



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Inmunocitoquímica de antígenos de la línea celular A-549 de
adenocarcinoma pulmonar humano**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

Xanic Alejandra Barrera Hernández



MÉXICO, D.F. AÑO 2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Homero Hernández Montes
VOCAL: Saturnino de León Chapa
SECRETARIO: Juan Arcadio Molina Guarneros
1er. SUPLENTE: Enrique Ortega Soto
2° SUPLENTE: Raquel Ortega Muñoz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunofarmacología, del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto CB 2008/98729.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. MARIBEL SOTO NÚÑEZ

SUSTENTANTE:

XANIC ALEJANDRA BARRERA HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle especialmente al Dr. Juan Molina por abrirme las puertas de su laboratorio, por todas sus enseñanzas, consejos y comprensión, además de haber dirigido esta maravillosa tesis.

A mi supervisora Maribel Soto, por su apoyo incondicional, dedicación, enseñanzas, llamadas de atención cuando las necesitaba y sobre todo por su infinita paciencia, gracias, muchísimas gracias!!!

A Patricia Cuautle, porque sin su apoyo, ayuda y enseñanzas, parte de esta tesis no hubiera sido posible.

A mi compañero de laboratorio Luis Fernando, por su colaboración, sus consejos y por brindarme su amistad.

A todo el Laboratorio de Inmunofarmacología, gracias, me llevo conmigo muchas enseñanzas y una gran formación académica.

A la Facultad de Química, por ser mi segundo hogar, porque cada uno de sus muros dejó una enseñanza en mí, siempre la llevaré en mi corazón.

Y por último a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser parte de ella, porque no hay mayor orgullo que ser universitario... Por mi raza hablará el espíritu.

DEDICATORIAS

A Dios, por haberme dado la fortaleza cuando más la necesitaba.

A mi mami, por ser mí amiga, mi compañera, mi confidente. Te amo mamá, esto es por ti y para ti.

A mi padre, por su apoyo y sabias palabras. Te amo, a pesar de nuestras diferencias, tú lo sabes.

A mi hermano Jorge, no pude haber tenido un hermano mejor, gracias por guiar mis pasos a través de los tuyos, te amo.

A Lili, por todos sus consejos, por ser un ejemplo de vida.

A mi madrina y a mi padrino, por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de este proceso. Los quiero.

A Brenda, Marina, Viri, Jonathan y Fernando, gracias por ser parte de mi vida, por su paciencia, por aceptarme como soy, por su maravillosa amistad y todas aquellas experiencias compartidas. Ustedes saben qué lugar ocupan en mi corazón. Los quiero mucho.

A Edgar, Alex, Ulises, Francisco, gracias por brindarme su amistad, por haber compartido tantas cosas dentro y fuera de los laboratorios y salones de clases, los quiero.

Y por supuesto al grupo cuatro, el mejor grupo de la facultad de química y todas aquellas personas que conocí a lo largo de esta maravillosa carrera, ya forman parte de mi vida.

PENSAMIENTOS

La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica.

Aristóteles.

Vivir es ir a la lucha con determinación
abrazar la vida y vivir con pasión.
Perder con clase y vencer con osadía,
por que el mundo pertenece a quien se atreve
y la vida es mucho más para ser insignificante.

Charles Chaplin.

Que quieres tu Xanito, ser mucho más grandecita
para poder volar como un cohete hacia el espacio.

Tú crecerás, dejarás de ser bebita,
serás adolescente y andarás en bici...

Xanito se va al espacio.

Guadalupe Hernández, mi mamá. Septiembre 1986.

ÍNDICE GENERAL

1.	Introducción.....	1
	• Respuesta inmune.....	1
	○ Respuesta inmune primaria y secundaria.....	3
	• Inmunocitoquímica.....	4
	• Fluorescencia.....	5
	○ Inmunofluorescencia.....	9
2.	Antecedentes.....	11
3.	Justificación.....	12
4.	Objetivo general y objetivos particulares.....	13
5.	Materiales y métodos.....	15
	• Material biológico.....	15
	• Anticuerpos.....	15
	• Obtención de los extractos proteicos de lisados celulares para la realización de estudios de electroforesis y <i>Western blot</i>	17
	• Inmunodetección de antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante <i>Western blot</i>	21
	• Inmunolocalización cualitativa de antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante microscopia de fluorescencia y elaboración de un registro digital de imágenes mediante microfotografía digital.....	27
	• Estimación cuantitativa de antígenos en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante análisis de las imágenes del registro.....	29

6.	Resultados.....	30
•	Titulación de la mezcla de suero inmune para la inmunodetección de antígenos específicos de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano.....	30
•	Inmunodetección de antígenos de células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante <i>Western blot</i>	31
•	Inmunolocalización cualitativa de antígenos de células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante microscopia de fluorescencia y elaboración de un registro digital de imágenes mediante microfotografía digital.....	34
•	Estimación cuantitativa de antígenos en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante el análisis de las imágenes del registro.....	37
7.	Discusión de resultados.....	41
8.	Conclusiones.....	42
9.	Referencias bibliográficas.....	43
10.	Apéndice.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura esquemática de un anticuerpo.....	2
Figura 2. Respuesta inmune primaria y secundaria.....	4
Figura 3. Diagrama de Jablonski, ilustra el proceso involucrado en la creación de un estado excitado electrónico de singulete por absorción óptica y una emisión subsecuente de fluorescencia.....	6
Figura 4. Excitación de un fluoróforo en tres diferentes longitudes de onda (EX 1, EX 2, EX 3).....	8
Figura 5. Representación esquemática de la inmunodetección de antígenos de células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549).....	16
Figura 6. Representación esquemática de la Inmunodetección de antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante <i>Western blot</i>	23
Figura 7. Representación esquemática de la Inmunolocalización cualitativa y cuantitativa de antígenos en las células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549).....	26
Figura 8. Representación esquemática de una placa Lab-Tek II Chamber Slide System.....	27
Figura 9. Representación esquemática de una placa Lab-Tek II Chamber Slide System, (anticuerpo primario + anticuerpo secundario).....	28
Figura 10. Western blot utilizando el suero inmune a diferentes diluciones.....	30
Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE. Patrón proteico de lisados de células A-549 y B16.....	31
Figura 12. Electrotransferencia de proteínas de células A-549 y B16. Tinción rojo de Ponceau.....	32

Figura 13. Western blot, anticuerpo primario, dilución 1:10000.....	32
Figura 14. Inmunolocalización de antígenos de células A-549 (400X).....	34
Figura 15. Inmunolocalización de antígenos de células A-549 (1000X).....	35
Figura 16. Inmunolocalización de antígenos y patrones morfológicos observados en la población celular A-549 (1000X).....	35
Figura 17. Marcaje positivo de los antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) en las diferentes etapas de la mitosis (200X).....	36
Figura 18. Inmunolocalización de antígenos de células A-549 (400X).....	37
Figura 19. Estimación cuantitativa de antígenos de la línea celular A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano.....	39
Figura 20. Curva patrón utilizada para la obtención de la concentración de proteína.....	53
Figura 21. Representación esquemática de la titulación de la mezcla de suero inmune para la inmunolocalización una placa Lab-Tek II Chamber Slide System.....	54
Tabla 1. Volúmenes de amortiguador de lisis para la obtención de proteína.....	18
Tabla 2. Estándares de BSA para la obtención de proteína.....	19
Tabla 3. Estimación cuantitativa de antígenos de la línea celular A-549 con suero hiperinmune de ratón Balb/c y anti-IgG de ratón acoplado a fluoresceína mediante análisis de imágenes.....	38
Tabla 4. Volúmenes de amortiguador de lisis, para la obtención de la concentración óptima de proteína.....	51

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
DE	Desviación estándar
EEM	Error estándar de la media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetracético
ELISA	Ensayos Inmunoenzimáticos en fase sólida
DMEM	Medio esencial modificado por Dulbecco
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
kDa	Kilodaltones
NBT	Azul de nitro-tetrazolio
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PM	Marcador de pesos moleculares
PVDF	Fluoruro de Polivinildeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
TEMED	Tetrametiletildiamina

INTRODUCCIÓN

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune se clasifica en dos tipos: respuesta innata y respuesta adaptativa.

La respuesta inmune innata provee la primera línea de defensa al hospedero, mediante mecanismos de defensa celulares y moleculares, que se presentan de manera natural en un organismo y están preparados para una rápida acción y reacción. Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes: 1) barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies; 2) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y células asesinas naturales (NK, del inglés Natural Killer cell); 3) factores solubles, como el complemento y los mediadores de la inflamación y 4) citosinas que regulan y coordinan la respuesta celular.

A diferencia de la inmunidad innata, en la inmunidad adaptativa, existen mecanismos de defensa más evolucionados cuya producción es estimulada tras la exposición a sustancias extrañas las cuales inducen respuestas inmunitarias específicas denominadas antígenos (Abbas, 2006). La respuesta inmune adaptativa se centra en una defensa antígeno-específica mediante receptores de antígeno altamente inmunodominantes. Los receptores de antígenos cuentan con una serie de ventajas únicas debido a su capacidad para reconocer antígenos: en primer lugar, la respuesta inmune adaptativa posee especificidad para macromoléculas diferentes, por lo tanto, la inmunidad adaptativa puede maximizar la eficacia de la respuesta inmune y reducir al mínimo los daños colaterales innecesarios. En segundo lugar, debido a la expresión

y la selección clonal, la inmunidad adaptativa dota al sistema inmune con un mecanismo por el cual puede recordar la exposición a sustancias extrañas anteriores y, por tanto, responder con mayor intensidad tras exposiciones repetidas a sustancias extrañas, es decir, le proporciona capacidad de memoria (Palm and Medzhitov, 2009).

Existen dos tipos de respuesta inmune adaptativa: la inmunidad celular, donde participan los linfocitos T y la inmunidad humoral, donde participan moléculas presentes en la sangre denominadas anticuerpos producidos por los linfocitos B (Abbas, 2006). Los anticuerpos son llamados también inmunoglobulinas (Ig); las inmunoglobulinas son glicoproteínas compuestas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, pueden ser identificadas funcionalmente en dominios variables, los cuales se unen a los antígenos y dominios constantes que especifican las funciones efectoras (Figura 1). Los dominios constantes de la cadena pesada se pueden cambiar para permitir la función efectora alterada mientras se mantiene la especificidad del antígeno. Las moléculas de anticuerpo pueden identificarse en función de las diferencias en la estructura de la cadena pesada, las distintas clases de moléculas de anticuerpo también reciben el nombre de isotipo y se denominan IgA, IgG, IgE, IgD e IgM (Abbas, 2006).

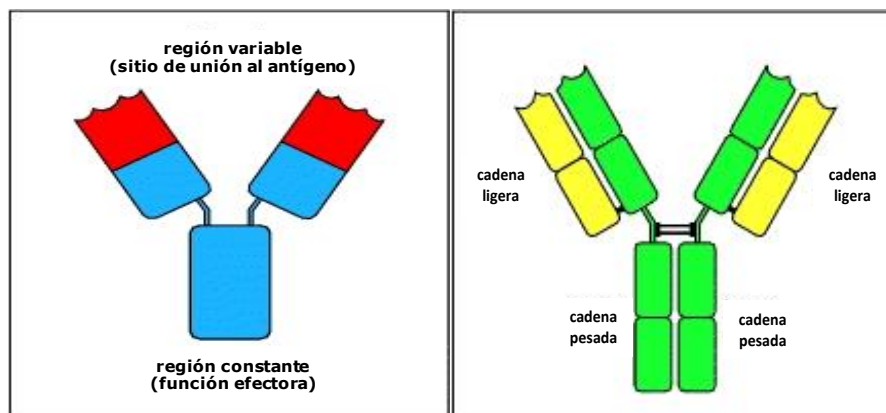


Figura 1. Estructura esquemática de un anticuerpo.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=imm&part=A53>

El método tradicional para la evaluación de la respuesta generada por las células B consiste en la cuantificación de anticuerpos inmunodominantes en el suero.

RESPUESTA INMUNE PRIMARIA Y SECUNDARIA

Después del contacto con el antígeno, primeramente hay una fase inicial cuando los títulos de anticuerpos inmunodominantes no pueden ser detectados, ya que toma de una a dos semanas observar un aumento logarítmico de los títulos de anticuerpo que posteriormente logra alcanzar una meseta antes de descender de nuevo (Figura 2). En la respuesta primaria, la aparición de IgG es precedida por IgM; los títulos de anticuerpos entran en una fase de latencia, llegan a una meseta y disminuyen con el tiempo después de cada inmunización. En comparación, en la respuesta inmune humoral secundaria, los títulos de anticuerpo aparecen más rápidamente, la meseta llega a un nivel superior y pueden persistir por periodos de tiempo muy largos (Figura 2). Además, la respuesta inmune secundaria se caracteriza por el predominio de los anticuerpos del isotipo IgG con una mayor afinidad por el antígeno inmunizado. Esta rápida y específica respuesta secundaria es dependiente del reclutamiento y activación de las células B de memoria (generadas durante la respuesta inmune primaria), ya que estas células presentan una ventaja sobre las células B vírgenes; tanto en el tiempo para generar una respuesta como en la división basada en el ritmo de desarrollo de las células efectoras. Incluso sin re-inmunizar, los niveles de anticuerpo en el suero se pueden mantener durante muchos años e incluso décadas (Lefevre and Carr, 2008). Estos niveles de anticuerpos son mantenidos gracias a la existencia de células

plasmáticas en la médula ósea que secretan anticuerpos por largos periodos de tiempo, debido a que los anticuerpos del isotipo IgG tienen sólo una vida media de 3 semanas, la supervivencia de las células plasmáticas en la médula ósea por períodos de tiempo largos, es un requisito para el mantenimiento de los títulos de anticuerpo, además de la continua diferenciación de células B de memoria en células plasmáticas en una forma antígeno-independiente (Odendahl and Mei, 2005).



Figura 2. Respuesta inmune primaria y secundaria.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=imm&part=A53>

INMUNOCITOQUÍMICA

La inmunocitoquímica se define como el proceso de localización de biomoléculas en células utilizando anticuerpos inmunodominantes (Capelozzi, 2009). Las moléculas que frecuentemente son localizadas mediante inmunocitoquímica, son las proteínas, pero los lípidos y otros componentes celulares también pueden ser localizados. La técnica

consiste en la detección de epítopes celulares inmunodominantes o muy selectivos con un anticuerpo (Capelozzi, 2009).

Existen dos técnicas inmunocitoquímicas, que pueden utilizarse para localizar antígenos, a continuación se mencionan:

- Método directo

En esta técnica un anticuerpo marcado reacciona directamente con el antígeno en la preparación citológica. Los tipos de marcadores pueden ser: un colorante fluorescente, un metal coloidal, un hapteno, marcadores radioactivos o enzimas. La principal aplicación del método directo se mantiene en la inmunofluorescencia, donde se utiliza esta técnica para identificar biomoléculas (Capelozzi, 2009).

- Método indirecto

Un anticuerpo primario reacciona con el antígeno y un anticuerpo secundario (marcado con un indicador), se dirige contra el anticuerpo primario (Capelozzi, 2009).

FLUORESCENCIA

Las pruebas de fluorescencia permiten realizar investigaciones para detectar componentes biomoleculares inmunodominantes (Riffle and Davis, 2010).

La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres etapas que se produce en ciertas moléculas (hidrocarburos aromáticos policíclicos en general, o heterocíclicos) llamadas fluoróforos o colorantes

fluorescentes (Allan, 2000). Una sonda fluorescente es un fluoróforo diseñado para responder a un estímulo específico o para localizar una región específica dentro de una muestra biológica (Haugland, 2002). El proceso responsable de la fluorescencia de las sondas fluorescentes y otros fluoróforos se ilustra en el diagrama de estado-electrónico simple (diagrama de Jablonski) (Figura 3).

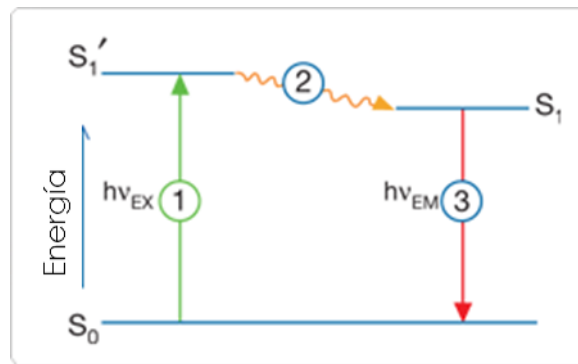


Figura 3. Diagrama de Jablonski, ilustra el proceso involucrado en la creación de un estado excitado electrónico de singulete por absorción óptica y una emisión subsiguiente de fluorescencia (Haugland, 2002).

Etapa 1: Excitación

Un fotón de energía $h\nu_{EX}$ es suministrado por una fuente externa y absorbida por el fluoróforo, creando un estado electrónico excitado de singulete (S_1') (Haugland, 2002).

Etapa 2: Tiempo de vida del estado excitado

El estado excitado existe para un periodo de tiempo finito (normalmente 1-10 nanosegundos). Durante este tiempo, el fluoróforo sufre cambios conformacionales y también está sujeto a una multitud de posibles interacciones con su ambiente molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes. En primer lugar, la energía de la S_1' es parcialmente disipada, produciendo un estado excitado relajado (S_1) desde la cual se origina la emisión de fluorescencia. En segundo lugar, no todas las moléculas inicialmente excitadas por absorción (etapa 1) vuelven al estado fundamental (S_0) por la emisión de fluorescencia (Haugland, 2002).

Etapa 3: Emisión de fluorescencia

Un fotón de energía $h\nu_{EM}$ es emitido, regresando el fluoróforo a su estado fundamental S_0 . Debido a la disipación de energía durante el estado excitado, la energía de este fotón es menor, y por tanto de mayor longitud de onda, que la excitación del fotón $h\nu_{EX}$. La diferencia de energía o longitud de onda ($h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$) se llama "el cambio de Stokes". El desplazamiento de Stokes es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia, ya que permite la detección de fotones de emisión en un fondo bajo, aislado de los fotones de excitación (Haugland, 2002).

Espectros de fluorescencia

El proceso de fluorescencia es cíclico. El hecho de que un solo fluoróforo pueda generar varios miles de fotones detectables es fundamental para la alta sensibilidad de las técnicas de detección por fluorescencia. Para moléculas poliatómicas en solución, las transiciones electrónicas discretas representadas por $h\nu_{EX}$ y $h\nu_{EM}$ en la figura 3 se sustituyen por amplios espectros de energía llamados: espectro de excitación de fluorescencia y espectro de emisión de fluorescencia. El espectro de excitación de fluorescencia de un solo fluoróforo en solución diluida suele ser idéntica a su espectro de absorción. El espectro de absorción por lo tanto puede ser utilizado como un sustituto del espectro de excitación de datos establecidos. En las mismas condiciones, el espectro de emisión de fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación, debido a la disipación parcial de la energía de excitación durante el tiempo de vida del estado excitado, como se ilustra en la figura 3. La intensidad de emisión es proporcional a la amplitud del espectro de excitación de fluorescencia a la longitud de onda de excitación (figura 4) (Haugland, 2002).

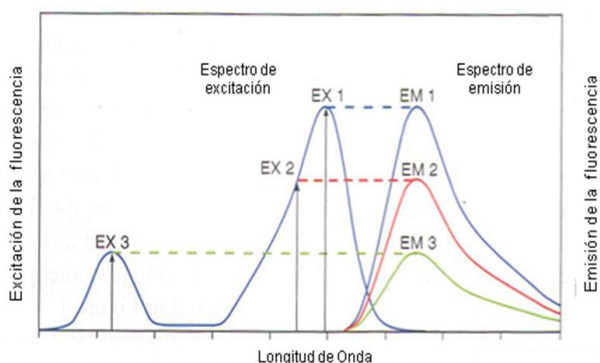


Figura 4. Excitación de un fluoróforo en tres diferentes longitudes de onda (EX 1, EX 2, EX 3) no cambia el perfil de las emisiones, pero no produce variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia (EM 1, EM 2, EM 3) que corresponden a la amplitud del espectro de excitación (Haugland, 2002).

Detección de Fluorescencia

Cuatro elementos esenciales de los sistemas de detección por fluorescencia pueden ser identificados: 1) una fuente de luz de excitación, 2) un fluoróforo, 3) filtros de longitud de onda de los fotones para aislar las emisiones de los fotones de excitación, 4) un detector que registra las emisiones de fotones y produce un salida de grabación, por lo general como una señal eléctrica. Independientemente de la aplicación, la compatibilidad de estos cuatro elementos es esencial para optimizar la detección por fluorescencia (Haugland, 2002).

INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia es una técnica que permite la visualización de una proteína o un antígeno en las células o secciones de tejido mediante la unión de un anticuerpo específico conjugado químicamente con un colorante fluorescente (DiDonato and Brasaemle, 2003). Los colorantes elegidos para la inmunofluorescencia se atenúan por la luz de una longitud de onda, generalmente de color azul o verde, y emiten luces de longitudes de onda diferentes en el espectro visible. Los colorantes fluorescentes más comunes son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), que emite luz verde, el rojo de Texas y la proteína Peridinn clorofila (PerCP), que emiten luz roja, la rodamina y ficoeritrina (PE) que emiten naranja / rojo (Riffle and Davis, 2010). Existen dos tipos principales de métodos de inmunofluorescencia: 1) inmunofluorescencia directa, en la que el anticuerpo primario es marcado con un colorante fluorescente, y

2) inmunofluorescencia indirecta, en la que un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo se usa para reconocer un anticuerpo primario.

Las técnicas de microscopía de inmunofluorescencia se han utilizado para estudiar la localización de las proteínas en las células durante muchos años.

La localización se puede explicar como una existencia de la señal en un pixel durante el análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia. El fenómeno de localización se puede observar fácilmente utilizando imágenes obtenidas con la ayuda de este tipo de microscopía (Allan, 2000).

La observación de la localización de antígenos normalmente proporciona un sólido apoyo para sus características comunes estructurales y funcionales. Sin embargo, en la mayoría de los casos no es suficiente observar solo la localización de los antígenos estudiados; también es importante estimar la localización cuantitativamente (Zinchuk and Zinchuk, 2007).

Debido a que las imágenes de baja calidad tienen altos niveles de fondo, las preparaciones deben estar hechas de forma apropiada para obtener un cálculo fiable de los coeficientes de localización. La evaluación adecuada de localización requiere de un fondo de corrección, es decir, definir el valor de la intensidad de los pixeles con el fin de separar las características de interés del resto de la imagen. Un análisis de localización cuantitativo, produce un número de los coeficientes para estimar el grado de localización y permite ver áreas auténticas de localización en las imágenes (Waters, 2009).

ANTECEDENTES

Previamente en el laboratorio de Inmunofarmacología del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, se realizó un estudio de la respuesta inmune primaria y secundaria humoral en un modelo murino (ratón) a los lisados de antígenos de células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante la estimación de los niveles séricos de anticuerpos inmunodominantes (IgG) a través de ELISA tipo sandwich, el cual permitió identificar la dosis de proteína a utilizar como inmunógeno para generar una respuesta inmune apropiada (Padilla, 2008).

Para ello, se formaron cuatro grupos, por estratos balanceados de cuatro ratones macho, cepa Balb/c. El grupo I sirvió de control (al cuál se le administró únicamente saponina) para asegurar que la respuesta inmune detectada mediante la cuantificación de anticuerpos inmunodominantes, sea específica a las proteínas obtenidas de lisados de células de A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano (ATCC). Los grupos restantes fueron inmunizados con 1, 10 Y 100 μg de lisado celular de la línea A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano.

Se hizo la recolección individual de los sueros correspondientes, los cuales se diluyeron en PBS 1X y se congelaron para posteriormente realizar la cuantificación de anticuerpos antígeno-inmunodominantes mediante ELISA. Se analizaron los sueros y en los que se obtuvo la mayor respuesta inmune humoral secundaria, fueron seleccionados para realizar una mezcla (Padilla, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. En México, en el 2005, se reportaron 7018 defunciones debidas a cáncer de pulmón, tráquea y bronquios, con una tasa de mortalidad de 6.6 personas por cada 100,000 habitantes (CONAPO, 2000). La elevada tasa de mortalidad se debe al hecho de que la mayoría de los casos de cáncer de pulmón se diagnostica en una etapa de desarrollo avanzada (Hammerschmidt, 2009).

El cáncer de pulmón se divide histológicamente en dos principales tipos: el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés). El NSCLC se clasifica a su vez en carcinoma epidermoide, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma, que es la forma más común de cáncer pulmonar en el mundo y en la población mexicana (representando el 70% de todos los casos de cáncer pulmonar) (Sandoval, 2009).

Por los datos estadísticos de la mortalidad en México, es de gran interés conocer si es posible generar una respuesta inmune a algunos antígenos de células de adenocarcinoma. Por lo que para este propósito escogimos estudiar este proceso en un modelo murino. En caso de generarla, los anticuerpos generados nos permitirán conocer la localización celular de estos antígenos mediante la técnica inmunocitoquímica, para tratar de identificar cuáles son y posteriormente tratar de aislar dichos antígenos para estudiar con ellos la probable respuesta inmune que se produce en pacientes con este tipo de cáncer pulmonar.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar los antígenos inmunodominantes de la respuesta inmune humoral secundaria en el ratón, de las proteínas de lisados de células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea celular A-549) y la probable localización celular de estos antígenos en estas células, empleando microscopía de fluorescencia, microfotografía digital y análisis de imágenes, para determinar si existe un patrón en la distribución de las proteínas antigénicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de los extractos proteicos de lisados celulares para la realización de estudios de electroforesis y *Western blot*
- Titulación de la mezcla de suero inmune para la inmunodetección de antígenos de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano
- Inmunodetección de los antígenos inmunodominantes en las células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante *Western blot*

- Inmunolocalización cualitativa de los antígenos en las células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante microscopía de fluorescencia y elaboración de un registro digital de imágenes mediante microfotografía digital.
- Estimación cuantitativa de los antígenos en las células de adenocarcinoma pulmonar humano (A-549) mediante el análisis de las imágenes del registro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Línea celular A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano y B-16 de melanoma de ratón (ATCC).

Las líneas celulares fueron cultivadas con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (apéndice, sección 1.1) suplementado al 10% con suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 50 µg/ mL de estreptomina. Los cultivos se mantuvieron incubados en una atmósfera de CO₂ al 5%, a una temperatura constante de 37°C. Se utilizaron botellas de cultivo de 80 cm² de área, en un volumen de 15 mL, hasta obtener una monocapa confluyente. Las células se cosecharon en una solución fisiológica suplementada con tripsina-EDTA (0.05%/ 0.05 Mm) (Gibco), se les dieron lavados con medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) (apéndice, sección 1.2) y se contaron en un hematocitómetro evaluando simultáneamente la viabilidad por la exclusión del azul tripán (Sigma) al 0.4 %. Para los ensayos se utilizaron cultivos con viabilidad mayor o igual al 95%.

2. Anticuerpos

Para el *western blot* se utilizó como anticuerpo primario una mezcla de sueros de ratones no inmunizado como control negativo, además de una mezcla de sueros de ratones inmunizado con lisados de la línea celular A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano. Como anticuerpo

secundario fue utilizado un anti-IgG de ratón (H + L) acoplado a fosfatasa alcalina (Millipore N°cat AP200A).

Para las inmunofluorescencias se utiliza como anticuerpo primario una mezcla de suero de ratón no inmunizado como control negativo además de una mezcla de suero de ratón inmunizado con la línea celular A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano. Como anticuerpo secundario fue utilizado un anti- IgG de ratón (H + L) hecho en cabra conjugado con fluoresceína (Millipore N°cat 12-506).

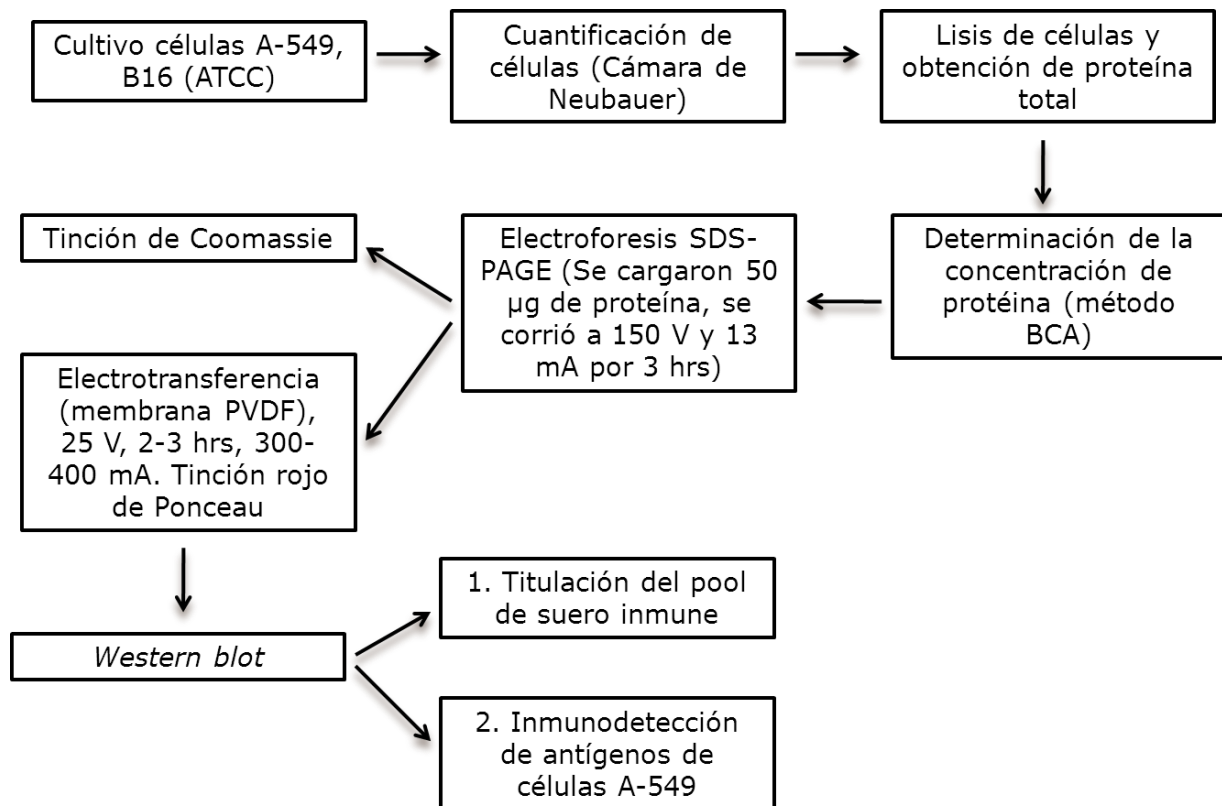


Figura 5. Representación esquemática de la inmunodetección de antígenos de células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549).

3. Obtención de los extractos protéicos de lisados celulares para la realización de estudios de electroforesis y *Western blot*

3.1 Lisis y cuantificación de células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano y B-16 de melanoma de ratón

Se colectan las células en un tubo cónico y se centrifugan durante 5 minutos a 420 XG, se decanta el sobrenadante y se desecha. Se resuspende el botón en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 50 µg/ mL de estreptomina.

En un tubo eppendorf se colocan 10 µL de la suspensión de células anterior, 10 µL de azul tripán al 0.4% (Sigma, N°cat T-8154) y 80 µL de medio RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 50 µg/ mL de estreptomina, mezclar. Se toman 10 µL de la suspensión anterior y se llena la cámara de Neubauer. Se realiza la cuantificación en un hematocitómetro.

A partir de este punto, todas las manipulaciones se realizan en frío. Se centrifuga durante 5 min a 420 XG. Resuspender el pellet en 5 mL de amortiguador de fosfato salino (PBS). Se centrifuga durante 5 minutos a 420 XG. Se resuspende el pellet en un amortiguador de lisis (apéndice, sección 1.3) + un inhibidor de proteínas (Sigma, N°cat P-8340) (10 µL para 1 mL de amortiguador de lisis).

3.1.1 Obtención del volumen óptimo del amortiguador de lisis

Para la determinación de la concentración de proteína de lisado de células de A-549 se lisaron las siguientes cantidades de células y se colocaron en un respectivo volumen de amortiguador de lisis:

Tabla 1. Volúmenes de amortiguador de lisis para la obtención de proteína.

Nº de células/mL	1×10^5	1×10^5	1×10^5	1×10^6	1×10^6	1×10^6
Volumen (μ L) de amortiguador de lisis*	1000	500	250	1500	1000	500

*apéndice, sección 4

Posteriormente se agita en hielo durante 30 minutos. Se centrifuga a 10,000 XG durante 12 minutos. Se remueve el sobrenadante y se mantiene en hielo a -20 °C.

3.2 Determinación de la concentración de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA).

Para la determinación de la concentración total de proteínas presente en las células de adenocarcinoma pulmonar humano, se realiza el método del ácido bicinconínico. Se utiliza un kit comercial (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, N°cat IL116702), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (apéndice, sección 5). Se construye una curva de calibración, a partir de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración proteica de 2 mg/mL.

A un volumen de 150 μ L de la muestra proteica contenida en un tubo Eppendorf y a un volumen de 150 μ L de las alícuotas contenidas en los viales (tabla 2), se le agregan 150 μ L de mezcla reactiva (solución de Sulfato de cobre, reactivos de trabajo (apéndice, sección 5) respectivamente.

Tabla 2. Preparación de alícuotas para la curva patrón a partir de una solución estándar de BSA (2 mg/mL)

Vial	Volumen de diluyente (amortiguador de lisis) (1:10)	Volúmenes de viales (mL)	Concentración final de BSA (μ g/mL)
A	2.25	0.25 mL de estándar de BSA	200
B	4	1 mL vial A	40
C	2	2 mL vial B	20
D	2	2 mL vial C	10
E	2	2 mL vial D	5
Blanco	4	0	0

Se colocan 300 μ L de las mezclas reactivas en cada uno de los pozos de la microplaca. Se incuba a 37°C por 2 horas. Se deja enfriar la microplaca a temperatura ambiente y se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Las lecturas obtenidas de las muestras se interpolan en la curva de calibración y se obtiene la concentración de

proteínas de la muestra (apéndice, sección 6). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. El promedio de ambos resultados es el valor final de la concentración proteica de la muestra.

4. Inmunodetección de antígenos de células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante Western blot

4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

4.1.1 Preparación de los geles (apéndice, sección 2)

Se prepara el gel separador, vaciar el gel separador al 15% (apéndice, sección 3.5) hasta 1 cm por debajo del peine, añadir un poco de agua destilada. Pasados 15 minutos retirar el agua destilada con papel absorbente. Se adiciona el gel concentrador (apéndice, sección 3.7), colocar el peine diente por diente para evitar burbujas. Esperar 15 minutos. Quitar el peine y absorber las burbujas con papel filtro.

4.1.2 Preparación de las muestras

Se preparan las muestras con 50 µg de proteína y un amortiguador de carga (2X). Calentar 1 minuto a 100°C. Se deja enfriar en hielo y se homogeneiza el volumen. Se llenan los carriles con la muestra y posteriormente con el amortiguador del tanque (apéndice, sección 3.9)

para evitar que se mezclen. Se corre la electroforesis a 150 V y 13 mA durante 3 h.

Para los lisados de ambas líneas celulares se utilizaron 50 µg de proteína de lisado celular por carril en el gel para electroforesis SDS-PAGE y un marcador de pesos moleculares (BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen, N°cat 10748-010). Cada muestra fue colocada en el gel en el siguiente orden:

# de pozo	Muestra (línea celular o marcador de pesos moleculares PM)
1	PM
2	A-549
3	A-549
4	A-549
5	B16
6	B16

4.1.3 Tinción de Coomassie

Para observar la correcta separación de las bandas y obtener un patrón de los lisados celulares, se realiza una tinción del gel con azul de

Coomassie al 25% (Sigma, B0149-5G) durante 1 minuto, enjuagar con agua destilada y colocar en una solución caliente de ácido acético al 10%.

4.2 Electrotransferencia

Se prepara el amortiguador de transferencia (apéndice, sección 3.10) al momento de utilizarse. Posteriormente se equilibran en el amortiguador las esponjas y los papeles filtro, se moja la membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF) (Millipore) en metanol durante 15 segundos, después, se enjuaga la membrana en agua destilada durante 2 minutos. Se equilibra la membrana en el amortiguador de transferencia por 5 minutos. Se equilibra el gel de electroforesis en el amortiguador de transferencia por 15 minutos.

Colocar sobre el soporte del aparato de transferencia en el siguiente orden el material a mencionar:

- Esponja
- Papel filtro
- Gel
- Membrana
- Papel filtro
- Esponja

Se llena la cámara con agua y hielo y se corre a 25 V, durante 2 horas, a 300-400 mA. Se enjuaga la membrana con agua destilada, se tiñe con rojo de ponceau (Sigma) al 1% durante 1 minuto. Posteriormente, se enjuaga la membrana con agua destilada para quitar el exceso de colorante.

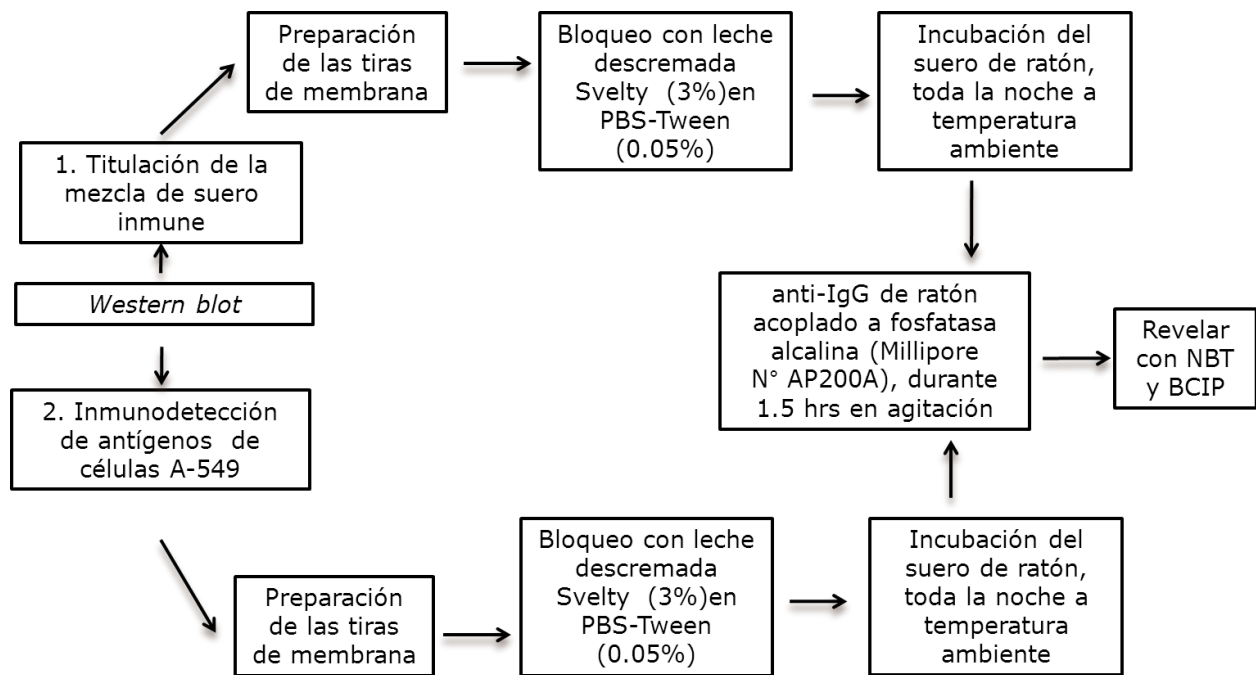


Figura 6. Representación esquemática de la Inmunodetección de antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante *Western blot*

4.3 Preparación de las tiras de membrana para *Western blot*

Cortar la membrana obtenida de la electrotransferencia de manera que cada una de las muestras teñidas incluyendo el marcador de pesos moleculares queden en forma de tiras. Se destiñen cada una de las tiras de membrana con NaOH 1N, y se enjuaga el exceso de NaOH con agua destilada, colocar las tiras de membrana en PBS (1X) (amortiguador de fosfato salino) (apéndice, sección 3.1).

4.4 Titulación de la mezcla de suero inmune (anticuerpo primario) para la inmunodetección de antígenos de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano

Se colocan las tiras de membrana en PBS-Tween 0.05 % y 20 mL de leche descremada al 3%, para el bloqueo de la membrana, agitar por 1 hora. Se colocan cada una de las tiras de membrana con el suero inmune de ratón (anticuerpo primario) en PBS-Tween 0.05% a diferentes diluciones:

- a) 1:10,000
- b) 1: 25,000
- c) 1: 50,000
- d) 1: 75,000
- e) 1:100,000

Se deja incubar toda la noche a temperatura ambiente. Se realizan tres lavados de 10 minutos en PBS (1X). Se adiciona el anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (2 μ L/mL), se incuba por 1 hora y media.

Realizar tres lavados de 10 minutos en PBS (1X). Revelar con Azul de nitro-tetrazolio/5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP) (Roche).

4.5 Inmunodetección de antígenos de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano

Se colocan las tiras de membrana en PBS-Tween 0.05 % y 20 mL de leche descremada al 3%, para el bloqueo de la membrana, agitar por 1 hora. Se colocan cada una de las tiras de membrana con el suero de ratón (anticuerpo primario) en PBS-Tween 0.05% a una dilución 1:10,000 en el siguiente orden:

- a) Marcador de pesos moleculares
- b) A-549 + suero de ratón inmune
- c) A-549 + suero de ratón no inmune
- d) A-549 sin suero (solo anticuerpo secundario)
- e) B16 + suero de ratón inmune
- f) B16 + suero de ratón no inmune

Se deja incubar toda la noche a temperatura ambiente. Realizar tres lavados de 10 minutos en PBS (1X). Se adiciona el anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (2 μ L/mL), se incuba durante 1 hora y media. Se realizan tres lavados de 10 minutos en PBS (1X). Se revela con NBT/BCIP.

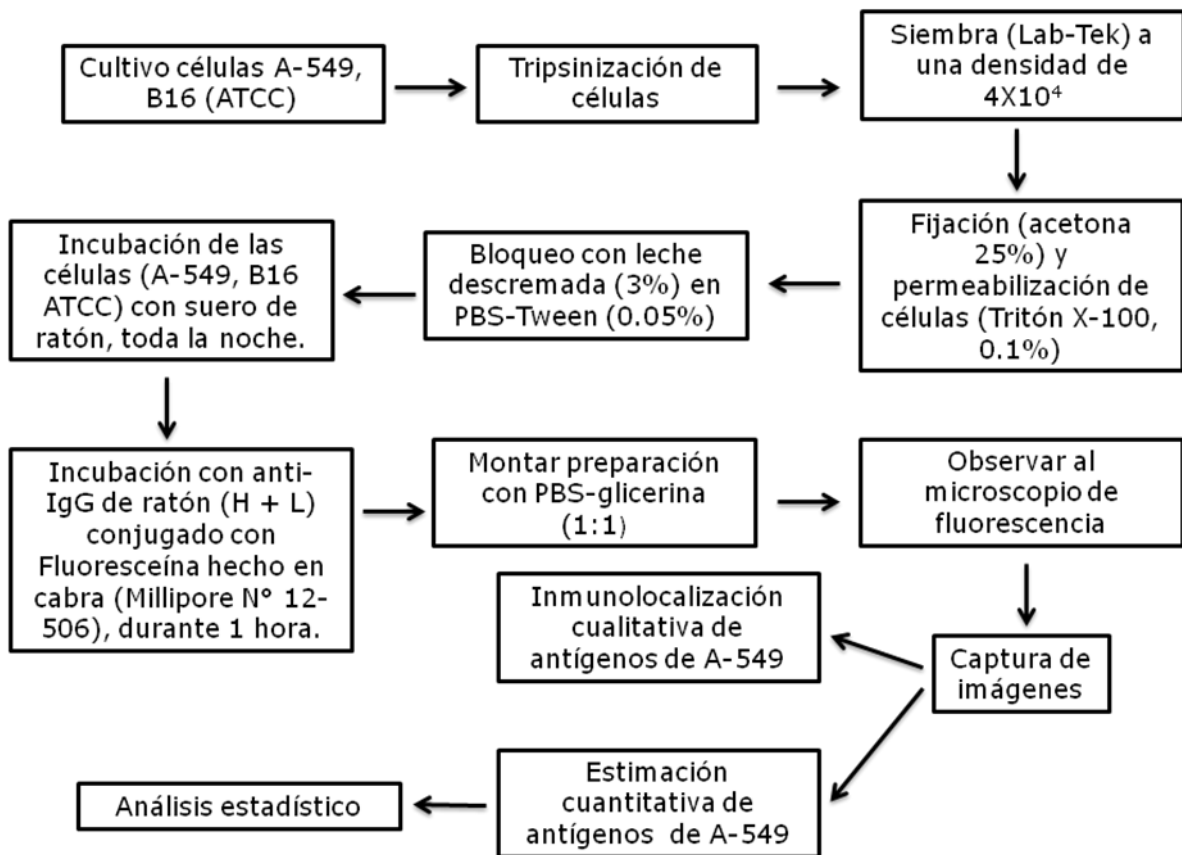


Figura 7. Representación esquemática de la Inmunolocalización cualitativa y cuantitativa de antígenos en las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549).

5. Inmunolocalización cualitativa de antígenos en las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante microscopía de fluorescencia.

Se cultivan ambas líneas celulares (A-549 y B16) a una densidad de 4×10^4 células por pozo en placas Lab-Tek II Chamber Slide System con medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado al 10% con suero bovino fetal, 100 U/mL de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina, se deja incubar la placa toda la noche a una atmósfera de CO_2 al 5%, a una temperatura constante de 37°C .

Posteriormente se fijan las células con acetona fría (Sigma) al 25% durante 10 minutos y se permeabilizan con Tritón X-100 (0.1%) (Sigma) durante 5 minutos. Después se bloquea la placa con leche descremada al 3% durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Se coloca en cada pozo el anticuerpo primario (apéndice, sección 6) como se presenta en el siguiente esquema:

1 Sin anticuerpo primario	2 Suero no inmune	3 Suero inmune Dil. 1:2000	4 Suero inmune Dil. 1:2000
5 Sin anticuerpo primario	6 Suero no inmune	7 Suero inmune Dil. 1:2000	8 Suero inmune Dil. 1:2000

Figura 8. Representación esquemática de una placa Lab-Tek II Chamber Slide System.

Se incuban las células toda la noche a una temperatura de 37°C. Se realizan tres lavados de 10 minutos a la placa con PBS. Se coloca el anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC) como anticuerpo secundario como se indica en la figura 9 y se incuba a una temperatura de 37°C durante 1 hora. Se realizan tres lavados de 10 minutos a la placa con PBS. Se despega la cámara de la placa Lab-Tek, se monta la preparación con PBS-glicerina (1:1) y se observa al microscopio de fluorescencia.

1 Sin suero, solo anti-IgG acoplado a FITC	2 Suero no inmune (1:2000) + anti-IgG acoplado a FITC (1:800)	3 Suero inmune (1:2000) + anti-IgG acoplado a FITC (1:800)	4 Suero inmune (1:2000) + anti-IgG acoplado a FITC (1:1600)
5 Sin suero, solo anti-IgG acoplado a FITC	6 Suero no inmune (1:2000) + anti-IgG acoplado a FITC (1:800)	7 Suero inmune (1:2000) + anti-IgG acoplado a FITC (1:800)	8 Suero inmune (1:2000) + anti-IgG acoplado a FITC (1:1600)

Figura 9. Representación esquemática de una placa Lab-Tek II Chamber Slide System.

6. Estimación cuantitativa de antígenos en células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante el análisis de las imágenes del registro.

Para el ensayo de inmunolocalización las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 600) a diferentes aumentos; se utilizó una cámara digital Nikon DXM1200c y posteriormente analizadas con el programa NIS Elements AR 3.0 de Nikon; se tomaron tres diferentes campos de células A-549 + suero de ratón no inmune y tres diferentes campos de células A-549 + suero de ratón inmune. A dichos campos, se les cuantificó la intensidad por pixel donde estaban localizados los antígenos inmunodominantes de adenocarcinoma pulmonar humano.

6.1 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se examinaron realizando un análisis de varianza ($p < 0.05$) utilizando el paquete estadístico SigmaStat para Windows versión 3.5.

Cuando se encontraba un resultado significativo, se valoraban las diferencias entre las medias de los grupos individuales mediante una prueba de Holm-Sidak. Los resultados se expresaron en forma de medias \pm error estándar de la muestra.

RESULTADOS

1. Titulación de la mezcla de suero inmune (anticuerpo primario) para la inmunodetección de antígenos de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano

Para la titulación del suero inmune (anticuerpo primario) se utilizaron diferentes diluciones, además de un control negativo (solo anticuerpo secundario) y un marcador de pesos moleculares:

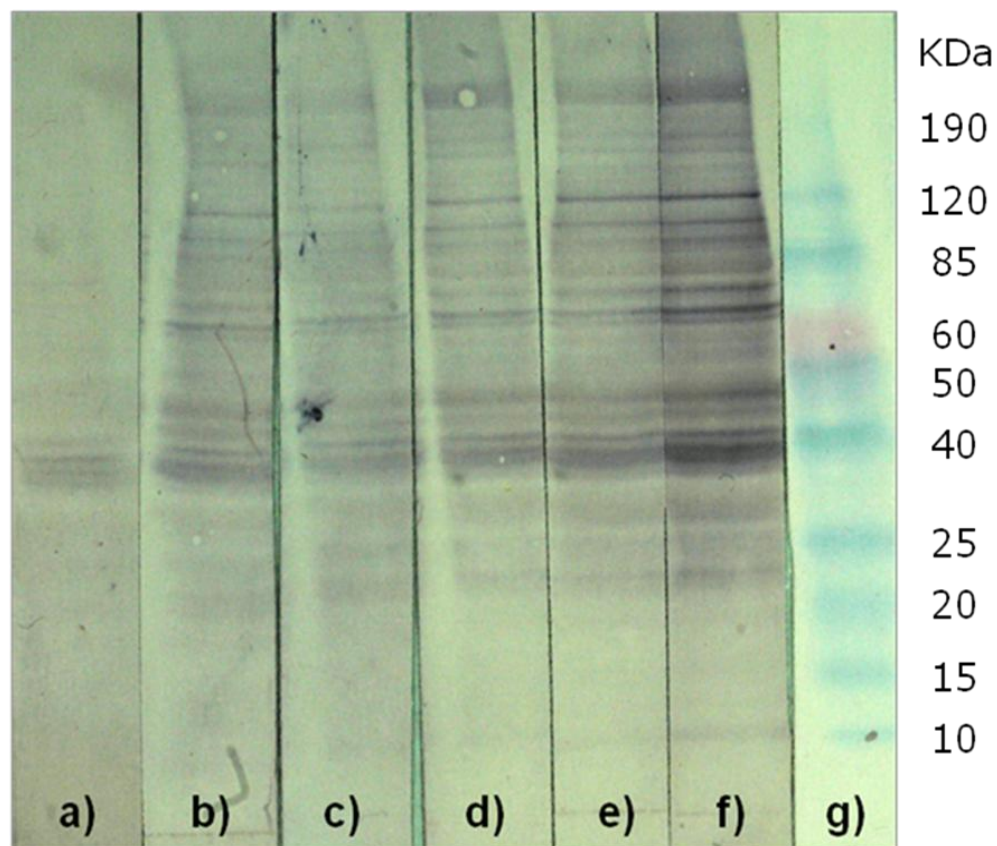


Figura 10. Western blot utilizando el suero de ratón inmune a diferentes diluciones: a) Control negativo (solo anticuerpo 2°), b) 1:100,000, c) 1:75,000, d) 1:50,000, e) 1:25000, f) 1:10,000 g) PM.

En la figura 10 se observan las bandas correspondientes a los antígenos de las proteínas de los lisados de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) en las diluciones efectuadas, correspondientes a las proteínas que fueron reconocidas por los anticuerpos de la mezcla de sueros inmunes. En las diluciones 1:25,000 y 1:10,000 (carriles E y F) se observan bandas con una mayor intensidad. Para la inmunodetección de antígenos inmunodominantes de células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) se decidió utilizar el anticuerpo primario a una dilución 1:10,000.

2. Inmunodetección de antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante *Western blot*

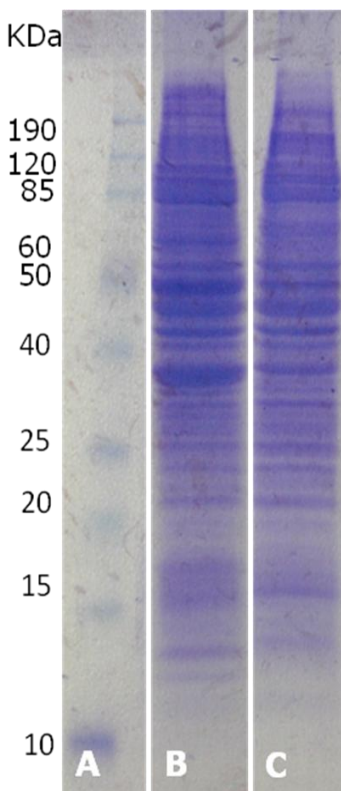


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE. Patrón proteico de lisados de células A-549 y B16; (A) PM, (B) línea celular A-549, (C) línea celular B16. Tinción de Azul de Coomassie. 41

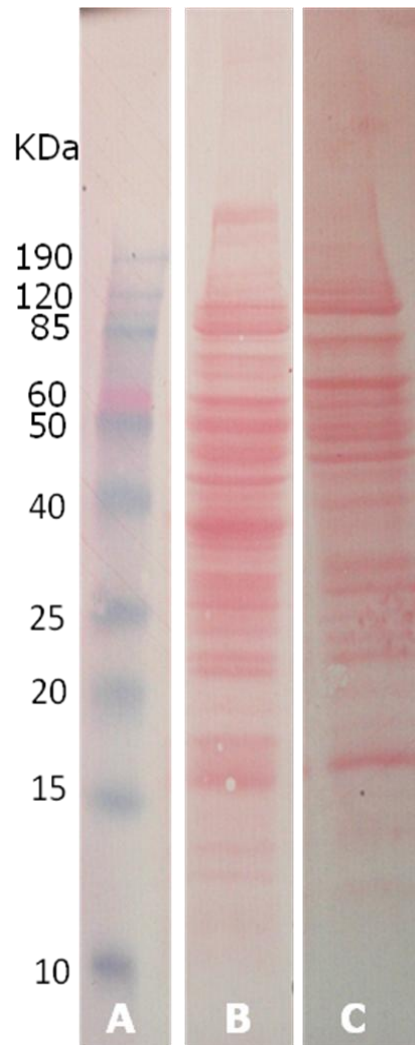


Figura 12. Electrotransferencia de proteínas de células A-549 y B16, (A) PM, (B) línea celular A-549, (C) línea celular B16 (control). Tinción rojo de ponceau.

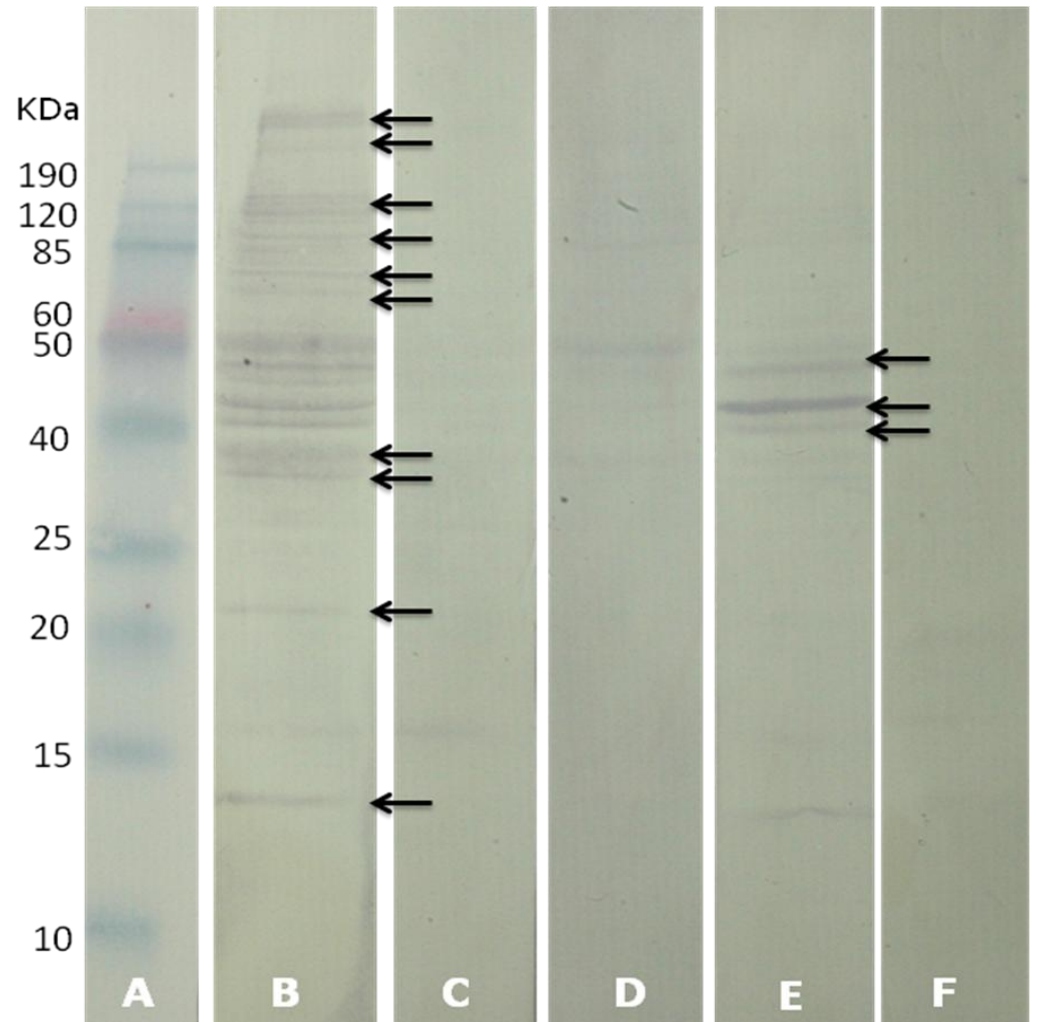


Figura 13. Western blot, dilución 1:10000. (A) PM, (B) A-549 + suero de ratón inmune, (C) A-549 + suero de ratón no inmune, (D) A-549 sin suero (solo anticuerpo secundario), (E) B16 + suero de ratón inmune, (F) B16 + suero de ratón no inmune.

Para la detección de antígenos de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano, en la figura 11 se observa un patrón protéico de lisados de A-549 y B16, en la figura 12 se observa una electrotransferencia correspondiente al patrón protéico de lisados de estas líneas celulares, con lo que se comprueba una correcta electrotransferencia de las proteínas. En la figura 13 se observan bandas (entre 60 y 190 kDa; y entre 10 y 40 kDa) de mayor intensidad correspondientes a los antígenos de las proteínas de los lisados de células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549), en donde las bandas con peso molecular entre 40 y 60 kDa no son específicas de la línea celular A-549, ya que se observa una inmunodetección de las mismas bandas en los lisados de la línea celular B16 de melanoma de ratón (carril E), la cual fue utilizada como control.

3. Inmunolocalización cualitativa de antígenos en las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante microscopía de fluorescencia y elaboración de un registro digital de imágenes mediante microfotografía digital.

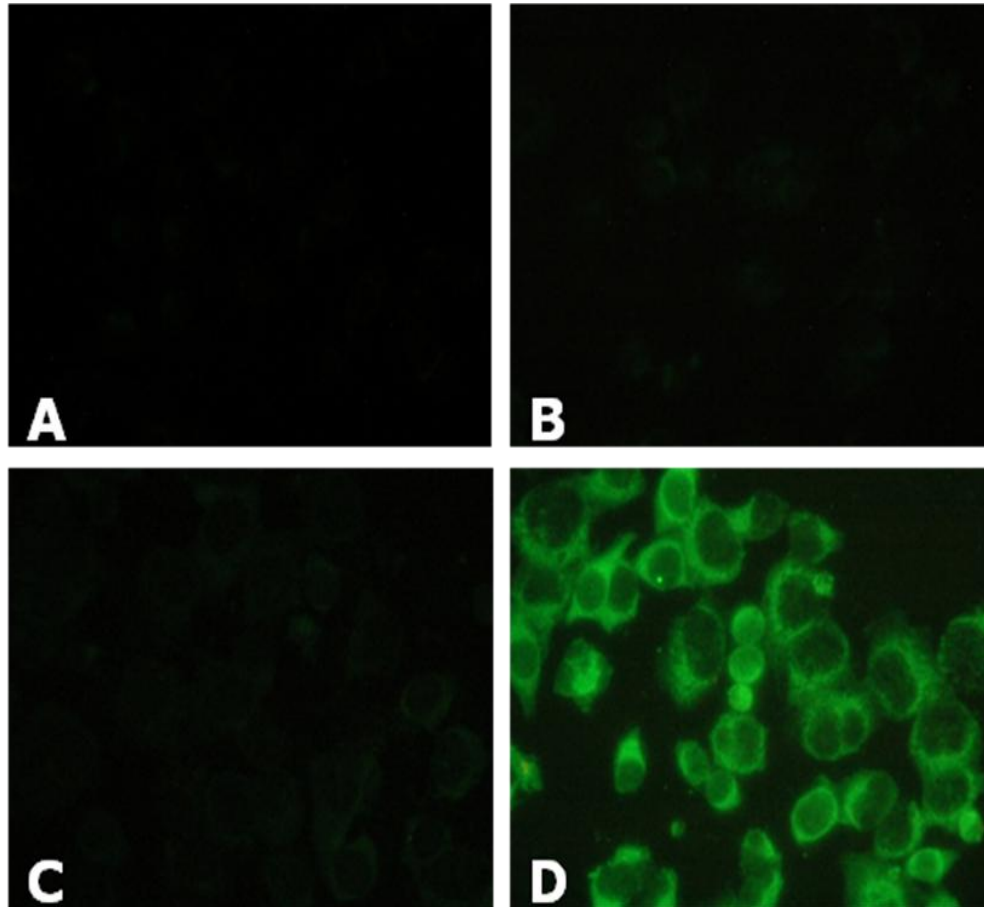


Figura 14. Inmunolocalización de antígenos de células A-549; 400X. **A.** Células B16 + suero de ratón inmune, **B.** Células B16 + suero de ratón no inmune, **C.** A-549 + Suero de ratón no inmune **D.** A-549 + Suero de ratón inmune.

En la figura 14-D se observa una inmunolocalización de los antígenos de células A-549; en las figuras A, B, y C, las cuales fueron utilizadas como controles, no se observa una inmunolocalización de los antígenos.

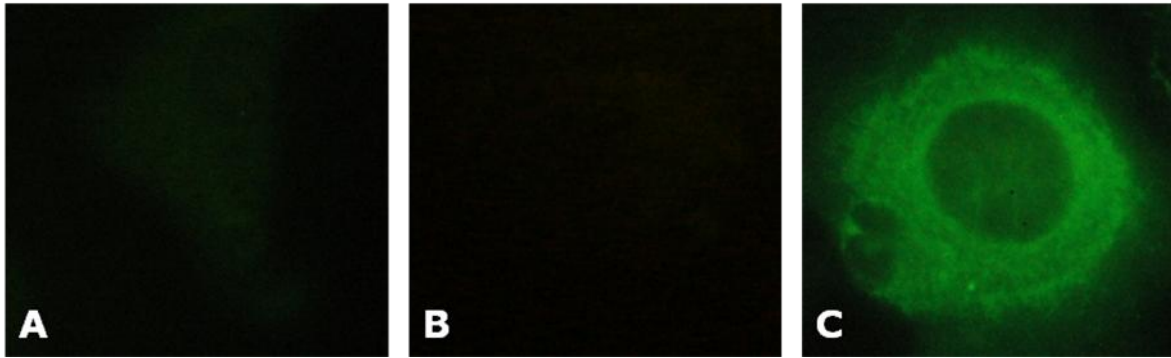


Figura 15. Inmunolocalización de antígenos de células A-549; 1000X
A. Suero de ratón no inmune, **B.** Sin suero (solo anticuerpo secundario),
C. Suero de ratón inmune.

En la figura 15-C se observa una inmunolocalización de antígenos de células A-549; en las figuras A y B, las cuales fueron utilizadas como controles, no se observa una inmunolocalización de los antígenos.

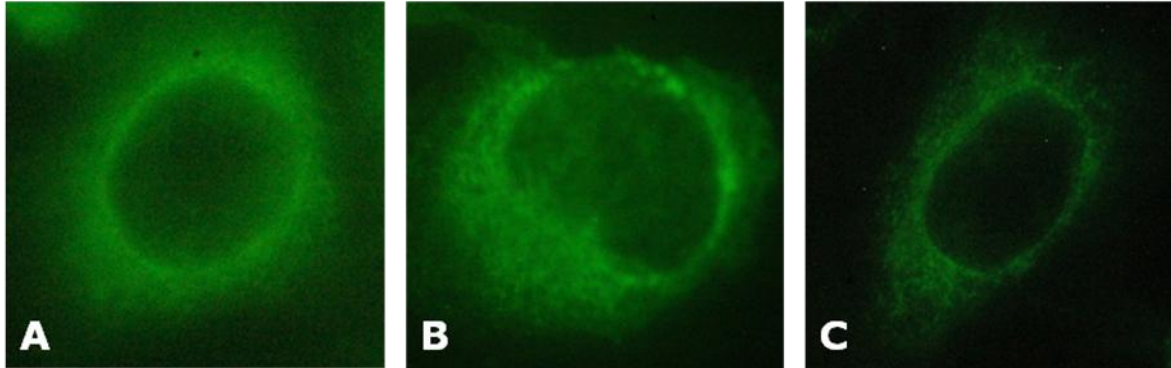


Figura 16. Inmunolocalización de antígenos y patrones morfológicos observados en la población celular A-549; 1000X. **A.** Perinuclear, **B.** Parcialmente perinuclear, **C.** Compartimentalizada de antígenos.

En la figura 16 se observan tres distintos patrones morfológicos predominantes en la población celular de A-549: inmunolocalización perinuclear, inmunolocalización parcialmente perinuclear e inmunolocalización compartimentalizada de antígenos.

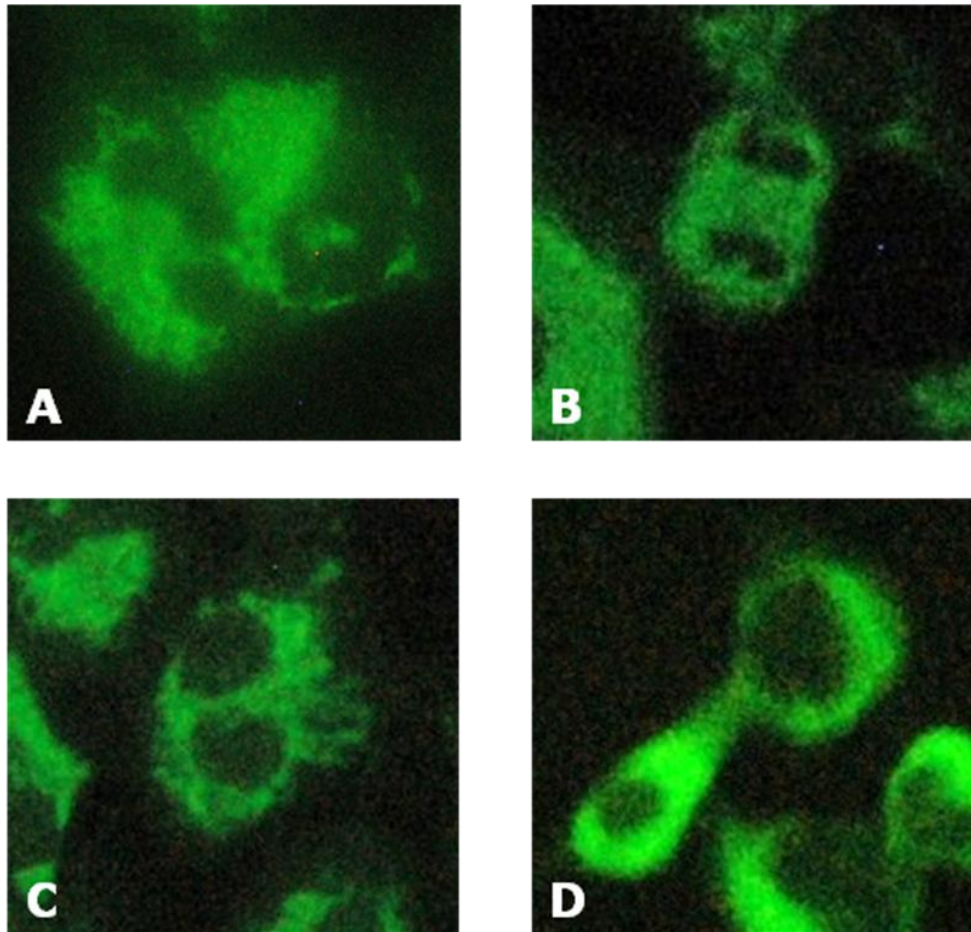


Figura 17. Marcaje positivo de los antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) en las diferentes etapas de la mitosis; 200X. **A.** En la profase, la envoltura nuclear se ha roto, y los cromosomas están condensados. **B.** En la metafase, la mayoría de los cromosomas se han congregado en el ecuador de la célula para formar la placa metafásica. **C.** En la anafase, los cromosomas duplicados se han separado en sus dos cromátidas y se mueven hacia los polos de la célula. **D.** En la telofase, los cromosomas separados han alcanzado los polos del huso mitótico y la célula se está escindiendo para dar lugar a dos células hijas (Jordan, 2004).

4. Estimación cuantitativa de antígenos en células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549) mediante el análisis de las imágenes del registro.

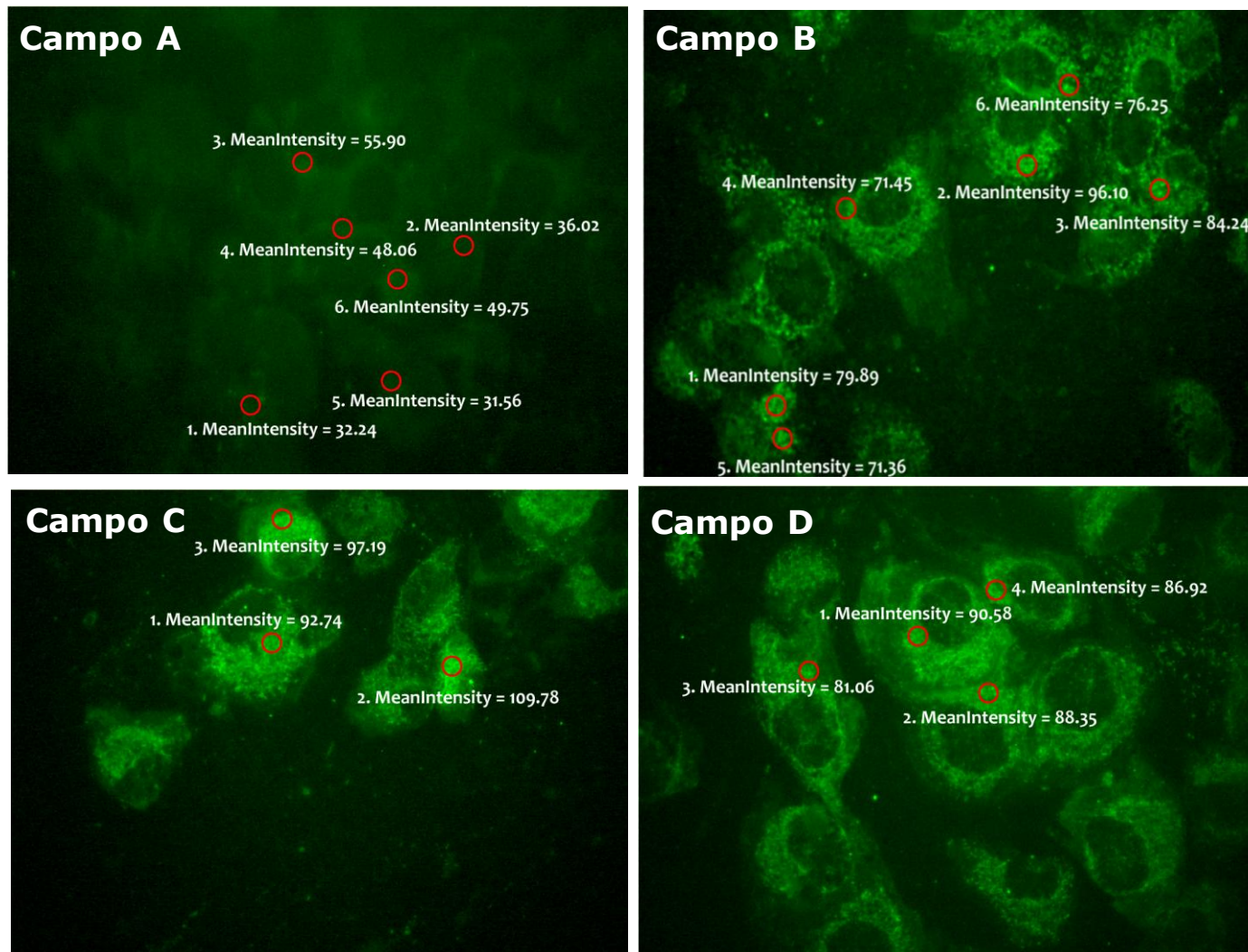


Figura 18. Inmunolocalización de antígenos de células A-549; 400X. **A.** Células A-549 + suero de ratón no inmune, **B-D.** Células A-549 + suero de ratón inmune.

En la tabla 3 se observa que el promedio de los valores de la intensidad por pixel de los grupos de tratamiento son mayores que los del grupo control. El análisis de varianza muestra que las diferencias entre los grupos tratados y el grupo control es significativa ($p < 0.05$).

Tabla 3. Estimación cuantitativa de antígenos de la línea celular A-549 con suero hiperinmune de ratón Balb/c y anti-IgG de ratón fluoresceinado mediante análisis de imágenes.

[Intensidad por pixel]	A-549+ suero de ratón no inmune. Campo A (grupo control)	A-549+ suero de ratón inmune. Campo B	A-549+ suero de ratón inmune. Campo C	A-549+ suero de ratón inmune. Campo D
	32.24	79.89	92.74	90.58
	36.02	96.10	109.78	88.35
	55.40	84.24	97.19	81.06
	48.06	71.45		86.92
	31.56	71.36		
	49.75	76.25		
PROMEDIO	42.17	79.88	99.90	86.73
DS	10.16	9.37	8.84	4.07
EEM	4.19	3.95	5.10	2.03
% INCREMENTO	100	189.42	236.90	205.65

Se realizó un procedimiento de comparación múltiple de todos los grupos con un nivel de significancia de $p < 0.05$ por el método de Holm-Sidak. En la figura 19 se observa una diferencia significativa entre las medias de los grupos B, C, D y el grupo A (grupo control).

**ESTIMACIÓN CUANTITATIVA DE LOS ANTÍGENOS
DE LA LÍNEA CELULAR A-549 CON SUERO
HIPERINMUNE DE RATÓN BALB/c Y
ANTI-IgG DE RATÓN FLUORESCINADO**

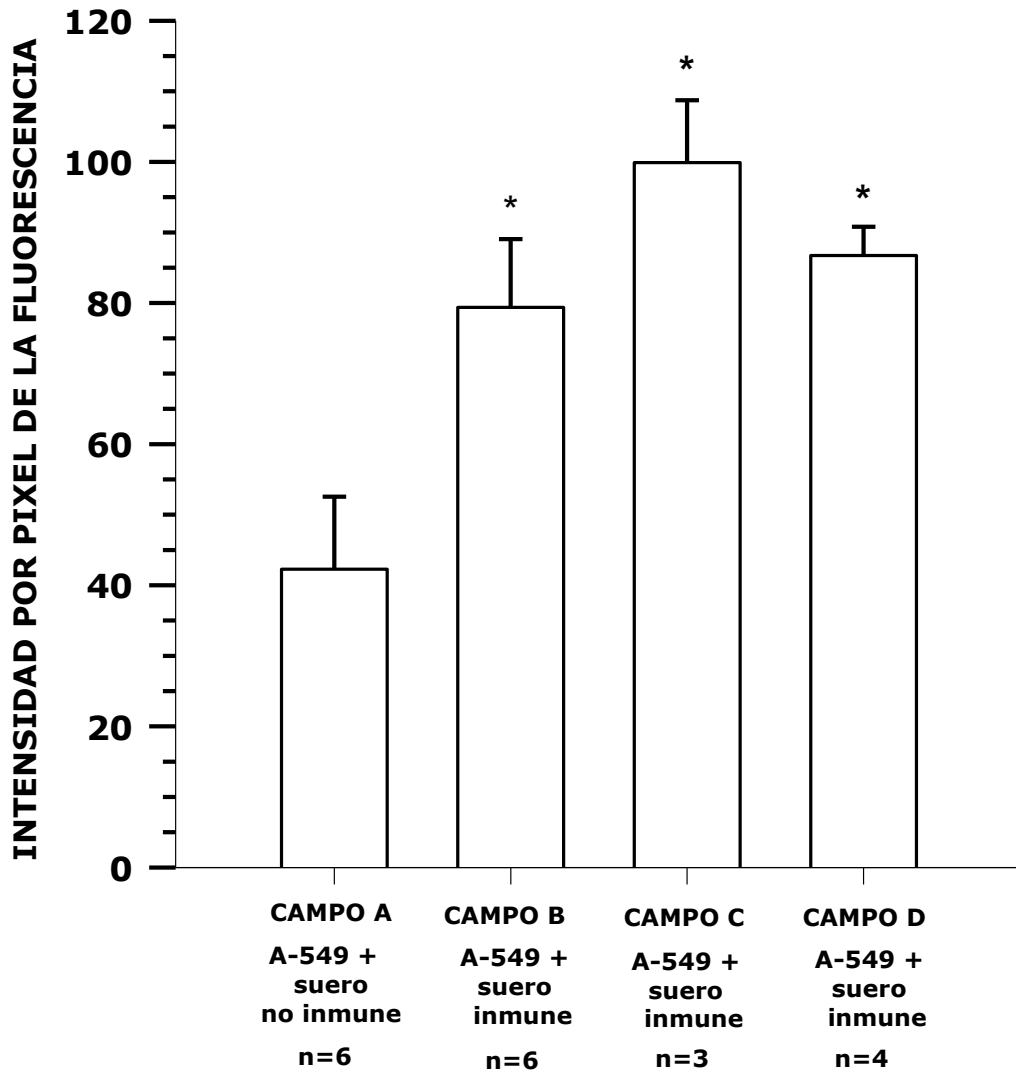


Figura 19. Estimación cuantitativa de antígenos de la línea celular A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano. Los asteriscos indican que existe una diferencia significativa entre las medias de los grupos B, C, D y el grupo control (A).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la inmunolocalización cuantitativa de los antígenos de adenocarcinoma pulmonar humano (figura 18) se logró cuantificar una intensidad por pixel en los grupos B, C y D (células A-549 + suero inmune) con un porcentaje de incremento de la fluorescencia claramente mayor al grupo A, correspondiente al grupo control (A-549 + suero no inmune). En la tabla 3 se observa que el promedio de los valores de las intensidades de la fluorescencia con respecto al grupo control son mayores, el análisis de varianza muestra que las diferencias entre los grupos tratados y el grupo control es significativa ($p < 0.05$). En la figura 19 se observa el promedio de la intensidad por pixel de cada uno de los grupos analizados en la figura 18, donde se muestra una diferencia significativa entre los grupos B, C, D (células A-549 + suero inmune) y el grupo control analizados (células A-549 + suero no inmune); por lo tanto, se logró obtener una estimación cuantitativa de antígenos de adenocarcinoma pulmonar humano.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En base a los resultados obtenidos en los lisados celulares de la línea A-549, en la inmunodetección mediante western blot de los antígenos de las células de adenocarcinoma pulmonar humano, identificamos varias proteínas con pesos moleculares en los rangos entre 10 a 40 KDa y 80 a 200 KDa (figura 13). En estas células, también se inmunodetectaron varias proteínas con pesos moleculares en el rango entre 40 a 60 KDa, que también se identificaron en los lisados de células B16 de melanoma de ratón, empleadas como control negativo. Por lo que las proteínas detectadas en este último rango de pesos moleculares, consideramos que no son específicas de las células A-549.

En los ensayos de inmunocitoquímica, las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia, fueron digitalizadas y analizadas mediante comparaciones de la cantidad e intensidad de los pixeles de dichas imágenes, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre las imágenes de los grupos analizados respecto a los grupos control.

Zaal y Smith en un estudio revelan que el aparato de Golgi se disocia en el inicio de la mitosis y después de una secuencia de eventos, se vuelve a asociar durante la citocinesis. En el presente estudio observamos un marcaje positivo de los antígenos de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano, dispersos en todo el citoplasma durante la metafase y la anafase. Por lo que podemos considerar que existe una localización de estos antígenos en el aparato de Golgi.

Por otra parte, en relación a la dinámica celular, se ha observado que durante la reconstitución del aparato de Golgi en la anafase y la telofase, se forman cuatro agrupaciones de este organelo; dos para cada célula hija, y estas emigran gradualmente hacia el perinúcleo de las células (Gaietta and Giepmans, 2006).

En nuestras imágenes de inmunofluorescencia de las células A-549, observamos una inmunolocalización de antígenos preferentemente perinuclear, a diferencia de las células B16 en donde no se observó ningún marcaje.

CONCLUSIONES

- ⊙ Se lograron identificar varios de los antígenos de lisados de las células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea celular A-549).
- ⊙ La inmunofluorescencia reveló la localización de estos antígenos de adenocarcinoma pulmonar humano preferentemente perinuclear.
- ⊙ Existe una inmunolocalización de los antígenos de adenocarcinoma pulmonar humano aparentemente en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico.

PERSPECTIVAS

- ⊙ En base a nuestros resultados, se propone lograr el aislamiento de dichos antígenos y realizar con ellos otros estudios de la respuesta inmune humoral de pacientes con cáncer pulmonar, con la finalidad de obtener algunos candidatos de vacuna para este tipo de cáncer pulmonar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. *Propiedades generales de las respuestas inmunitarias*. En: Inmunología celular y molecular. Barcelona, Elsevier 2006; pp. 3-17.
- Allan, V.J. *Protein localization by fluorescence microscopy: A practical approach*. Oxford University, New York, 2000. p 256.
- Capelozzi, V. *Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer*. J Bras Pneumol. 2009; 35 (4): 375-382.
- DiDonato, D; Brasaemle, D. *Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy*. J Histochem Cytochem 2003; 51 (6): 773-780.
- Gaietta, G; Giepmans, B; Deerinck, T; Smith, B; Ngan, L; Llopis, J; Stephen, A; Tsien, R; Ellisman, M. *Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy*. Proc Nat Acad Sci 2006. 103 (47): 17777-17782.
- Giepmans, B. *Bridging fluorescence microscopy and electron microscopy*. Histochem Cell Biol 2008. 130: 211-217.
- Hammerschmidt S; *Lung cancer: current diagnosis and treatment*. Dtsch Ärztebl Int 2009. 106(49): 809-20.

- Haugland, R. *Handbook of fluorescent probes and research products*. USA, Molecular Probes 2002; p 1-5.
- INEGI/Secretaria de Salud. Dirección General de Información en salud. CONAPO, 2002. Proyecciones de la población en México, 2000-2050.
- Jordan, M. A.; Wilson, L. *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nat Rev Cancer 2004. 4: 253-265.
- Lefevre, E; Carr, V; Prentice, H. *A quantitative assessment of primary and secondary immune responses in cattle using a B cell ELISPOT assay*. INRA, EDP Sciences 2008; 40 (3): 1-13.
- Odendahl, M; Mei, H; Annett, H; Hansen, A; Muehlinghaus, G; Berek, C; Hiepe, F. *Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response*. Blood 2005; 105 (4): 1614-1621.
- Padilla, T. *Estudio de la respuesta inmune primaria y secundaria en el ratón a antígenos de células de adenocarcinoma pulmonar humano (línea A-549)*. Estancias Profesionales Tuteladas, Facultad de Química, Semestre 2008-1, UNAM.
- Palm, N; Medzhitov, R. *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev 2009; 227: 221-233.

- Riffle, M; Davis, TN. *The yeast resource center public image Repository: A large database of fluorescence microscopy images.* BMC Bioinformatics 2010. 19: 263.
- Sandoval V., N.C. *Determinación de la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en células tumorales y el receptor PD-1 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.* Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, 2009. p 61.
- Waters, JC. *Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy.* J Cell Biol 2009. 185 (7): 1135-48.
- Zaal, KJ; Smith, CL; Polishchuk, RS; Altan, N; Cole, NB; Ellenberg, J; Hirschberg, K; Presley, JF; Roberts, TH; Siggia, E; Phair, RD; Lippincott-Schwartz, J. *Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis.* Cell 1999. 99 (6): 559-562.
- Zinchuk, V; Zinchuk, O; Okada, T. *Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena.* Histochem Cytochem 2007. 40 (4): 107-111.

APÉNDICE

1. Soluciones para cultivo y lisis celular

1.1 Medio RPMI-1640

En un vaso de precipitados colocar 900 mL de agua desionizada, agregar 2 g de NaHCO_3 y agitar. Posteriormente agregar un frasco de medio RPMI-1640 (Contenido en mg/L: 400 KCl, 48.84 MgSO_4 , 6000 NaCl, 800 Na_2HPO_4 , 2000 glucosa, 1 Glutación, 5 Rojo de fenol, 200 L-arginina, 50 L-asparagina, 20 L-ácido aspártico, 65 L-cistina, 20 L-ácido glutámico, 300 L-glutamina, 10 L-glicina, 15 L-histidina, 20 L-hidroxiprolina, 50 L-isoleucina, 50 L-leucina, 40 L-lisina, 15 L-metionina, 15 L-fenilalanina, 20 L-prolina, 30 L-serina, 20 L-treonina, 5 L-triptofano, 29 L-tirosina, 20 L-valina, 0.2 Biotina, 1 ácido fólico, 35 inositol, 1 niacinamida, 1 ácido para-aminobenzóico, 0.005 Vitamina B_{12} , 0.2 Riboflavina y 1 tiamina), agitar agitar hasta disolver, ajustar a pH 7.3. Llevar al aforo en un matraz y esterilizar a través de filtración.

1.2 Medio DMEM

En un vaso de precipitados colocar 900 mL de agua desionizada. Posteriormente agregar un sobre de medio DMEM (Contenido en mg/L: 264 CaCl_2 , 0.1 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 400 KCl, 200 MgSO_4 , 6400 NaCl, 3700 NaHSO_3 , 141 NaH_2PO_4 , 4500 D-glucosa, 15 Rojo de fenol, 110 Piruvato sódico, 84 L-arginina, 48 L-cistina, 584 L-glutamina, 30 glicina, 42 L-histidina, 105 L-isoleucina, 105 L-leucina, 146 L-lisina, 30 L-metionina,

68 L-fenilalanina, 42 L-serina, 95 L-treonina, 16 L-triptófano, 72 L-tirosina, 94 L-valina, 4 ácido fólico, 7.2 inositol, 4 nicotinamida, 4 ácido para-aminobenzóico, 0.4 Riboflavina, 4 Tiamina), agregar 3.2 g de NaHCO_3 y agitar.

1.3 Amortiguador de lisis

20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM NaOH, 1mM EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), 1mM EGTA (Ácido etilenglicol tetracético), 1% Tritón X-10

2. Preparación de geles para para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

	GEL SEPARADOR		GEL CONCENTRADOR	
	15%		6%	
Acrilamida (apéndice, sección 3.4)	5 mL		1 mL	
Amortiguador (apéndice, sección 3.6, 3.8 respectivamente)	1.5 M pH 8.8	2.5 mL	0.5 M pH 6.8	1.25 mL
Agua destilada	2.4 mL		2.7 mL	
SDS 10% (apéndice, sección 3.2)	100 µL		50 µL	
TEMED	6 µL		10 µL	
Persulfato de amonio (apéndice, sección 3.3)	70 µL		50 µL	

3. Soluciones para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y *Western blot*

3.1 Amortiguador de fosfato salino (PBS 10X)

En un vaso de precipitado disolver 21.29 g de Na_2HPO_4 anhidro y 87.67 g de NaCl en 800 mL de agua desionizada. Por separado en un vaso de precipitado disolver 2.07 g de Na_2HPO_4 anhidro y 8.76 de NaCl con 100 mL de agua desionizada. Mezclar las dos soluciones, ajustar el pH a 7.3 y llevar a un volumen final de 1100 mL.

3.2 Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Pesar 10 g de SDS y disolver en 100 mL de agua destilada.

3.3 Persulfato de amonio (10%)

Pesar 0,1 g de Persulfato de amonio y disolver en 1 mL de agua destilada, dejar congelado y usarse a temperatura ambiente.

3.4 Solución monomérica (acrilamida)

Pesar 60 g de acrilamida y 1.6 g de bisacrilamida, disolver en 200 mL de agua destilada, conservar a 4°C en la oscuridad.

3.5 Gel separador (15%)

En un tubo cónico de 10 mL estéril, adicionar 5 mL de acrilamida, 2.5 mL de buffer (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8), 2.4 mL de agua desionizada, 100 µL de SDS (10%) y por último se adicionan 50 µL de persulfato de amonio y 6 µL de TEMED (invitrogen) hasta que la mezcla vaya a vaciarse a la cámara.

3.6 Amortiguador para el gel separador (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8)

Pesar 36.3 g de Tris, adicionar 150 mL de agua desionizada hasta obtener una completa disolución, ajustar a pH 8.8 y adicionar 200 mL de agua desionizada.

3.7 Gel concentrador (6%)

En un tubo cónico de 10 mL estéril, adicionar 1 mL de acrilamida, 1.25 mL de buffer (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8), 2.7 mL de agua desionizada, 50 µL de SDS (10%) y por último se adicionan 25 µL de persulfato de amonio y 5 µL de TEMED hasta que la mezcla vaya a vaciarse a la cámara.

3.8 Amortiguador para el gel concentrador (0.5 M Tris-Cl pH 6.8)

Pesar 3.0 g de Tris, adicionar 40 mL de agua desionizada hasta obtener una completa disolución, ajustar a pH 6.8 y adicionar 50 mL de agua desionizada

3.9 Amortiguador de tanque (0.025 M Tris, 0.0192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3)

Pesar 3.028 g de Tris, 14.413 g de glicina, 1 g de SDS y disolver en 1 L de agua destilada

3.10 Amortiguador de transferencia

Pesar 1.5 g de Tris, 7.2 g de glicina, posteriormente disolver en 100 mL de metanol y 400 mL de agua destilada.

4. Obtención del volumen óptimo del buffer de lisis para obtener la concentración óptima de proteína de lisado de A-549

Tabla 4. Volúmenes de amortiguador de lisis, para la obtención de la concentración óptima de proteína.

Nº de células/mL	1×10^5	1×10^5	1×10^5	1×10^6	1×10^6	1×10^6
Volumen (μ L) de buffer de lisis	1000	500	250	1500	1000	500
Absorbancia (nm)	0.349	0.476	0.477	0.386	0.412	0.807
[proteína] (μ g/mL) (dil 1:10)	46.778	63.711	63.800	51.711	55.089	108.714
[proteína] (μ g/mL)	467.778	637.111	638.000	517.111	550.889	1087.143

En la tabla 3 se puede observar que el volumen óptimo del buffer de lisis es de 500 μ L ya que es donde se obtiene la mayor concentración de proteína de lisado de A-549.

5. Preparación de los reactivos para la determinación de la concentración total de proteínas, método del ácido bicinconínico.

Se utiliza un kit comercial (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, N°cat IL116702). Preparación de los reactivos:

- Reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tartrato de sodio en NaOH 0.2 N)
- Reactivo B (ácido bicinconínico al 4%)
- Reactivo C (Sulfato cúprico pentahidratado al 4%)

Para 50 mL de muestra proteica se utilizan 25 mL de reactivo A

Para 50 mL de muestra proteica se utilizan 24 mL de reactivo B

Para 50 mL de muestra proteica se utiliza 1 mL de reactivo C

6. Obtención de la curva patrón para la determinación de la concentración de proteína de lisados de células A-549 y B16 por el método de BCA.

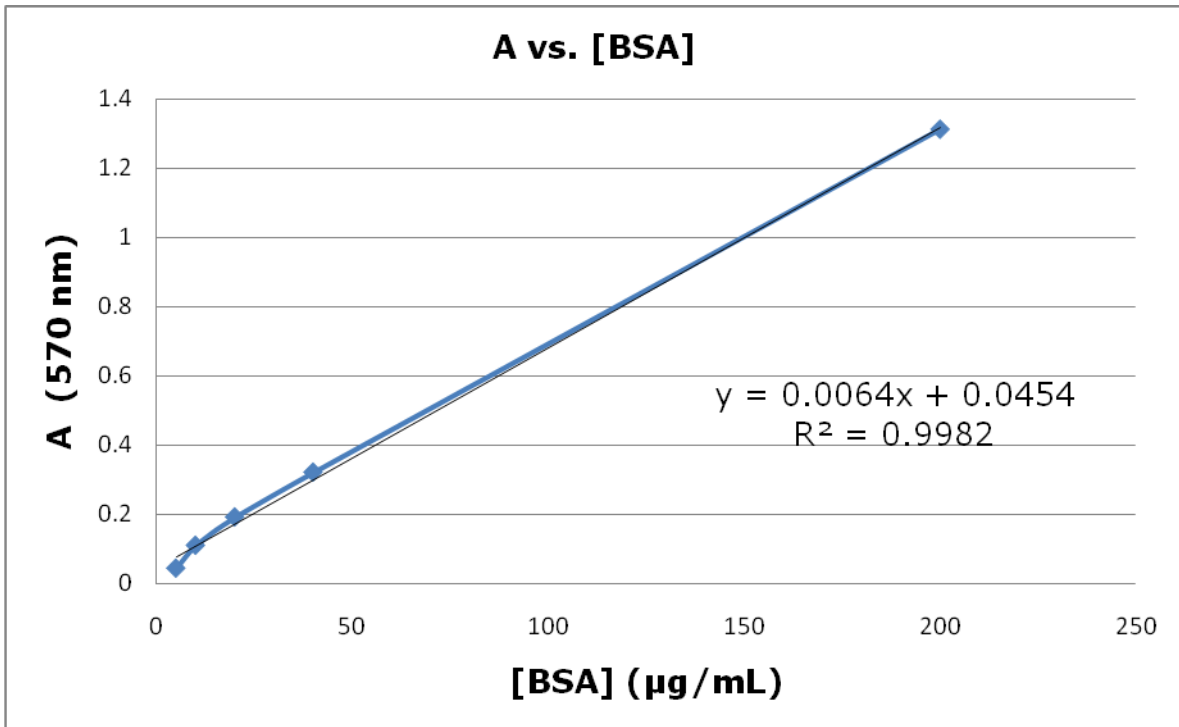


Figura 20. Curva patrón utilizada para la obtención de la concentración de proteína.

En el gráfico obtenido se observa un coeficiente de correlación igual a 0.99.

7. Titulación de la mezcla de suero inmune (anticuerpo primario) para la inmunolocalización de antígenos inmunodominantes de las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano

1 Sin anticuerpo primario	2 Suero no inmune	3 Suero inmune Dil. 1:1000	4 Suero inmune Dil. 1:2000
5 Sin anticuerpo primario	6 Suero no inmune	7 Suero inmune Dil. 1:1000	8 Suero inmune Dil. 1:2000

Figura 21. Representación esquemática de la titulación de la mezcla de suero inmune para la inmunolocalización una placa Lab-Tek II Chamber Slide System.