59	AH	IMA	α IL-12p40, α IFN γ
II-1	AH	Fibrosis quística, IMA	α IL-12p40, α IFN γ
I-51	AH	Mtb diseminada	α IFN γ
I-53	AH	Mtb, M. chelonae	α IFN γ
I-57	AH	IMA	α IFN γ
III-16	AH	Tratamiento con anti-TNF α	α TNF α
IV-10	AH	IMA, linfopenia	α GM-CSF
IV-39	AH	Nocardiosis	α GM-CSF

6.4.2. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas mediante la técnica de ELISA.

El suero III-16 correspondiente a un individuo que recibió tratamiento con Infliximab (anti-TNF α) fue muy útil en la estandarización de la técnica de ELISA para la determinación del título de anticuerpos anti-citocinas en suero. Como se puede observar en la Figura 13, el título de anticuerpos del paciente es significativamente mayor al que presenta el control, incluso en dilución 1:1200.

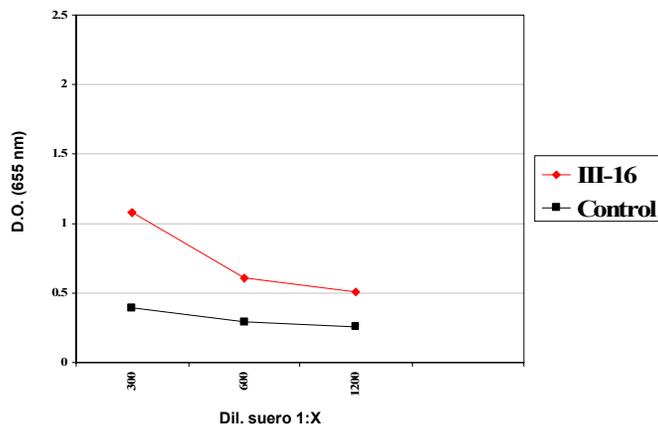


Fig. 13. Títulos de anticuerpos anti-TNF- α en el suero de un individuo que recibió tratamiento con Infliximab (III-16) comparado con un individuo sano. Este suero se empleó en la estandarización de la técnica de ELISA para la determinación del título de anticuerpos anti-citocinas. Las densidades ópticas se han graficado contra las diluciones séricas. Cada punto representa la media de experimentos hechos por duplicado.

Mediante esta misma técnica se realizó un análisis semicuantitativo determinando el título de anticuerpos anti-IL-6 en tres muestras séricas correspondientes a pacientes con vasculitis y TB, y se compararon con muestras de individuos sanos (Fig. 14). En todos los casos, los controles mostraron un mayor título de anticuerpos que las muestras de los pacientes; sin embargo, la diferencia entre ambos grupos no fue notoria.

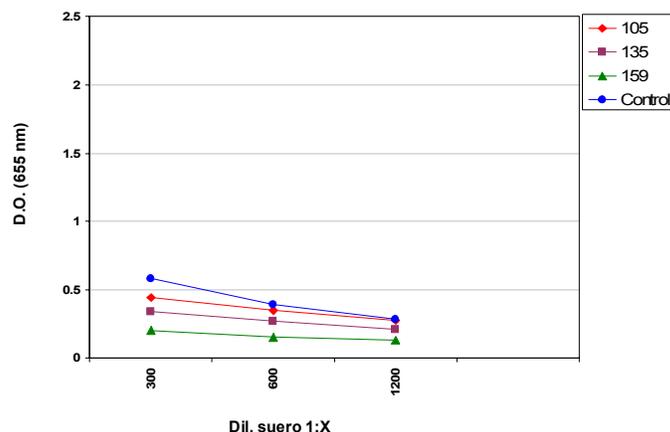


Fig. 14. Títulos de anticuerpos anti-IL-6 en el suero de pacientes con vasculitis (105, 135 y 159), comparados con los niveles de autoanticuerpos contra esta misma citocina en un individuo sano. Las densidades ópticas se han graficado contra las diluciones séricas. Cada punto representa la media de experimentos hechos por duplicado.

En el análisis de los sueros positivos a la presencia de anticuerpos anti-IL-10 e IL-12p40 mediante la técnica de ELISA los controles mostraron títulos de anticuerpos anti-citocinas menores o iguales al suero de los pacientes, pero al igual que en el caso de IL-6, dichas diferencias no fueron notorias (Fig. 15y 16).

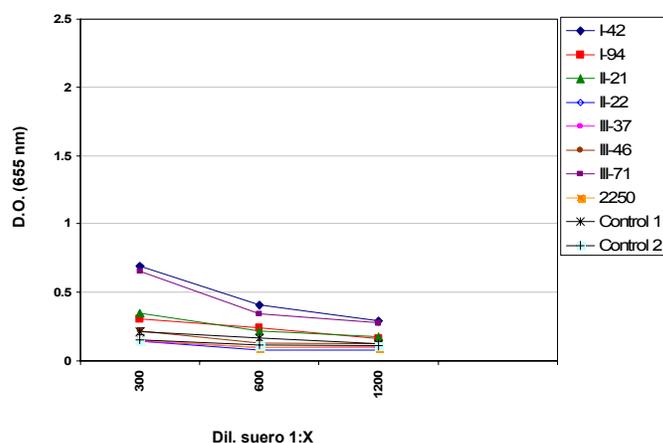


Fig. 15. Títulos de anticuerpos anti-IL-10 en los sueros de pacientes con infecciones con MNT o TB diseminada (II-22, III-37, III-46), *S. paratyphi* y linfadenitis (I-42), desórdenes inflamatorios distintos a LEG (II-21, III-71), lupus y TB (2250), comparados con los niveles de autoanticuerpos contra la misma interleucina en un individuo sano positivo en el ensayo de IFMA-Q (I-94) y dos controles negativos (Control 1 y 2). Las densidades ópticas se han graficado contra las diluciones séricas. Cada punto representa la media de experimentos hechos por duplicado.

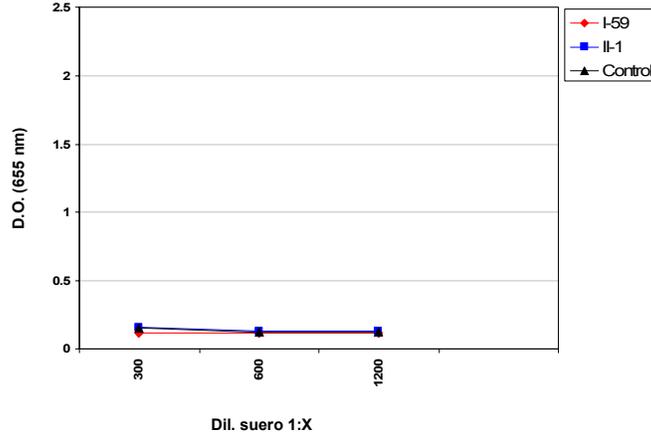


Fig. 16. Títulos de anticuerpos anti-IL-12p40 en el suero de pacientes con infecciones provocadas por MNT (I-59, II-1), comparados con los niveles de estos autoanticuerpos en un individuo sano. Las densidades ópticas se han graficado contra las diluciones séricas. Cada punto representa la media de experimentos hechos por duplicado.

Para el análisis de las muestras con anticuerpos anti-IFN γ se emplearon dos presentaciones de dicha citocina recombinante. En la Figura 17 panel A se muestran los resultados obtenidos con la solución parenteral de uso clínico, Imukin (IFN- γ b1). Existe una marcada diferencia entre los sueros I-53 y I-57 (del grupo de infecciones causadas por MNT) comparados con los controles (D.O. en un rango de 1.415 a 0.382), la cual fue más evidente cuando el antígeno fijado a las placas de ELISA fue el IFN- γ recombinante marca PeproTech, obteniéndose valores de D.O. en un rango de 1.960 a 0.442 (Fig. 17 panel B).

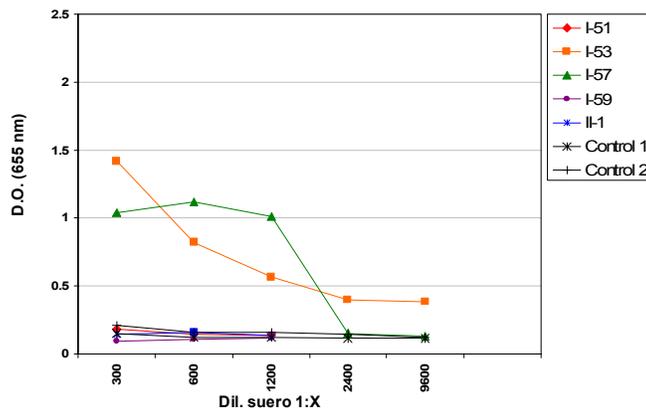


Fig. 17 A. Títulos de anticuerpos anti-IFN- γ en el suero de pacientes con infecciones ocasionadas por MNT (I-51, I-53, I-57, I-59, II-1) empleando Imukin (IFN- γ 1b, solución de uso parenteral) como antígeno. Estos títulos se compararon con los niveles de autoanticuerpos en dos individuos sanos (Control 1 y 2). Las densidades ópticas se han graficado contra las diluciones séricas. Cada punto representa la media de experimentos hechos por duplicado.

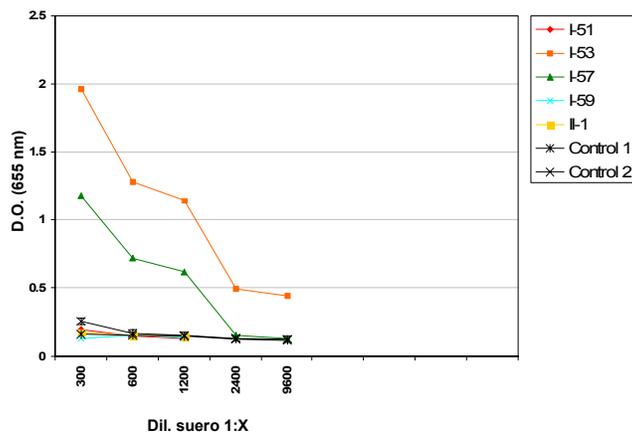


Fig. 17 B. Títulos de anticuerpos anti-IFN γ en el suero de pacientes con infecciones ocasionadas por MNT (I-51, I-53, I-57, I-59), comparados con los niveles de estos autoanticuerpos en individuos sanos (control 1 y 2). En los experimentos representados en este gráfico se empleó como antígeno el IFN γ recombinante marca PeproTech. Las densidades ópticas se han graficado contra las diluciones séricas. Cada punto representa la media de experimentos hechos por duplicado.

En el ensayo semicuantitativo realizado con las muestras de suero positivas a la presencia de anticuerpos anti-GM-CSF (Fig. 18) el suero IV-39, correspondiente a un paciente con nocardiosis, mostró un alto nivel de anticuerpos contra esta citocina y una marcada diferencia con respecto al título de anticuerpos en el control. Por esta razón, se realizó un segundo experimento en el que se trabajaron diluciones dobles del suero en un rango de 1:500 a 1:10000, obteniéndose valores de D.O. en un rango de 2.306 a 0.633, respectivamente.

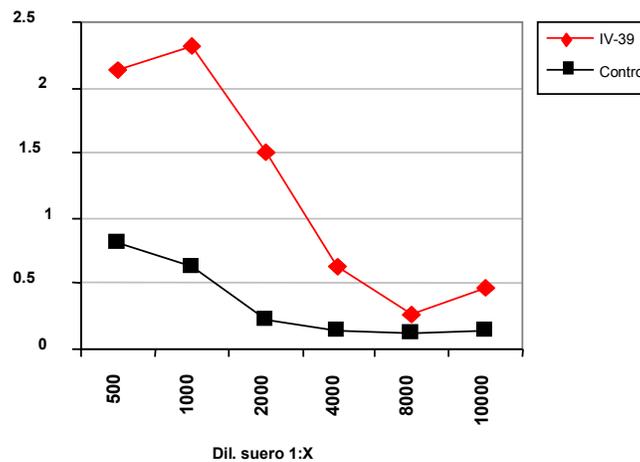


Fig. 18. Título de anticuerpos anti-GM-CSF en el suero de un paciente con nocardiosis (IV-39), comparado con los niveles de estos autoanticuerpos en un individuo sano. Las densidades ópticas se han graficado contra las diluciones séricas. Cada punto representa la media de experimentos hechos por duplicado.

6.5. Detección de autoanticuerpos contra el receptor para IFN- γ (IFN- γ R1 e IFN- γ R2) en líneas celulares mediante la técnica de citometría de flujo.

6.5.1. Detección de la expresión de las subunidades IFN- γ R1 e IFN- γ R2 del receptor para IFN- γ en líneas celulares mediante la técnica de citometría de flujo.

En primera instancia se evaluó la expresión de la cadena IFN γ R1 en las líneas celulares L929 y LhgR. La línea celular LhgR se caracteriza por la expresión de la subunidad IFN γ R1 del receptor para IFN- γ , por lo que en los gráficos se refiere como LhgR / IFN γ R1 (Fig. 19, panel B). Como control negativo se utilizó la línea celular L929, la cual no expresa el receptor IFN γ R1 (Fig. 19, panel A).

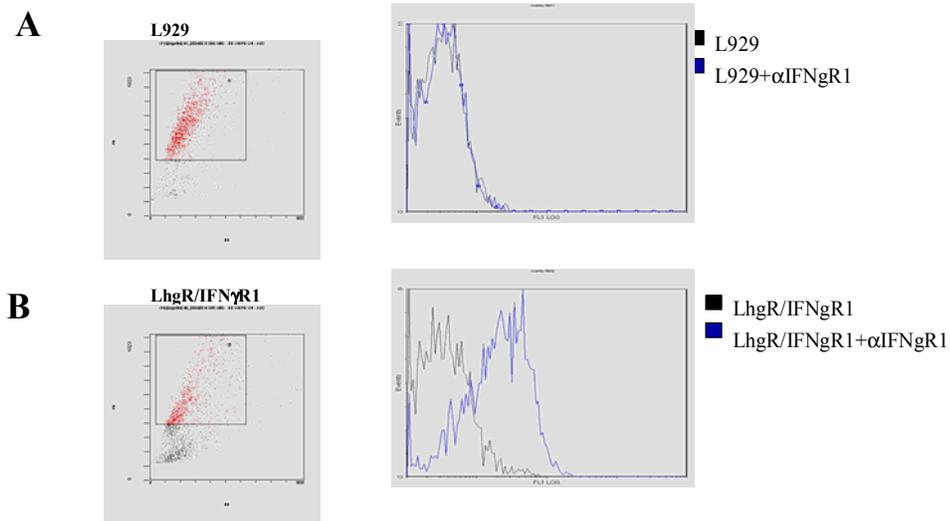


Fig. 19. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la cadena IFN γ R1 del receptor para IFN γ en las líneas celulares L929 y LhgR. Ambas líneas se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal murino anti-IFN γ R1 y se tiñeron con el conjugado caprino anti-IgG-PE. Como control negativo se emplearon células no teñidas. En el panel **A** se aprecia la ausencia de la cadena IFN γ R1 en células de la línea L929, mientras que en el panel **B** su expresión es evidente en la línea celular LhgR.

Una vez estandarizada la técnica de citometría de flujo utilizando el anticuerpo monoclonal murino anti-IFN γ R1 y el conjugado caprino anti-IgG-PE para la detección del receptor IFN γ R1 en las líneas celulares L929 y LhgR, ésta se llevó a cabo en cada uno de los ensayos realizados para la detección de autoanticuerpos contra dicho receptor para asegurar que las células expresaran dicho receptor (controles).

Durante la detección de la subunidad IFN γ R2 en las líneas celulares B-EBV Comar e IFN γ R2 $^{-/-}$ se apreció una reacción inespecífica (fondo) muy fuerte, con un valor medio de la intensidad de fluorescencia equivalente a $\mu = 311.2$, a pesar de haber utilizado anticuerpos monoclonales específicos para el receptor de interés. Por este motivo y por la brevedad del tiempo disponible para el análisis de las muestras séricas, se decidió emplear exclusivamente las líneas L929 y LhgR aunque esto limitara el experimento solamente a la búsqueda de autoanticuerpos anti-IFN γ R1.

6.5.2. Condiciones finales de la técnica de citometría de flujo para la detección de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 en muestras séricas.

- 1) Se emplearon las líneas celulares L929 y LhgR en una cantidad de 2×10^5 células por tubo.
- 2) Se añadieron alícuotas de 50 μ l de suero en dilución 1:200 en FACs buffer. El período de incubación fue de 1 hr en hielo.
- 3) Posteriormente, se empleó el conjugado anti-IgG-FITC humana producido en conejo (DakoCytomation, F0056) en dilución 1:25. Las muestras se incubaron durante 20 min en hielo y en la oscuridad.
- 4) En cada uno de los ensayos realizados se incluyeron los siguientes controles:
 - una muestra de cada línea celular sin teñir.
 - una muestra de cada línea celular a la que se le añadió exclusivamente el conjugado anti-IgG-FITC humana.
 - una muestra de cada línea celular a la que se le añadió únicamente el isotipo control IgG F(ab')₂ – FITC de conejo.
- 5) Entre cada paso de la técnica se realizaron 2 lavados con 1 ml de FACs buffer y las muestras se centrifugaron 3 min / 1400 rpm / 4°C.

6.5.3. Detección de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 en muestras séricas mediante la técnica de citometría de flujo.

El análisis por citometría de flujo de los sueros se realizó tomando en cuenta los grupos de pacientes previamente formados según la afección que estos padecían. En la Figura 20 se ejemplifican algunos resultados obtenidos de éste análisis para los controles positivos realizados con la línea celular LhgR, los controles negativos realizados con la línea celular L929, el suero de un individuo sano y el suero de un individuo con TB pulmonar, positivo a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ R1, ambos probados tanto en la línea celular L929 como con la LhgR.

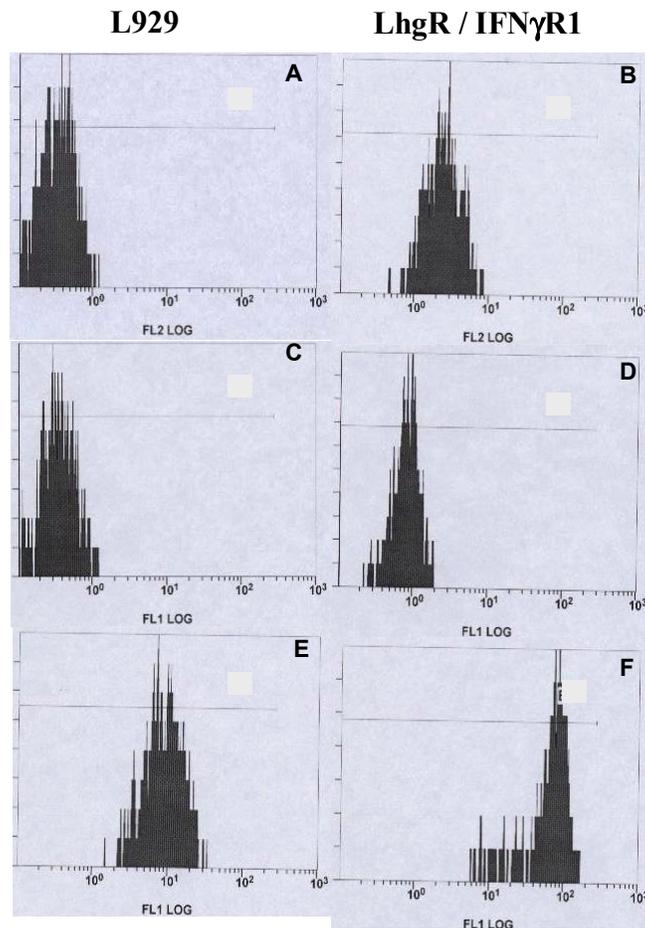


Fig. 20. Detección de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 en líneas celulares L929 y LhgR/IFN γ R1 empleando sueros de un individuo sano y un paciente con TB pulmonar. Para verificar la expresión del receptor ambas líneas celulares se enfrentaron al anticuerpo específico anti-IFN γ R1 (A y B). Un ejemplo de los resultados obtenidos al enfrentar ambas líneas con el suero de individuos sanos y conjugado anti-IgG humana se representa en los paneles C y D, mientras que los resultados obtenidos con el suero de un individuo con TB pulmonar y conjugado anti-IgG humana se ejemplifican en los paneles E y F.

En las tablas 23 a la 33 se reporta el valor promedio de la intensidad media de fluorescencia correspondiente a los controles de ambas líneas celulares (L929 y LhgR) enfrentadas al anticuerpo monoclonal murino anti-IFN γ R1, así como el de los sueros analizados con cada una de las líneas celulares. Es importante recordar que la línea LhgR expresa el receptor IFN γ R1 y que la línea L929 se utilizó como control negativo para cada experimento pues no expresa dicho receptor.

TABLA 23. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros correspondientes a pacientes con infección diseminada o recurrente causada por micobacterias no tuberculosas (MNT) o *M. tuberculosis* (Mtb).

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Controles	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.4	16.9
I-1	AH	Infección diseminada con <i>M. kansasii</i> .	1.8	2
II-18	AH	Paciente I-1, 4 meses después.	2.2	2
I-8	AH	Infección micobacteriana atípica (IMA)	1.2	1.9
I-15	AH	IMA, linfopenia.	4.6	1.7
I-18	AH	IMA, fibrosis quística	3.8	1
II-1	AH	Paciente I-18, 6 meses después.	3.2	2.7
I-19	AH	<i>M. kansasii</i>	4.1	1.4
III-30	AH	Paciente I-19, 11 meses después.	1.4	1.1
I-24	AH	<i>M. xenopei</i>	1.5	1.3
I-28	AH	MNT, hipotiroidismo	2.6	1
I-47	AH	<i>M. chelonae</i> , <i>Aspergillus</i> , linfadenitis	3.8	2.8
I-51	AH	Mtb	3.8	1.6
I-53	AH	Mtb, <i>M. chelonae</i>	5.1	16
II-4	AH	IMA, fibrosis quística	4	2.2
II-10	AH	IMA	3.9	3.5
II-22	AH	Mtb	6.9	1.4
II-32	AH	<i>M. kansasii</i>	0.5	0.7
II-35	AH	IMA, <i>Salmonella</i>	0.8	1
II-53	AH	IMA, fibrosis quística	2.5	1.2
III-1	AH	<i>M. avium</i>	2.6	6.7
III-63	AH	Paciente III-1, 3 meses después.	2.1	2
III-10	AH	Mtb, Inmunodeficiencia variable crónica (IVC)	2.9	1
III-20	AH	<i>M. abscessus</i> , fibrosis quística	2.1	1.2
III-28	AH	Mtb	1.7	2.3
III-32	AH	<i>M. avium</i>	0.4	0.3
III-33	AH	MNT, fibrosis quística	1.3	1.6
III-37	AH	<i>M. malmoense</i>	5.4	3
III-42	AH	Mtb, linfopenia	1.6	2.9
III-46	AH	<i>M. kansasii</i>	1.9	1.4
III-53	AH	Mtb	1	2.5
III-59	AH	<i>M. kansasii</i>	4.3	1.3
III-64	AH	Mtb	2.6	1.5
IV-10	AH	IMA, linfopenia		
IV-19	AH	IMA, deficiencia de IFN γ	1.4	2.3
IV-37	AH	IMA	3.3	0.9
IV-38	AH	Mtb	1.4	2.3
IV-40	AH	IMA	2.7	1.4
IV-41	AH	IMA	3.6	1.4
IV-42	AH	IMA	2.1	1.8
IV-43	AH	IMA	4.7	2.7

IV-44	AH	IMA	1.9	0.5
IV-45	AH	IMA	2	1.3
IV-46	AH	IMA	2.7	1
IV-48	AH	Meningitis tuberculosa	2.8	2.3
IV-49	AH	IMA	1.4	1.3
IV-55	AH	<i>M. avium</i>	2.5	0.7
IV-57	AH	<i>M. chelonae</i> , fibrosis quística, <i>Aspergillus</i>	6.3	4
IV-69	AH	Mtb	4.1	2.6
IV-73	AH	Mtb	3.1	1.9
IV-74	AH	Historia familiar de TB pulmonar	2.4	1.3
IV-79	AH	MNT	2.8	1.2
V-1	AH	MNT, <i>Salmonella</i> , IL-12Rb1 deficiente, terapia con IFN γ	3.3	2.3
V-7	AH	Mtb	5.1	11
V-10	AH	MNT, fibrosis quística	1.7	2
V-12	AH	Mtb	4.3	3.3
V-19	AH	IMA	3	2.3
V-20	AH	IMA	3	2.3
V-24	AH	<i>M. malmoense</i>	5.3	1.1
BW	AH	IMA	1.8	2.6
JS	AH	BCGosis	2.7	3.9
TJ	AH	Mtb multidrogo resistente	1	1
PD	AH	IMA	2	1

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 24. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros correspondientes a pacientes con Tuberculosis pulmonar.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.4	12.9
Tb-1	INCMNSZ	TB PULMONAR	14.4	13.4
Tb-2	INCMNSZ	TB PULMONAR	3	37.5
Tb-3	INCMNSZ	TB PULMONAR	5.2	24.5
Tb-4	INCMNSZ	TB PULMONAR	6.9	13
Tb-5	INCMNSZ	TB PULMONAR	6.8	14.6
Tb-6	INCMNSZ	TB PULMONAR	26.9	24.7
Tb-6 ²	INCMNSZ	TB PULMONAR	17.6	26.2
Tb-7	INCMNSZ	TB PULMONAR	2.8	17.2
Tb-8	INCMNSZ	TB PULMONAR	6.7	18.7
Tb-11 ²	INCMNSZ	TB PULMONAR	11.5	56.9
Tb-13	INCMNSZ	TB PULMONAR	4.4	13.3
Tb-14	INCMNSZ	TB PULMONAR	3.7	9.6
Tb-16	INCMNSZ	TB PULMONAR	10.8	23.7
Tb-17	INCMNSZ	TB PULMONAR	7.1	31.4
Tb-25	INCMNSZ	TB PULMONAR	7.6	29
TB02	INER	TB PULMONAR	9.7	21.9
TB07	INER	TB PULMONAR	9.3	7.2
TB08	INER	TB PULMONAR	16.9	23.4
TB09	INER	TB PULMONAR	4.9	19.3
TB10	INER	TB PULMONAR	6.3	4.7
SLJ	INER	TB PULMONAR / cepa multidrogo resistente	12	21.9
FRS	INER	TB PULMONAR/ cepa multidrogo resistente	6	13
ARAM	INER	TB PULMONAR/ cepa multidrogo resistente	4.4	28
JG	INER	TB PULMONAR/ cepa multidrogo resistente	7.1	8.7
JL	INER	TB PULMONAR/ cepa multidrogo resistente	5.4	21.1

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 25. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y Tuberculosis pulmonar.

SUEROS	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.6	26.2
1728	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.1
1739	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.1
1745	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.2
1936	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.6	0.8
1959	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.2
1960	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1	3.3
1962	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.9
1969	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1	1.1
2002	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	0.9
2006	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.8
2012	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1
2032	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.6
2044	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.6
2045	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1	0.9
2062	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.6
2070	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1.1	1.1
2076	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1.6	1.4
2133	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.8
2138	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.8
2141	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.2
2164	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	0.9
2165	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1
2172	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	0.9
2173	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.5
2175	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.1
2180	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.2
2190	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.8
2196	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.4
2240	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.6	1.3
2249	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.6	0.9
2250	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.8
2288	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	1.2
2324	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1
2332	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	1.4
2334	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	0.8
2335	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.1
2348	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.9
2352	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1.4	3.8
2354	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1	1.3
2356	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.3
2520	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	1.1

2524	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.3
2537	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1.4	2
2622	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.6
2629	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	1.1
2737	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.9	1.4
3265	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	2.6	3.2
4391	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.9
5308	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	1.1
6460	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	1.1
7128	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.8	0.7
7163	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	0.7	0.7
152570	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1.1	0.9
BYZ	INCMNSZ	LEG + TB PULMONAR	1.1	0.9

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 26. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros correspondientes a pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG).

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.6	26.2
P47-01	INCMNSZ	LEG	1.1	1.2
P47-02	INCMNSZ	LEG	2	1.8
P47-03	INCMNSZ	LEG	0.9	1.1
P47-04	INCMNSZ	LEG	0.7	0.9
P47-05	INCMNSZ	LEG	0.7	1
P47-06	INCMNSZ	LEG	0.6	1
P47-07	INCMNSZ	LEG	0.7	1.1
P47-08	INCMNSZ	LEG	1	2
P47-09	INCMNSZ	LEG	0.9	2.2
P47-10	INCMNSZ	LEG	0.8	0.9

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 27. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros correspondientes a pacientes con Vasculitis y Tuberculosis (TB) Pulmonar.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.8	5.1
108	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	1.2	4
111	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.1	10.6
118	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	1.6	2.5
125	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.5	7.1
126	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	5	4
135	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	9.4	3.9
139	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	4.3	3.6
142	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	1.5	2.6
147	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	13.3	6.6
150	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.7	1.4
154	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	5.1	5.4
159	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.7	6.4
174	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.8	3.5
C209	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.4	4
216	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.1	4.3
232	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	10.1	9.3
220	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	8.3	3.6
276	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.9	2.9
405	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.9	5.6
409	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.9	2.9
422	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.1	4.3
604	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.9	2
612	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	14.6	11.8
613	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.7	4.3
614	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.2	5
615	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.2	3.9
619	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	3.6	2.8
624	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	1.1	9.2
625	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	5.4	3.2
626	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	2.2	6.3
631	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	8.4	6.9
802	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	10.4	7.6

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 28. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros correspondientes a pacientes con Vasculitis.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.8	5.1
VSP-01	INCMNSZ	VASCULITIS	6.6	2.2
VSP-02	INCMNSZ	VASCULITIS	7	8.2
VSP-03	INCMNSZ	VASCULITIS	2.6	1.9
VSP-04	INCMNSZ	VASCULITIS	3.5	1.2
VSP-05	INCMNSZ	VASCULITIS	3.1	1.3
VSP-06	INCMNSZ	VASCULITIS	13.4	5.9
VSP-07	INCMNSZ	VASCULITIS	1.6	1.6
VSP-08	INCMNSZ	VASCULITIS	5.8	4.5
VSP-09	INCMNSZ	VASCULITIS	10.8	9
VSP-10	INCMNSZ	VASCULITIS	4.9	6.2

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 29. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros de pacientes con salmonelosis.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.5	19.8
I-42	AH	S. paratyphy, linfadenitis	0.7	0.9
I-43	AH	S. paratyphy, linfadenitis	0.5	0.9
I-44	AH	S. paratyphy, linfadenitis	0.5	0.7
I-45	AH	S. paratyphy, linfadenitis	0.5	1.1
IV-50	AH	Salmonelosis recurrente	0.7	1

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 30. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros de pacientes con infecciones recurrentes con microorganismos oportunistas.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.5	19.8
I-22	AH	Infecciones generales recurrentes	0.5	0.8
I-23	AH	Infecciones generales recurrentes	0.4	0.8
I-31	AH	Pseudomonas, fibrosis quística	0.5	0.9
II-12	AH	Sepsis por pneumococo	0.4	1.4
III-61	AH	Paciente II-12, 8 meses después.	0.5	0.9
II-16	AH	Sepsis por pneumococo	0.5	0.9
II-19	AH	Meningitis por pneumococo	0.7	1.1
III-19	AH	T. whippeli	3.2	1.5
III-66	AH	Candida, linfopenia	2.4	1.1
III-70	AH	Mucormicosis	0.5	1.1
IV-29	AH	Infección recurrente con Staphylococcus	0.5	1.1
IV-39	AH	Nocardia	9.3	11.1
IV-47	AH	Rhodococcus	2.2	1.6
V-8	AH	Sepsis por pneumococo	0.5	0.8
V-9	AH	Meningitis por pneumococo	0.4	3.5

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 31. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros de pacientes con desórdenes autoinmunes o inflamatorios distintos a LEG y otros.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.5	19.8
I-17	AH	Enfermedad de Erdheim Chester	0.7	1.6
I-21	AH	Síndrome Hiper-IgM	0.6	1.5
I-27	AH	Proceso granulomatoso destructivo severo	0.6	1.3
II-6	AH	Síndrome de Behcet	0.5	0.8
II-8	AH	Inmunodeficiencia Variable Crónica (IVC)	2.8	1.5
II-21	AH	Desorden inflamatorio	2.2	1.9
II-28	AH	IVC, terapia anti-TNF α .	0.5	1.8
II-39	AH	Síndrome Hiper-IgE	1.1	0.8
II-41	AH	Síndrome Hiper-IgE	0.5	1.1
III-44	AH	Síndrome hemofagocítico, XLP	0.6	1.2
III-67	AH	Síndrome de Ehler Danlos, M. szulgai	0.5	1.8
III-71	AH	Granuloma múltiple, ¿TB?	2.6	2
III-77	AH	Osteomielitis multifocal, M. spec.	0.5	1
IV-1	AH	Síndrome de Ehler Danlos, M. szulgai	2.8	1.2
IV-3	AH	Lesiones osteolíticas granulomatosas	2.9	2.1
IV-51	AH	Desconocido	3.7	2.3
IV-66	AH	Síndrome de Good	2	1.8
IV-80	AH	Desconocido	3.1	1.6
V-2	AH	Desconocido	2.1	1.2
V-4	AH	Desconocido	0.5	1.5
V-14	AH	Osteomielitis multifocal	1.2	0.7

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 32. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los suero de pacientes que reciben terapia con anticuerpos anti-TNF α (Infliximab).

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.4	12.9
I-11	AH	Muestra post-tratamiento anti-TNF α	9.5	14.7
III-8	AH	Paciente con tratamiento anti-TNF α	11.5	16.4
III-16	AH	Paciente III-8, 20 días después	20.6	25.8
III-31	AH	Muestra pre-tratamiento anti-TNF α	5.1	1.3

*Intensidad media de fluorescencia

TABLA 33. Resultados del análisis por citometría de flujo en líneas celulares L929 y LhgR (LhgR/IFN γ R1) de los sueros correspondientes a individuos sanos (controles negativos).

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Control Positivo	---	Tinción del IFN γ R1 con anticuerpo monoclonal específico.	0.7	12.4
I-82	AH	No vacunado	16.4	10.1
I-83	AH	No vacunado	12.4	13.4
I-84	AH	No vacunado	14.1	11.9
I-85	AH	No vacunado	14.5	13.4
I-87	AH	No vacunado	13.3	9.2
I-89	AH	No vacunado	13.2	3.8
I-92	AH	No vacunado	13.3	7.9
I-94	AH	No vacunado	12.5	7.9
II-48	AH	No vacunado	16.5	13.4
II-50	AH	No vacunado	8	4.6
II-54	AH	No vacunado	12.1	7
II-55	AH	No vacunado	15.7	12
II-56	AH	No vacunado	16.3	21.6
II-57	AH	No vacunado	12.6	16.7
II-58	AH	No vacunado	21	12.6
II-59	AH	No vacunado	6.3	6.7
II-60	AH	No vacunado	7.1	9.1
II-64	AH	No vacunado	7.4	6.3
II-67	AH	No vacunado	17.1	5.9
II-69	AH	No vacunado	16.8	12.1
II-70	AH	No vacunado	10.6	6.6
II-71	AH	No vacunado	11.1	10.1
II-72	1H	No vacunado	16.5	11.1
II-73	AH	No vacunado	13	5.1
II-75	AH	No vacunado	12.4	6.4
II-77	AH	No vacunado	14.3	8.6
II-79	AH	No vacunado	13.5	9.6
III-6	AH	No vacunado	11.7	1.8
III-21	AH	No vacunado	9.6	11
III-22	AH	No vacunado	12.5	9.6
IV-5	AH	No vacunado	5.8	8.8

*Intensidad media de fluorescencia

Tomando como referencia la variación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del control positivo de cada una de las líneas celulares se determinó que sueros eran positivos a la presencia de autoanticuerpos anti- IFN γ R1. Aquellos sueros en los que se observó un incremento del doble o más de su IMF al estar en contacto con la línea celular que expresa el IFN γ R1 (LhgR) fueron considerados como

positivos mientras que el comportamiento de las muestras correspondientes a individuos sanos tendía a conservar la misma IMF o incluso a disminuirla. La Tabla 34 ofrece un resumen de los sueros considerados como positivos, el lugar de procedencia de éstos, la afección de cada paciente y la intensidad media de fluorescencia que se reportó para cada una de las líneas celulares empleadas. Como se puede apreciar, 14 de las 16 muestras que se consideraron positivas a la presencia de autoanticuerpos contra IFN γ R1 corresponden al grupo de pacientes con TB pulmonar (n=25); esto es, el 56% de los pacientes con TB pulmonar presentaron autoanticuerpos anti-IFN γ R1.

TABLA 34. Sueros positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ R1.

SUERO	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN	L929*	LhgR*
Tb-2	INCMNSZ	TB PULMONAR	3	37.5
Tb-3	INCMNSZ	TB PULMONAR	5.2	24.5
Tb-5	INCMNSZ	TB PULMONAR	6.8	14.6
Tb-7	INCMNSZ	TB PULMONAR	2.8	17.2
Tb-8	INCMNSZ	TB PULMONAR	6.7	18.7
Tb-11 ²	INCMNSZ	TB PULMONAR	11.5	56.9
Tb-13	INCMNSZ	TB PULMONAR	4.4	13.3
Tb-14	INCMNSZ	TB PULMONAR	3.7	9.6
Tb-16	INCMNSZ	TB PULMONAR	10.8	23.7
Tb-17	INCMNSZ	TB PULMONAR	7.1	31.4
Tb-25	INCMNSZ	TB PULMONAR	7.6	29
TB02	INER	TB PULMONAR	9.7	21.9
ARAM	INER	TB PULMONAR/ cepa multidrogo resistente	4.4	28
JL	INER	TB PULMONAR/ cepa multidrogo resistente	5.4	21.1
624	INCMNSZ	VASCULITIS + TB PULMONAR	1.1	9.2
I-53	AH	Mtb, <i>M. chelonae</i>	5.1	16

*Intensidad media de fluorescencia

7. DISCUSION

La detección de anticuerpos es una de las herramientas más comúnmente utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Las técnicas serológicas son relativamente simples, rápidas y no invasivas. En muchas infecciones la mayoría de los individuos producen anticuerpos contra el mismo antígeno inmunodominante. En otros casos, principalmente en las infecciones causadas por patógenos intracelulares, el repertorio de anticuerpos es muy diverso por lo que es conveniente el empleo de técnicas que nos permitan trabajar con varios antígenos a la vez.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de IFMA, la cual permite trabajar con varios antígenos a la vez en un mismo ensayo, fijados en diferentes sitios en membranas de NC. Esto permite eliminar la posibilidad de que exista interferencia entre los antígenos utilizados y hace posible discernir el reconocimiento antigénico de una manera individual. Además, esta técnica permite el procesamiento de un número considerable de muestras séricas y de sus controles en una misma corrida del ensayo. Otra de las ventajas que representa el uso de esta técnica es que, además de ser de simple realización, es relativamente de bajo costo.

Aunque la técnica de ELISA es sensible y específica presenta algunas desventajas en los aspectos prácticos y económicos frente a la técnica de IFMA. Si bien en una microplaca pueden procesarse 96 muestras no hay que olvidar que cada uno de los pozos requiere de 50 μ l mínimo de cada una de las diluciones de los reactivos a trabajar. Por otra parte, un solo carril de la cámara Miniblotter 45 para la técnica de IFMA solo requiere de 150 μ l de solución o dilución de cada reactivo y este volumen es suficiente para procesar hasta 45 antígenos enfrentados a un número similar de muestras séricas. Esto quiere decir, que a pesar de hacer diluciones de cada uno de los reactivos o sueros empleados en los experimentos el volumen de cada solución madre (stock) empleado en la técnica de ELISA es considerablemente mayor y rinde menos que aquel utilizado para la técnica de IFMA. Considerando que los antígenos empleados fueron citocinas recombinantes y que son particularmente costosas, el ahorro en los volúmenes empleados representa una ventaja en cuanto a los costos de la técnica (el volumen de antígeno utilizado para procesar 45 muestras por IFMA es apenas suficiente para procesar 3 muestras por ELISA). Además, el uso de un soporte de NC es una ventaja en el aspecto económico pues su costo es menor al de las microplacas de ELISA.

Por otra parte, la técnica de IFMA no solo ofrece la posibilidad de trabajar varias muestras de una sola vez y de emplear volúmenes pequeños de los reactivos, sino que además permite hacer los lavados de la membrana de manera más rápida y sencilla mediante un dispositivo que permite la entrada y salida de las

soluciones en todos los canales a la vez. Además, para la interpretación de los resultados obtenidos por IFMA no requiere de equipos sofisticados. Estas características hacen del ensayo de IFMA una técnica rápida, sencilla y económica, ideal para implementarla como prueba de tamiz.

A diferencia del uso de un sustrato colorimétrico (α -cloronaftol y H_2O_2), el empleo de un sustrato quimioluminiscente incrementó la sensibilidad de la técnica de IFMA; y con el uso de éste último se realizó el análisis de todos los sueros que se incluyeron en el presente estudio permitiendo la detección de positivos y negativos a la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas. Así mismo, se llegó a detectar una señal ambigua en algunos sueros, por lo que se consideraron como sospechosos a la presencia de anti-citocinas.

Por el método de IFMA-C se logró estandarizar el sistema para la detección de IL-1 β aunque la señal de reconocimiento resultó ser muy débil para el control positivo. Por otra parte, la estandarización de este sistema para la técnica de IFMA-Q presentó algunas complicaciones ya que se observaron varias reacciones inespecíficas entre los componentes del sistema (anticuerpos, estreptavidina peroxidada, sustrato quimioluminiscente) tanto en el control positivo como en el negativo.

En todas las muestras que resultaron positivas por la técnica de IFMA-Q se detectaron autoanticuerpos del isotipo IgG mas no IgM. Tomando en cuenta que los AAN, los cuales son inocuos, son de isotipo IgM y preponderantemente y los recientes reportes de IgGs capaces de reconocer alguna citocina existen razones para considerar que los autoanticuerpos reportados en este trabajo pudieran tener algún efecto patogénico (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998; Döffinger *et al.*, 2004).

Las muestras séricas de un individuo que recibió tratamiento con anticuerpos anti-TNF α (Infliximab) fueron de gran ayuda para poder estandarizar tanto la técnica de IFMA como la de ELISA; además, dichas muestras nos permitieron validar los resultados obtenidos por ambas técnicas. Esta correlación quedó de manifiesto al compararse la intensidad de las bandas en las membranas de NC contra los niveles de anticuerpos presentes en los sueros analizados por ELISA, es decir, cuanto más intensas fueron las bandas en las membranas mayor eran el nivel anticuerpos (valores de D.O. mayores) en los sueros. Esta condición fue más evidente en aquellos casos en los que se detectaron anticuerpos anti-GM-CSF (suero III-16) o anti-IFN γ (sueros I-53 y I-57), en los que se observaron bandas intensas en las membranas y altos niveles de anticuerpos determinados por ELISA.

Debido a que en los sueros en los que se detectaron autoanticuerpos anti-IFN γ , anti-GM-CSF y anti-TNF α mediante IFMA-Q, también se determinaron por ELISA niveles elevados de dichas inmunoglobulinas, estos resultados le dan validez a la técnica de IFMA-Q como prueba presuntiva de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas.

Las muestras séricas que presentaron elevados niveles de autoanticuerpos anti-IFN γ comparten la característica de pertenecer al grupo de individuos con infecciones micobacterianas atípicas y recurrentes (causadas por MNT), lo cual coincide con los resultados de los casos reportados por Döffinger, *et al.* (2004) y Höflich *et al.* (2004). En conjunto, estos datos sugieren que la presencia de estos autoanticuerpos podría provocar que estos pacientes fueran más susceptibles a este tipo de infecciones y/o que no respondieran adecuadamente a los tratamientos terapéuticos que se les administran. Ya que en los pacientes incluidos en este estudio se han descartado todos aquellos con susceptibilidad de tipo primario o secundario, se puede considerar que los casos que aquí se reportan como positivos presentan susceptibilidad tardía aunque no es posible asegurar si la presencia de autoanticuerpos se presentó previamente o posteriormente a la infección micobacteriana.

Un caso muy interesante es el del paciente IV-39, quien padece nocardiosis. Los miembros del género *Nocardia* se consideran organismos oportunistas. El elevado nivel de autoanticuerpos anti-GM-CSF detectado podría estar relacionado con la infección que padece este individuo, pues esta citocina se encuentra involucrada en el estallido respiratorio en los macrófagos y en la formación del granuloma para el control de la infección, de tal forma que la posible actividad neutralizante de estos autoanticuerpos podría ser la causa de la susceptibilidad del paciente hacia infecciones oportunistas, como la nocardiosis.

Los pacientes con proteinosis pulmonar adquirida o idiopática no sólo sufren la acumulación de proteína surfactante en los alveolos e infecciones por organismos oportunistas, sino que recientemente se ha demostrado que presentan anticuerpos anti-GM-CSF por lo que se podría considerar una enfermedad autoinmune. Generalmente, estos pacientes responden satisfactoriamente a la terapia con GM-CSF (Uchida, 2004; Bonfield, 2002 a, Bonfield 2002 b; Carraway, 2000; Kitamura, 1999). Además, en diversos estudios se ha observado que ratones GM-CSF $-/-$ son susceptibles a la infección pulmonar ya sea por estreptococos del grupo B y *Pneumocystis carinii*, la eliminación de patógenos virales, bacterianos y fúngicos es deficiente; sus macrófagos alveolares tienen defectos de adhesión celular, fagocitosis, producción de iones superóxidos, expresión de receptores de reconocimiento de patógenos y presentan una pobre secreción de citocinas proinflamatorias (Trapnell *et al.*, 2003).

En algunos casos (IL-6, IL-10 e IL-12p40) analizados en el presente estudio, las señales obtenidas en IFMA-Q fueron tenues y esto se reflejó en los datos que arrojaron los ensayos de ELISA pues los niveles de anticuerpos fueron muy bajos (D.O. ≤ 0.1). Cabe mencionar que hubo muestras que presentaron señales de intensidad media a baja, las cuales fueron consideradas positivas por la técnica de IFMA pero que en los ensayos de ELISA resultaron negativas a la presencia de IgGs anti-citocinas. Si bien puede tratarse de falsos positivos obtenidos por IFMA-Q, es también importante tomar en cuenta la posibilidad de que las citocinas, al igual que otras proteínas, al ser fijadas a las membranas de NC o en soportes plásticos (microplacas de poliestireno) pueden tener cambios en su conformación (estructura secundaria, terciaria o cuaternaria). Estos cambios en su conformación pueden provocar que queden expuestas regiones que comúnmente no son reconocidas por los anticuerpos en el suero o pueden quedar ocultas regiones que en otras circunstancias sí son reconocidas; esto se puede reflejar en la alteración de la capacidad de unión de las IgGs presentes en las muestras séricas. Por otra parte, algunos autores han reportado falsos positivos con el uso de citocinas glicosiladas pues en el suero también se hallan anticuerpos anti-polisacáridos (Bendtzen *et al.*, 1998; Bendtzen, 2004).

Por otra parte, considerando los resultados obtenidos por técnica de IFMA-Q es interesante resaltar que los sueros de individuos que padecen LEG complicado con TB pulmonar poseen autoanticuerpos específicos para IL-10 mientras que en los individuos que padecen exclusivamente de LEG estos autoanticuerpos no se detectaron.

Así mismo, al comparar los resultados obtenidos con pacientes que padecen vasculitis complicada con TB pulmonar y pacientes que solamente sufren vasculitis, se observó que 3 muestras de pacientes con vasculitis y TB presentaron autoanticuerpos anti-IL-6, mientras que los individuos con vasculitis exclusivamente fueron negativos a la presencia de estos autoanticuerpos. Por lo tanto, se puede considerar que la presencia de estos autoanticuerpos está relacionada con el padecimiento pulmonar.

Las vasculitis comprenden un grupo heterogéneo de etiologías y manifestaciones diversas caracterizadas por la inflamación de los vasos sanguíneos. Independientemente del mecanismo patogénico de cada forma de vasculitis, todas ellas se caracterizan por un proceso inflamatorio en la pared vascular en el que participan diversas citocinas y mediadores inflamatorios (Ledford,1997). La IL-6 interviene en la maduración de células T y monocitos, en la diferenciación de células B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos y es, además, una citocina pro-inflamatoria. Considerando que un antígeno propio producido en concentraciones más elevadas de lo normal puede romper la homeostasis de un sistema (Fourneau *et al.*,

2004; Fairweather *et al.*, 2001), otra posible explicación de la presencia de autoanticuerpos en este tipo de pacientes es que sea el resultado de la producción excesiva de la IL-6.

En cuanto al efecto patológico que las anti-citocinas pudieran tener, no existe la certeza de que estos autoanticuerpos posean actividad neutralizante sobre los efectos biológicos de las citocinas empleadas en este estudio. Sin embargo, considerando los pocos reportes que existen al respecto, se ha demostrado la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IFN γ en todos los casos (Patel *et al.*, 2005; Döffinger *et al.*, 2004; Höflich *et al.*, 2004). Para verificar la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-citocinas reportados en el presente trabajo lo más adecuado sería realizar pruebas de neutralización de la actividad biológica de las citocinas *in vitro* empleando cultivos celulares estimulados con las citocinas contra las que van dirigidas los autoanticuerpos de interés. Si en presencia del suero de los pacientes o del autoanticuerpo purificado la actividad biológica de estas citocinas se verá disminuida o abatida, y de esta forma se confirmaría dicha actividad neutralizante.

El desarrollo de infecciones micobacterianas diseminadas se relaciona no solamente con defectos en la producción de citocinas sino también con la actividad de sus respectivos receptores, por esta razón en la etapa final del presente estudio fue de interés la detección de autoanticuerpos dirigidos contra la cadena IFN γ R1 del receptor para IFN γ mediante la técnica de citometría de flujo. El análisis del total de las muestras séricas mostró que el mayor número de muestras de pacientes que presentaron estos autoanticuerpos pertenece al grupo de individuos afectados por TB pulmonar. Considerando los reportes de Höflich (2004) y Döffinger (2004) con respecto al hallazgo de autoanticuerpos anti-IFN γ , los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 podría estar relacionada con el desarrollo de la enfermedad pulmonar y/o con una respuesta deficiente al tratamiento de ésta.

Hasta ahora en la literatura no se han reportado casos de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 involucrados en el desarrollo de TB pulmonar, sin embargo, los resultados obtenidos en presente trabajo son de carácter preliminar, por lo que es necesario confirmar el efecto patogénico de estos autoanticuerpos. Con la finalidad de demostrar que estos autoanticuerpos anti-IFN γ R1 poseen actividad neutralizante se sugiere la implementación de un modelo *in vitro* de la inhibición de los efectos de las cascadas de señalización activadas por la vía IFN γ /IFN γ R1, como es la vía STAT-1 (Casanova y Abel., 2002; Höflich *et al.*, 2004).

Se ha reportado la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en individuos sanos y se cree que este podría ser un mecanismo de inmunorregulación pero, tomando en cuenta las observaciones hechas en este trabajo, se sugiere que en pacientes que sufren de infecciones recurrentes o diseminadas con patógenos intracelulares esos mecanismos se encuentran alterados de tal manera que crean un escenario que hacen más susceptible al individuo a contraer este tipo de infecciones. Por tal motivo, sería recomendable que en estos pacientes se lleven a cabo las pruebas pertinentes para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas o anti-receptores con actividad neutralizante, principalmente para aquellas involucradas en el control de estas infecciones.

Es importante mencionar que en el caso del suero I-53 (procedente de un paciente con infección diseminada causada por *M. chelonae*), se detectaron autoanticuerpos capaces de reconocer tanto la citocina (IFN γ) como el receptor de la misma (IFN γ R1). Esta circunstancia enfatiza el posible rol de estos autoanticuerpos como elementos que merman la efectividad de la respuesta inmune del individuo causándole susceptibilidad a infecciones atípicas micobacterianas.

En forma general, la presencia de los autoanticuerpos detectados en este estudio podrían ser el resultado de una condición autoinmune sub-clínica previa en estos pacientes, pero también pudieron generarse como un mecanismo de inmunorregulación de la respuesta del propio individuo. En el peor de los escenarios podría sospecharse que la elevación en la concentración de algunas moléculas implicadas en la respuesta inmune del hospedero (citocinas) pudiera llevar a la pérdida de la tolerancia hacia estas moléculas propias (Fourneau *et al.*, 2003).

No se sabe por qué o cómo se induce la producción de autoanticuerpos contra algunas citocinas, sin embargo, los linfocitos B reactivos contra citocinas parecen estar presentes frecuentemente como lo indican los hallazgos de autoanticuerpos dirigidos contra un número de citocinas cada vez mayor tanto en humanos como en ratones. Debido a que la participación de las células T cooperadoras es esencial para la producción de anticuerpos del isotipo IgG de alta afinidad, la pérdida de la tolerancia podría estar involucrada en el curso de los eventos que llevan a la inducción de autoanticuerpos (Bendtzen *et al.*, 1998).

Otra posibilidad es que se lleve a cabo la activación de linfocitos B y T a través de la reacción cruzada con moléculas estructuralmente relacionadas con las citocinas en un escenario de inflamación o con moléculas propias de algún microorganismo, fenómeno conocido con el nombre de mimetismo molecular (Bendtzen *et al.*, 1998; Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998; Christen y von Herrath, 2003).

La tolerancia también puede verse alterada si una citocina se une como hapteno a un acarreador codificado por un microorganismo. Por ejemplo, los vaccinia virus producen moléculas muy similares a los receptores para IFN α/β , TNF α , IL-1, IL-6 e IFN γ . Muchas de estas estructuras similares a los receptores pierden su dominio transmembranal y son secretados de la célula infectada. Algunos de estos "receptores" secretados conservan su capacidad de unirse a su contraparte en el hospedero (citocina) funcionando entonces como acarreador de ésta, favoreciendo el desarrollo de la respuesta autoinmune. La infección crónica o recurrente capaz de desafiar a la tolerancia hacia epítomos en la citocina nativa (y la posterior pérdida de ésta) podría explicar la producción continua de estos autoanticuerpos (Bendtzen *et al.*, 1998).

En condiciones fisiológicas, las células T autorreactivas naturales contribuyen en gran medida a la selección del repertorio de células B autorreactivas (Bendtzen *et al.*, 1998). Alternativamente, puede especularse que los linfocitos B autorreactivos (CD5+) naturales se encuentran dotados con alguna habilidad para activar (switching) su cambio de isotipo en ausencia de la interacción con linfocitos T y dar lugar a IgGs de alta afinidad capaces de reconocer antígenos propios. Esta hipótesis es consistente con el hallazgo de pequeñas cantidades de IgG en el suero de pacientes con síndrome de hiper-IgM deficientes en CD40L (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998).

8. CONCLUSIONES

- La técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos (IFMA) en membranas de nitrocelulosa (NC) resultó una prueba rápida, sencilla y económica, adecuada para la detección de autoanticuerpos contra citocinas. Así mismo, la técnica de citometría de flujo es una buena opción para la detección de autoanticuerpos anti-receptores de citocinas.
- El empleo de un sustrato quimioluminiscente en la técnica de IFMA resultó ser más adecuado para el revelado de la misma en comparación con un sustrato colorimétrico.
- Nuestras observaciones demuestran que los autoanticuerpos anti-GM-CSF, anti-IFN γ y/o anti-IFN γ R1 pueden encontrarse en pacientes con infecciones causadas por patógenos intracelulares (como *M. tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas y *Nocardia*); sin embargo, su rol como causantes de un estado de susceptibilidad necesita ser demostrado mediante pruebas de neutralización *in vitro* de la actividad biológica de las citocinas o de su receptor.
- La presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ R1 parece estar involucrada en el desarrollo de la tuberculosis pulmonar aunque se requiere de ensayos de competencia o neutralización *in vitro* para confirmar su participación en el desarrollo de la enfermedad.
- Los individuos con infecciones oportunistas o causadas por MNT que fueron positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas por ELISA presentaron niveles más elevados de autoanticuerpos que los individuos sanos, lo que sugiere que estos autoanticuerpos pueden estar involucrados en la susceptibilidad a este tipo de infecciones.
- Debido a la discordancia que existe entre algunos resultados obtenidos por las técnicas de IFMA-Q y ELISA, sería importante considerar si el tipo de soporte sólido (NC y microplaca de poliestireno) está influenciando la conformación que el antígeno pudiera adoptar y afectando el reconocimiento de los epítopos reconocidos por los autoanticuerpos anti-citocinas.
- En pacientes en los que han sido descartadas inmunodeficiencias primarias y secundarias, y que presentan infecciones diseminadas o recurrentes causadas por *M. tuberculosis*, micobacterias atípicas o microorganismos oportunistas, sería de gran importancia realizar el análisis para

detectar la posible presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y/o anti-receptores que pudieran estar interfiriendo con su respuesta inmune.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos del presente trabajo son de carácter preliminar pues a pesar de haber demostrado la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en necesaria la demostración de la actividad neutralizante de éstas para poder aportar pruebas contundentes de que la susceptibilidad de inicio tardío en estos pacientes se debe a la presencia de estas inmunoglobulinas. Para verificar la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-citocinas se sugiere la realización de pruebas de neutralización de la actividad biológica de las citocinas *in vitro* empleando cultivos celulares estimulados con las citocinas contra las que van dirigidas los autoanticuerpos de interés. Si en presencia del suero de los pacientes o del autoanticuerpo purificado la actividad biológica de estas citocinas se verá disminuida o abatida, y de esta forma se confirmaría dicha actividad neutralizante.

Llevar a cabo estos ensayos implicará la estandarización de un procedimiento óptimo de activación *in vitro* de sangre completa, PBMC o macrófagos para la producción de las citocinas que se deseen analizar. Por lo tanto, el diseño y desarrollo de un modelo de neutralización de la actividad biológica *in vitro* de cierta citocina por los autoanticuerpos específicos para ésta, así como la estandarización de un sistema de detección cuantitativa o semicuantitativa de las citocinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares, son de vital importancia para elucidar el efecto patogénico de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en pacientes con susceptibilidad a infecciones micobacterianas y/o causadas por microorganismos oportunistas.

Para estos ensayos podrían emplearse muestras de sangre completa diluidas en medio de cultivo o PBMCs purificadas con Ficoll, y distribuidas en placas de cultivo celular. Estas células serían estimuladas con algún mitógeno como alguna endotoxina (LPS) o concanavalina A (Con A) con o sin IFN γ exógeno para favorecer la producción de TNF α . Para comprobar que los autoanticuerpos anti-IFN γ o anti-IFN γ R1 reportados en este trabajo en algunos de los pacientes realmente poseen actividad neutralizante, los cultivos celulares tendrían que ser incubados junto con el suero de estos pacientes en las condiciones de estimulación ya mencionadas para registrar si existe alguna disminución en la producción de TNF α (Döffinger *et al.*, 2004; Höflich *et al.*, 2004). La presencia de esta última citocina en los sobrenadantes de los cultivos se detectaría empleando un sistema de captura ya sea por técnica de ELISA o de IFMA.

Por otra parte, la evaluación de la actividad biológica *in vitro* del GM-CSF podría realizarse empleando cultivos de macrófagos alveolares estimulados con dicha citocina durante 24 h. Posteriormente se mediría la concentración de $\text{TNF}\alpha$ en los sobrenadantes. Para verificar la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-GM-CSF reportados en este trabajo, el mismo experimento tendría que realizarse en presencia del suero del paciente en el que se detectaron estas inmunoglobulinas (Carraway *et al.*, 2000). Otra opción sería utilizar una línea celular dependiente de GM-CSF, como las células TF-1, la cual fuera estimulada con la citocina exógena en presencia o ausencia del suero del paciente para posteriormente evaluar el porcentaje de células sobrevivientes (Uchida *et al.*, 2004).

Con la finalidad de demostrar que los autoanticuerpos anti- $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ poseen actividad neutralizante se sugiere la implementación de un modelo *in vitro* de la inhibición de los efectos de las cascadas de señalización activadas por la vía $\text{IFN}\gamma/\text{IFN}\gamma\text{R1}$, como es la vía STAT-1 (Casanova y Abel., 2002; Höflich *et al.*, 2004). Otra posibilidad para demostrar experimentalmente la actividad neutralizante de las inmunoglobulinas contra $\text{IFN}\gamma\text{R1}$, sería mediante un ensayo *in vitro* empleando células que expresen de manera constitutiva el receptor de interés. Estos cultivos se pondrían en contacto con el suero del paciente que posee autoanticuerpos anti-receptor y posteriormente se les añadiría $\text{IFN}\gamma$. La actividad biológica del $\text{IFN}\gamma$ (por ejemplo, producción de $\text{TNF}\alpha$) registrada en estos cultivos se compararía con aquella de los cultivos a los que no se les añadió el suero del paciente. Si el efecto del $\text{IFN}\gamma$ se ve disminuido en presencia del suero del paciente se tendrían elementos para demostrar que los anticuerpos que hemos detectado están implicados en la respuesta inmune deficiente de estos individuos y que, por lo tanto, tienen un efecto patológico que se ve reflejado en el incremento de la susceptibilidad al desarrollo de la TB pulmonar.

También es de sumo interés ampliar el número de moléculas del sistema inmune sometidas a la detección de autoanticuerpos en pacientes con diferentes enfermedades infecciosas, abarcando no solamente otras citocinas sino también quimiocinas y receptores. Así mismo se buscará mejorar el sistema de detección de autoanticuerpos empleando el sistema Luminex Bioplex, el cual se basa en el mismo principio de los sistemas de captura que la técnica de ELISA, empleando como soportes sólidos microesferas de poliestireno de $5.5\ \mu\text{m}$ que contienen diferentes marcadores fluorescentes que hacen posible la diferenciación de las microesferas en distintas poblaciones. Cada población a su vez puede conjugarse con otras moléculas de captura de manera que pueden utilizarse para detectar más de 100 variables individuales (antígenos, anticuerpos, etc.) de manera simultánea. La detección de estas variables se realiza en un citómetro de flujo con dos fuentes de laser, una de las cuales excita el marcador que contiene la microesfera y la otra que excita el marcador de la molécula de captura o reportera. La

sensibilidad de esta técnica es comparable a la de una ELISA convencional pero presenta las ventajas de permitir un análisis más complejo en cuanto al número de variables y del uso de volúmenes menores de las muestras.

10. REFERENCIAS

Abbas A., Lichtman A., Pober J. (2004). Cellular and Molecular Immunology. Ed. W.B. Saunders Company, USA.

Altare F., Durandy A., Lammas D., Emile J.F., Lamhamedi S., Le Deist F., Drysdale P., Jouanguy E., Doffinger R., Bernaudin F., et al. (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. **280**: 1432-1435.

Ausina Ruiz. (1992). Tuberculosis. En Medicina Interna, 13ª ed. Sección 17, parte II. CD-ROM.

Bach, E., Aguet, M. y Schreiber. (1997). The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*. **15**:563-591.

Barnes P.F., Abrams J.S., Lu S., Sielings P.A., Rea T.H., Modlin R.L. (1993). Patterns of cytokine production by *Mycobacterium* reactive human T-cell clones. *Infct Immun*. **61**: 197-203.

Bendtsen K., Hansen M.B., Ross C. and Svenson M. (1998). High-avidity autoantibodies to cytokines. *Trend Immuno Today* . **19** (5): 209 - 211.

Bendtsen, K. (2004). Natural and therapy-induced antibodies to cytokines. *Drug Discovery Today*. **9** (6): 259.

Berclaz P.Y., Shibata Y., Whitsett J.A., Trapnell B.C. (2002). GM-CSF, via PU.1, regulates alveolar macrophage Fc γ R-mediated phagocytosis and the IL-18/IFN γ -mediated molecular connection between innate and adaptive immunity in the lung. *Blood*. **100**: 4193-4200.

Bonfield T.D., Russell D., Burgess S., Malur A., Kavuru M.S., Thomassen M.J. (2002). Autoantibodies against Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor are diagnostic for pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **27**: 481-486.

Caragol I., Raspall M., Fieschi C., Feinber J., Larrosa M.N., Hernández M., Figueras C., Bertrán J.M., Casanova J.L. and Español T. (2003). Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta 1 deficiency. *Clin Infect Dis*. **37**: 302-306.

Carraway M.S., Ghio A.J., Carter J.D., Piantadosi C.A. (2000). Detection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **161**: 1294-1299.

Casanova J.L. and Abel L. (2002). Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*. **20**: 581-620.

Christen U. and Von Herat M. (2004). Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol*. **40**: 1113 – 1120.

Clarke S.R.M. (2000). The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leuk Biol*. **67**: 607-614.

Cooper A.M., Roberts A.D., Rhoades E.R., Callahan J.E., Getzy D.M. y Orme I.M. (1995). The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*. **84**: 423-432.

Cunningham J.A., Kellner J.D., Bridge P.J., Trevenen C.L., Mcleod D.R., Davies H.D. (2000). Disseminated bacilli Calmette-Guerin infection in an infant with a novel deletion in the interferon-gamma receptor gene. *Int J Tuberc Lung Dis.* **4(8)**: 791-794.

De Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, De Boer T, Van Breda Vriesman PJC, Kabel PJ, Draaisma JMT, Van Dissel JT, Kroon FP, Casanova JL, Ottenhoff THM. (1998). Severe micobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor deficient patients. *Science.* **280**: 1435-38.

Döffinger R., Smahi A., Bessia C., Geissmann F., Feinberg J., Durandy A., Bodemer C., Kenwrick S., Dupuis-Girod S., Blanche S., Wood P., Raabia S.H., Headon D.J., Overbeek P.A., Le Deist F., Holland S.M., Velan K., Kumararatne D.S., Fischer A., Shapiro R., Conley M.E., Reimund E., Kalhoff H., Abinun M., Munich A., Israel A., Courtois G. y Casanova J.L. (2001). X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- B signaling. *Nature genetics.* **27**: 277-285.

Döffinger R., Dupuis S., Picard C., Fieschi C., Feinberg J., Barcenas-Morales G. y Casanova J.L. (2002). Inherited disorders of IL-12 and IFN-gamma mediated immunity: a molecular genetics update. *Mol Immunol.* **38**: 903-909.

Döffinger R., Helbert M.R., Barcenas-Morales G., Yang K., Dupuis S., Ceron-Gutierrez L., Espitia-Pinzon C., Barnes N., Bothamley G., Casanova J.L., *et al.* (2004). Autoantibodies to interferon-gamma in a patient with selective susceptibility to mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity. *Clin Infect Dis.* **38**: 10-14.

Döffinger R., Patel S., Kumararatne D.S. (2005). Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol.* **17**: 440 – 446.

Fairweather K., Kaya Z., Shellman G.R., Lawson C.M., Rose N.R. (2001). From infection to autoimmunity. *Journal of Autoimmunity.* **16**: 175-186.

Fieschi C., Dupuis S., Catherinot E., Feinberg J., Bustamante J., Breiman A., Altare F., Baretto R., Le Deist F., Kayal S., *et al.* (2003). Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta 1 deficiency: Medical and immunological implications. *J Exp Med.* **197**: 527-535.

Fourneau JM, Bach JM, van Endert PM, Bach JF. (2004). The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Mol Immunol.* **40**: 1095-1102.

Flynn J. y Chan J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* **19**:93-129.

Garcia I., Miyazaki Y., Marchal G., Lesslauer W., Vassalli P. (1997). High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas. *Eur J Immunol.* **27**: 3182-3190.

Good R.C. y Shinnick T.M. (1998). Microbiology and microbial infections, vol. 2, capítulo 26: Mycobacterium. 9 ed. Arnold, UK.

Gaynor, R. (2003). A role for extracellular matrix binding receptors in regulation hematopoietic growth factor signaling. *PNAS.* **100 (24)**: 13737-13738.

Greenwood C.M.T., Fujiwara T.M., Boothroyd L.J., Miller M.A., Frappier D., Fanning E.A., Schurr E., Morgan K. (2000). Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP-1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet.* **67**: 405-416.

Henderson R.A., Watkins S.C., Flynn J.L. (1997). Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* **159**: 635-643.

Hill A. (2001). The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **2**: 373-400.

Höflich C., Sabat R., Rosseau S., Temmesfeld B., Slevogt H., Docke W.D., Grutz G., Meisel C., Halle E., Gobel U., *et al.* (2004). Naturally occurring anti-IFN-gamma autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia cocovenenans*. *Blood.* **103**: 673-675

Janeway C.A. y Travers P. (1997). Immunobiology: the immune system in health and disease. 3 ed. Garland Publishing Inc.

Kalams S.A. y Walker B.D. (1998). The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* **188**: 2199-2204

Kampmann B., Hemingway C., Stephens A., Davidson R., Goodsall A., Anderson S., Nicol M., Schölvinck E., Relman D., Waddell S., Langford P., Sheehan B., Semple L., Wilkinson K.A., Wilkinson R.J., Ress S., Hibberd M., Levin M. (2005). Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN γ . *Journal of Clinical Investigation.* **115(9)**: 2480-2488.

Karopoulos C., Rowley M.J., Handley, C.J., Strugnell R.A. (1995). Antibody reactivity to mycobacterial 65 kDa heat shock protein: relevance to autoimmunity. *Journal of autoimmunity.* **8**: 235-248.

Keane J., Gershon S., Wise R.P., Mirabile-Levens E., Kasznica J., Schwieterman W.D., Siegel J.N., Braun M.M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med.* **345(15)**: 1098-1104.

Kinjo Y., Kawakami K., Uezu K., Yara S., Miyagi K., Koguchi Y., Hoshino T., Okamoto M., Kawase Y., Yokota K., Yoshino K., Takeda K., Akira S., Saito A. (2002). Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40. *The Journal of Immunology.* **169(1)**: 323 - 329.

Kitamura T., Tanaka, Watanabe J., Uchida K., Kanegasaki S., Yamada Y., Nakata K. (1999). Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte / macrophage colony-stimulating factor.

Kohm A.P., Fuller K.G., Miller S.D. (2003). Mimicking the way to autoimmunity: an evolving theory of sequence and structural homology. *Trends in Microbiology.* **11 (3)** : 101 – 105.

Lacroix-Desmazes S., Kaveri S.V., Mouthon L. Ayoub A., Malanchere E., Coutinho A., Kazatchkine M.D. (1998). Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *Journal of Immunological Methods.* **216**: 117-137.

Lalvani A., Brookes R., Wilkinson R., Malin A., Pathan A., Andersen P., Dockrell H., Pasvol G., Hill A. (1998). Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Sci USA.* **95**:270-275.

Ledford DK. (1997). Immunologic aspects of vasculitis and cardiovascular diseases. *JAMA.* **278**: 1962.

Madariaga L., Amurrio C., Martín G., García-Cebrian F., Bicandi J., Lardelli P., Dolores Suarez M., Cisterna R. (1998). Detection of anti-interferon-gamma autoantibodies in subjects infected by *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2(1)**:62-68.

Meager A., Wadhwa M., Dilger P., Bird C., Thorpe R., Newsom-Davis J., Willcox N. (2003). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol.* **132**:128-136.

Micallef J.M., Ohtsuki T., Kohno K., Tanabe F., Ushio S., Namba M., Tanimoto T., Torigoe K., Fuji M., Ikeda M., Fukuda S., Kurimoto M. (1996). Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol.* **26**: 1647-1651.

Murray C.J. y Salamon J.A.. (1998). Modeling The impact of global tuberculosis control strategies. *Proc Nat Acad Sci USA.* **95**:13881-13886.

North J.R. and Jung Y. (2004). Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* **22**: 599-623.

Orme I.M., Roberts A.D., Griffen J.P., Abrams J.S. (1993). Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* **151**: 518-525.

Ottenhoff T.H.M., Mutis T. (1995). Role of cytotoxic cells in the protective immunity against and immunopathology of intracellular infections. *Eur J Clin Invest.* **25**: 371-377.

Patel S.Y., Ding L. Brown M.R., Lantz L., Gau T., Cohen S., Martyak L.A., Kubak B., Holland S.M. (2005). Anti-IFN γ autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *Journal of Immunology.* **175**: 4769-4776.

Pedral-Sampaio D., Martins Netto E., Brites C., Bandeira A.C., Guerra C., Barberin M., Badaró R. (2003). Use of Rhu-GM-CSF in pulmonary tuberculosis patients: results of a randomized clinical trial. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* **7(4)**: 245-252.

Picard C., Fieschi C., Altare F., Al-Jumaah S., Al-Hajjar S., Feinberg J., Dupuis S., Soudais C., Al-Mohsen I.Z., Genin E., *et al.*(2002). Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet.* **70**: 336-348.

Pine R. (2002). IRF and tuberculosis. *J Interferon and Cytokine Research.* **22**: 15-25.

Rioux J.D. and Abbas A.K. (2005). Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature.* **435**: 584-589.

Roitt I., Brostoff J., Male D.(2002). Immunology, 6a ed., Mosby International Ltd. / Elsevier Science Limited, UK.

Rook G., Hernandez-Pando R., Dheda K. and Seah G. (2004). IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in Immunol.* **25 (9)** : 483 - 488.

Rose NR. (2001). Infection, mimics, and autoimmune disease. *The Journal of Clinical Investigation.* **107 (8)**: 943 – 944.

Russel D.G. (1995). Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. *Current Opinion Immunol.* **7**: 479-483.

Serbina N.V. y Flynn J.L. (1999). Early emergence of CD8+T cells primed for production of Type I cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun.* **67**: 3980-3988.

Trapnell B.C., Whitsett J.A., Nakata K. (2003). Pulmonary Alveolar Proteinosis. *N Eng J Med.* **349 (26)**: 2527-2539.

Trinchieri G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* **70**: 183-243.

Uchida K, Nakata K., Trapnell B.C., Terakawa T., Hamano E., Mikami A., Matsushita I., Seymour J.F., Oh-eda M., Ishige I., Eishi Y., Kitamura T., Yamada Y., Hanaoka K., Keicho N. (2004). High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood.* **103(3)**: 1089-1098.

Vankayalapati R., Wizel B., Weis E.S., Samten B., Girard M.W., Barnes F.P. (2000). Production of interleukin -18 in human tuberculosis. *J Infect Dis Soc Amer.* **182**: 234-239.

A N E X O I

TABLAS

TABLA 1. Sueros correspondientes a pacientes con infección diseminada o recurrente causada por micobacterias no tuberculosas (MNT) o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCION
I-1	AH*	Infección diseminada con <i>M. kansasii</i> .
II-18	AH	Paciente I-1, 4 meses después.
I-8	AH	Infección micobacteriana atípica (IMA)
I-15	AH	IMA, linfopenia.
I-18	AH	IMA, fibrosis quística
II-1	AH	Paciente I-18, 6 meses después.
I-19	AH	<i>M. kansasii</i>
III-30	AH	Paciente I-19, 11 meses después.
I-24	AH	<i>M. xenopei</i>
I-28	AH	MNT, hipotiroidismo
I-47	AH	<i>M. chelonae</i> , <i>Aspergillus</i> , linfadenitis
I-51	AH	Mtb
I-53	AH	Mtb, <i>M. chelonae</i>
II-4	AH	IMA, fibrosis quística
II-10	AH	IMA
II-22	AH	Mtb
II-32	AH	<i>M. kansasii</i>
II-35	AH	IMA, <i>Salmonella</i>
II-53	AH	IMA, fibrosis quística
III-1	AH	<i>M. avium</i>
III-63	AH	Paciente III-1, 3 meses después.
III-10	AH	Mtb, Inmunodeficiencia variable crónica (IVC)
III-20	AH	<i>M. abscessus</i> , fibrosis quística
III-28	AH	Mtb
III-32	AH	<i>M. avium</i>
III-33	AH	MNT, fibrosis quística
III-37	AH	<i>M. malmoense</i>
III-42	AH	Mtb, linfopenia
III-46	AH	<i>M. kansasii</i>
III-53	AH	Mtb
III-59	AH	<i>M. kansasii</i>
III-64	AH	Mtb
IV-10	AH	IMA, linfopenia
IV-19	AH	IMA, deficiencia de IFN γ
IV-37	AH	IMA
IV-38	AH	Mtb
IV-40	AH	IMA
IV-41	AH	IMA
IV-42	AH	IMA
IV-43	AH	IMA
IV-44	AH	IMA
IV-45	AH	IMA

IV-46	AH	IMA
IV-48	AH	Meningitis tuberculosa
IV-49	AH	IMA
IV-55	AH	<i>M. avium</i>
IV-57	AH	<i>M. chelonae</i> , fibrosis quística, <i>Aspergillus</i>
IV-69	AH	Mtb
IV-73	AH	Mtb
IV-74	AH	Historia familiar de TB pulmonar
IV-79	AH	MNT
V-1	AH	MNT, <i>Salmonella</i> , IL-12R β 1 deficiente, terapia con IFN γ
V-7	AH	Mtb
V-10	AH	MNT, fibrosis quística
V-12	AH	Mtb
V-19	AH	IMA
V-20	AH	IMA
V-24	AH	<i>M. malmoense</i>
BW	AH	IMA
JS	AH	BCGosis
TJ	AH	Mtb multidrogo resistente
PD	AH	IMA

* Sueros donados por el Dr. Rainer Döffinger, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Hospital Addenbrookes (AH), Inglaterra.

TABLA 2. Sueros correspondientes a pacientes con Tuberculosis (TB) pulmonar.

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
Tb-1	INCMNSZ♦	TB pulmonar
Tb-2	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-3	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-4	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-5	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-6	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-6 ²	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-7	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-8	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-11 ²	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-13	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-14	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-16	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-17	INCMNSZ	TB pulmonar
Tb-25	INCMNSZ	TB pulmonar
TB02	INER◊	TB pulmonar
TB07	INER	TB pulmonar
TB08	INER	TB pulmonar
TB09	INER	TB pulmonar
TB10	INER	TB pulmonar
SLJ	INER	TB pulmonar / cepa multidrogo resistente
FRS	INER	TB pulmonar / cepa multidrogo resistente
ARAM	INER	TB pulmonar / cepa multidrogo resistente
JG	INER	TB pulmonar / cepa multidrogo resistente
JL	INER	TB pulmonar / cepa multidrogo resistente

♦ Sueros donados por por el Dr. Javier Cabiedes, Dpto. de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ); ◊ y el Dr. Eduardo Sada Díaz, Dpto. de Microbiología Clínica. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

TABLA 3. Sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y Tuberculosis (TB) Pulmonar.

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
1728	INCMNSZ*	LEG + TB pulmonar
1739	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
1745	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
1936	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
1959	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
1960	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
1962	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
1969	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2002	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2006	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2012	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2032	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2044	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2045	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2062	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2070	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2076	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2133	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2138	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2141	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2164	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2165	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2172	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2173	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2175	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2180	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2190	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2196	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2240	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2249	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2250	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2288	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2324	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2332	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2334	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2335	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2348	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2352	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2354	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2356	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2520	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2524	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2537	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2622	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2629	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
2737	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar

3265	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
4391	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
5308	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
6460	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
7128	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
7163	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
152570	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar
BYZ	INCMNSZ	LEG + TB pulmonar

♦ Sueros donados por por el Dr. Javier Cabiedes, Dpto. de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ);

TABLA 4. Sueros correspondientes a pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG).

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
P47-01	INCMNSZ♦	LEG
P47-02	INCMNSZ	LEG
P47-03	INCMNSZ	LEG
P47-04	INCMNSZ	LEG
P47-05	INCMNSZ	LEG
P47-06	INCMNSZ	LEG
P47-07	INCMNSZ	LEG
P47-08	INCMNSZ	LEG
P47-09	INCMNSZ	LEG
P47-10	INCMNSZ	LEG

♦ Sueros donados por por el Dr. Javier Cabiedes, Dpto. de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

TABLA 5. Sueros correspondientes a pacientes con Vasculitis y Tuberculosis (TB) Pulmonar.

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
105	INCMNSZ*	VASCULITIS + TB pulmonar
107	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
108	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
111	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
118	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
125	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
126	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
127	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
135	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
139	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
142	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
147	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
150	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
154	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
159	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
174	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
C209	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
216	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
232	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
220	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
276	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
405	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
409	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
422	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
510	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
602	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
604	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
612	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
613	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
614	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
615	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
619	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
624	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
625	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
626	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
631	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar
802	INCMNSZ	VASCULITIS + TB pulmonar

♦ Sueros donados por por el Dr. Javier Cabiedes, Dpto. de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

TABLA 6. Sueros correspondientes a pacientes con Vasculitis.

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
VSP-01	INCMNSZ♦	VASCULITIS
VSP-02	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-03	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-04	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-05	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-06	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-07	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-08	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-09	INCMNSZ	VASCULITIS
VSP-10	INCMNSZ	VASCULITIS

♦ Sueros donados por por el Dr. Javier Cabiedes, Dpto. de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

TABLA 7. Sueros de pacientes con salmonelosis.

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
I-42	AH*	S. paratyphy, linfadenitis
I-43	AH	S. paratyphy, linfadenitis
I-44	AH	S. paratyphy, linfadenitis
I-45	AH	S. paratyphy, linfadenitis
IV-50	AH	Salmonelosis recurrente

* Sueros donados por el Dr. Rainer Döffinger, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Hospital Addenbrookes (AH), Inglaterra.

TABLA 8. Sueros de pacientes con infecciones recurrentes con microorganismos oportunistas.

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
I-22	AH*	Infecciones generales recurrentes
I-23	AH	Infecciones generales recurrentes
I-31	AH	Pseudomonas, fibrosis quística
II-12	AH	Sepsis por pneumococo
III-61	AH	Paciente II-12, 8 meses después.
II-16	AH	Sepsis por pneumococo
II-19	AH	Meningitis por pneumococo
III-19	AH	T. whipplei
III-66	AH	Candida, linfopenia
III-70	AH	Mucormicosis
IV-29	AH	Infección recurrente con Staphylococcus
IV-39	AH	Nocardia
IV-47	AH	Rhodococcus
V-8	AH	Sepsis por pneumococo
V-9	AH	Meningitis por pneumococo

* Sueros donados por el Dr. Rainer Döffinger, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Hospital Addenbrookes (AH), Inglaterra.

TABLA 9. Sueros de pacientes con desordenes autoinmunes o inflamatorios distintos a LEG y otros.

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
I-17	AH*	Enfermedad de Erdheim Chester
I-21	AH	Síndrome Hiper-IgM
I-27	AH	Proceso granulomatoso destructivo severo
II-6	AH	Síndrome de Behcet
II-8	AH	Inmunodeficiencia Variable Crónica (IVC)
II-21	AH	Desorden inflamatorio
II-28	AH	IVC, terapia anti-TNF α
II-39	AH	Síndrome Hiper-IgE [®]
II-41	AH	Síndrome Hiper-IgE [®]
III-44	AH	Síndrome hemofagocítico, XLP
III-67	AH	Síndrome de Ehler Danlos, M. szulgai
III-71	AH	Granuloma múltiple, ¿TB?
III-77	AH	Osteomielitis multifocal, M. spec.
IV-1	AH	Síndrome de Ehler Danlos, M. szulgai
IV-3	AH	Lesiones osteolíticas granulomatosas
IV-51	AH	Desconocido
IV-66	AH	Síndrome de Good
IV-80	AH	Desconocido
V-2	AH	Desconocido
V-4	AH	Desconocido
V-14	AH	Osteomielitis multifocal

[®]Familiares consanguíneos.

* Sueros donados por el Dr. Rainer Döffinger, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Hospital Addenbrookes (AH), Inglaterra.

TABLA 10. Suero de pacientes que reciben terapia con anticuerpos anti-TNF α (Infliximab).

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
I-11	AH*	Muestra post-tratamiento anti-TNF α
III-8	AH	Paciente con tratamiento anti-TNF α
III-16	AH	Paciente III-8, 20 días después
III-31	AH	Muestra pre-tratamiento anti-TNF α

* Sueros donados por el Dr. Rainer Döffinger, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Hospital Addenbrookes (AH), Inglaterra.

TABLA 11. Sueros correspondientes a individuos sanos (controles negativos).

CLAVE	PROCEDENCIA	DESCRIPCIÓN
I-20	AH*	No vacunado
I-81	AH	No vacunado
I-82	AH	No vacunado
I-83	AH	No vacunado
I-84	AH	No vacunado
I-85	AH	No vacunado
I-87	AH	No vacunado
I-89	AH	No vacunado
I-92	AH	No vacunado
I-94	AH	No vacunado
II-48	AH	No vacunado
II-50	AH	No vacunado
II-54	AH	No vacunado
II-55	AH	No vacunado
II-56	AH	No vacunado
II-57	AH	No vacunado
II-58	AH	No vacunado
II-59	AH	No vacunado
II-60	AH	No vacunado
II-64	AH	No vacunado
II-67	AH	No vacunado
II-69	AH	No vacunado
II-70	AH	No vacunado
II-71	AH	No vacunado
II-72	AH	No vacunado
II-73	AH	No vacunado
II-75	AH	No vacunado
II-77	AH	No vacunado
II-79	AH	No vacunado
III-6	AH	No vacunado
III-21	AH	No vacunado
III-22	AH	No vacunado
III-24	AH	No vacunado
III-34	AH	No vacunado
III-41	AH	No vacunado
III-43	AH	No vacunado
III-49	AH	No vacunado
III-52	AH	No vacunado
III-54	AH	No vacunado
III-58	AH	No vacunado
III-60	AH	No vacunado
III-65	AH	No vacunado
III-68	AH	No vacunado
III-72	AH	No vacunado
III-80	AH	No vacunado
III-81	AH	No vacunado
IV-5	AH	No vacunado
IV-32	AH	No vacunado

IV-34	AH	No vacunado
IV-53	AH	No vacunado
IV-61	AH	No vacunado
IV-71	AH	No vacunado
IV-76	AH	No vacunado
V-11	AH	No vacunado
V-13	AH	No vacunado
V-15	AH	No vacunado
1	FES-C	No vacunado
2	FES-C	Vacunado
3	FES-C	Vacunado
4	FES-C	Vacunado

* Sueros donados por el Dr. Rainer Döffinger, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Hospital Addenbrookes (AH), Inglaterra.
FES-C: Sueros donados por voluntarios del Laboratorio de Inmunología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

TABLA 12. Citocinas humanas recombinantes y sus respectivas concentraciones analizadas en la estandarización de la técnica de Inmunoensayo de Fijación de Múltiples Antígenos con revelado colorimétrico.

CITOCINA	LABORATORIO (No. catálogo)	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/ml}$)
IL-1 β	CLB-ELISA	0.0023
	PeptoTech (200-01B)	10, 5, 1, 0.1
IL-6	PeptoTech (200-06)	5, 1, 0.1
IL-10	CLB-ELISA	0.004
	PeptoTech (200-10)	10, 5, 1, 0.1
IL-12p40	PeptoTech (200-12p40)	10, 5, 1, 0.1
IL-18	Medical Biological Laboratories Co. LTD (B001)	5, 1, 0.1
IFN- γ	CLB-ELISA	0.0044
	PeptoTech (300-02)	5, 1, 0.1
Imukin (IFN- γ 1b) solución de uso parenteral	Boehringer Ingelheim France (40919/FR/1)	5
TNF- α	Sanquin Plesmanlaan (125)	0.0073
	PeptoTech (300-01)	10, 5, 1, 0.1
GM-CSF	PeptoTech (300-03)	2, 1, 0.1

TABLA 14. Conjugados anti-IgG y anti-IgM humana y las concentraciones en las que fueron utilizados para la estandarización de la técnica de IFMA-C.

CONJUGADOS	DILUCIONES DOBLES
Caprino anti-IgM μ humana biotinilado (Pierce, 31778; UK)	1:250 - 1:8000
Monoclonal murino anti-IgG (Fc) humana (Sigma, B3773; UK)	1:250 - 1:8000
Caprino anti-IgM μ F(ab) ₂ humana biotinilado (Sigma, B2641; UK)	1:250 - 1:8000
Anti-IgG + IgM humanas biotinilado (Pierce, 31776; UK)	1:250 - 1:8000
Policlonal caprino anti-IgG humana (Abcam Limited, ab7152-100; UK)	1:250 - 1:8000
Murino anti-IgG humana – HRP (Pierce, 31778; UK)	1:250 - 1:8000

TABLA 15. Citocinas humanas recombinantes y sus respectivas concentraciones utilizadas para la estandarización de la técnica de IFMA-Q.

CITOCINA	LABORATORIO (No. catálogo)	CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/ml}$)
IL-1 β	CLB-ELISA	0.0023, 0.0011
	PeptoTech (200-01B)	5, 1
IL-6	PeptoTech (200-06)	5, 2, 1
	R & D Systems (206-IL)	
IL-10	CLB-ELISA	0.004
	PeptoTech (200-10)	5, 2, 1
IL-12p40	PeptoTech (200-12p40)	5, 2, 1
	Biosource (PHC0124)	
IL-18	Medical Biological Laboratories Co. LTD (B001)	5, 2, 1
	Peptotech (200-18)	
IFN- γ	CLB-ELISA	0.0044
	PeptoTech (300-02)	10, 5, 2, 1
Imukin (IFN- γ 1b) solución de uso parenteral	Boehringer Ingelheim France (40919/FR/1)	5
TNF- α	Sanquin Plesmanlaan (125)	0.0073
	PeptoTech (300-01)	10, 5, 2, 1
GM-CSF	PeptoTech (300-03)	2, 1
PPD tuberculosis*	Donado por la Dra. Iris Estrada (ENCB)**	25, 50

*Control de fijación de los antígenos.

** Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

TABLA 17. Conjugados biotinilados anti-IgG y anti-IgM humana y concentraciones en las que fueron utilizados para la estandarización de la técnica de IFMA-Q.

CONJUGADO BIOTINILADO	DILUCIONES
Caprino anti-IgM μ humana (Pierce;31778)	1:5000, 1:10000, 1:20000
Monoclonal murino anti-IgG (Fc) humana (Sigma; B3773)	1:6000, 1:12000, 1:24000
Caprino anti-IgM μ F(ab) $_2$ humana (Sigma; B2641)	1:1500, 1:3000, 1:6000
Anti-IgG + IgM humanas (Pierce; 31776)	1:6000, 1:12000, 1:24000

A N E X O II

SOLUCIONES Y REACTIVOS

PBS (pH = 7.2).

NaCl..... 8g
K₂HPO₄..... 1.21g
KH₂PO₄..... 0.34g
H₂O dest..... 1.00 L

PBS-T 20 (0.05%).

PBS pH 7.2 1.0 L
Tween 20 0.5 ml

Solución Teñidora de Azul de Coomassie R-250:

Solución stock* 25 ml
Metanol 100 ml
Ácido acético 20 ml
Agua destilada 55 ml

* Solución Stock al 1%: azul de Coomassie R-250 1% en agua destilada.

Solución Desteñidora de Azul de Coomassie:

Metanol 250 ml
Ácido acético 50 ml
Agua destilada 200 ml

Solución Teñidora de Negro de Amido 0.1%:

Negro de Amido 0.1 g
Metanol 45 ml
Ácido acético 10 ml
Agua destilada 45 ml

Solución Desteñidora de Negro de Amido:

Metanol 45 ml
Ácido acético 10 ml
Agua destilada 45 ml

Solución Reveladora de α -cloronaftol y H₂O₂:

α -cloronaftol 0.3 g
Metanol 10 ml
PBS pH 7.2 50 ml
H₂O₂ 50 μ l

Solución Bloqueadora ASB 3%:

PBS-T 0.05% , pH = 7.2 100 ml
Albúmina sérica bovina 3.0 g

Solución Bloqueadora ASB 5%:

PBS-T 0.05% , pH = 7.2 100 ml
Albúmina sérica bovina 5.0 g

Solución Diluyente ASB 0.5%:

PBS-T 0.05% , pH = 7.2 100 ml
Albúmina sérica bovina 0.5 mg

Buffer de Carbonatos 0.05M, pH 9.6:

NaHCO₃ 0.293 g
Na₂CO₃ 0.159 g
Agua destilada 100 ml

FACs Buffer:

PBS pH 7.2 500 ml
Suero fetal bovino 5 ml
Na₃N 0.05 ml

ANEXO III

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

A. Presentaciones en modalidad de Cartel:

- Fernández Ramírez G.A., Rosales M.E., Avila Miyazawa I., Cerón Gutiérrez L., Espitia Pinzón C., Cabiedes J., Sada E., Montaraz Crespo J.A., Döffinger R., Barcenás Morales G. "Anticuerpos anti-citocinas en pacientes con infecciones micobacterianas". Simposio Fronteras del Conocimiento en Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Celebrado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F., 7 y 8 de marzo de 2006.
- G.A. Fernández-Ramírez, M.E. Rosales, I. Avila Miyazawa, L. Cerón-Gutiérrez, C. Espitia-Pinzón, J. Cabiedes, E. Sada, J.A. Montaraz-Crespo, R. Döffinger, G. Barcenás-Morales. Autoantibodies to cytokines in patients with mycobacterial infections. 16 th. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Celebrado en Niza, Francia, del 1 al 4 de abril del 2006.

B. Presentación Oral:

- GA Fernández-Ramírez, ME Rosales, I Avila-Miyazawa, L Cerón-Gutiérrez, C Espitia-Pinzón, J Cabiedes-Contreras, JA Montaraz-Crespo, R Döffinger, G Barcenás-Morales. Autoantibodies against cytokines involved in the IL-12/IFN- γ pathway in patients with mycobacterial infections. Durante la sesión: Bacterial and Parasitic Infection and Autoimmunity. 5th International Congress on Autoimmunity. A celebrarse en Sorrento, Italia, del 29 de noviembre al 3 de diciembre del 2006.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAN = Autoanticuerpos naturales

ASB = Albúmina sérica bovina

BCC = Buffer de carbonatos

BCG = Bacilo Clamette-Guérin

CPA = Célula presentadora de antígeno

D.O. = Densidad óptica

ELISA = Ensayo inmunenzimático ligado a una enzima

FACs = Análisis por citometría de flujo

Fc = Fracción cristalizable

Fc γ R = Receptor de la fracción cristalizable de IgG

FITC = Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF = Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

HLA-II = Antígeno leucocitario humano tipo II

IFMA = Inmunoensayo de fijación de múltiples antígenos

IFMA-C = IFMA por método colorimétrico

IFMA-Q = IFMA con sustrato quimioluminiscente

IFN α = Interferón alpha

IFN γ = Interferón gamma

IL = Interleucina

IL-1Ra = Receptor antagonista de IL-1

IMA = Infección micobacteriana atípica

IMF = Intensidad media de fluorescencia

iPAP = Proteinosis pulmonar-alveolar idiopática

IVC = Inmunodeficiencia variable crónica

LEG = Lupus eritematoso generalizado

LPS = Lipopolisacárido

MBP = Proteína de unión a manosa

MHC-II = Complejo principal de histocompatibilidad tipo II

MNT = Micobacterias no tuberculosas
Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*
NC = Nitrocelulosa
NF κ B = Factor nuclear kappa B
NK = Natural killer
NO = Oxido nitroso
NRAMP = Proteína de resistencia natural asociada a macrófagos
NY = Nylon
PAP = Proteinosis pulmonar-alveolar
PBMC = Células mononucleares de sangre periférica
PBS = Buffer de fosfatos
PE = Ficoeritrina
PBS-T = Buffer de fosfatos adicionado con Tween-20
PPDtb = Derivado protéico purificado de *M. tuberculosis*
RFLPs = polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción
SNP = Polimorfismos de un nucleótido sencillo
STAT-1 = Transductor de señales y activador transcripcional - 1
TB = Tuberculosis
TCR = Receptor de células T
TH1 / TH2 = Célula T cooperadora tipo 1/ célula T cooperadora tipo 2
TLRs = Receptores tipo Toll
TNF α = Factor de necrosis tumoral alfa
 λ = longitud de onda
 μ g = microgramo
 μ l = microlitro
mg = miligramo
ml = mililitro
h = hora
min = minuto
nm = nanómetros