



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISPOT PARA
LA DETECCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE
ANTICUERPOS IgG E IgA EN TEJIDOS PORCINOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N
ALIN ILINIZA LINARES TORRES
ERICK SAÚL SÁNCHEZ SALGUERO

ASESOR:
Dr. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS
Estandarización de la técnica de Elispot para la detección de células productoras de anticuerpos IgG e IgA en tejidos porcinos.

Que presenta la pasante: Alin Iliniza Linares Torres

Con número de cuenta: 40700700-2 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de marzo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Vega López	
VOCAL	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
SECRETARIO	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
1er SUPLENTE	QFB. Ladislao Palomar Morales	
2do SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE
CÉLULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS IgG E IgA EN TEJIDOS PORCINOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Estandarización de la técnica de Elispot para la detección de células productoras de anticuerpos IgG e IgA en tejidos porcinos.

Que presenta el pasante: **Erick Saúl Sánchez Salguero**

Con número de cuenta: **30281864-6** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de marzo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Vega López	
VOCAL	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
SECRETARIO	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
1er SUPLENTE	QFB. Ladislao Palomar Morales	
2do SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Este proyecto fue parcialmente financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con los números de los proyectos ICYTDF/267 e ICYTDF/323.

Responsable del proyecto Dr. Marco Antonio Vega López.

“Los que lo saben vienen del gran linaje de nosotros, los hombres mayas. Esos sabrán el significado de lo que hay aquí cuando lo lean. Y entonces lo verán y entonces lo explicarán y entonces serán claros los oscuros signos del katún...”

Chilam Balam. Fragmento

"Luz os es dada tanto para el bien como para la malicia"

Dante Alighieri. La Divina Comedia. Purgatorio

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor, el PhD. Marco Antonio Vega López, por brindarnos la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por los conocimientos compartidos, su confianza y guía en el desarrollo de esta tesis.

A la Biól. María del Carmen Ramírez Estudillo por el apoyo y enseñanza dedicados para el desarrollo de las técnicas experimentales en el bioterio y en el laboratorio.

Al M. en C. Edgar Rodrigo Guzmán Bautista y al M. en C. Ángel de Jesús Balam May por la experiencia y consejos que enriquecieron este trabajo.

Queremos agradecer al resto de los integrantes del laboratorio 5 Inmunobiología de las Mucosas del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV del IPN. Al Técnico Oscar Iván Rojas Gómez, a los Q.F.B. Alicia Laura Gama Espinosa, Carlos Emilio García Ruiz e Iván Salinas Zacarías y al pM.V.Z. Victor Alfonso García Osnaya por el apoyo y consejos brindados durante el trabajo experimental.

Al M.VZ. Manuel Flores Cano y al M.V.Z. Daniel Cortés por su apoyo en el manejo y cuidado de los animales en el bioterio. De igual manera, agradecemos al resto del personal de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV del IPN.

A nuestros profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que nos transmitieron sus conocimientos a lo largo de toda nuestra formación universitaria.

Con admiración y cariño, agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra *alma mater*.

Gracias

A Dios.

A mis padres, Vicky Torres y Oscar Linares por ser mi fundamento, por darme su amor, confianza y apoyo incondicional.

A mis hermanos, Ixchel y Manuel por las enseñanzas y consejos.

A Mamá Eva por su cariño, apoyo y lecciones de vida.

A mi *sis* Thalía y mi *bro* Ness por caminar y crecer junto a mí, por escucharme y apoyarme siempre en momentos complicados.

A mis compañeros del laboratorio Inmunobiología de las Mucosas, por la experiencia y los “grandes momentos” que pase con ustedes.

A mis profesores y compañeros de la FES Cuautitlán, por el conocimiento y las vivencias compartidas durante la carrera.

A *Chelito* por su amistad y compañerismo durante todo este tiempo, en verdad ha sido un placer trabajar y convivir contigo.

Y a todas las personas que formaron parte de mi vida, por el aprendizaje y crecimiento personal que han dejado tras de sí.

Alin Iliniza Linares Torres

A mis padres Saúl Sánchez Castro e Isabel Salguero Rubio

Porque desde siempre han sido la base de mi formación personal y profesional, ya que sin ustedes nunca hubiera llegado hasta aquí. Por su sacrificio, dedicación, entrega y cariño en cada día de mi vida.

A mi hermano Christian Omar Sánchez Salguero

Por tu apoyo, tu compañerismo, las enseñanzas que me has brindado y por todas las vivencias que has compartido conmigo. Te quiero Chris.

A mi novia Alma Rosa Alonso Zúñiga

Por tus consejos, tu cariño, tu compromiso y porque siempre has creído en mi. Pero sobre todo, porque te has convertido en una parte muy importante de mi vida. Te amo Alma.

A todos los miembros de mi familia

Porque aunque estén lejos o cerca, siempre me han brindado sus enseñanzas y apoyo a lo largo de mi vida.

A mi compañera de tesis Alin Iliniza Linares Torres

Por toda la odisea que conllevó el trabajo experimental y escritura del presente trabajo. Gracias por ser mi compañera de carrera y ser parte de esta tesis.

Este trabajo lo dedico especialmente a la memoria de Quintila Castro López, María Enriqueta Rubio Otero, Sofía Castro López y Publio González González, porque su cariño y ejemplo siempre están conmigo. ¡Donde quiera que se encuentren!

Erick Saúl Sánchez Salguero

RESUMEN

En México, durante el 2011, se registraron más de 21 millones de casos de enfermedades agudas relacionadas con la mucosa respiratoria, principalmente en personas de la tercera edad y en la población infantil, donde representa el 18% de muertes, estas cifras reflejan la importancia de estas patologías y justifican el estudio sistemático del tracto respiratorio, para el desarrollo racional de vacunas que generen protección efectiva en la mucosa. Los estudios de la respuesta inmunológica en la mucosa respiratoria paradójicamente son escasos y no incluyen el análisis de las células productoras de anticuerpos presentes en ese tracto, debido, entre otras cosas, a que se requieren técnicas estandarizadas y probadas que generen datos confiables y reproducibles.

La técnica de ELISPOT, cuyo fundamento está basado en el ELISA, fue introducida por Czerkinsky en 1983 para la detección y conteo de células productoras de, citocinas y anticuerpos. La técnica de ELISPOT no ha sido aplicada, específicamente, en la detección de células productoras de anticuerpos (AbPC) en pulmón de cerdo, el que, por sus características, es un modelo que ofrece ventajas sobre los roedores, utilizados habitualmente en estudios inmunológicos.

El presente trabajo consistió en la estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA en pulmón, en sangre y en ganglio linfático porcinos, evaluando diferentes condiciones, tales como: elaboración de placas dentro del laboratorio, la comparación del conteo manual con el automatizado, el ajuste del número de células utilizadas en las determinaciones, el uso de dos técnicas de detección de AbPC-IgA, el efecto del cultivo de células estimuladas *in vitro*, contra la detección directa y, finalmente, la necesidad de semipurificar a las poblaciones celulares de interés, utilizando gradientes discontinuos de densidad.

La técnica estandarizada de ELISPOT, para detectar AbPC-IgG y AbPC-IgA en mucosas, permitirá estudiar mejor la respuesta inmunológica ante la vacunación e infecciones de interés clínico



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ÍNDICE GENERAL.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Generalidades del sistema inmunitario	2
Anatomía del sistema inmunitario.....	2
Desarrollo, maduración y activación de linfocito B.....	3
Características de la célula plasmática	5
Propiedades de los anticuerpos	5
IgG	6
IgA	6
SISTEMA INMUNITARIO EN TEJIDOS MUCOSALES	8
Mucosas.....	8
MALT	8
Mucosa respiratoria.....	10
MODELO EXPERIMENTAL	12
Características del cerdo.....	12
ANTECEDENTES DE ELISPOT.....	13
Placa hemolítica	13
ELISA	15
ELISPOT.....	17
Historia.....	17
Fundamento.....	17
Características del ensayo	18
Sensibilización, bloqueo y lavado.....	20
Enzimas	21
Análisis de resultados y conservación de las membranas	23
Aplicaciones.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25



HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS	26
Objetivo general	26
Objetivos particulares.....	26
DISEÑO EXPERIMENTAL	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Animales experimentales	28
Protocolo de inmunización.....	28
ELISA cuantitativo de suero y secreciones mucosales	29
Muestras de mucosas y suero	29
Preparación de placas de ELISPOT	30
Cinética de detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA en sangre por ELISPOT.....	31
Días de sangrados para cinética en sangre por ELISPOT	31
Sangrados	31
Técnica de ELISPOT para detección de AbPC-IgG en sangre	31
Técnica de ELISPOT para detección de AbPC-IgA en sangre	37
Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA totales y específicas en pulmón	40
Distribución de los sacrificios	40
Obtención y procesamiento de órganos	41
Pulmón	41
Ganglio linfático.....	42
ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES EN ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE AbPC-IgA EN PULMÓN	43
Proceso de revelado IgA con Ab secundario.....	44
Proceso de revelado IgA sin Ab secundario.....	44
SEMIPURIFICACIÓN DE CÉLULAS POR GRADIENTE DE PERCOLL	45
RESULTADOS	46
Monitoreo del protocolo de inmunización mediante la cuantificación de IgG e IgA en suero y secreciones mucosales por ELISA	46
Condiciones para la elaboración de las placas de ELISPOT.....	48
Prueba de placas elaboradas por cinética de ELISPOT para la detección AbPC en sangre de animales inmunizados	49
Comparación del método de conteo manual y el automático bajo las condiciones de uso de las placas de ELISPOT	52



ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE
CÉLULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS IgG E IgA EN TEJIDOS PORCINOS



Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG totales y antiOVA en pulmón de cerdo	57
Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo	63
DISCUSIÓN	79
Monitoreo del protocolo de inmunización por ELISA en suero y secreciones mucosales	79
Condiciones para la elaboración de las placas de ELISPOT	81
Prueba de las placas elaboradas en el laboratorio para la detección de AbPC en sangre de animales inmunizados por ELISPOT	82
Métodos de conteo manual y automático bajo las condiciones de uso de las placas de ELISPOT elaboradas	85
Detección del número de AbPC-IgG y AbPC-IgA en sangre por la técnica de ELISPOT en grupo de cerdos inmunizados con OVA	86
Detección de AbPC-IgG totales y antiOVA en ganglio linfático por ELISPOT	88
Detección de AbPC-IgA totales y antiOVA en ganglio linfático por ELISPOT	88
Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo.....	89
CONCLUSIONES	96
PERSPECTIVAS.....	97
ANEXO.....	97
Soluciones estériles para ELISPOT	97
Soluciones no estériles para ELISPOT	100
Soluciones para ELISA	101
REFERENCIAS	103



LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo (del inglés, <i>Antibody</i>)
AbPC	Células productoras de anticuerpos (del inglés, <i>Antibody producing cells</i>)
ACF	Adyuvante Completo de Freund
AEC	3-amino-9-etilcarbazol
AIC	Adyuvante Incompleto de Freund
Ag	Antígeno
AP	Fosfatasa alcalina (del inglés, <i>Alkaline Phosphatase</i>)
APC	Célula presentadora de antígeno (del inglés <i>Antigen Presenting Cell</i>)
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios (del inglés, <i>Bronchial Associated Lymphoid Tissue</i>)
BCIP	sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BCR	Receptor de linfocito B (del inglés, <i>B Cell Receptor</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
c.b.p.	Cuanto baste para
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
ConA	Concanavalina A
DAB	3,3'-diaminobencidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés, <i>Desoxirribonucleic acid</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ELISPOT	Ensayo por inmunomancha ligado a enzimas (del inglés, <i>Enzyme-Linked Immunospot Assay</i>)
FCS	Suero fetal bovino (del inglés, <i>Fetal Calf Serum</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés, <i>Horseradish Peroxidase</i>)
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IN	Intranasal
KLH	Hemocianina de lapa ojo de cerradura (del inglés <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>)
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (del inglés, <i>Mucosal Associated Lymphoid</i>)



ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE
CÉLULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS IgG E IgA EN TEJIDOS PORCINOS



	<i>Tissue</i>)
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex I</i>)
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex II</i>)
NALT	Tejido Linfoide Asociado a Nasofaringe (del inglés, <i>Nasopharinx Associated Lymphoid Tissue</i>)
NBT	Nitroazul de tetrazolio (del inglés, <i>nitro-blue tetrazolium</i>)
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Amortiguador de Fosfatos Salino (del inglés, <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PFC	Células formadoras de placa (del inglés, <i>Plaque Forming Cells</i>)
pIgR	Receptor polimérico de inmunoglobulinas (del inglés, <i>polymeric Ig Receptor</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés, <i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i>)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (del inglés, <i>Polyvinylidene fluoride</i>)
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (en inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
SC	Subcutánea
SIgA	IgA secretoria (del inglés, <i>secretory IgA</i>)
SPF	Libres de patógenos específicos (del inglés, <i>Specific pathogen free</i>)
SRBC	Eritrocitos de oveja (del inglés, <i>Sheep Red Blood Cells</i>)
SSF	Solución salina fisiológica
Th1	Linfocito T cooperador clase 1
Th2	Linfocito T cooperador clase 2
TLCK	Clorhidrato de Na-tosyl-L-lisina clorometil cetona (del inglés, <i>Na-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride</i>)
TLRs	Receptores tipo “herramienta” (del inglés, <i>Toll-like receptors</i>)
TMB	3,3',5,5' tetrametilbencidina
TPCK	N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (del inglés, <i>N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone</i>)
UPEAL-CINVESTAV	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV
VEA	Virus de la Enfermedad de Aujeszky



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras generales de los cinco principales isotipos de inmunoglobulinas	7
Figura 2. Fisiología general de los sitios inductores y efectores en la respuesta inmunológica de las mucosas	10
Figura 3. Fundamento de la técnica de Cuningham para el ensayo de placa hemolítica.	14
Figura 4. Variantes de la técnica de ELISA	15
Figura 5. Procedimiento general de la técnica de ELISPOT	19
Figura 6. Diseño experimental	27
Figura 7. Diseño de placa para ELISA cuantitativo	30
Figura 8. Diseño de placa para cultivo celular de 20 horas. s/e (sin estimular) o testigo negativo en amarillo, ConA (concanavalina A) o testigo positivo en rojo y OVA (ovoalbúmina) en azul.	33
Figura 9. Diseño de placa para la detección de AbPC-IgG totales y antiOVA por ELISPOT	36
Figura 10. Representación esquemática del revelado de ELISPOT sin Ab secundario para la detección de AbPC-IgG totales y antiOVA	37
Figura 11. Diseño de placa para la detección de AbPC-IgA totales y antiOVA por ELISPOT	39
Figura 12. Representación esquemática del revelado de ELISPOT con Ab secundario para la detección de AbPC-IgA totales y antiOVA	40
Figura 13. Diseño experimental para las pruebas de estandarización de ELISPOT en la detección de AbPC-IgA en pulmón	43
Figura 14. Diseño experimental para la semipurificación de células de pulmón con Percoll	45
Figura 15. Monitoreo del protocolo de inmunización por cuantificación de anticuerpos séricos IgG e IgA antiOVA mediante ELISA cuantitativo	47
Figura 16. Monitoreo del protocolo de inmunización por cuantificación de anticuerpos en secreción nasal y saliva IgG e IgA antiOVA mediante ELISA cuantitativo	48
Figura 17. Fotografías representativas de cultivos celulares de 20 horas de PBMC con diferentes estímulos	50
Figura 18. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG en sangre de cerdos inmunizados con OVA	51
Figura 19. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en sangre de cerdos inmunizados con OVA	52
Figura 20. Métodos de conteo de manchas en membranas reveladas de ELISPOT mediante el uso de <i>Image J</i> ®	53
Figura 21. Comparación estadística entre técnicas de conteo manual y automático en membranas de pozos testigo y con todo	54
Figura 22. Cinética de células formadoras de mancha de AbPC-IgG total y antiOVA en sangre a lo largo del protocolo de inmunización en grupo OVA determinadas por ELISPOT	56
Figura 23. Cinética de células formadoras de mancha de AbPC-IgA total y antiOVA en sangre a lo largo del protocolo de inmunización en grupo OVA determinadas por ELISPOT	57
Figura 24. Comparación estadística de la cantidad de células no adherentes de ganglio linfático y pulmón de cerdos	58
Figura 25. Comparación estadística de la cantidad de células no adherentes de ganglio linfático y pulmón de cerdo, cosechadas en las diferentes condiciones de cultivo.	59
Figura 26. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG en ganglio linfático de cerdos inmunizados con OVA	60
Figura 27. Células productoras de IgG totales y antiOVA en ganglio linfático de cerdos inmunizados determinadas por ELISPOT	61



Figura 28. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG en pulmón de cerdos inmunizados con OVA.....	62
Figura 29. Células productoras de IgG totales y antiOVA en pulmón de cerdos inmunizados, determinadas por ELISPOT	63
Figura 30. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en ganglio linfático de cerdos inmunizados con OVA.....	64
Figura 31. Células productoras de IgA totales (A) y antiOVA (B) en ganglio linfático de cerdos inmunizados, determinadas por ELISPOT	65
Figura 32. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en pulmón de cerdos inmunizados con OVA.....	66
Figura 33. Ejemplo de conteo por estimados determinando áreas y su comparación estadística en membranas correspondientes a la detección de AbPC en sangre.....	67
Figura 34. Ejemplo del conteo por estimados en membrana para la detección de AbPC- IgA en pulmón.....	68
Figura 35. Células productoras de IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdos inmunizados, determinadas por ELISPOT	69
Figura 36. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la respuesta con 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica con anticuerpo secundario.....	70
Figura 37. Células productoras de IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta entre 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica con anticuerpo secundario.....	71
Figura 38. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la respuesta en 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica sin anticuerpo secundario.....	72
Figura 39. Células productoras de IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta entre 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica sin anticuerpo secundario.....	73
Figura 40. Células productoras de IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta de 400 000 células por pozo por técnicas con y sin anticuerpo secundario	74
Figura 41. Fotografías de membranas representativas de ELISPOT para AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la respuesta en 200 000 y 400 000 células no estimuladas <i>in vitro</i> por técnica sin anticuerpo secundario.....	75
Figura 42. Células productoras de IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta de 200 000 y 400 000 células estimuladas y no estimuladas <i>in vitro</i> por técnica sin anticuerpo secundario.....	76
Figura 43. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la repuesta de 400 000 células por técnica sin anticuerpo secundario semipurificadas con Percoll y sin semipurificación.....	77
Figura 44. Células productoras de IgA totales en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta detectada en células semipurificadas con Percoll y sin semipurificación. 78	



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones establecidas para la elaboración y esterilización de las placas de ELISPOT desarrolladas en el laboratorio	49
Tabla 2. Valores y desviaciones obtenidos en repeticiones de conteo manual en membranas de pozos testigo y con todo en ELISPOT para la detección de AbPC en sangre de cerdos inmunizados	55



INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico procesa antígenos que ingresan al organismo por medio del sistema inmunitario interno y externo. El sistema inmunitario interno defiende al organismo cuando los antígenos logran evadir al sistema inmunitario externo, a través de la inmunidad celular y humoral, mediadas por células citotóxicas, linfocitos B y células plasmáticas (Abbas y col., 2002; Vega-López y col., 2012). El sistema inmunitario externo se encarga de llevar a cabo la exclusión inmunológica (dada principalmente por IgA secretoria -SIgA-) y se compone del Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT).

Las superficies mucosas son barreras delgadas y permeables al interior del cuerpo que realizan funciones fisiológicas como intercambio de gases (vías respiratorias) y absorción (tracto gastrointestinal). La mucosa respiratoria es uno de los sitios de mayor exposición al medio ambiente, es por ello que resulta de gran interés estudiar sus mecanismos de protección, así como conocer si los anticuerpos presentes en este tejido son producidos a nivel local o sistémico (Vega-López y col., 2012), por ello es necesario contar con una técnica que detecte AbPC en tejidos y no solo anticuerpos presentes en las secreciones mucosales.

El ELISPOT (del inglés *Enzyme-Linked Immunospot Assay*) emplea el principio del ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) *sandwich* (Czerkinsky y col., 1983; Kemeny, 1997) y detecta las AbPC. Esta técnica se ha empleado para realizar pruebas en tejido sanguíneo. Sin embargo, no se cuenta con suficiente información de tejido pulmonar y debido a las complicaciones éticas que representa la experimentación en humanos, se utiliza un modelo experimental porcino que presenta un sistema inmunitario similar al humano (posee una estructura ganglionar parecida al Anillo de Waldeyer, no tiene NALT (del inglés *Nasopharynx Associated Lymphoid Tissue*) y el BALT (del inglés *Bronchial Associated Lymphoid Tissue*) no es constitutivo). Por tales motivos, se requiere contar con una técnica estandarizada de ELISPOT para la detección de AbPC en pulmón porcino ya que su aplicación facilitará el estudio de mejores tratamientos terapéuticos y profilácticos.



ANTECEDENTES

Generalidades del sistema inmunitario

La inmunidad es el conjunto de reacciones y mecanismos que monta el organismo frente a sustancias dañinas tales como partículas, microorganismos y toxinas; mediante complejos procesos celulares y moleculares. Está regulada por el sistema inmunitario, cuyas principales funciones son la protección, vigilancia y mantenimiento de homeostasis en el cuerpo (Abbas y col., 2002; Vega-López y col., 2012).

El organismo se defiende de diversos antígenos mediante una respuesta innata y/o una respuesta adaptativa. La respuesta innata está constituida por mecanismos de resistencia previos a la infección, como barreras físicas y químicas de epitelios, células fagocíticas, dendríticas y granulocitos, que activan y facilitan la intervención de los mecanismos específicos de activación y regulación conocidos como respuesta adaptativa, que comprende mecanismos específicos, capaces de generar memoria inmunológica y aumentar la afinidad tras cada exposición con el antígeno. Existen dos tipos de respuesta inmunitaria: celular, efectuada y regulada por linfocitos T citotóxicos y T cooperadores (Th1 o Th2) y humoral, realizada por linfocitos B que se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Ab). Siendo esta última, el principal mecanismo de defensa frente a antígenos extracelulares y toxinas (Abbas y col., 2002; Talamás, 2010; Vega y col., 2012).

Estas poblaciones celulares del sistema inmunitario están presentes, en condiciones normales, como células circulantes en sangre y linfa o dispersas en los tejidos del cuerpo. Sin embargo, su presencia puede ser modificada como respuesta a la inmunización o interacción con el antígeno (Bonilla y Oettgen, 2010).

Anatomía del sistema inmunitario

Los órganos linfoides primarios en los mamíferos son la médula ósea y el timo (Bianchi y col., 1992; Rothkötter, 2009; Bonilla y Oettgen, 2010), los secundarios comprenden a los



ganglios linfáticos, bazo, sistema inmunitario cutáneo y de las mucosas (Waldman y Henney, 1971; Vega-López y col., 2012), donde se lleva a cabo la interacción con el antígeno, activación, proliferación y diferenciación de linfocitos. Estos órganos están conectados por medio de vasos sanguíneos y linfáticos, facilitando la recirculación de células de respuesta inmunológica, linfocitos activados, transporte de antígenos, anticuerpos y proteínas (Binns, 1982).

Desarrollo, maduración y activación de linfocito B

La ontogenia de los linfocitos B inicia con las células pro-B, éstas no producen inmunoglobulinas (Ig), sin embargo expresan marcadores como CD19 y CD10. La célula pre-B representa el siguiente estadio, donde se producen cadenas pesadas μ citoplasmáticas que pueden asociarse a cadenas ligeras sustitutivas (similares a las cadenas κ y λ , pero no poseen regiones variables) dando lugar al receptor de célula pre-B. Este receptor es esencial para estimular la proliferación y maduración de las células B (Abbas y col., 2002; Butler y col., 2006; Bonilla y Oettgen, 2010). La célula B madura expresa entonces IgM e IgD en su membrana y abandona la médula ósea para poblar tejidos linfoides y diferenciarse en subtipos B1 y B2. El linfocito B1 se caracteriza por ser una pequeña población CD5+ que prevalece en las cavidades peritoneal y pleural, así como en bazo a edades tempranas. Expresa niveles altos de IgM y bajos de IgD en su membrana. Su principal función es la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos bacterianos no proteicos, como polisacáridos, fosfatidilcolina y lipopolisacáridos. Son capaces de expandirse sin tener contacto con antígenos foráneos y producen grandes cantidades de anticuerpos IgM inespecíficos, denominados anticuerpos naturales. Cabe destacar que gran parte de la SIgA presente en las mucosas proviene de la activación de linfocitos B1 por bacterias comensales (Geffner y Fainbom, 2008; Baumgarth, 2011). Los linfocitos B2 constituyen más del 90% de los linfocitos B y su función principal es reconocer antígenos proteicos y diferenciarse en células productoras de anticuerpos específicos. Su desarrollo y maduración concluye con



dos estados transicionales T1 y T2, éste último se diferencia en linfocitos de recirculación o no recirculantes (Shapiro-Shelef y Calame., 2005; Radbruch y col., 2006).

El proceso de activación T-dependiente se inicia con la presentación del antígeno a linfocitos T, los cuales al activarse secretan citocinas. Estas citocinas en combinación con las señales del CD40 en el linfocito B estimulan la proliferación y diferenciación de las células B en AbPC.

El linfocito B tiene un importante papel en la relación entre la respuesta innata y adaptativa ya que puede comportarse como célula presentadora de antígeno (APC) reconociendo antígenos por medio del BCR, regula la expresión de moléculas coestimuladoras, así como la producción de citocinas y factores proinflamatorios (Viau y Zoulai, 2004). Este proceso es independiente de linfocito T, ya que no requiere el paso de activación por parte del linfocito T cooperador (Finke y Acha-Orbea, 2001).

Los linfocitos B activados pueden proliferar y diferenciarse, dependiendo del perfil de citocinas y estímulos del medio, en células de memoria o plasmablastos. Si se diferencian en células de memoria (CD20+ CD19+ CD27+ CD38-) pasan a centros germinales de ganglios y médula ósea donde se mantienen con estímulos externos a través del BCR, CD40 y TLR; tienden a ser más duraderos y por ello pueden responder rápidamente a una segunda exposición al antígeno (Alberts y col., 2004). Si proliferan y se convierten en plasmablastos (CD20- CD19+ CD27++ CD38++) pueden sobrevivir en circulación, ser reclutados en la mucosa o sitio efector para llevar a cabo su función como célula de vida corta o dirigirse a nichos dentro de la médula ósea y centros germinales, donde se diferencian en células plasmáticas de vida larga (Abbas y col., 2002; Butler y col., 2006; Jourdan y col., 2009; Bonilla y Oettgen, 2010).



Características de la célula plasmática

Las células plasmáticas representan la fase final de diferenciación de las células B y se encargan de producir anticuerpos, los cuales se encuentran en retículo endoplásmico, aparato de Golgi y expresados como proteínas integrales de membrana. Las células plasmáticas producen aproximadamente 10 000 Ab por segundo (Radbruch y col., 2006; Talamás, 2010). Estas moléculas pueden localizarse en plasma, secreciones mucosales y, en menor medida, en el líquido intersticial de los tejidos.

Durante los estadios iniciales de la respuesta inmunológica, el tiempo de vida de las células plasmáticas es muy corto, típicamente de 3 a 5 días (Radbruch y col., 2006). No obstante, siguiendo el proceso de maduración de la afinidad, las células plasmáticas pueden continuar viables y secretando altos niveles de anticuerpos entre 2 a 3 semanas después de la última interacción con el antígeno (Goldsby y col., 2003; Shapiro-Shelef y Calame, 2005). Los linfocitos B de memoria tienden a ser más duraderos y por ello pueden responder rápidamente a una segunda exposición al antígeno (Alberts, 2004; Radbruch y col., 2006). Las señales derivadas de las células T cooperadoras, incluidas las de CD40L y las citocinas, también inducen el cambio de isotipo en las células B mediante un proceso de recombinación, que conduce a la producción de los diferentes isotipos de Ig que regulan distintas funciones efectoras (Takahashi, 2007).

Propiedades de los anticuerpos

Los anticuerpos tienen una estructura básica simétrica compuesta de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas (compuestas por unidades homólogas repetidas de 110 aminoácidos conocidas como dominios) unidas por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras se componen de regiones variables (V) amino terminales y de regiones constantes (C) carboxi terminales. La región V de la cadena pesada consta de un dominio de Ig y la región C de la cadena pesada consta de tres o cuatro dominios de Ig. La región variable de una cadena pesada (V_H) se yuxtapone con la región V de una cadena ligera (V_L) para formar un sitio de



unión al antígeno. Las regiones C de las cadenas pesadas reaccionan con otras moléculas y células efectoras del sistema inmunitario y regulan la mayoría de las funciones biológicas de los anticuerpos (figura 1) (Vora y col., 1999; Abbas y col., 2002; Bluter y col., 2009).

IgG

La IgG es la clase más abundante en el suero (80 %) donde tiene un tiempo de vida media de 21-23 días (Russell y col., 1996; Abbas y col., 2002; Bluter y col., 2009). Está equilibrada entre los compartimientos intravasculares y extravasculares con lo que proporciona protección de tipo sistémica (Bouvet y Fischetti, 1999). Las cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) se diferencian por el tamaño de la región de la bisagra, por el número y posición de los enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas y en aminoácidos que afectan las funciones biológicas y efectoras de cada subtipo (figura 1). Como la activación del complemento (IgG3 > IgG1 > IgG2) y la opsonización (IgG1 > IgG3 > IgG4 en orden de eficacia) (Bouvet y Fischetti, 1999). La IgG puede ser transportada a través de barreras epiteliales intactas como la placenta en humanos, intestino neonatal de los roedores y de cerdos para la transferencia pasiva de inmunidad de la madre al feto. En la secreción en mucosas la subclase predominante es IgG1 (Plaut, 1972; Baba y col., 2000; Abbas y col., 2002; Bonilla y Oettgen, 2010).

IgA

La IgA tiene dos subtipos estructuralmente homólogos (IgA1 mayoritariamente en suero e IgA2 en secreciones mucosales). En general, la IgA abarca del 10-15 % de Ig en suero donde tiene un tiempo de vida media de 5-6 días (Russell y col., 1996; Pilette y col., 2001; Abbas y col., 2002). De esta proporción el 88 % es monomérica. En contraste, la IgA2 es el isotipo predominante en secreciones mucosales como leche, saliva, lágrimas, moco de vías bronquiales, intestinales y genitourinarias; en forma de IgA polimérica secretoria (SIgA) (Plaut, 1972; Bouvet y Fischetti, 1999; Baba y col., 2000; Goldsby y col., 2003).



La SIgA se integra como un dímero o tetrámero, una cadena J y un componente secretor (figura 1) (que proviene del receptor de inmunoglobulinas poliméricas -pIgR- encargado de transportar la Ig por membranas celulares por unión a la cadena J). La producción de IgA diaria en la luz de las mucosas es de 40 mg/kg de peso en el adulto, que equivale a una mayor cantidad comparada con la de todas las demás Ig juntas. Tiene un tiempo de vida media más prolongado que la IgG en secreciones mucosales por la estabilidad que le confiere la cadena J en la luz de la mucosa (Ogra y col., 2001; Goldsby y col., 2003; Bluter y col., 2009; Estes, 2010).

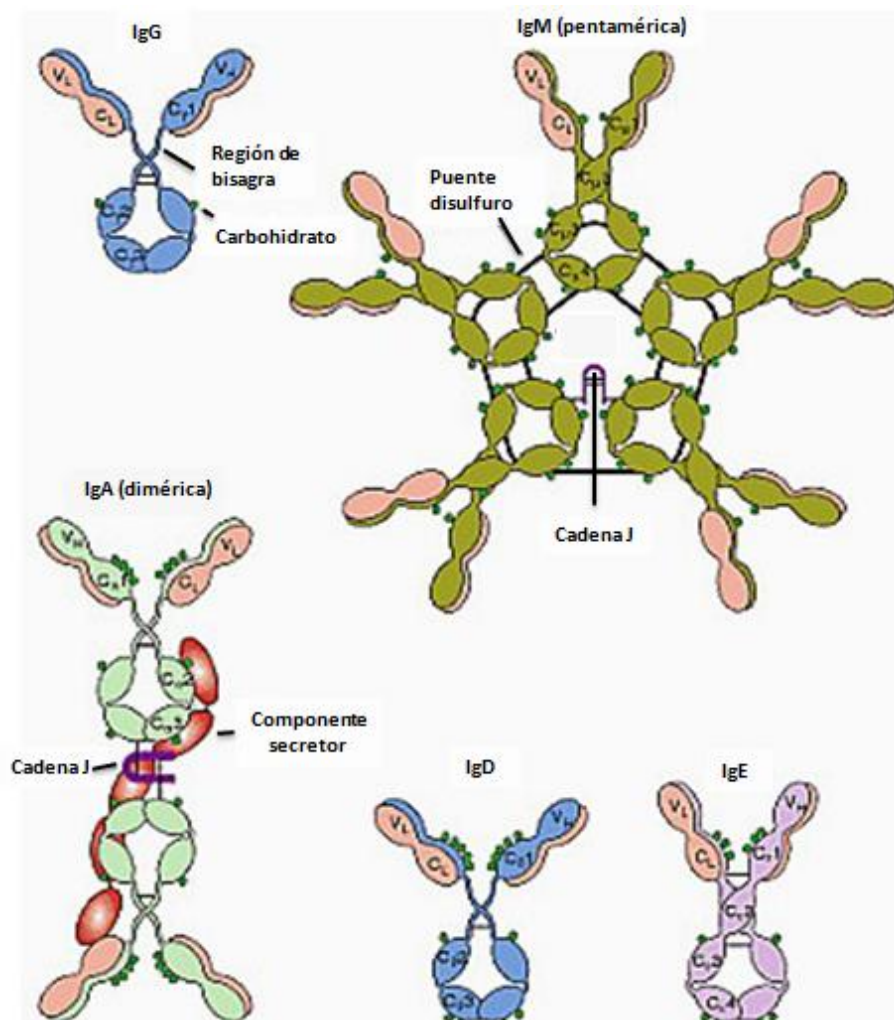


Figura 1. Estructuras generales de los cinco principales isotipos de inmunoglobulinas (Elgert, 2009).



SISTEMA INMUNITARIO EN TEJIDOS MUCOSALES

Mucosas

Las mucosas son la mayor superficie de contacto del cuerpo con el exterior, abarcan más de 400 m² y tienen una interacción constante con antígenos, partículas y toxinas. Una de las principales características de las mucosas es la presencia de elevados niveles de SIgA, la distribución delimitada de poblaciones de linfocitos T y B, la compartimentalización de la respuesta inmunológica, la generación de tolerancia por contacto constante con antígenos no patógenos como alimentos, fármacos, sustancias de excreción y gases así como la exclusión inmunológica de antígenos patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos. Esta función es caracterizada por la producción y liberación de anticuerpos secretores (SIgA y SIgM) a la luz de la mucosa (Brandtzaeg y col., 1999; Bailey y col., 2001; Dearman y col., 2001; Holmgren y col., 2003; Pilette y col., 2001; Kiyono y Fukuyama, 2004; Lefrançois y Puddington, 2006; Vega-López y col., 2012).

MALT

El Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) es un conjunto de estructuras especializadas con poblaciones de células bien delimitadas que están relacionadas con la protección y respuesta inmunitaria en los tejidos mucosales. Dependiendo del lugar anatómico y la mucosa con la cual se relacionen se dividen en: Tejido Linfoide Asociado a Nasofaringe (NALT) y Tejido Linfoide Asociado a Bronquios (BALT) en el tracto respiratorio y el Tejido Linfoide Asociado a Intestino (GALT) en el tracto gastrointestinal. Dependiendo de la función en la respuesta inmunológica, el MALT se divide en sitios inductores (placas de Peyer en intestino, BALT y el NALT en vías respiratorias) y sitios efectores (lamina propia intestinal, BALT y tracto respiratorio en general) (Bouvet y Fischetti, 1999; Kiyono y Fukuyama, 2004; Estes, 2010).

En los sitios inductores las células inexpertas son activadas mediante el reconocimiento y presentación antigénica. Los antígenos son endocitados por células especializadas en el



epitelio y transportados a la cara basolateral para ser procesados por APC y presentados a los linfocitos T y B. Los linfocitos B activados viajan por la linfa, atraviesan los ganglios linfáticos regionales y pasan a la sangre. Desde la circulación sanguínea regresan a los sitios efectores donde se distribuyen ampliamente y se diferencian a células plasmáticas especializadas en liberar inmunoglobulinas secretoras, que atraviesan la capa de células epiteliales y recubren la zona apical que da a la luz (figura 2). Allí, las inmunoglobulinas pueden interactuar con el antígeno que dio origen a la respuesta, el resto de los linfocitos B activados se diferencia *in situ* y las células plasmáticas pueden permanecer como células de memoria (Kiyono y Fukuyama, 2004).

A través de la cooperación con los factores de la respuesta innata, ambiente de citocinas y los anticuerpos producidos por las células plasmáticas de la mucosa, se impide la entrada de antígenos patógenos con una respuesta preferentemente no inflamatoria en la superficie epitelial (exclusión inmunológica). Los anticuerpos secretados contribuyen a esta función neutralizando al antígeno, sin embargo cuando la respuesta inmunitaria falla, los antígenos que lograron penetrar las barreras deben removerse desde la lámina propia. La eliminación inmunológica depende de anticuerpos producidos por respuesta sistémica o local y es sustituida por mecanismos proinflamatorios e incluso por la presencia de IgG que induce un daño en la estructura del tejido por su capacidad de fijar complemento (figura 2). La actividad secretora depende de la cooperación entre células B mucosales y el componente secretor (SC) o receptor polimérico de Ig (pIgR) que median el transporte activo de IgA e IgM al exterior (Brandtzaeg y col., 1999; Pilette y col., 2001; Kiyono y Fukuyama, 2004).

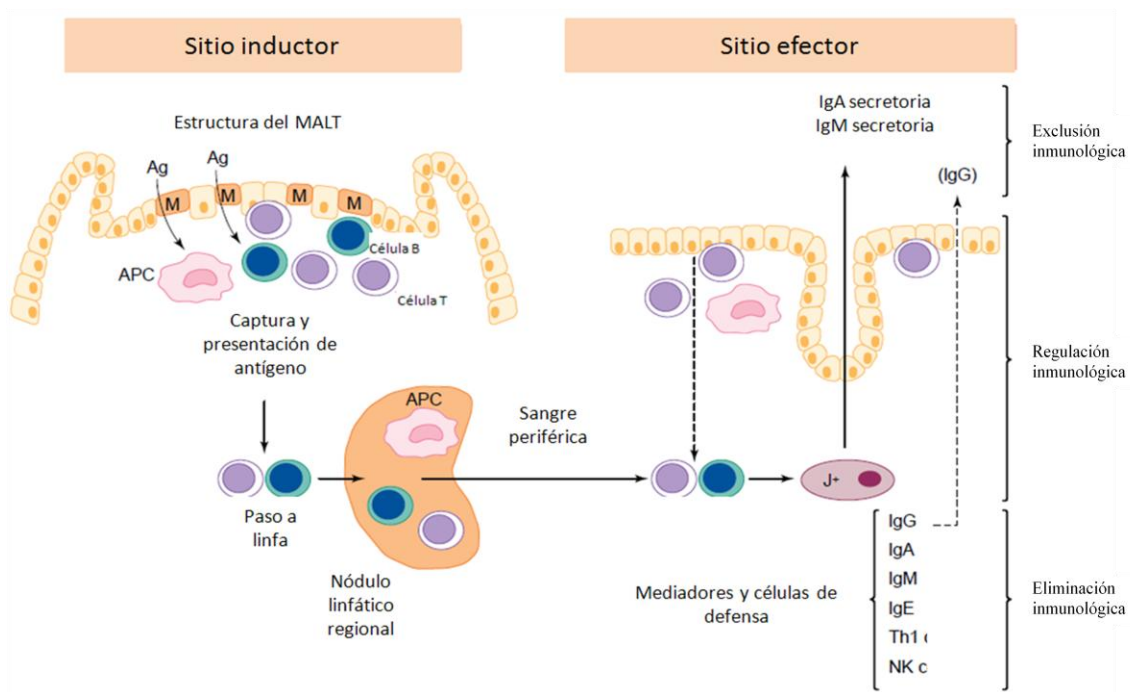


Figura 2. Fisiología general de los sitios inductores y efectores en la respuesta inmunitaria de las mucosas. En los sitios inductores se da el transporte por células tipo M del Ag hacia la cara basolateral del epitelio y son presentados por APC a linfocitos. Las células activadas migran por sangre y linfa a ganglios linfáticos y a tejidos efectores. En estos sitios se lleva a cabo la regulación, exclusión inmunológica y eliminación del antígeno (Brandtzaeg y col., 1999).

Mucosa respiratoria

El tracto respiratorio está dividido en vías respiratorias altas: nariz, faringe, laringe, tráquea, NALT y anillo de Waldeyer (amígdalas, adenoides y cúmulos linfoides) y las vías respiratorias bajas: tejido pulmonar, árbol bronquioalveolar y el BALT, en el cual predomina la IgG. Tanto el NALT como el BALT están integrados de folículos de linfocitos B bien delimitados de las zonas de agrupación de linfocitos T (Ogra y col., 2001; Debertain y col., 2003; Kiyono y Fukuyama, 2004; Bienenstock y McDermott, 2005; Cerutti y col., 2011; Vega-López y col., 2012).

El NALT está involucrado en la respuesta inductora y efectora de la mucosa nasal, siendo uno de los primeros sitios de contacto con antígenos inhalados (Bienenstock y McDermott,



2005; Vega-López y col., 2012). Esta estructura ha sido bien descrita en roedores, se encuentra embebida en el epitelio de las paredes de las vías respiratorias permitiendo la infiltración y el paso de sustancias (Randall, 2010). Sin embargo, en el humano su presencia no es necesariamente constitutiva, debido a que la faringe humana está rodeada por el anillo de Waldeyer (Vega-López y col., 2012).

El BALT está involucrado en la respuesta inmunológica en las vías respiratorias bajas y posee una mayor cantidad de folículos de células B y T que el NALT (Bienenstock y McDermott, 2005; Randall, 2010). En el pulmón el sistema linfoide tiene tres tipos. El primero se encuentra en el tercio superior de las vías respiratorias y presenta las características de tejido linfoide mucosal. El segundo está considerado como parte del sistema inmunológico sistémico. El tercer segmento consiste en una combinación de los dos anteriores y presenta una población de linfocitos intraepiteliales (IELs) (Bienenstock y McDermott, 2005). Diversos estudios han revelado que los linfocitos presentes en el espacio perivascular del pulmón, pueden abandonar el vaso sanguíneo pulmonar y migrar a lámina propia del bronquio (Pabst y Binns, 1994; Pilette y col., 2001; Lefrançois y Puddington, 2006; Foo y Phipps, 2010).

La relación de anticuerpos secretados específicos de Ag con la presencia de AbPC en el tejido respiratorio está poco descrita, de ahí la importancia de determinar si los anticuerpos mucosales provienen de torrente sanguíneo o si son producidos por las células presentes en el tejido efector, como parámetro de evaluación de respuesta local ante las infecciones y la vacunación (Janetzki, 2004).



MODELO EXPERIMENTAL

Características del cerdo

El modelo murino para estudios inmunológicos es por mucho, el más estudiado, sin embargo, existen limitaciones en su uso ya que por su tamaño, no se pueden obtener grandes cantidades de muestra y presentan pocas similitudes con el sistema inmunitario del humano. El uso de primates es poco viable por las condiciones que requieren para su confinamiento, mantenimiento y manejo, resultando costosos y demasiado complicados, y el ser humano no puede ser sujeto de experimentación por cuestiones éticas (Rothkötter y col., 2002).

El sistema inmunológico del cerdo tiene características anatómicas y fisiológicas parecidas a las del ser humano, sin embargo, existen ligeras diferencias que son de importancia para su estudio y comparación. El periodo de gestación en los cerdos es de 115 días, cada etapa del desarrollo está caracterizada por poblaciones celulares y constitución de estructuras inmunitarias inmaduras muy bien definidas (Rothkötter y col., 2002; Butler y col., 2006; Sinkora y Butler, 2009). La placenta de tipo epiteliocorial no permite la transferencia materna de células e inmunoglobulinas hacia el embrión o feto. Este traspaso se da a través de leche y calostro, a diferencia del humano y los roedores (Bianchi y col., 1992; Sinkora y col., 2005; Butler y col., 2006; Rothkötter, 2009).

Los ganglios linfáticos en el cerdo presentan una estructura denominada “invertida”, lo cual se explica por la inversión del flujo de la linfa en comparación con otras especies de mamíferos. Es decir, los vasos aferentes ingresan por el hilio y los vasos linfáticos eferentes abandonan al ganglio por su periferia. El flujo central de la linfa en los vasos aferentes se reúne en una cisterna a partir de la cual se distribuye la linfa mixta en el parénquima de todo el nódulo y puede reaccionar a cualquier sustancia que llegaría en un solo vaso aferente. Esta “inversión” anatómica no genera limitaciones fisiológicas en la



presentación de antígeno y activación de células inmunitarias en comparación con otros mamíferos (Binns, 1982).

Anatómicamente, los pulmones en el cerdo están compuestos de tres lóbulos: craneal, medio y caudal, además de presentar un lóbulo accesorio (que no existe en el humano). Tanto en el cerdo, como en el humano, el NALT está ausente y en el primero existe una cadena ganglionar parecida al anillo de Waldeyer humano, inexistente en roedores (Pabst y Binns, 1994; Bailey y col., 2001; Cerutti y col., 2011; Vega-López y col., 2012). El BALT en el cerdo y en el humano es inducible y no constitutivo, como en el caso de los ratones. Además de todo lo anterior, el cerdo tiene una mayor cercanía filogenética con el humano, se pueden obtener mayores cantidades de muestra y su manejo es sencillo por ser un animal de rápido crecimiento, prolífico y dócil. Todas estas características hacen al modelo porcino una mejor opción para el estudio del sistema inmunológico de vías respiratorias en la detección y cuantificación de las células productoras de anticuerpos en pulmón.

Desde la segunda mitad del siglo pasado se han desarrollado y aplicado técnicas sencillas, rápidas y económicas para la detección y cuantificación de células productoras de moléculas específicas (Kalyuzhny, 2009).

ANTECEDENTES DE ELISPOT

Placa hemolítica

El ensayo de placa hemolítica se consideró por mucho tiempo la técnica de elección para evaluar la respuesta humoral a antígenos específicos (Truffa-Biachi y Bordenave, 1980), fue desarrollada tanto por Jerne y col. (Jerne y Nordin, 1963) como por Ingraham y Bussard con la finalidad de estudiar la formación de anticuerpos a nivel celular. Ambos grupos de investigadores detectaron anticuerpos IgM producidos contra eritrocitos de oveja (SRBC) empleados como antígeno (Garvey y col., 1977; Falkoff y col., 1983), utilizando como soporte una fase de agar o metilcelulosa. Fauci y Pratt aplicaron esta técnica en células B



humanas tras su estimulación *in vitro* (Fauci y Pratt, 1976), asimismo Loaftger y col. lograron detectar moléculas de DNA (del inglés, *Desoxirribonucleic acid*) (Loaftger y col., 1988). Posteriormente, se utilizaron antígenos como el toxoide tetánico y la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) que pueden adsorberse sobre los SRBC utilizando ácido tánico, cloruro crómico o carbodiimida (Czerkinsky y col., 1983; Descotes, 2004).

Cunningham desarrolló una modificación de la técnica utilizando una cámara compuesta por dos portaobjetos, donde por capilaridad se adicionaba una mezcla de SRBC (antígeno), complemento de cobayo y una suspensión celular de bazo de ratón inmunizado (AbPC). Se dejaba en incubación y la unión de anticuerpos contra los SRBC permitía la activación de complemento lo cual producía la lisis de los eritrocitos generando áreas que eran observables al microscopio (figura 3) (Cunningham, 1965; Kennedy y Axelrad, 1971; Hall, 1985).

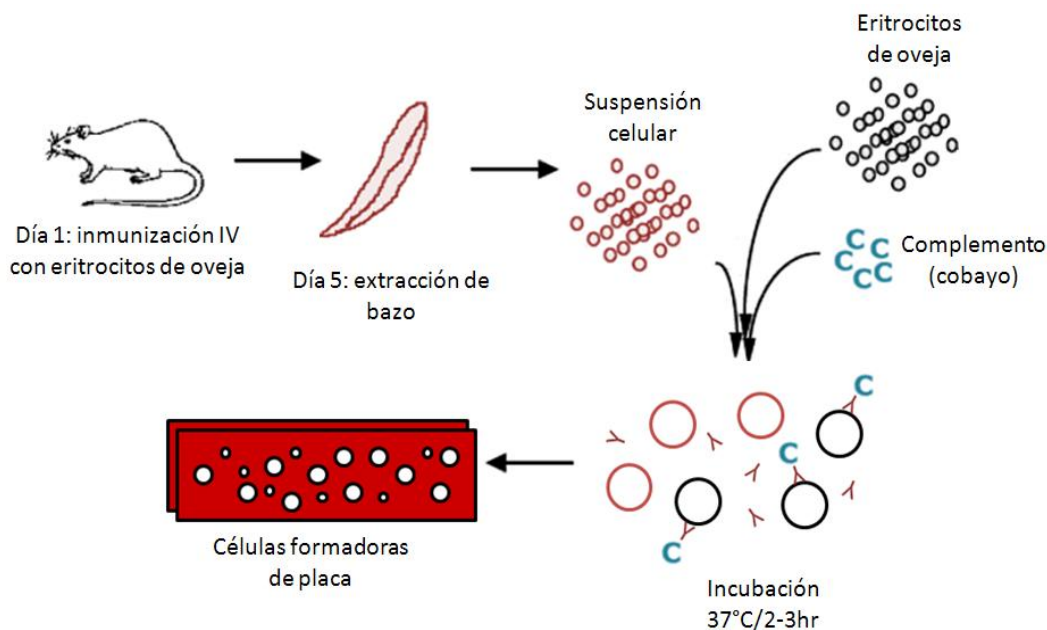


Figura 3. Fundamento de la técnica de Cunningham para el ensayo de placa hemolítica. Esta técnica detecta células formadoras de anticuerpos contra antígeno (eritrocitos de oveja, en este ejemplo) mediante la formación de zonas de lisis generadas por la activación del complemento. Cada aro se considera la actividad de una célula formadora de anticuerpos (Cunningham, 1965).



Algunos de los inconvenientes de esta técnica son el cuidado especial que requiere el uso de complemento, el proceso de hemólisis no puede detenerse generando una lisis masiva por lo cual los conteos deben hacerse lo más rápido y acertadamente posible, además de que no es posible diferenciar entre isotipos IgG e IgM (Sedwick y Holt, 1983; Czerkinsky y col., 1988; Janetzki, 2004). La placa hemolítica es considerada el antecedente directo del ELISPOT, porque ambas técnicas determinan cantidad de células productoras de un producto metabólico (Sedwick y Holt, 1983; Czerkinsky y col., 1988; Janetzki, 2004).

ELISA

El ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es un inmunoensayo cuantitativo que en la actualidad se emplea con mayor frecuencia (figura 4). Tuvo sus inicios en los años 70's, fue descrito por dos grupos de investigación en el mismo año, uno en Francia (Avrameas y Guilber, 1971) y el otro en Suecia (Engvall y Perlman, 1971).

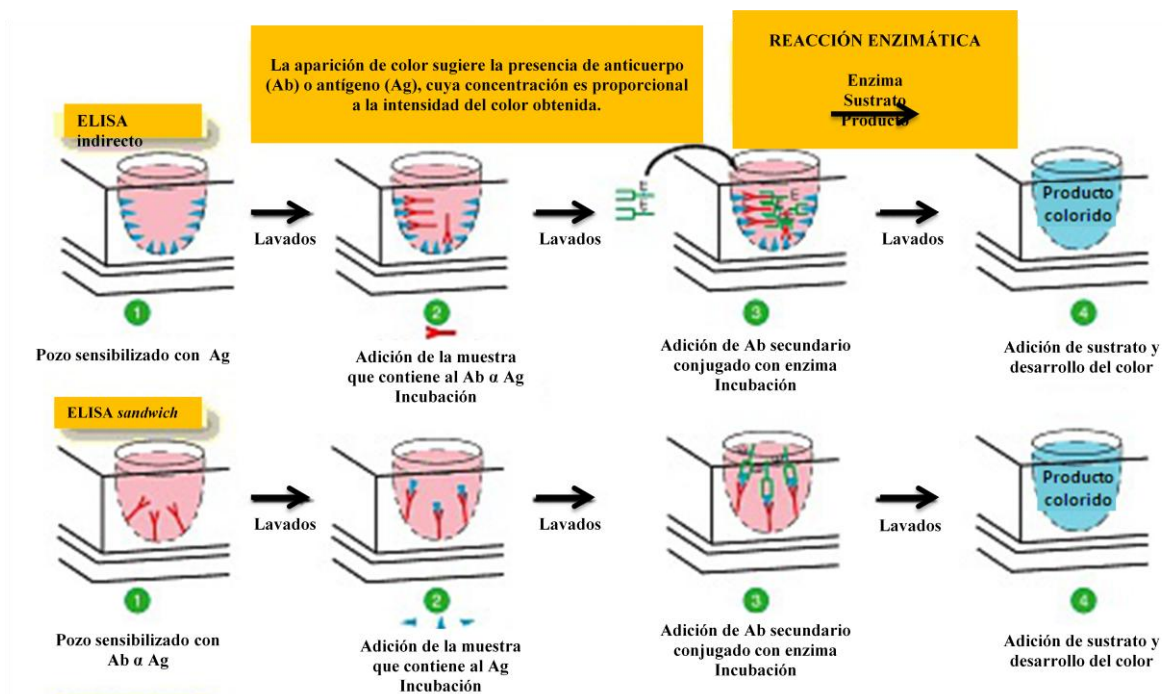


Figura 4. Variantes de la técnica de ELISA. El ELISA indirecto detecta anticuerpos específicos, utilizando al antígeno (Ag) para sensibilizar los pozos. El ELISA *sandwich* detecta al Ag que se une al anticuerpo de captura, formando un complejo Ag-Ab. Para el revelado de ambos tipos de ELISA se emplea un anticuerpo secundario acoplado a una enzima. La intensidad de color como producto de la reacción enzimática es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (Elgert, 2009).



Como su nombre lo indica, la molécula de detección está adsorbida a una fase sólida, la más utilizada es la placa de 96 pozos hecha con un material que posee una alta capacidad de unión con las proteínas como el poliestireno. La concentración óptima de anticuerpo o antígeno debe determinarse experimentalmente, sin embargo es recomendable que sea de 0.5-10.0 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, la concentración de antígeno puede ser determinada basándose en la conversión del sustrato (Luttman y col., 2006).

La actividad de fondo es causada por un anticuerpo o antígeno marcado con enzima que es adsorbido de manera inespecífica, lo cual representa un problema para la técnica. Es por ello que el bloqueo de sitios libres de unión proteínica y la aplicación de técnicas de lavado adecuadas resultan esenciales en el desarrollo de la técnica (Wakefield y col., 1982; Luttmann y col., 2006).

Las enzimas que más se utilizan son: la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP) de intestino de ternera, la β -galactosidasa de *Escherichia coli*, y la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*; en ese orden. Su actividad se determina por sustratos detectables de manera colorimétrica, fluorométrica, o luminométrica. Los productos detectados coloriméricamente deben permanecer estables por un largo tiempo después de detener la reacción (Engvall, 1980; Porstmann y Kiessig, 1992).

La técnica de ELISA se ha usado para la detección de microorganismos infecciosos como bacterias, hongos, parásitos e incluso virus (Labrousse y col., 1982; Elgert, 2009). La gran ventaja del ELISA sobre otros métodos reside en que no requiere un equipamiento sofisticado para su implementación en el laboratorio.



ELISPOT

Historia

En 1983 Sedgewick y Holt publicaron una nueva técnica para el conteo de células productoras de anticuerpos, la cual estaba basada en los mismos principios del ensayo de ELISA, donde el antígeno se encontraba inmovilizado en un soporte sólido para unirse a anticuerpos liberados por esplenocitos cultivados (Sedwick y Holt, 1983). Czerkinsky y col. describieron una técnica para la detección de anticuerpos similar a la anterior dándole

el nombre de ELISPOT, que resultó en una alternativa de la placa hemolítica (Czerkinsky y col., 1983; Czerkinsky y col., 1988). Después la técnica original fue modificada recubriendo la fase sólida utilizando anticuerpos en lugar de antígenos y así capturar moléculas como citocinas liberadas por las células cultivadas (Tjarkowski y col., 1984; Czerkinsky y col., 1988). Durante el primer lustro del siglo XXI las publicaciones sobre ELISPOT se han quintuplicado, lo cual refleja la importancia de esta técnica en el área de investigación y diagnóstico (Janetzki y col., 2004; Boulet y col., 2007).

Fundamento

El término ELISPOT proviene del acrónimo inglés *Enzyme-Linked Immunospot Assay*. Este método se usa para detectar células productoras de anticuerpos, así como linfocitos T productores de citocinas, presentando la ventaja de capturar el anticuerpo o la citocina de interés sobre una superficie, permitiendo la evaluación de cada célula cultivada.

Aunque el ensayo de ELISPOT emplea el mismo principio de *sandwich* de ELISA hay dos diferencias principales entre estos dos ensayos. Primero, el ELISA mide la concentración real de citocina o anticuerpo (Sedwick y Holt, 1983; Kemeny, 1997) con lo que contesta la pregunta “¿cuánto es secretado?”, mientras que el ELISPOT enumera las células secretoras dando respuesta a “¿cuál es la frecuencia de las células secretoras?” (Czerkinsky y col., 1983). Por lo tanto un ensayo no debe emplearse en vez del otro. Segundo, el ELISA es un inmunoensayo diseñado para analizar una muestra libre de células (Kemeny, 1997),



mientras que el ELISPOT es una combinación de un inmunoensayo y un bioensayo porque las células vivas son cultivadas directamente en las placas. La técnica ha sido comparada con la sensibilidad de la citometría de flujo (Karlsson y col., 2003).

Características del ensayo

El desempeño del ensayo de ELISPOT depende de la calidad de cuatro componentes principales: anticuerpos de captura y detección, enzimas conjugadas, sustratos cromogénicos y las placas con membranas (Kalyuzhny, 2005), debido a que la actividad de secreción celular en el ELISPOT se determina por el número de manchas en el fondo de la placa (figura 5).

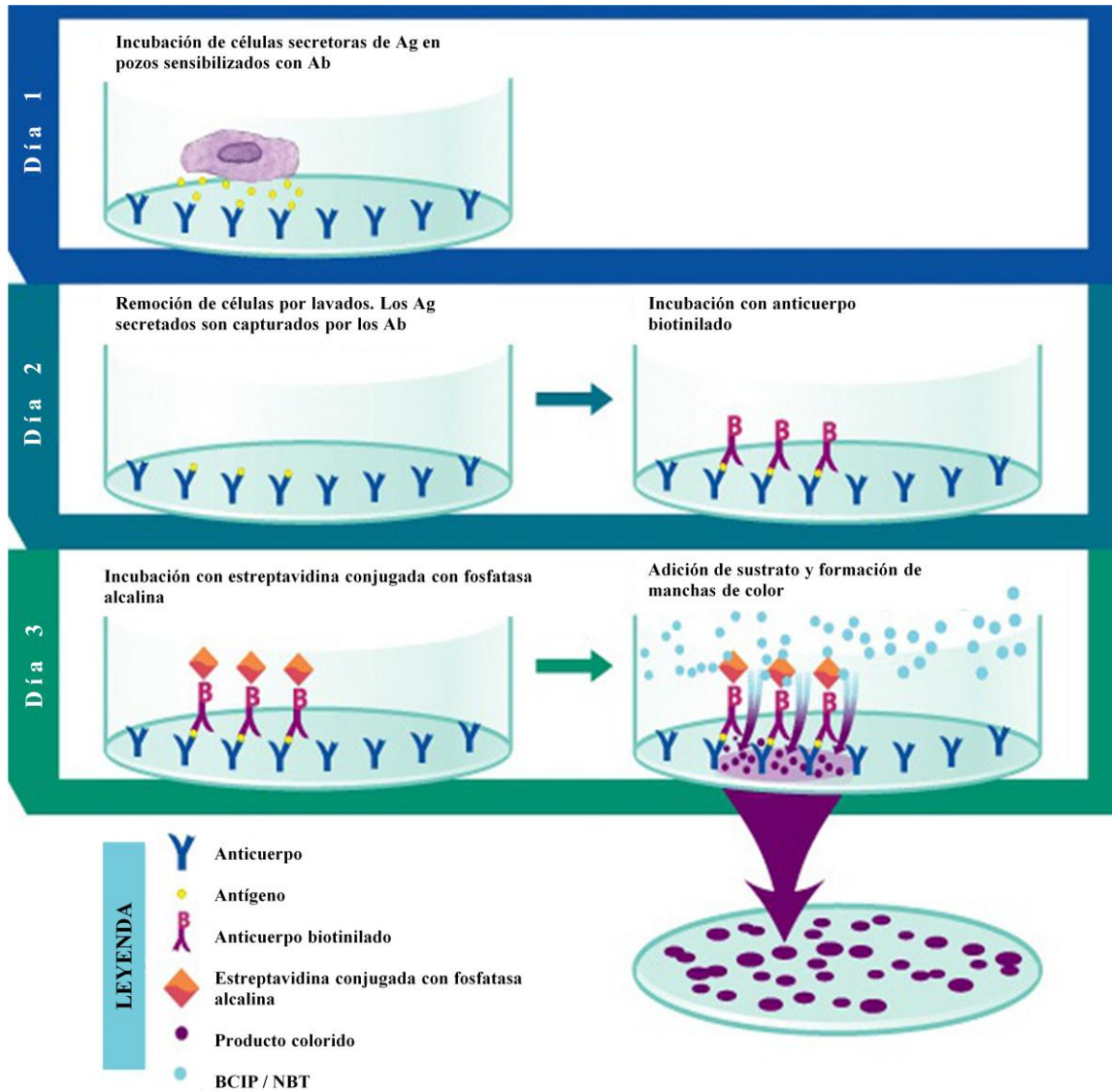


Figura 5. Procedimiento general de la técnica de ELISPOT. El día 1 consiste en la incubación de las células productoras de antígeno en los pozos sensibilizados. El día 2 consiste en la remoción de las células y la adición de anticuerpo biotinilado. En el día 3 se revela con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina y se adiciona el sustrato para que se lleve a cabo la reacción enzimática y la formación de manchas. Sin embargo, se ha observado que el anticuerpo biotinilado y la estreptavidina pueden adicionarse el mismo día (R&D Systems).

Estos componentes deben ser optimizados para facilitar la formación de manchas detectables, las cuales deben presentar una tinción intensa, tener bordes definidos y un



diámetro más pequeño para evitar que se unan, ya que manchas confluentes pueden contarse como una sola (Kalyuzhny, 2009).

Sensibilización, bloqueo y lavado

Los ensayos de ELISPOT pueden realizarse en placas plásticas de 96 pozos (Tanguay y Killion, 1994; Ronnelid y Klareskog, 1997) con membranas de nitrocelulosa (Taguchi y col., 1990; Rönnelid y Klareskog, 1997) o fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Schielen y col., 1995, McCutcheon y col., 1997). Estas membranas se utilizan como soporte para las células y poseen una mayor capacidad de retención de anticuerpos de captura que el material de las placas.

En los ensayos de ELISPOT se requiere la difusión de las moléculas secretadas por las células hacia el antígeno o los anticuerpos de captura inmovilizados en la membrana, requiriendo procesos de bloqueo con proteínas (BSA, FCS, caseína, gelatina o leche en polvo) que por sus características pueden unirse covalentemente a los espacios vacíos de la membrana (Bora y col., 2002).

Es posible emplear anticuerpos monoclonales y policlonales, ya sea para la captura de antígeno o para la detección del mismo. Dichos anticuerpos pueden ser producidos contra la molécula completa del antígeno o solo contra una porción. El factor crítico para escogerlos es su habilidad de reconocer epítopos del antígeno de interés que no se superpongan (Kemeny, 1997). Por esta razón, no está recomendado emplear el mismo anticuerpo monoclonal para captura y detección en el mismo ensayo de ELISPOT. También se considera importante la capacidad de la técnica de eliminar las reacciones cruzadas entre IgG e IgM (Bernard y Lantier, 1985) usando anticuerpos específicos para cada isotipo (Bianchi y col., 1992).

El que algunos anticuerpos puedan emplearse en inmunohistoquímica, inmunoelectrotransferencia y en ELISA no necesariamente garantiza que también puedan



utilizarse en el ELISPOT. El único método confiable para identificar la mejor combinación de anticuerpos de captura y detección es probarlos directamente en el ensayo. La concentración de los anticuerpos de captura debe ser optimizada para obtener manchas intensamente teñidas con bordes bien definidos. Los anticuerpos de detección empleados en ELISPOT pueden estar conjugados con biotina para hacer posible la reacción con enzimas conjugadas a estreptavidina (Savage y col., 1992). Los anticuerpos de detección deben ser biotinilados para evitar reacciones cruzadas con el anticuerpo de captura, en caso de que ambos anticuerpos provengan de la misma especie. Alternativamente el sistema de detección puede ocupar anticuerpos directamente conjugados a una enzima, desafortunadamente la sensibilidad suele ser más baja que con los anticuerpos biotinilados y se podría correr el riesgo que la intensidad de las manchas obtenidas por respuesta inespecífica fuera similar a las de la respuesta específica, sin poder diferenciar entre ellas lo cual dificultaría el conteo. En 2001 Kalyuzhny y Stark reportaron que la intensidad de manchas específicas y no específicas variaba independiente de los reactivos usados y de su concentración (Kalyuzhny y Stark, 2001).

Enzimas

La peroxidasa de rábano picante (HRP) o la fosfatasa alcalina (AP) pueden ser utilizadas conjugadas a estreptavidina (Savage y col., 1992). La HRP con un pH óptimo es 7.6 cataliza la oxidación de los sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno, el cual cambia el color con una pérdida de electrones. La ventaja de emplear HRP es que las manchas se desarrollan rápidamente, mientras que el inconveniente es el aumento del fondo. La AP con un pH óptimo es de 9.0-9.6 desarrolla manchas lentamente permitiendo un tiempo de incubación más prolongado con los sustratos cromogénicos sin el riesgo de desarrollar tinción de fondo (Savage y col., 1992). Puede requerirse de una incubación prolongada para aumentar la sensibilidad de un ensayo basado en AP. Con la combinación de HRP y AP es posible desarrollar una técnica de ELISPOT para la detección simultánea de dos moléculas



diferentes (Okamoto y col., 1998; Okamoto y col., 2000). La principal desventaja de sistemas multianálisis es la pérdida de sensibilidad para cada uno de los antígenos.

Independientemente de la enzima conjugada que se utilice, su sustrato correspondiente debe producir un color intenso y estable. Un sustrato para HRP es AEC (3-amino-9-etilcarbazol, $C_{14}H_{14}N_2$) el cual forma manchas de un color rojo intenso (Savage y col., 1992). Sin embargo, el AEC es inestable y las manchas se blanquean en un periodo corto de tiempo lo que puede resultar en la pérdida de información importante. Otro sustrato para HRP es la DAB (3,3'-diaminobencidina, $C_{12}H_{14}N_4$), que produce manchas de color café de menor intensidad a las obtenidas con AEC y aunque la DAB es estable es venenosa y potencialmente carcinogénica. Uno de los sustratos más frecuentemente utilizados para la AP es una mezcla de BCIP (sal p- toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) y NBT (cloruro de nitroazul de tetrazolio), el cual forma manchas de color negro-azul intenso (Savage y col., 1992). Debido a su alta estabilidad las manchas reveladas con BCIP/NBT no desaparecen.

Dependiendo del proyecto de investigación, las células pueden ser estimuladas *in vitro* o directamente en placas de ELISPOT, pero debe tenerse en mente que las células cultivadas y estimuladas fuera de las placas de ELISPOT necesitan ser transferidas a medio de cultivo fresco para evitar tinción de fondo.

Existen dos formatos comerciales principales para el ensayo de ELISPOT: *kits* listos para usar (*ready-to-use* RTU) desarrollados y optimizados y *kits* hágalo usted mismo (*do-it-yourself* DIY) que incluye reactivos y placas de 96 pozos sin sensibilizar. Los *kits* RTU pueden incluir placas de 96 pozos presensibilizadas y todos los reactivos necesarios para correr el ensayo (Klencke y col., 2002).



Análisis de resultados y conservación de las membranas

En ELISA la concentración de las moléculas en la muestra se obtiene midiendo la densidad óptica del color de la solución del sustrato que llena los pozos (Kemeny, 1997), mientras que en ELISPOT la capacidad de secreción de las células se mide contando manchas de color en el fondo del pozo por medio de aparatos automatizados o con el uso de programas digitales para conteos en las imágenes capturadas de las membranas (Czerkinsky y col., 1983; Sedwick y Holt, 1983;). Después de finalizado el experimento, las placas de 96 pozos teñidas se convierten en información experimental importante y pueden requerir de almacenamiento en un lugar seguro, es por ello que pueden sacarse de las placas, laminarse, nombrarse y almacenarse en un álbum de fotografías. Este tratamiento no representa ningún daño a las membranas y en caso de necesitarlo pueden reanalizarse por lectores de ELISPOT (Kalyuzhny y Stark, 2001; Turner y col., 2004).

Aplicaciones

El ELISPOT presenta muchas ventajas técnicas y de sensibilidad sobre el ensayo de placa hemolítica (Descotes, 2004), que comparado con la inmunofluorescencia y la citometría de flujo, resulta en una técnica sencilla, rápida y de menor costo para detectar células productoras de citocinas y/o anticuerpos (Karlsson y col., 2003; Janetzki, 2004). La técnica de ELISPOT ha sido utilizada para estudios de diagnóstico e investigación en la detección de células productoras de interleucinas y anticuerpos en sangre, bazo y ganglio como descripción de la respuesta inmunológica sistémica; en cultivos de córnea para ensayos de adherencia celular, así como en tracto gastrointestinal (intestino delgado y grueso) y pulmón como descripción de la respuesta inmunológica mucosal en diferentes modelos como el murino (Sedwick y Holt, 1983; Czerkinsky y col., 1984; Schielen y col., 1995; Okamoto y col., 2000), aviar (Bianchi y col., 1990), dípteros (Janetzki y col., 2000), homínidos (Mäkitalo y col., 2002) incluido el humano (Czerkinsky y col., 1984; Czerkinsky y col., 1988; Barington y col., 1992; Rönnelid y Klareskog, 1997; Helms y col., 2000; Kalyuzhny y Stark, 2001; Karlsson y col., 2003; Okamoto y col., 2004; Janetzi y



**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE
CÉLULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS IgG E IgA EN TEJIDOS PORCINOS**



col., 2004; Turner y col., 2004; Santos y col., 2008; Almeida y col., 2009; Afonso y col., 2010), peces (Secombes y col., 1991; Xu y col., 2009) y porcino (Bianchi y col., 1990; Nuntrapasert y col., 2004; Díaz y Mateu, 2005). Sin embargo, la técnica no ha sido aplicada específicamente en el estudio del sistema inmunitario pulmonar porcino. El uso de la técnica en el estudio de la respuesta inmunológica en mucosa respiratoria permitirá determinar las respuestas inducidas tras la vacunación y desafío con antígenos específicos relacionados con enfermedades respiratorias.



JUSTIFICACIÓN

La mucosa respiratoria representa un importante sitio de contacto con el medio ambiente, y por ende, el estudio de la inmunología de dicha estructura es de gran importancia. Hasta noviembre del 2011 se han reportado más de 21 millones de casos de enfermedades relacionadas con las vías respiratorias en la población mexicana sólo en ese año, afectando principalmente a la población infantil y a adultos mayores de 60 años. Estas enfermedades causan hasta el 18 % de muertes en niños menores de 5 años. Los datos reflejan el impacto e importancia de realizar estudios sobre la inmunidad en la mucosa respiratoria. Sin embargo, existen limitaciones éticas para el estudio en humanos, por lo que deben emplearse modelos animales, preferentemente distintos a los roedores, por las diferencias anatómicas y fisiológicas que dificultan la extrapolación de resultados.

La similitud funcional y anatómica del sistema inmunitario del cerdo con el humano, permite utilizar a este animal como modelo experimental en pruebas, que determinen las poblaciones de células productoras de anticuerpos en la mucosa respiratoria, con el fin de evaluar la conformación del tejido y el efecto de protocolos de vacunación. La técnica de ELISPOT es capaz de evaluar poblaciones celulares productoras de anticuerpos en sangre y su empleo en otros tejidos es nuevo, no existiendo antecedentes en pulmón en el modelo porcino.

HIPÓTESIS

La detección AbPC-IgG y AbPC-IgA antígeno específicas en pulmón de cerdos puede realizarse con la técnica estandarizada de ELISPOT.



OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA en pulmón de minicerdos vietnamita.

Objetivos particulares

- Establecer las condiciones para la elaboración de las placas de ELISPOT en el laboratorio.
- Probar las placas elaboradas en el laboratorio para la detección de AbPC en sangre de animales inmunizados.
- Comparar el método de conteo manual y el automático bajo las condiciones de uso de las placas de ELISPOT.
- Estandarizar la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA en pulmón de cerdo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó una camada de 8 animales divididos en 3 grupos: de acuerdo al antígeno usado para la inmunización: animales inmunizados con OVA= ovoalbúmina, con PBS= amortiguador de fosfatos salino y sin inmunizar. Se siguió el protocolo de inmunización mucosal probado en el laboratorio SC= subcutáneo, SC e IN= Intranasal (Gama y García, 2011). Se desarrollaron dos cinéticas durante los 31 días de experimentación, una de AbPC en sangre y otra de Ab en suero (tomando muestras 5 días después de cada inmunización). En las dos últimas semanas (a partir del día 31 al 40) se desarrolló el ELISPOT de punto final en ganglio y pulmón. Este ensayo se desarrolló en tres días subsecuentes: día 1 extracción de células y cultivo, día 2 cosecha de células y sembrado en placas de ELISPOT y día 3 revelado por inmunoensayo enzimático (figura 6).



ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS IgG e IgA EN TEJIDOS PORCINOS

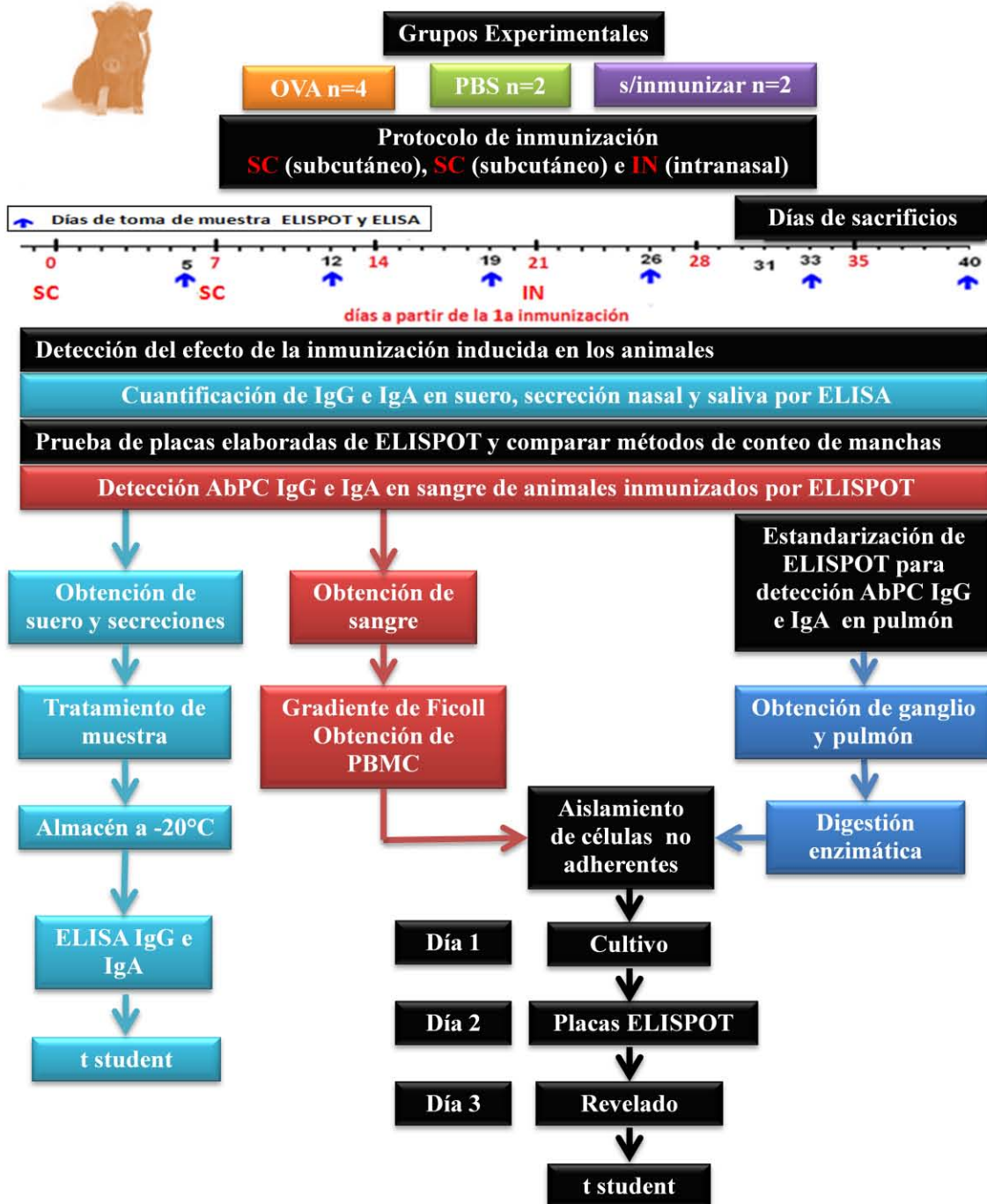


Figura 6. Diseño experimental. Se representan los pasos que se siguieron en la determinación de las condiciones óptimas para la detección por ELISPOT de AbPC en sangre como estudio longitudinal, así como en ganglio linfático y pulmón como ensayo de punto final. Así como la cuantificación de anticuerpos en suero y secreciones mucosales por la técnica de ELISA.



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se emplearon 8 minicerdos vietnamita (*Vietnamese pot belly minipigs*) libres de patógenos específicos (SPF) de tres meses de edad, 5 machos y 3 hembras de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (UPEAL-CINVESTAV). Los animales se alimentaron únicamente con aproximadamente 800 g de LACTOCERDINA PT (Nestlé Purina *Pet Care Company*) diariamente y agua *ad libitum*. Fueron aretados en la oreja derecha (Aretes Rockink®) a las siete semanas de vida. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las normas aprobadas por el Comité Interno (CICUAL) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). La distribución de grupos se realizó de acuerdo a los resultados de la cuantificación de anticuerpos IgG e IgA anti OVA séricos por ELISA:

- a) Grupo OVA: cerdos machos 49, 50, 51 y cerda 46
- b) Grupo PBS: cerdos machos 47 y 48.
- c) Grupo sin inmunizar: cerdas 99 y 100 como reemplazo de cerdas para gestación.

Protocolo de inmunización

Se inmunizaron los grupos OVA y PBS de acuerdo al protocolo SC/SC/IN empleado en el laboratorio. En las inmunizaciones subcutáneas se administró una dosis de 1 mg/kg de antígeno (ovoalbúmina) o PBS, en la base de la oreja izquierda. La ovoalbúmina (*albumin chicken egg white* Sigma 9006-59-1) al igual que el PBS se mezclaron en relación 1:1 con Adyuvante Completo de Freund (Sigma, CAS 9007-81-2) para la primera inmunización. Siete días después, para la segunda inmunización, la dosis se elaboró con Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma 026K8902) en la misma relación. Quince días después se aplicó la inmunización intranasal, administrando una dosis de 2 mg/kg de ovoalbúmina sin adyuvante solamente al grupo OVA.



ELISA cuantitativo de suero y secreciones mucosales

Muestras de mucosas y suero

Para la cuantificación de IgG e IgA en suero como en secreción nasal y saliva, se empleó la técnica de ELISA cuantitativo. Todos los animales fueron muestreados cada siete días durante siete semanas (las últimas dos semanas correspondieron a las fechas de sacrificio), iniciando con el primer muestreo de saliva y secreción nasal un día antes de la primera inmunización, empleando hisopos convencionales de doble punta de algodón. Los hisopos húmedos se centrifugaron a 15000 xg en micro tubos de 1.5 mL (Centrífuga Eppendorf® modelo 5424 para 24 tubos) y el líquido obtenido se mezcló con un coctel de inhibidores de proteasas TPCK (*N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*, SIGMA), TLCK (*Na-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride*, SIGMA) y PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*, SIGMA, preparado en relación 1:1:1, a partir de una solución madre de 5 mg/mL, 2.5 mg/mL y 17.4 mg/mL respectivamente y se empleó en una relación 1:20 (inh/mtra). Una vez adicionados los inhibidores, se almacenó la muestra a -20 °C hasta su uso.

La muestra de sangre para suero fue obtenida por punción de la vena cava craneal por tubo de vidrio con vacío (BD Vacutainer® *serum* 10 mL), con aguja 21 G x 1" (BD Vacutainer® *Precision Glide multiple sample needle*). La sangre se incubó 2 horas aproximadamente a 37 °C (Incubadora Precision® Economic model 2EG) y centrifugó a 550 xg (Centrífuga Jouan® Serie: 39612183). El suero se guardó en alícuotas de 750 µL a -20 °C hasta el momento de su uso.

Para monitorear que el protocolo de inmunización con OVA estaba generando respuesta humoral en los animales a nivel sistémico y de mucosas, se cuantificaron los anticuerpos específicos de antígeno en suero, saliva y secreción nasal por ELISA.



Para la técnica de ELISA se usaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo en forma de U (Costar®, *Corning Incorporated Corning*, NY) (figura 7). La metodología seguida fue la misma que la descrita en trabajos anteriores para la cuantificación de IgG e IgA específicas de antígeno en suero y secreciones mucosales dentro del laboratorio (Gama y García, 2011; Salinas, 2011).

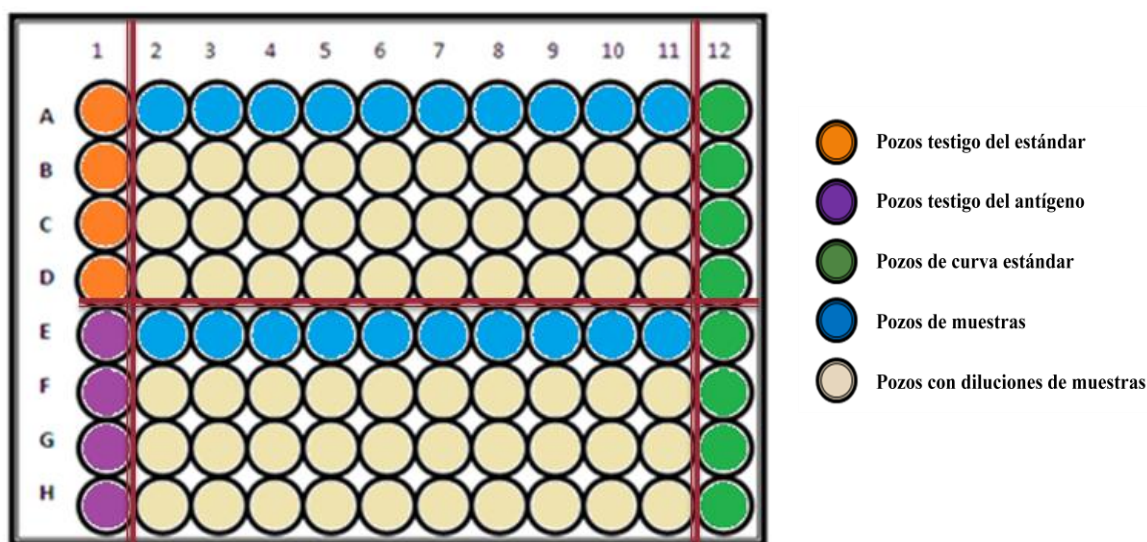


Figura 7. Diseño de placa para ELISA cuantitativo. Se muestra la distribución de los pozos testigo del estándar (naranja) y del antígeno (lila), la curva estándar (verde) desde A12 hasta H12 en concentración descendente, las muestras problema (azul) y sus diluciones (*beige*) dentro de la placa de ELISA cuantitativa para IgG e IgA.

Preparación de placas de ELISPOT

Debido al alto costo de las placas comerciales para ELISPOT, se decidió acondicionar placas de 96 pozos con membranas de nitrocelulosa para el desarrollo y estandarización de la técnica de ELISPOT. Para ello se usaron placas de 96 pozos de fondo plano de poliestireno Costar®, que fueron recubiertas con membranas de nitrocelulosa (Hybond® -c extra; *supported nitrocellulose membrane*, Amersham®). Las membranas, recortadas con una perforadora convencional, medían 0.6 cm de diámetro, lo cual les brindó un buen ajuste al colocarlas con pinzas dentro de los pozos.



Una vez elaboradas, las placas se esterilizaron por microondas en un horno SHARP Carousel® con 5 ciclos de 4 minutos, a una potencia de 5.0 (60 W) e intervalos de reposo de 10 minutos entre cada ciclo, en lotes de 4 a 5 placas envueltas en bolsas plásticas. Para la prueba de esterilidad se escogió una placa al azar y se agregaron 150 µL de medio completo en diferentes pozos, se incubó a 37 °C por 4 días en atmósfera de CO₂ al 5 %.

Cinética de detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA en sangre por ELISPOT

Días de sangrados para cinética en sangre por ELISPOT

Durante 30 días se desarrolló una cinética en sangre para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA por ELISPOT, todos los grupos fueron sangrados cinco días después de cada inmunización como se muestra en la figura 6. Existió una cuarta fecha de sangrados, únicamente para los grupos OVA y PBS que coincidió con el día de sacrificio para cada cerdo.

Sangrados

La muestra de sangre completa se obtuvo por vena cava craneal con tubo Vacutainer® heparinizado (BD Vacutainer® *sodium heparin* 10 mL) y aguja 21G x 1” Vacutainer®. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta el momento de su tratamiento.

Técnica de ELISPOT para detección de AbPC-IgG en sangre

Por las características de la técnica de ELISPOT se requirieron tres días consecutivos para su desarrollo:

- **Día uno. Obtención de células**

Gradiente de Ficoll

Para obtener células mononucleares se diluyeron 20 mL de sangre heparinizada en 20 mL de PBS, estos 40 mL se vertieron sobre 8 mL de *Histopaque* (Sigma-Aldrich *Histopaque*®)



1077) estéril en tubos cónicos estériles de 50mL. Se centrifugó a 560 xg/30 min a 25 °C y se obtuvo la interfase, la cual se centrifugó a 450 xg/10 min. La pastilla se resuspendió en 7 mL de amortiguador de lisis de eritrocitos (APÉNDICE) durante 10 min, posteriormente se llevó con PBS estéril a un volumen final de 30 mL y se centrifugó a 350 xg/10 min. La pastilla se resuspendió en 30 mL de PBS, centrifugándose después a 350 xg/10 min para eliminar restos del amortiguador de lisis.

Células adherentes

Las células se resuspendieron en 10 mL de medio completo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) y se vertieron en cajas Petri estériles, dejándolas incubando durante 1 hora a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %, con la finalidad de remover células adherentes.

Conteo celular

Las células no adherentes se extrajeron de la caja Petri y se centrifugaron a 350 xg/10 min, la pastilla se resuspendió en 4 mL de medio completo RPMI 1640; a partir de esta suspensión celular se preparó una dilución 1/20 (cél/PBS) con PBS no estéril, de esta dilución se tomaron 10 µL y se mezclaron con 10 µL de Azul de Tripán (*Trypan Blue Stain* 0.4 % Gibco 15250), esta mezcla se colocó en una laminilla para ser analizada por un contador digital (*Countess automated cell counter* de Invitrogen®).

Cultivo celular

Se ajustó el número de células para cultivar 20×10^6 cél en 6 mL de medio completo RPMI 1640, en placas de cultivo de 6 pozos (Costar 3506). Se evaluaron tres condiciones: pozo sin estímulo (s/e), pozo con Concanavalin A 10 µg/mL (ConA) y pozo con ovoalbúmina 1 mg/mL (OVA) (Joling y col., 1993; Maloy y col., 1994). El cultivo se incubó durante 20 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ (figura 8).

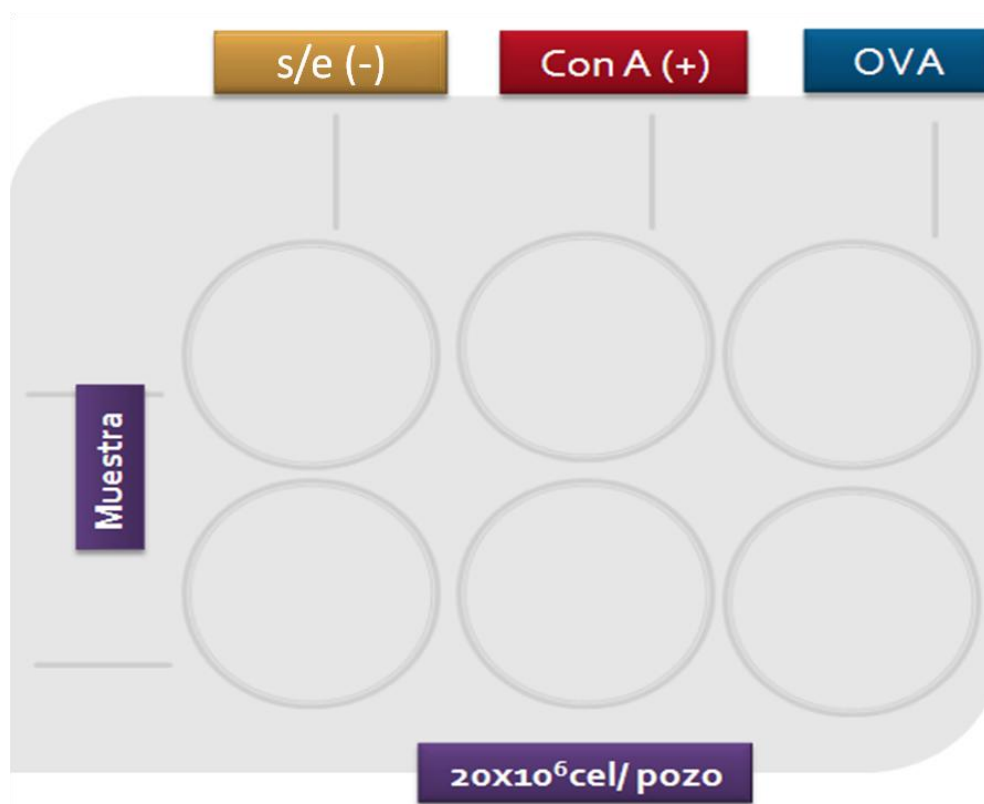


Figura 8. Diseño de placa para cultivo celular de 20 horas. s/e (sin estimular) o testigo negativo en amarillo, ConA (concanavalina A) o testigo positivo en rojo y OVA (ovoalbúmina) en azul.

Sensibilización de placas ELISPOT con OVA

La sensibilización de los pozos con antígeno OVA permitió la detección por ELISPOT de AbPC específicas de antígeno. Para ello, se preparó una solución de OVA de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador de carbonatos estéril pH 9.6. La membrana de nitrocelulosa como fase sólida, aumentó la sensibilidad de detección de moléculas con bajo peso molecular sin generar fondos por unión inespecífica (Sedwick y Czerkinsky, 1992; Israf y col, 2004). De esta solución se adicionaron 100 μL por pozo, de acuerdo al diseño de placa para la técnica de ELISPOT (figura 9 y 11). La placa se dejó a 4 °C durante toda la noche.



■

Día dos. Cosecha y sembrado de células

Sensibilización de placas ELISPOT con anticuerpo de captura

La sensibilización de los pozos con anticuerpo de captura permitió la detección por ELISPOT de AbPC totales. Para ello, se preparó una dilución 1/100 de anticuerpo de captura IgG (*goat anti pig IgG-Fc A-100-104A-II* Bethyl Laboratories Inc.) en amortiguador de carbonatos estéril pH 9.6, de la cual se añadieron 100 µL por pozo, como indica el diseño de placa en la figura 9. La placa se dejó a 25 °C por 2 horas.

Lavados y bloqueo de placas ELISPOT

Las placas se lavaron tres veces con 200 µL de PBS-T 0.05 % estéril y posteriormente se realizaron tres lavados más con 200 µL de PBS estéril. Para bloquear se adicionaron 200 µL de medio completo RPMI 1640, dejando reposar a 25 °C durante 2 horas como mínimo.

Cosecha y conteo de células cultivadas

Después de las 20 horas de cultivo, se obtuvieron las células y se centrifugaron a 350 xg/10 min, la pastilla se resuspendió en 2 mL de medio completo RPMI 1640. El conteo se realizó como ya se indicó.

Sembrado de células en placas ELISPOT

De acuerdo a los resultados del conteo, se ajustó el volumen de la suspensión celular de tal manera que se añadan 400 000 células por pozo según el diseño de placa (figura 9). Las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C y 5 % CO₂.

■ **Día tres. Revelado de ELISPOT**

Proceso de revelado para IgG (técnica sin Ab secundario) (figura 10)

Las placas se sacaron de la incubadora y se lavó cada pozo cuatro veces con 200 µL de agua destilada fría, después se lavaron dos veces con 200 µL de PBS-T 0.05 % no estéril. Se eliminó el exceso de líquido dentro de los pozos. Se preparó una dilución 1/10 000 del anticuerpo IgG-HRP (*Goat anti-Pig IgG HRP Lote: A100-104P-23* Bethyl® Bethyl Laboratories Inc. EUA) en PBS-T BSA 1 % y se adicionaron 100 µL por pozo, según el diseño de placa (figura 9) y se incubó por 2 horas a 25 °C. Se lavaron los pozos seis veces con 200 µL de PBS-T 0.05 %.



Se secaron las placas sacudiéndolas sobre toallas absorbentes y se adicionaron 50 μ L de diaminobencidina (Sigma Fast® 3,3-diaminobenzidine tablet sets. Peroxidase substrate) preparada en agua Milli-Q. Se monitoreó la formación de manchas con una lente de aumento. Para detener la reacción se añadieron 200 μ L de agua destilada no estéril por pozo, posteriormente se hizo un segundo lavado con la misma cantidad de agua destilada. Se eliminó el exceso de agua y las placas se dejaron secar a 37 °C toda la noche.

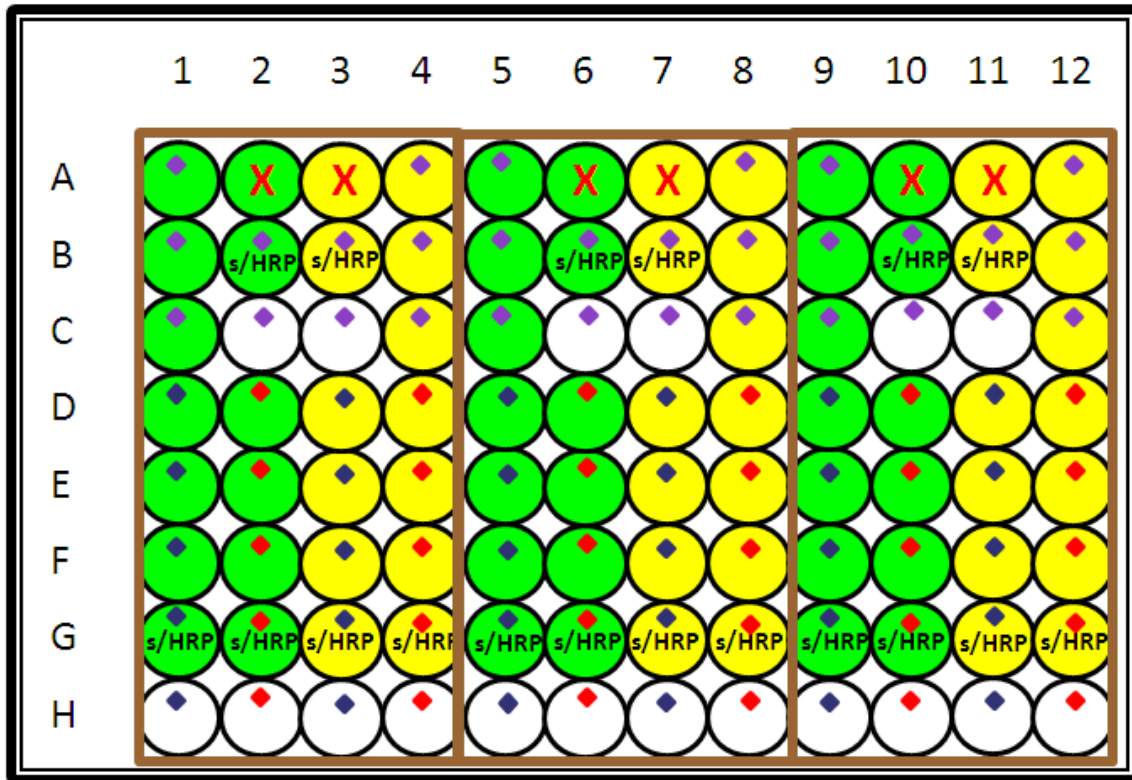
Captura de imágenes y conteo de manchas

Se sacaron las membranas secas, con pinzas convencionales y se pegaron a una plantilla y se tomaron fotografías de cada membrana con la cámara digital del microscopio estereoscópico Leica® ez4d. Las imágenes se recortaron siguiendo la forma circular de la membrana y las manchas se contaron manualmente utilizando el *software* Image J® (Windows Desarrollado por: Java Image®). Se realizaron comparaciones entre el conteo manual y automático.

Tratamiento de resultados y Estadística

Ya que las técnicas de revelado requieren el uso de pozos testigo para descartar respuestas inespecíficas de los anticuerpos utilizados, a los conteos obtenidos en los pozos “con todo”, es decir, con la adición de todos los reactivos necesarios para el revelado de manchas (figura 9) se les restó el promedio de los conteos obtenidos de sus pozos testigo.

Tomando en cuenta el número de células sembradas por pozo en las placas de ELISPOT los valores obtenidos se ajustaron para ser reportados como: el número de células formadoras de manchas por cada 100 000 células sembradas en el pozo (CFM /100 000 cél). Estos valores se expresaron como el promedio de las membranas de los grupos experimentales (4 animales -grupo OVA-, 2 animales -grupo PBS- y 2 animales -grupo sin estimular-) \pm el error estándar de la media. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por la prueba paramétrica de t de Student.



- Pozo sensibilizado con Ab de captura
- Pozo sensibilizado con antígeno OVA
- Pozo testigo no sensibilizado
- Pozo con células sin estimular (s/e)
- Pozo con células estimuladas con ConA
- Pozo con células estimuladas con OVA
- Pozo testigo sin células
- s/HRP** Pozo testigo sin Ab conjugado con enzima (Ab-HRP)

Figura 9. Diseño de placa para la detección de AbPC-IgG totales y antiOVA por ELISPOT. Con la técnica de revelado sin Ab secundario se pueden procesar tres muestras por placa (zonas delimitadas por rectángulos de aristas marrones). Las AbPC-IgG totales se detectan con un anticuerpo de captura anti IgG (pozos amarillos) y las AbPC-IgG antiOVA, con antígeno (pozos verdes). (figura 10). El pozo testigo sin sensibilizar no contiene Ab de captura o antígeno OVA. El testigo S/HRP no contiene Ab conjugado con HRP.

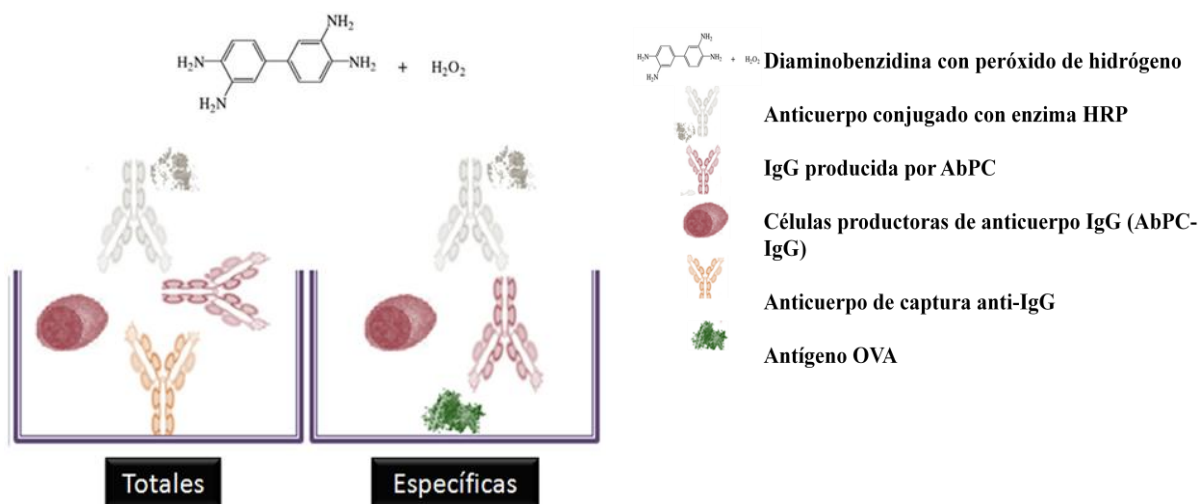


Figura 10. Representación esquemática del revelado de ELISPOT sin Ab secundario para la detección de AbPC-IgG totales y antiOVA. Para la detección de AbPC-IgG antiOVA, el pozo se sensibiliza con OVA (proteína verde), se adicionan las células (células rojas) las cuales producen y liberan IgG (anticuerpo rojo), que es detectado por el anticuerpo conjugado con HRP (complejo gris). Para el revelado se adiciona diaminobenzidina, como sustrato, con peróxido de hidrogeno (molécula). La única diferencia que existe para la detección de AbPC-IgG totales es que el pozo se sensibiliza con anticuerpo de captura (anticuerpo naranja) anti IgG

Técnica de ELISPOT para detección de AbPC-IgA en sangre

Se siguió la misma metodología descrita para IgG en el **Día uno** y el **Día dos**, excepto la sensibilización de placas ELISPOT con anticuerpo de captura.

Sensibilización de placas ELISPOT con anticuerpo de captura

Se preparó una dilución 1/100 de anticuerpo de captura IgA (*goat anti pig IgA affinity purified A-100-102A* Bethyl Laboratories Inc.) en amortiguador de carbonatos estéril pH 9.6, de la cual se añadieron 100 μ L por pozo, como indica el diseño de placa en la figura 11. La placa se dejó a 25 °C por 2 horas.

■ **Día tres. Revelado de ELISPOT**

Proceso de revelado IgA (técnica con Ab secundario) (figura 12)

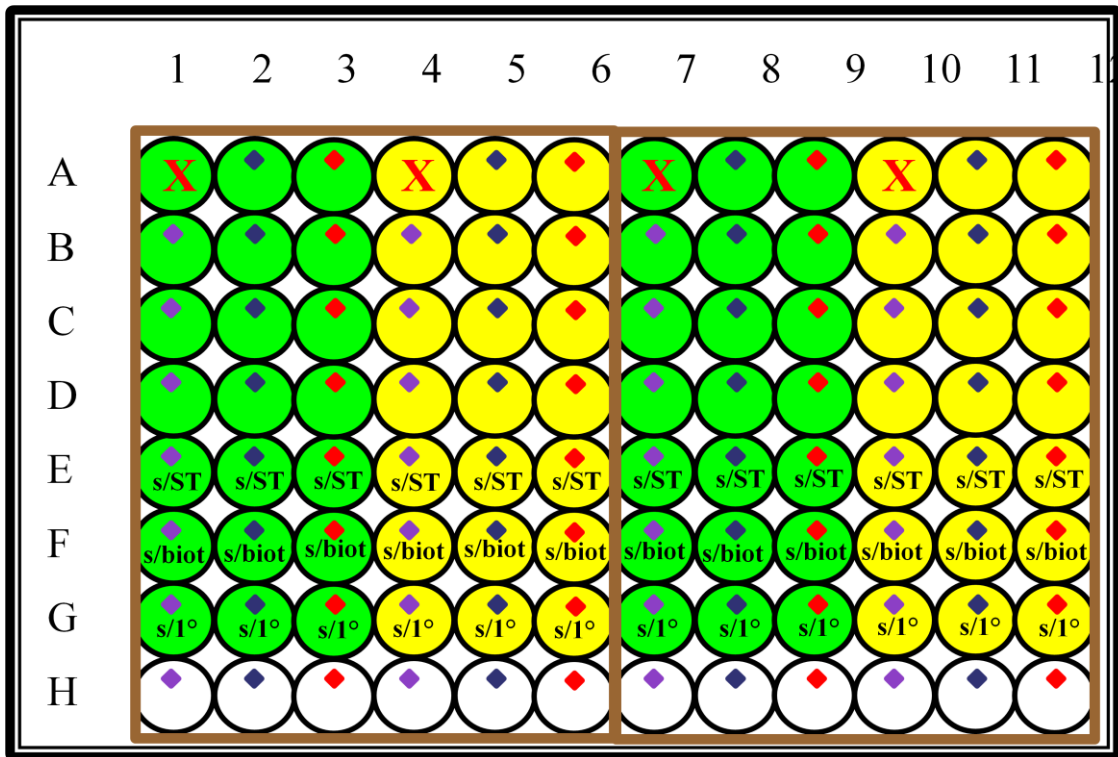
En experimentos previos dentro del laboratorio, se determinó el uso de anticuerpo secundario para lograr una mayor sensibilidad y mejor detección de IgA en suero y



mucosas por medio del ELISA, ya que el ELISPOT emplea el mismo fundamento se decidió utilizar este mismo método usando el anticuerpo secundario.

Las placas se sacaron de la incubadora y se lavó cada pozo como se describe para el revelado de IgG. Se eliminó el exceso de líquido dentro de los pozos. Se preparó una dilución 1/250 del anticuerpo *IgA mouse α -pig* (MCA638 Lote: 010710 Serotec EUA) en PBS-T BSA 1 % y se adicionaron 100 μ L por pozo, según el diseño de placa (figura 11) y se incubó por 2 horas a 25 °C. Se lavaron los pozos seis veces con 200 μ L de PBS-T 0.05 %. Se elaboró una dilución 1/2500 del anticuerpo biotinilado *goat anti-murine IgG* (Invitrogen™ Molecular Probes™ 567269 EUA) en PBS-T BSA 1 % y se adicionaron 100 μ L por pozo (figura 11) y se incubó por 2 horas a 25 °C. Después se lavaron los pozos con PBS-T 0.05 % como se mencionó anteriormente. Se preparó una dilución 1/1000 de estreptavidina conjugada con HRP (Zymed® 43-8323 EUA) en PBS-T BSA 1 % y se agregaron 100 μ L por pozo acorde al diseño de placa (figura 11), dejándose incubar 1 hora a 25 °C.

A partir de la adición de diaminobencidina hasta el análisis estadístico de los resultados, la metodología es igual a la descrita para la detección de AbPC-IgG.



- Pozo sensibilizado con Ab de captura
- Pozo sensibilizado con antígeno OVA
- Pozo testigo no sensibilizado
- Pozo con células sin estimular (s/e)
- Pozo con células estimuladas con ConA
- Pozo con células estimuladas con OVA
- Pozo testigo sin células
- Pozo testigo sin anticuerpo primario
- Pozo testigo sin anticuerpo biotinilado
- Pozo testigo sin complejo estreptavidina-enzima

Figura 11. Diseño de placa para la detección de AbPC-IgA totales y antiOVA por ELISPOT. La técnica de revelado con Ab secundario (biotinilado) permite procesar dos muestras por placa (zonas delimitadas por rectángulos de aristas marrones). Las AbPC-IgA totales se detectan con un anticuerpo de captura anti IgA (pozos amarillos) y las AbPC-IgA antiOVA, con antígeno (pozos verdes) (figura 12). El testigo sin sensibilizar no contiene Ab de captura o antígeno OVA.

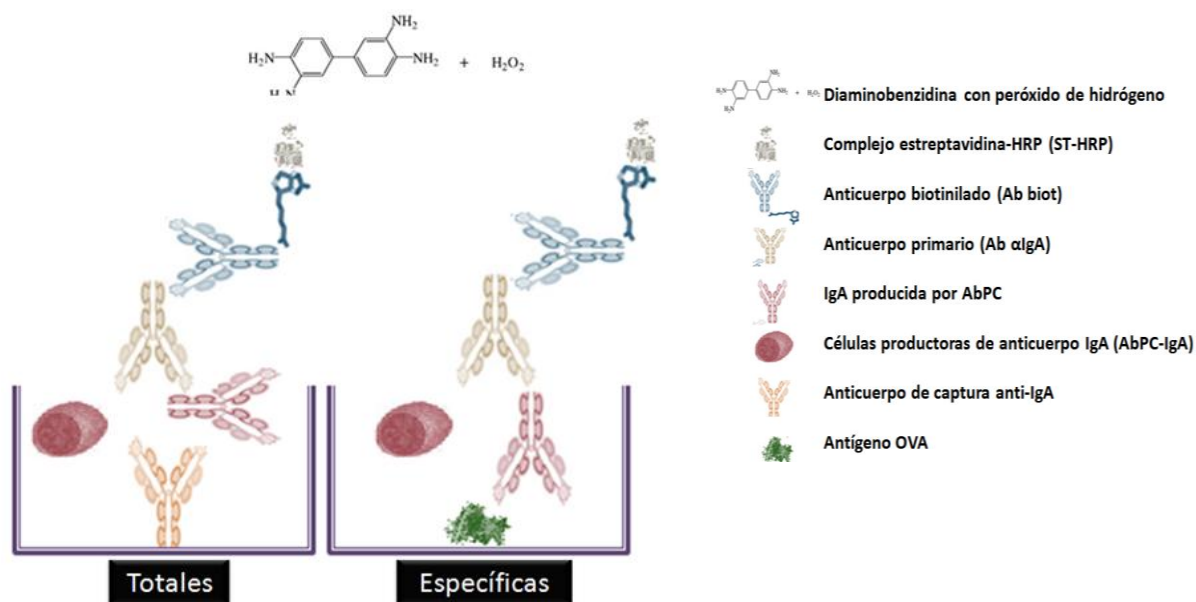


Figura 12. Representación esquemática del revelado de ELISPOT con Ab secundario para la detección de AbPC-IgA totales y antiOVA. Para la detección de AbPC-IgA antiOVA, el pozo se sensibiliza con OVA (proteína verde), se adicionan las células (células rojas) que producen y liberan IgA (anticuerpo rojo), detectada por el anticuerpo primario o Ab αIgA (anticuerpo café), después se adiciona el anticuerpo biotinilado o Ab biot (complejo azul) que se une al anticuerpo primario. Finalmente la biotina se une por afinidad estructural al complejo estreptavidina-HRP o ST-HRP (complejo gris). Para el revelado se adiciona diaminobenzidina, como sustrato, con peróxido de hidrogeno (molécula). La única diferencia que existe para la detección de AbPC-IgA totales, es que el pozo se sensibiliza con anticuerpo de captura (anticuerpo naranja) anti IgA.

Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA totales y específicas en pulmón

Una vez montada la técnica de ELISPOT para detectar AbPC-IgG y AbPC-IgA en sangre, se decidió probarla en ganglio y pulmón.

Distribución de los sacrificios

Los animales correspondientes a los grupos OVA y PBS, se sacrificaron a lo largo de dos semanas. En cada día se obtuvieron muestras mucosales y sanguíneas.

Los animales fueron pesados y muestreados de mucosa nasal, posteriormente se les administró 1 mL Sural® (Azaperona. SAGARPA Q-0895-021 Chinoin®) por cada 20 kg de peso, vía intramuscular y tras 20 minutos, se les administró vía intravenosa Zoletil®



(Zolazepam. SAGARPA Q-0042-058 o 306 Virbac®, respectivamente) en una dosis 2.8 mg/Kg de peso. Después se tomaron muestras de saliva y de sangre para ELISPOT. Una vez muestreados, los animales se aseguraron de las patas traseras y se colgaron para lavarlos con jabón, después se secaron y sanitizaron con solución de yodo (tintura de yodo Tupzol® N-2264-G). Se sacrificaron por desangramiento, cortando las venas yugulares.

Obtención y procesamiento de órganos

Se obtuvieron, en condiciones de esterilidad, los pulmones completos, tráquea y corazón (ligando la parte superior de la tráquea, venas y arterias subclavias y carótidas, así como la vena cava), y ganglios linfáticos (cervicales, axilares, mandibulares y peritraqueales). El procesamiento de dichos órganos se realizó con material estéril.

Pulmón

■ Día uno

Lavado

Se realizó el lavado de los pulmones pasando 1 L de solución salina fisiológica (SSF) por medio de un catéter I.V. 18 G x 1" (Punzocat®) a través de la vena pulmonar y haciendo una incisión en el ventrículo izquierdo del corazón, con la finalidad de remover la mayor cantidad de sangre del tejido.

Obtención del parénquima pulmonar

Se hizo un *pool* de los diferentes lóbulos pulmonares (craneal, medio y caudal), a los cuales se les retiró el árbol bronquial, procurando no generar moco. Después se maceró el tejido, cortándolo con tijeras en pequeños trozos.

Digestión con colagenasa

Por cada gramo de tejido se adicionó 1.5 mL de colagenasa IV 150 U/mL (*Collagenase type 4* Worthington® Lote: 4189 EUA) preparada en medio incompleto RPMI 1640, dejándose en agitación durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se filtró con organza estéril y la suspensión se centrifugó a 350 xg/10 min; la pastilla se resuspendió en 30 mL de PBS estéril y se centrifugó nuevamente a 350 xg/10 min. Después se lisaron los eritrocitos y a



partir de este punto se sigue la metodología descrita en **Desarrollo de ELISPOT en sangre, Día uno, Día dos y Día tres.**

Conteo de manchas

Como se observa más adelante (ver resultados), ya que las manchas obtenidas en la detección de AbPC-IgA totales y específicas presentaron confluencia (imagen 32) dificultando el conteo. Se decidió usar un conteo estimado mediante el uso de funciones de área, en el cual se determinó el número de manchas en un área pequeña (determinada por la función del programa *Image J*) de toda la membrana y se refirió proporcionalmente al área total (determinada por la función del programa *Image J*). Este conteo denominado como “conteo estimado” se ensayó y comparó con el método de conteo manual en membranas correspondientes a la detección de AbPC-IgA de sangre para determinar si las respuestas obtenidas presentaban diferencia significativa (figura 33). Una vez determinado que las respuestas entre métodos de conteo fueron iguales se aplicó en la estandarización de ELISPOT para detectar AbPC-IgA de pulmón.

Ganglio linfático

▪ **Día uno**

Limpieza

Se utilizaron los ganglios ubicados en la zona de inmunización. Con pinzas estériles se removió el tejido adiposo que los recubría y se maceraron de igual forma que el parénquima pulmonar.

Digestión con colagenasa

Se siguió la misma metodología descrita para pulmón.



ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES EN ELISPOT PARA LA DETECCIÓN DE AbPC-IgA EN PULMÓN

Debido a que los valores de AbPC-IgA en pulmón se obtuvieron por conteo estimado (ver resultados figuras 32 y 34), se decidió usar otro animal para probar diferentes condiciones y determinar si las condiciones probadas mejoraban la apariencia y definición de las manchas para el conteo manual.

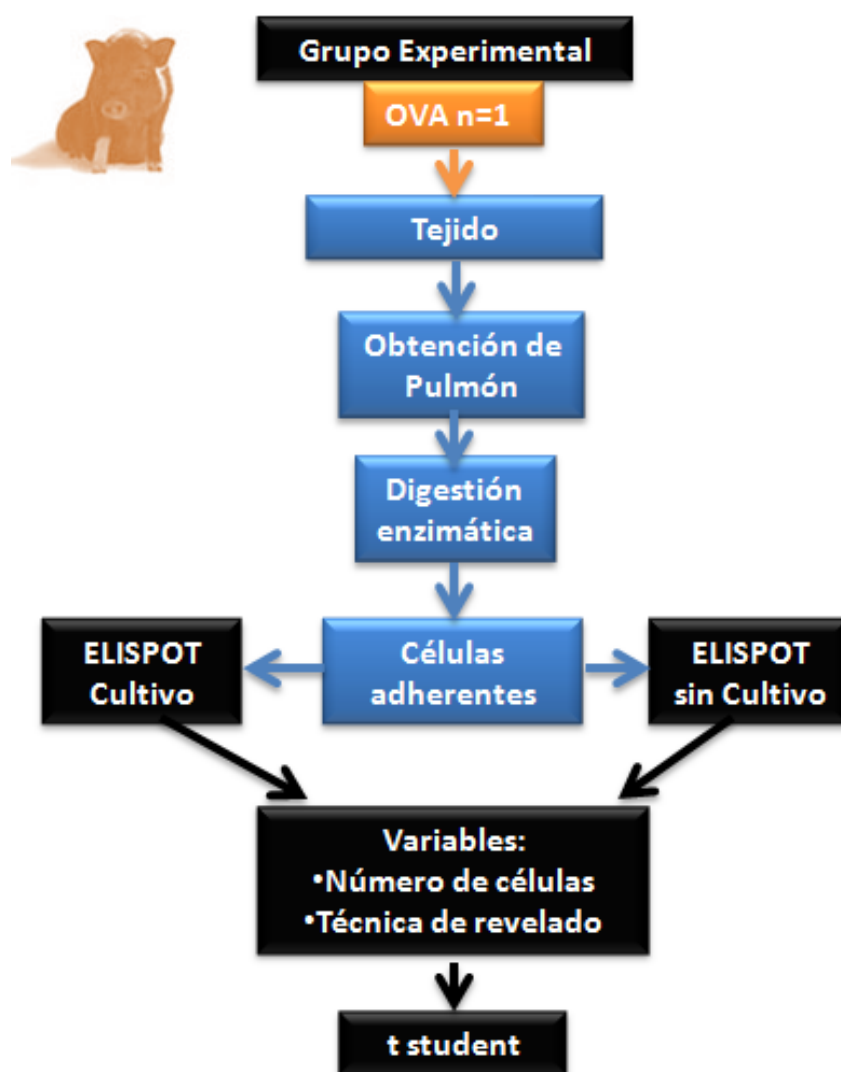


Figura 13. Diseño experimental para las pruebas de estandarización de ELISPOT en la detección de AbPC-IgA en pulmón. Se observa la metodología general para la determinación de condiciones para la detección y cuantificación de AbPC-IgA en pulmón de cerdo (número de células por pozo, técnicas de revelado y evaluación de la influencia del cultivo celular).



Se usó un animal inmunizado por protocolo mucosal (SC, SC e IN) con OVA y adyuvante oleoso. Las pruebas a realizar consistieron en células obtenidas de pulmón llevadas a cultivo de 20 horas, antes descrito, y células sin cultivar. Ambas poblaciones se probaron bajo dos diferentes variables: la comparación de la respuesta al utilizar dos números de poblaciones celulares (200 000 y 400 000 cél/pozo) y comparación de la técnica de revelado en IgA (técnica con anticuerpo secundario y la técnica de revelado sin anticuerpo secundario).

Proceso de revelado IgA con Ab secundario (figura 12)

Misma metodología que en el apartado de proceso de revelado IgA con Ab secundario.

Proceso de revelado IgA sin Ab secundario (figura 10)

Misma metodología que en el apartado de proceso de revelado IgG sin Ab secundario excepto el uso de anticuerpo IgA conjugado con enzima HRP. Se preparó una dilución 1/10 000 de anticuerpo IgA-HRP (Goat anti-Pig IgA HRP conjugated Lote: A100-102P-22 Bethyl®) en PBS-T BSA 1 %, de la cual se agregaron 100 µL por pozo y se incubó 2 horas a 25 °C.

El proceso de revelado fue el mismo que el descrito previamente.



SEMPURIFICACIÓN DE CÉLULAS POR GRADIENTE DE PERCOLL

Aún con las determinaciones obtenidas por las pruebas piloto, no se mejoró la definición de manchas en pulmón, por lo que se decidió utilizar células semipurificadas por un método de gradiente discontinuo de densidad, como el Percoll

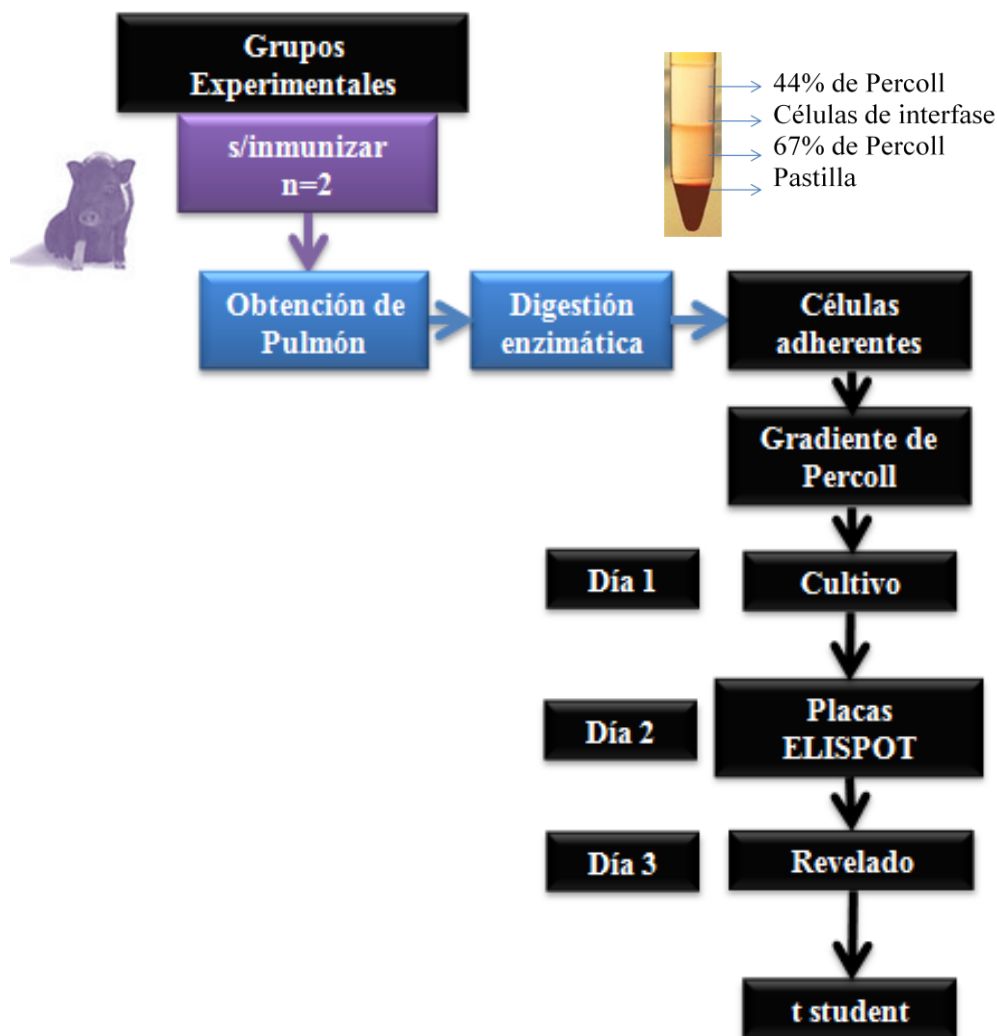


Figura 14. Diseño experimental para la semipurificación de células de pulmón con Percoll. Se observa la metodología general para la determinación del efecto de la semipurificación de las células obtenidas de pulmón con Percoll.



Se usó un animal no inmunizado. La prueba consistió en tratar células obtenidas de pulmón, con un gradiente de densidad discontinuo (Percoll) y hacer una comparación con células sin este tratamiento. Probado con 400 000 cél/pozo y técnica de revelado sin anticuerpo secundario.

Después de los lavados con el amortiguador de lisis de eritrocitos, la pastilla se resuspendió en 10 mL de Percoll al 44 %v/v en PBS estéril, y se vertió sin mezclar sobre una cama de 10 mL de Percoll al 67 %v/v en PBS estéril. Se centrifugó a 201 xg/30 min a 25 °C. Se colectaron las células de la interfase y se lavaron dos veces con medio completo RPMI 1640 estéril centrifugando a 140 xg/5 min.

El resto de la metodología se siguió como la descrita previamente. Se utilizó la técnica de revelado sin Ab secundario para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA.

RESULTADOS

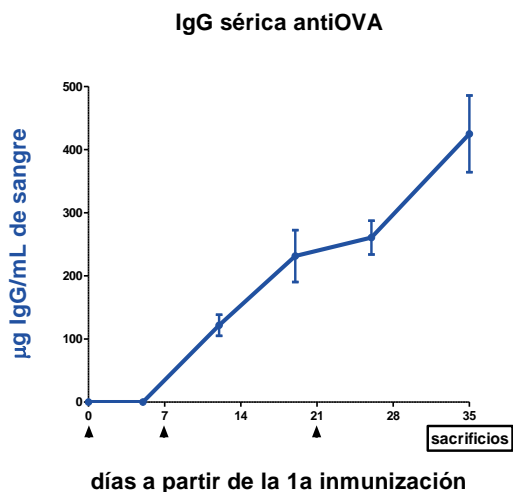
Monitoreo del protocolo de inmunización mediante la cuantificación de IgG e IgA en suero y secreciones mucosales por ELISA

Para determinar que el protocolo de inmunización generó respuesta humoral a nivel sistémico en los animales, se cuantificaron anticuerpos en suero por ELISA (IgG: $\mu\text{g/mL}$, IgA: ng/mL). Los resultados se presentan en una cinética de concentración de IgG antiOVA (figura 15 A) y de IgA antiOVA (figura 15 B).

Aunque en ambos casos los valores aumentan en respuesta a la segunda inmunización, los comportamientos no se mantienen parecidos en función del tiempo en comparación de ambos isotipos.



A



B

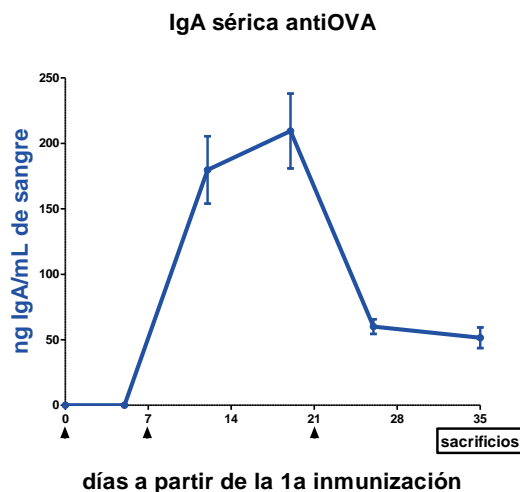


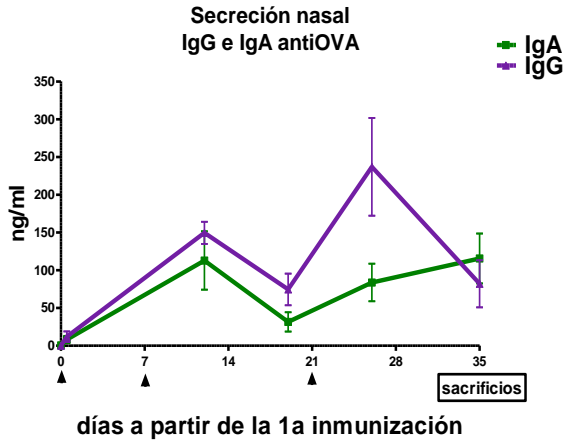
Figura 15. Monitoreo del protocolo de inmunización por cuantificación de anticuerpos séricos IgG e IgA antiOVA mediante ELISA cuantitativo. Los valores netos son los promedios de los animales inmunizados menos el valor de los animales no inmunizados de IgG sérica (A) e IgA sérica (B) por ELISA \pm EEM (error estándar de la media).

Para confirmar que el protocolo generó respuesta humoral en secreciones mucosales, se cuantificó la IgG e IgA específicas de antígeno en secreción nasal y saliva por ELISA. Las curvas muestran la respuesta antiOVA (figura 16 A y B), donde la cantidad de IgG es ligeramente mayor que la de IgA, aunque este isotipo se considera preferentemente de mucosas (Vega-López y col., 2012).

Se corroboró que el protocolo de inmunización generó respuesta humoral específica de antígeno a nivel sistémico y mucosal, detectable por ELISA cuantitativa.



A



B

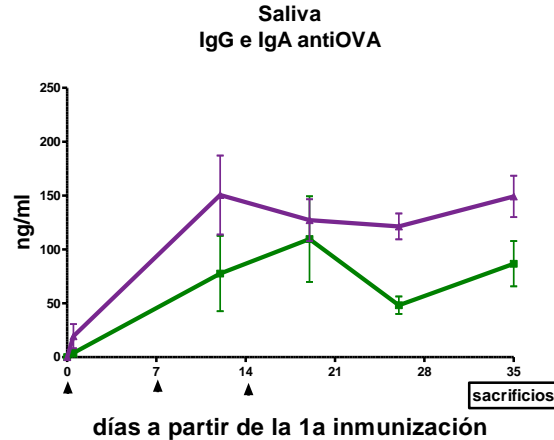


Figura 16. Monitoreo del protocolo de inmunización por cuantificación de anticuerpos en secreción nasal y saliva IgG e IgA antiOVA mediante ELISA cuantitativo. Los valores netos son los promedios de los animales inmunizados menos el valor de los animales no inmunizados de IgG (curva morada) e IgA (curva verde) en secreción nasal (A) y saliva (B) por ELISA. Los resultados se presentan como el promedio de los valores netos de 4 animales \pm EEM (error estándar de la media).

Condiciones para la elaboración de las placas de ELISPOT

Las placas comerciales para ELISPOT están especialmente diseñadas para el uso de lectores automatizados y kits comerciales RTU cuyo uso y adquisición resultan costosos (Klencke y col., 2002). Tomando en cuenta que la estandarización de la técnica requería de ensayos en diferentes condiciones, se optó por utilizar placas elaboradas en el laboratorio.

Como el uso de autoclave no era viable por el tipo de material de las placas y la radiación ultravioleta es potencialmente riesgosa, se optó por la radiación por microondas. Las condiciones de esterilización como número de ciclos de radiación, potencia e intervalos de reposo ya habían sido probadas en ensayos anteriores (tabla 1). Bajo estas condiciones el proceso fue eficiente para lotes de 4 a 5 placas, aunque a mayores tiempos de exposición o con ciclos continuos las placas se fundían por el calor generado. Por ello se utilizó una base horizontal de tres placas reutilizadas para sostener el lote y con esto se evitaba que las placas se fundieran.



Posteriormente los lotes de placas se pasaron por una prueba de esterilización con medio completo RPMI 1640, resultando éstas negativas a crecimiento bacteriano confirmando la efectividad del método de esterilización.

Tabla 1. Condiciones establecidas para la elaboración y esterilización de las placas de ELISPOT desarrolladas en el laboratorio

Placas poliestireno Costar® fondo plano	
Material adsorbente	Nitrocelulosa 45micron Hybond
Diámetro de membranas	0.6cm aprox.
Esterilización	Radiación por microondas
No. de ciclos	5 de 60 Watts (p5)
Tiempo por ciclo	4 min con intervalos de reposo de 10 min
Prueba de esterilidad	Medio de cultivo 4 días a 37°C

Prueba de placas elaboradas por cinética de ELISPOT para la detección AbPC en sangre de animales inmunizados

Se realizaron los cuatro ensayos de la cinética de detección de AbPC en sangre por ELISPOT para probar la funcionalidad de las placas elaboradas y aplicarlas posteriormente en el desarrollo de ELISPOT en ganglio y pulmón (figura 6).

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas del gradiente de Ficoll fueron estimuladas *in vitro* mediante un cultivo de 20 horas para evaluar si la técnica de ELISPOT podía detectar el efecto de los estímulos sobre las células. Previo a la cosecha, los cultivos celulares se monitorearon y se determinó que no estaban contaminados. En la



figura 17 se muestran las características de estos cultivos y las formaciones clásicas de rosetas bajo el efecto del estímulo con ConA y OVA.

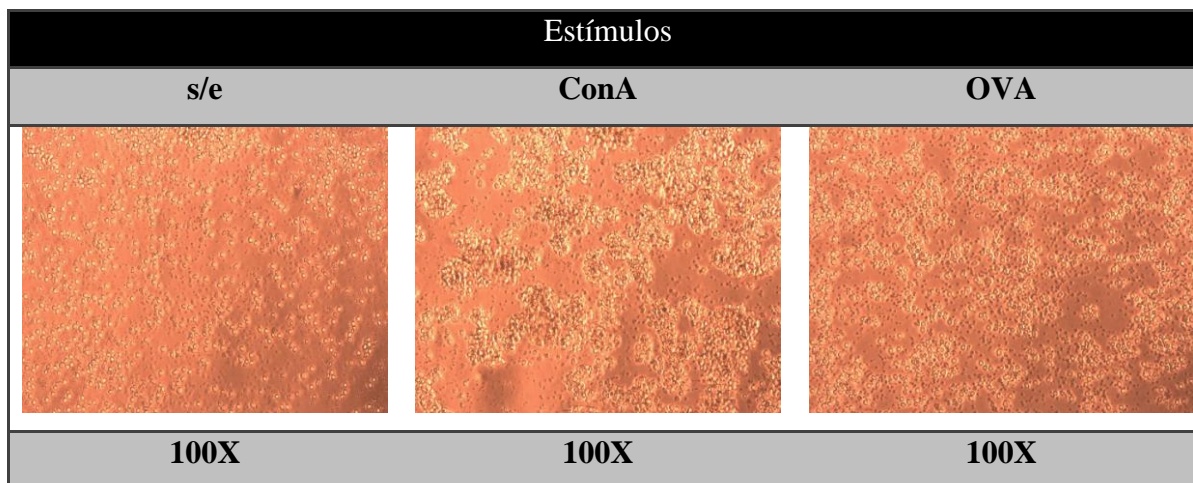


Figura 17. Fotografías representativas de cultivos celulares de 20 horas de PBMC con diferentes estímulos. Sin estimular (s/e), concanavalina A (ConA) y ovoalbúmina (OVA) (Capturadas con microscopio invertido Zeiss ® Axiovert 25).

Transcurrido el tiempo de cultivo las células se contaron y se determinó su viabilidad. Las células se sembraron en las placas de ELISPOT para su incubación y posterior revelado para la detección de AbPC-IgG usando técnica de revelado sin anticuerpo secundario (figuras 9 y 10) y de AbPC-IgA usando técnica de revelado con anticuerpo secundario (figuras 11 y 12).

Detección de AbPC- IgG en sangre de animales inmunizados

Las membranas representativas de la detección de AbPC-IgG en sangre (técnica de revelado y estímulo en el cultivo) se muestran en la figura 18, tanto de los pozos testigo como de los pozos con todo.

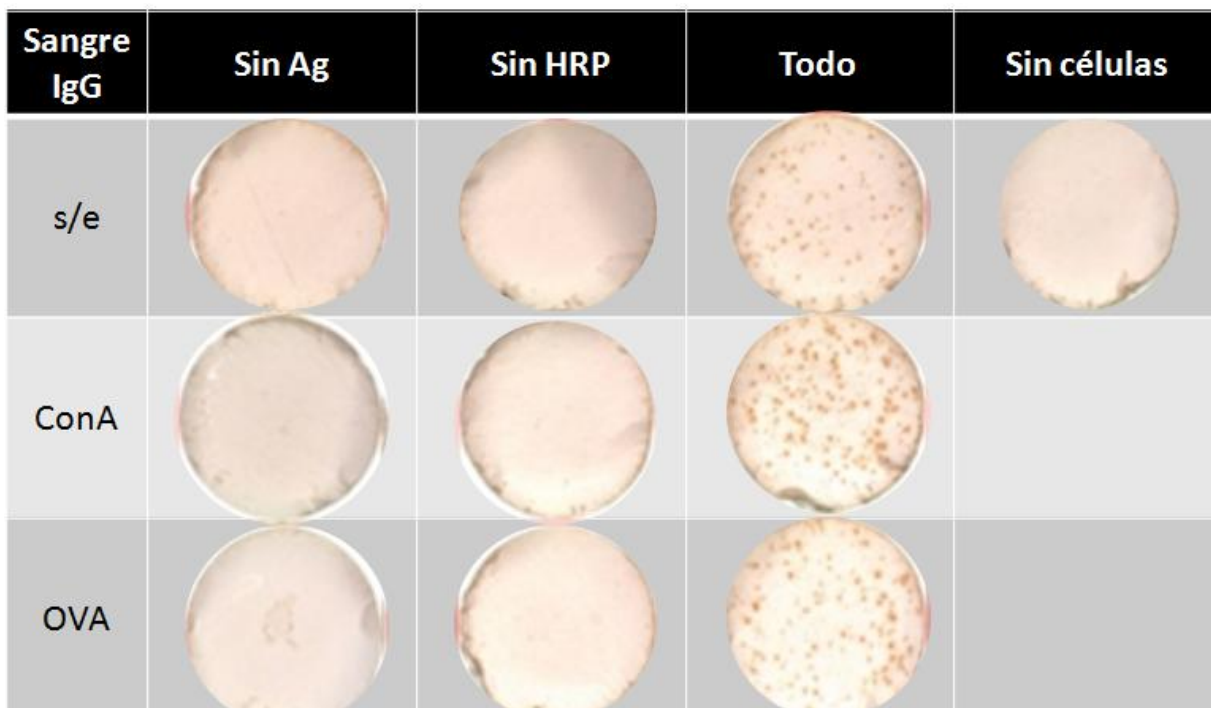


Figura 18. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG en sangre de cerdos inmunizados con OVA. Son evidentes las diferencias para las respuestas entre los pozos testigo, pozos no sensibilizados con OVA o con Ab de captura según el diseño de placa (figura 9) (sin Ag), pozos sin la adición de Ab α -pig IgG-HRP (sin-HRP), pozos sin suspensión celular (sin células); en comparación con la respuesta en las membranas con adición de todos los reactivos necesarios para el revelado y obtención de manchas (Todo).

DetECCIÓN DE AbPC-IgA EN SANGRE DE ANIMALES INMUNIZADOS

Las membranas de la detección de AbPC-IgA con anticuerpo secundario (técnica de revelado y estímulo en el cultivo) se muestran en la figura 19.

En la técnica de revelado con anticuerpo secundario se observaron respuestas inespecíficas en los pozos testigo sin la adición de anticuerpo primario (figura 19). Las cuales debieron ser restadas posteriormente a los valores obtenidos en los pozos con todo y no se promediaron con los valores obtenidos de los otros pozos testigo (con valores de prácticamente cero).

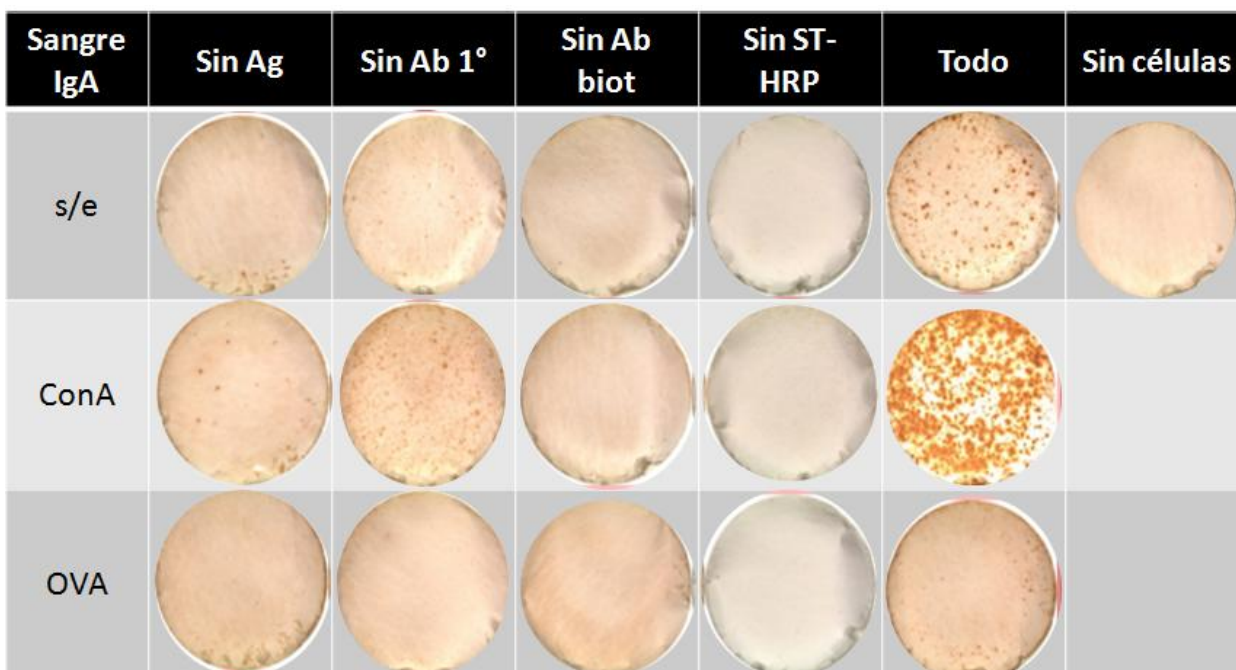


Figura 19. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en sangre de cerdos inmunizados con OVA. Como en el caso de IgG, se observan diferencias importantes para las respuestas entre los pozos testigo, pozos no sensibilizados con OVA o con Ab de captura (sin Ag) según el diseño de placa (figura 11), pozos sin la adición de Ab primario α -pig IgA (sin Ab 1°), pozos sin Ab secundario (biotilado) *goat antimurine* (sin Ab secundario) y pozos sin la adición del complejo estreptavidina-HRP (sin ST-HRP), pozos sin suspensión celular (sin células); en comparación con la respuesta en las membranas con adición de todos los reactivos necesarios para el revelado y obtención de manchas (Todo).

Comparación del método de conteo manual y el automático bajo las condiciones de uso de las placas de ELISPOT

Una vez obtenidas las imágenes del primer punto de la cinética en sangre por ELISPOT, fue necesario comparar entre dos métodos de conteo: manual (figura 20 A) que permite al operador usar su criterio para realizar el conteo de manchas y el automático (figura 20 B) que consiste en establecer parámetros como tamaño, resolución de imagen, distancia entre manchas (Distancia de 1-5 píxeles entre manchas, resolución de imagen en 8 bits, unidades ajustadas en μm , color binario, circularidad 0-1 y tamaño entre 1-100) para que el programa Image J [®] realice el conteo. El conteo automático generó resultados más dispersos en la mayoría de las membranas con respecto al método manual. Como se observa en la figura 20



B el programa tomó en cuenta marcas producidas por la manipulación de las membranas delimitando extensiones de área inespecíficas e ignoró manchas propias de la respuesta por AbPC.

A

B

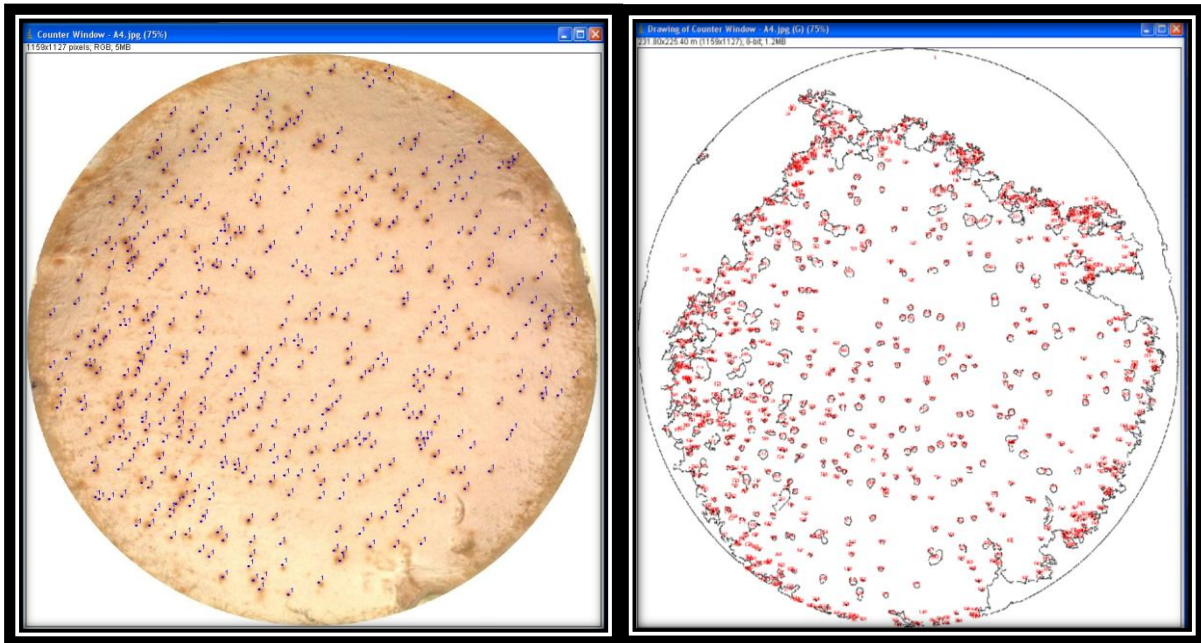


Figura 20 . Métodos de conteo de manchas en membranas reveladas de ELISPOT mediante el uso de *Image J*®. El *software* utilizado permite el conteo de partículas en una imagen capturada y editada. De ahí la importancia del cuidado de la membrana al ser trabajada, tanto en el conteo denominado manual (A) como el uso del conteo automático (B).

La comparación entre ambos métodos de conteo se muestra en la figura 21 donde se observan los resultados de los valores obtenidos del promedio de tres repeticiones para cada una de las condiciones en los pozos testigo y los pozos con todo en los animales del grupo OVA.

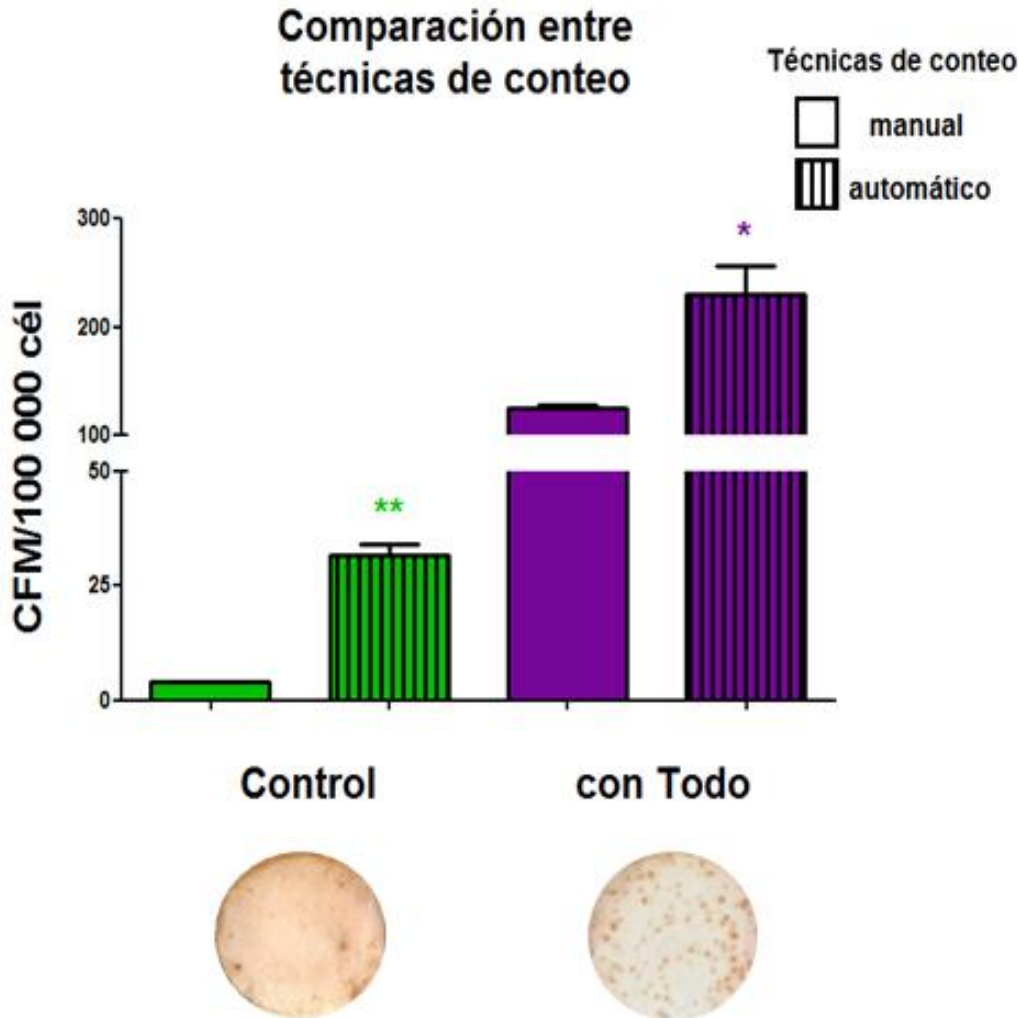


Figura 21. Comparación estadística entre técnicas de conteo manual y automático en membranas de pozos testigo y con todo. El gráfico muestra que los valores promedio obtenidos de los conteos del número de CFM por cada 100 000 cél presentan diferencia entre ambos métodos de conteo. El conteo manual presenta menores desviaciones que el método automático para las membranas de pozos testigo y con todo.

Para determinar la variación del método manual, se evaluaron las desviaciones estándar de los conteos por triplicado en cada membrana para todos los animales. Los resultados se muestran en la tabla 2, donde se compararon los valores de los pozos testigo y con todo. Las desviaciones fueron bajas y parecen estar en una relación proporcional a la cantidad de manchas contadas por membrana. Estos valores mostrados en la tabla 2 son representativos



de todos los conteos para la cinética en sangre en la detección tanto de AbPC-IgG como de AbPC-IgA.

Tabla 2. Valores y desviaciones obtenidos en repeticiones de conteo manual en membranas de pozos testigo y con todo en ELISPOT para la detección de AbPC en sangre de cerdos inmunizados

Pozos testigo	No. de manchas/membrana	Desviación estándar	Pozos Todo	No. de manchas/membrana	Desviación estándar
	0	±0.0		241	±2.1
	0	±0.1		281	±3.0
	0	±0.0		267	±2.5
	1	±0.3		293	±3.0

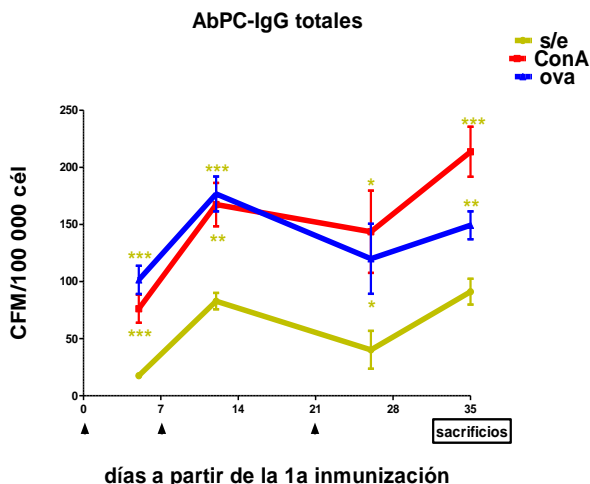
Una vez establecido que la técnica detectó AbPC-IgG y AbPC-IgA en sangre y que el conteo debió realizarse manualmente, se probó que la técnica detectara AbPC durante el protocolo de inmunización mediante cinéticas, comparando el efecto de los estímulos en el cultivo de Ig totales y antiOVA.

Detección del número de AbPC-IgG en sangre por la técnica de ELISPOT en grupo de cerdos inmunizados con OVA

Las AbPC-IgG totales (figura 22 A) muestran diferencias significativas entre las células estimuladas con ConA y OVA sobre el testigo negativo(s/e) para Ig totales. En el caso AbPC-IgG antiOVA (figura 22 B), sólo a partir de la segunda inmunización se muestra un aumento en las tres condiciones (s/e, ConA y OVA).



A



B

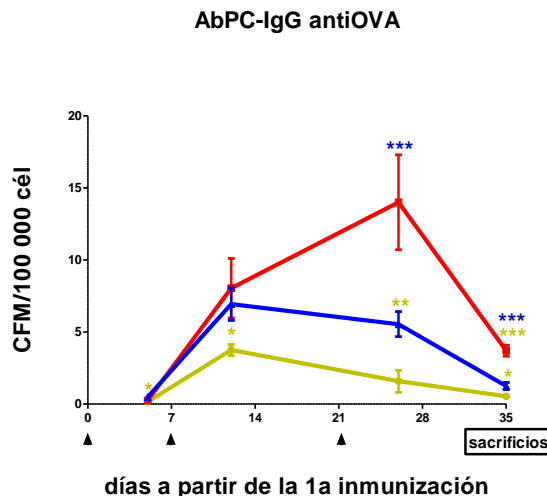


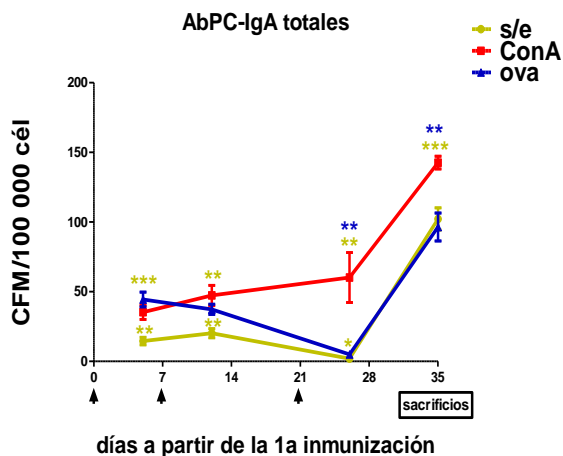
Figura 22. Cinética de células formadoras de mancha (CFM) de AbPC-IgG total (A) y antiOVA (B) en sangre a lo largo del protocolo de inmunización en grupo OVA determinadas por ELISPOT. En ambos gráficos se compara la respuesta de células estimuladas en cultivo de 20 horas (s/e en línea amarilla, ConA en línea roja y OVA en línea azul) a lo largo de 35 días posteriores a la primera inmunización. Cada punto representa el promedio de 4 animales \pm EEM (error estándar de la media). El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. (* $P < 0.05$) (** $P < 0.01$) (***) $P < 0.001$).

Detección del número de AbPC-IgA en sangre por la técnica de ELISPOT en grupo de cerdos inmunizados con OVA

Las AbPC-IgA tanto totales (figura 23 A) como antiOVA (figura 23 B) se muestran en los gráficos donde se observan diferencias significativas entre las células estimuladas con ConA con respecto a OVA y s/e para totales, en el caso de la respuesta específica, prácticamente no hay diferencias.



A



B

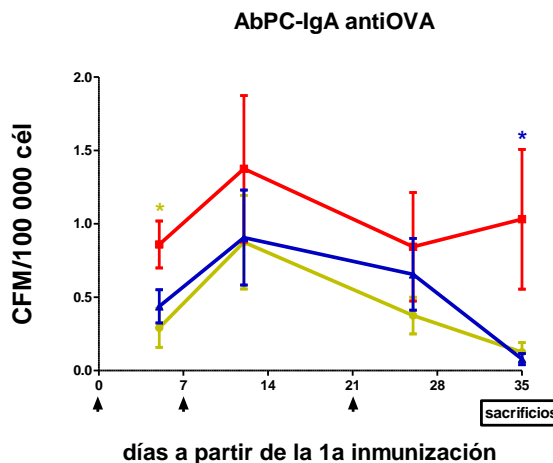


Figura 23. Cinética de células formadoras de mancha (CFM) de AbPC-IgA total (A) y antiOVA (B) en sangre a lo largo del protocolo de inmunización en grupo OVA determinadas por ELISPOT. En los gráficos se compara la respuesta de células estimuladas en cultivo de 20 horas (s/e, ConA y OVA). Cada punto representa el promedio de 4 animales \pm EEM (error estándar de la media). El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. (* $P < 0.05$) (** $P < 0.01$) (***) $P < 0.001$).

Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG totales y antiOVA en pulmón de cerdo

A partir del día 31 (figura 6) se realizó el sacrificio de los animales para la obtención de ganglios linfáticos (como tejido testigo por ser un órgano ligado a la inmunidad sistémica) y pulmón (como tejido problema ligado a la inmunidad mucosal) para detectar AbPC por ELISPOT.

La figura 24 muestra los promedios de los conteos de células obtenidos en relación a las cantidades de muestras requeridas para cada órgano de los seis animales sacrificados. El ganglio fue el tejido con mayor rendimiento celular. Las células fueron llevadas a cultivo de 20 horas con diferentes condiciones de estímulo (s/e, ConA y OVA).



Cantidades de células no adherentes en tejidos

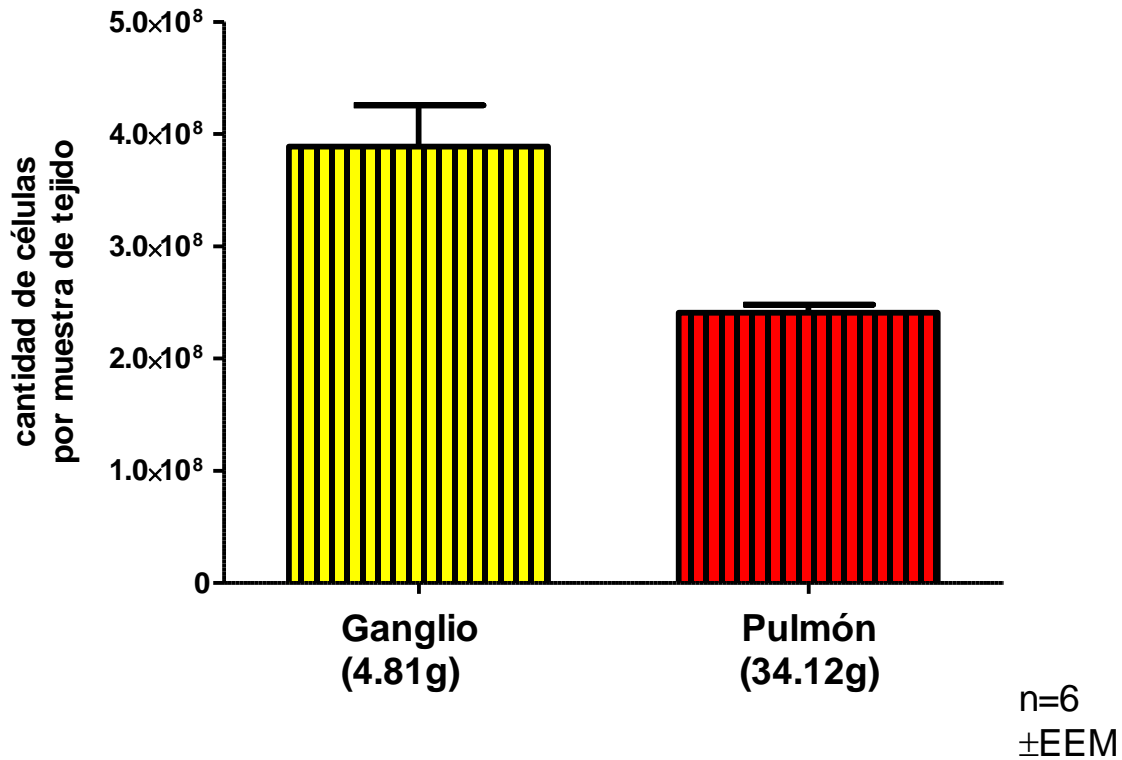


Figura 24. Comparación estadística de la cantidad de células no adherentes de ganglio linfático y pulmón de cerdos. Cantidad promedio de tejido procesado por ensayo (n=6).

Las células obtenidas después del cultivo fueron contadas y se determinó su viabilidad para sembrarlas en placas de ELISPOT. En la figura 25 se muestran los promedios de las cantidades de células donde se compararon las diferentes condiciones de cultivo y observar cuantas células se perdían por efecto de adherencia o muerte celular en función de los estímulos trabajados (s/e, ConA y OVA).



**Cantidades de células de tejidos
obtenidas de cultivo de 20×10^6 células
comparadas por estímulo**

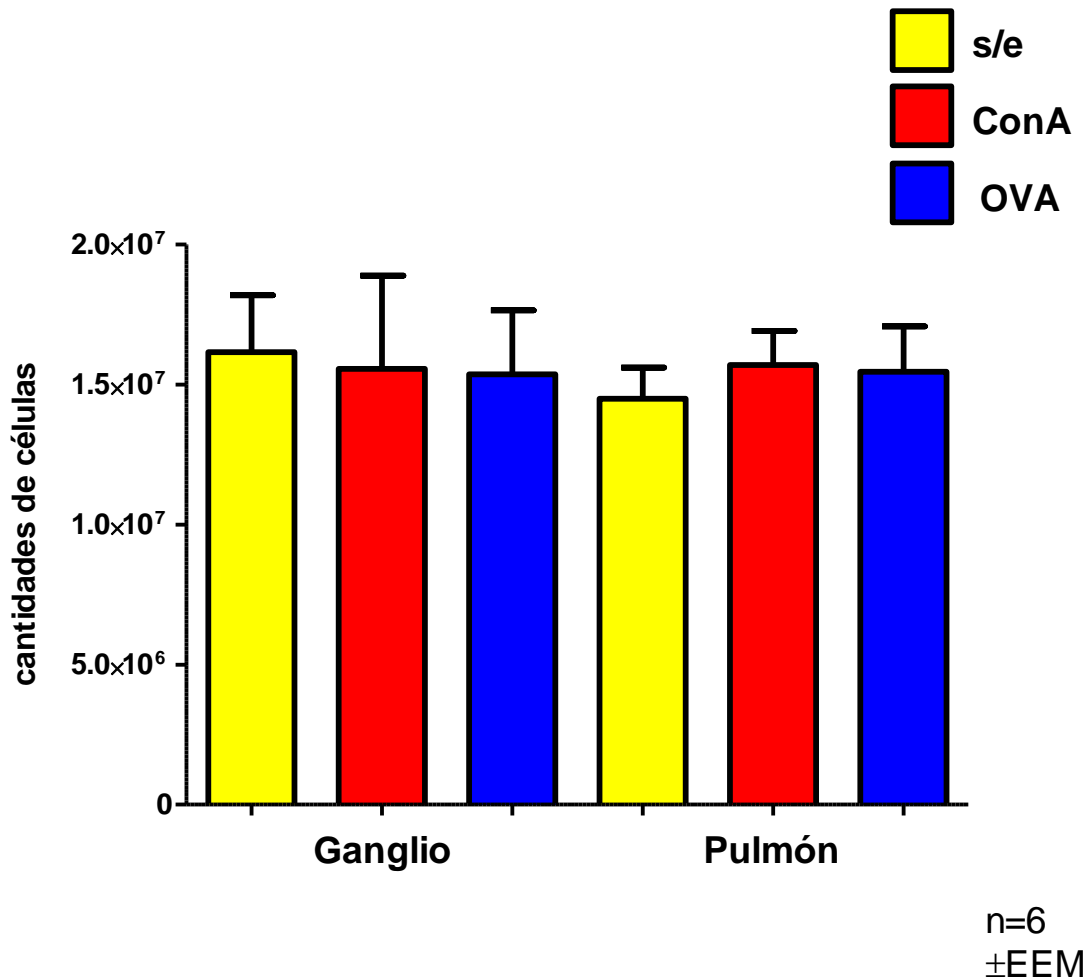


Figura 25. Comparación estadística de la cantidad de células no adherentes de ganglio linfático y pulmón de cerdo, cosechadas en las diferentes condiciones de cultivo. Cantidad promedio de tejido procesado por ensayo (n=6).

Como se observa en la figura 25 después del cultivo se pierde cierta cantidad de células por adherencia o muerte celular. Sin embargo este efecto no tiene diferencia entre los tejidos ni entre los estímulos comparados.



Con las condiciones determinadas en sangre se desarrolló la técnica de ELISPOT para ganglio linfático y pulmón.

Detección de AbPC-IgG en ganglio por ELISPOT

Las manchas obtenidas para la detección de AbPC-IgG en ganglio se muestran en la figura 26.



Figura 26. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG en ganglio linfático de cerdos inmunizados con OVA. Son evidentes las diferencias para las respuestas entre los pozos testigo, pozos no sensibilizados con OVA o con Ab de captura según el diseño de placa (sin Ag), pozos sin la adición de Ab α -pig IgG-HRP (sin-HRP), pozos sin suspensión celular (sin células); en comparación con la respuesta en las membranas con adición de todos los reactivos necesarios para el revelado y obtención de manchas (Todo).

El análisis de ELISPOT de ganglio y la estandarización de la técnica en pulmón se realizó comparando valores de punto final en el grupo OVA y grupo PBS por cada estímulo trabajado.



En AbPC-IgG total (figura 27 A) los valores de ConA y OVA mantienen una mayor respuesta que s/e. En el caso de AbPC-IgG específica (figura 27 B) es clara la diferencia entre los animales inmunizados con OVA con respecto a los inmunizados con PBS. Contrario a lo esperado OVA mantiene una respuesta mucho mayor que ConA.

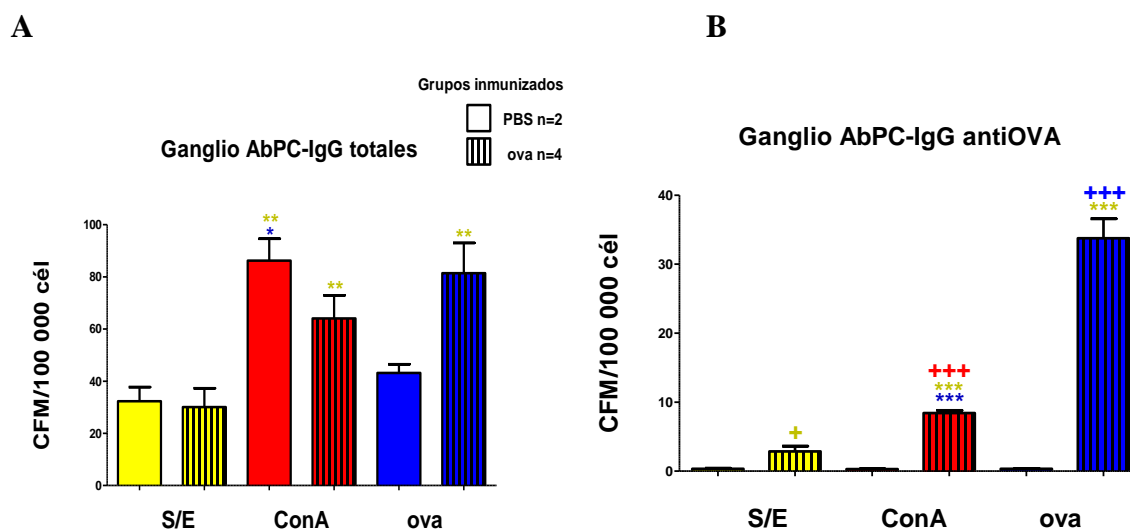


Figura 27. Células productoras de IgG totales (A) y antiOVA (B) en ganglio linfático de cerdos inmunizados determinadas por ELISPOT. Los gráficos muestran el comparativo entre respuesta de grupos de animales no inmunizados (barras vacías) e inmunizados con OVA (barras con líneas). El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. El + corresponde a diferencias evaluadas entre respuestas totales y antiOVA (* P<0.05) (** P<0.01) (***) P<0.001). Los resultados son presentados como el promedio de 4 animales (OVA) y 2 animales (PBS) \pm EEM (error estándar de la media).

Detección de AbPC-IgG en pulmón por ELISPOT

La detección de AbPC-IgG en pulmón se muestra en la figura 28 donde se observa ligera confluencia en las manchas de las membranas con todo sin embargo, el conteo no se vio afectado.

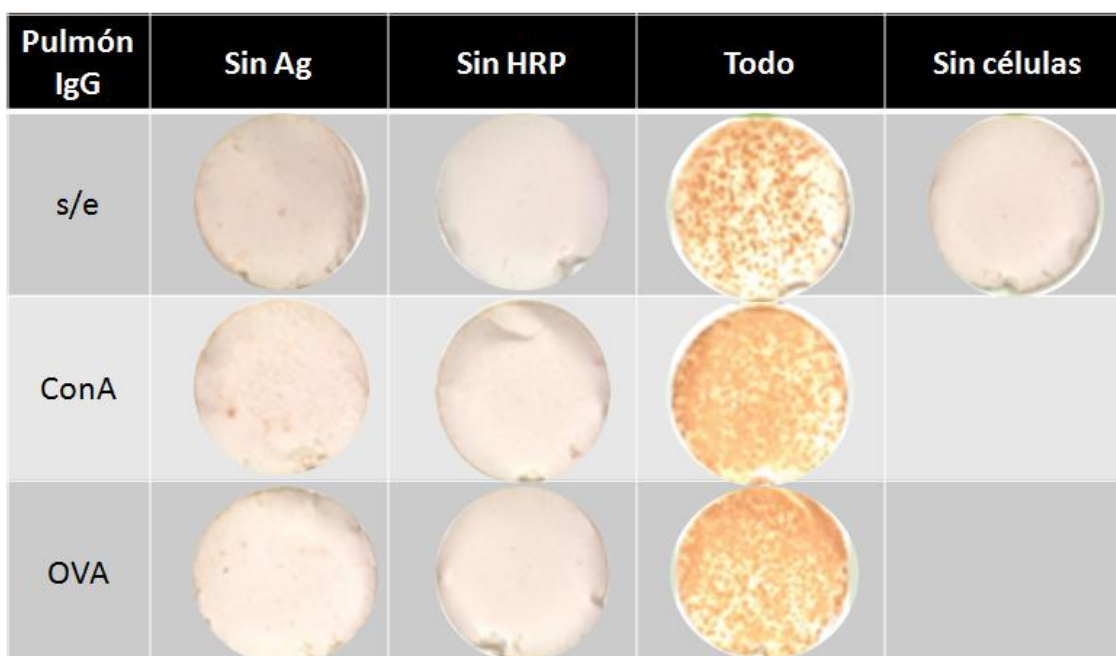
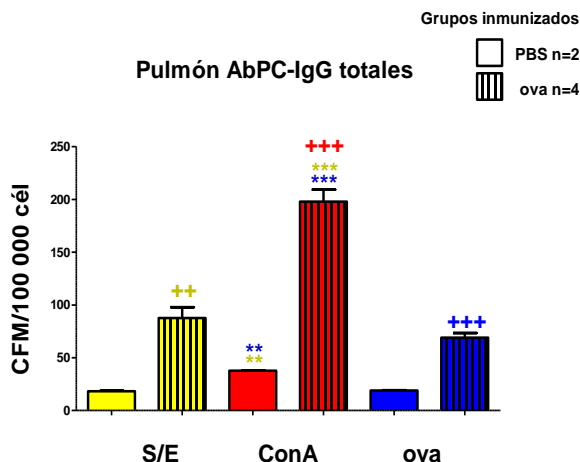


Figura 28. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG en pulmón de cerdos inmunizados con OVA. Aunque las membranas poseen manchas difusas es posible realizar su conteo por el método manual ya mencionado, son evidentes las diferencias para las respuestas entre los pozos testigo, pozos no sensibilizados con OVA o con Ab de captura según el diseño de placa (figura 9) (sin Ag), pozos sin la adición de Ab α -pig IgG-HRP (sin-HRP), pozos sin suspensión celular (sin células); en comparación con la respuesta en las membranas con adición de todos los reactivos necesarios para el revelado y obtención de manchas (Todo).

Al observar los valores obtenidos en pulmón para AbPC-IgG total (figura 29 A) y antiOVA (figura 29 B) las respuestas son más elevadas en el grupo inmunizado con OVA en comparación con el grupo inmunizado con PBS. Los valores de ConA se encuentran más elevados que en el caso de OVA, siendo s/e el de menor respuesta.



A



B

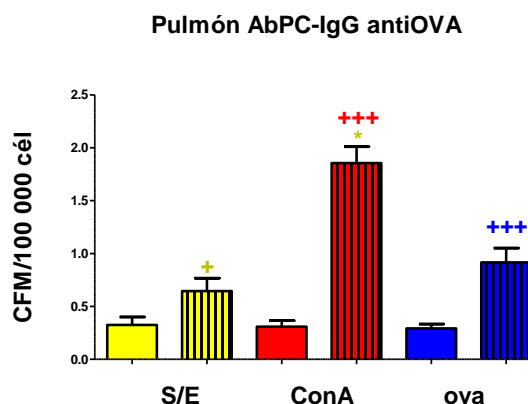


Figura 29. Células productoras de IgG totales (A) y antiOVA (B) en pulmón de cerdos inmunizados, determinadas por ELISPOT. Los gráficos muestran el comparativo entre respuesta de grupos de animales no inmunizados (barras vacías) e inmunizados con OVA (barras con líneas). El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. El + corresponde a diferencias evaluadas entre respuestas totales y antiOVA (* $P < 0.05$) (** $P < 0.01$) (***) $P < 0.001$). Los resultados son presentados como el promedio de 4 animales (OVA) y 2 animales (PBS) \pm EEM (error estándar de la media).

Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo

Detección de AbPC-IgA en ganglio por ELISPOT

A partir del día 31 (figura 6) se realizó el sacrificio de los animales y la obtención de ganglios linfáticos y pulmón para la detección de AbPC por ELISPOT.

La detección de AbPC-IgA en ganglio se muestran en la figura 30 donde no se obtuvo respuesta por el análisis cualitativo (aspecto de las membranas) y cuantitativo (análisis estadístico de conteos).

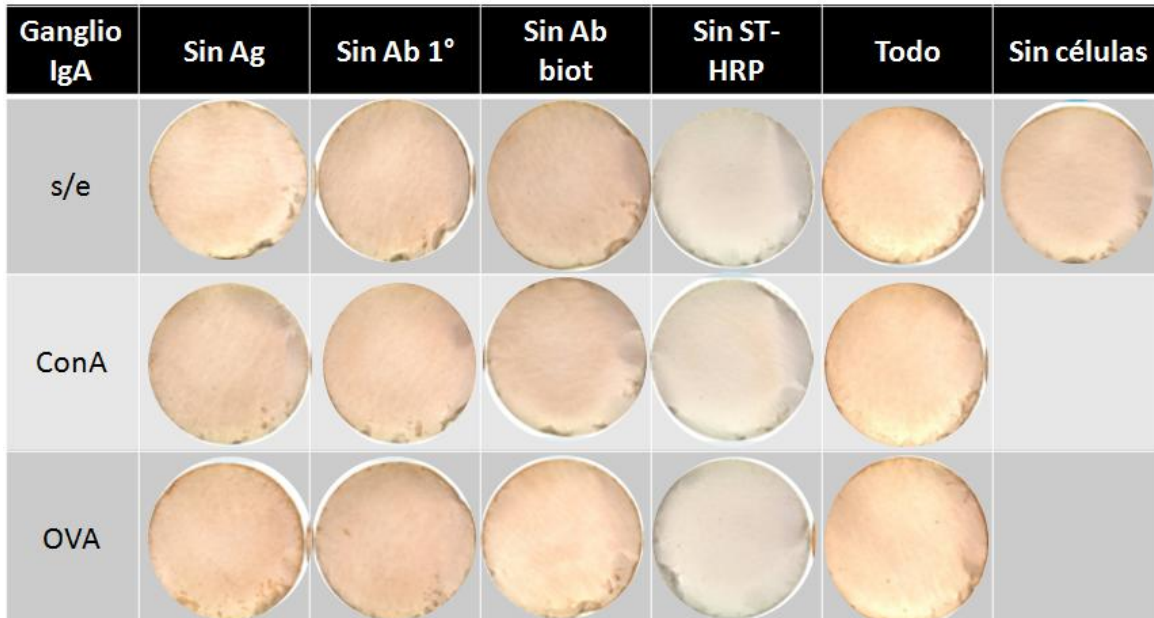
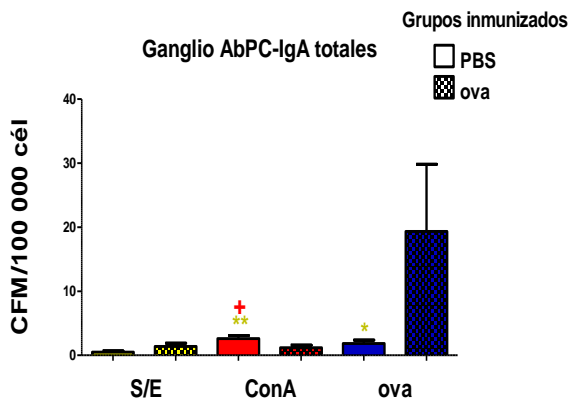


Figura 30. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en ganglio linfático de cerdos inmunizados con OVA. Existen ligeras diferencias entre las respuestas de los pozos testigo, pozos no sensibilizados con OVA o con Ab de captura según el diseño de placa (figura 11) (sin Ag), pozos sin la adición de Ab α -pig IgA (sin Ab 1°), pozos sin Ab biotinilado *goat antimurine* (sin Ab biot) y pozos sin la adición del complejo estreptavidina-HRP (sin ST-HRP), pozos sin suspensión celular (sin células); en comparación con la respuesta en las membranas con adición de todos los reactivos necesarios para el revelado y obtención de manchas (Todo).

En el número de AbPC-IgA totales (figura 31 A) y antiOVA (figura 31 B) se observaron respuestas sin diferencias significativas entre los estímulos.



A



B

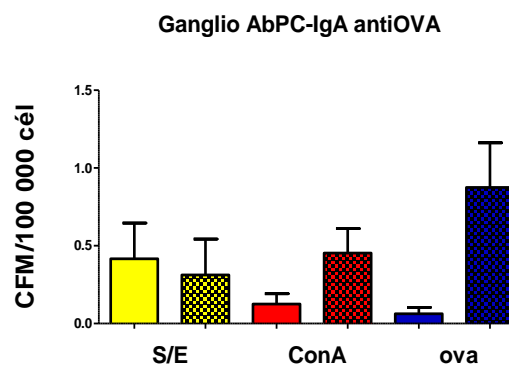


Figura 31. Células productoras de IgA totales (A) y antiOVA (B) en ganglio linfático de cerdos inmunizados, determinadas por ELISPOT. Los gráficos muestran el comparativo entre respuesta de grupos animales no inmunizados (barras vacías) e inmunizados con OVA (barras con líneas). Estadística por prueba de t de Student. El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. El + corresponde a diferencias evaluadas entre respuestas totales y antiOVA (* $P < 0.05$) (** $P < 0.01$). Los resultados son presentados como el promedio de 4 animales (OVA) y 2 animales (PBS) \pm EEM (error estándar de la media).

DetECCIÓN DE AbPC-IgA EN PULMÓN POR ELISPOT

Las manchas obtenidas como resultado de la actividad de AbPC-IgA en pulmón se muestran en la figura 32. Ya que las manchas observadas fueron confluentes se dificultó el conteo manual y fue necesario utilizar el método estimado para obtener valores de conteos.

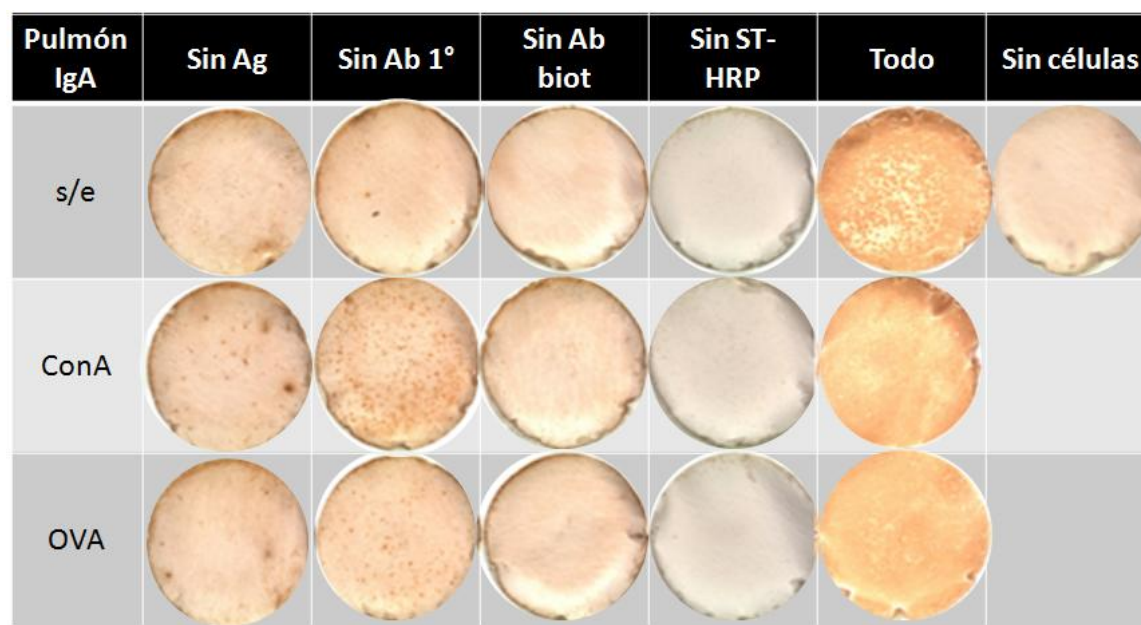


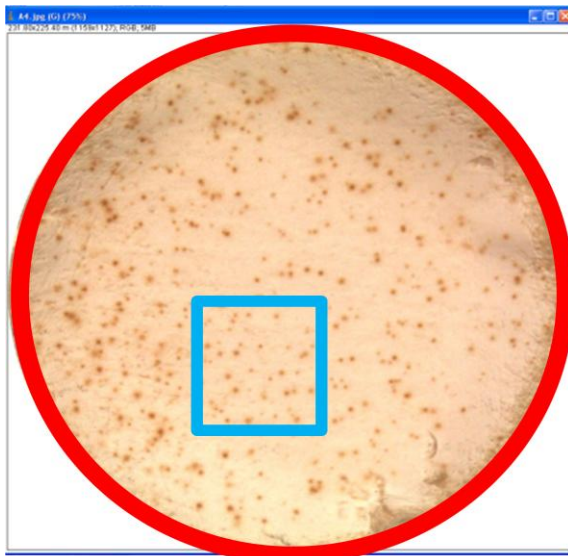
Figura 32. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en pulmón de cerdos inmunizados con OVA. Además de hallarse altos valores de fondos en el pozo testigo sin Ab 1°, las manchas confluentes obtenidas en Todo no permiten un conteo directo como en los casos anteriores. Existen ligeras diferencias entre las respuestas entre los pozos testigo, pozos no sensibilizados con OVA o con Ab de captura según el diseño de placa (figura 11) (sin Ag), pozos sin la adición de Ab α -pig IgA (sin Ab 1°) donde se observan respuestas en cantidad considerable tratadas como fondos inespecíficos, pozos sin Ab biotinilado *goat antimurine* (sin Ab biot) y pozos sin la adición del complejo estreptavidina-HRP (sin ST-HRP), pozos sin las suspensiones de células de cultivo (sin células); en comparación con la respuesta en las membranas con adición de todos los reactivos necesarios para el revelado y obtención de manchas (Todo).

Se decidió comparar entre el conteo directo de sangre y el conteo “estimado” de pulmón para determinar si los valores que se obtuvieron no presentan diferencia significativa (figura 33 B). El conteo estimado consistió en la obtención del número de manchas en una zona con mejor definición (rectángulo azul) de toda la membrana. Se obtuvo el valor promedio del área de 20 membranas (círculo rojo). El número total de manchas se obtiene por relación algebraica.

Como se observa en la figura 33 B no se obtuvieron diferencias significativas entre los conteos directos y estimados en membranas con manchas definidas, es por ello que se empleo el conteo estimado para las muestras de pulmón (figura 34).



A



B

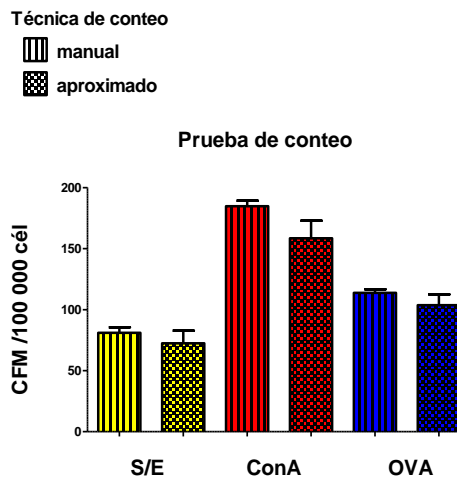


Figura 33. Ejemplo de conteo por estimados determinando áreas y su comparación estadística en membranas correspondientes a la detección de AbPC en sangre. Con ayuda del *software* se determino el área total de la membrana (círculo rojo) y área representativa (rectángulo azul) (A) (Fotografía de membrana de nitrocelulosa tomada en microscopio estereoscópico Leica EZ4d). En el grafico B se muestran los valores obtenidos por conteo manual directo (barras con líneas) y por estimados (barras con cuadrículas) en sangre. Los resultados son presentados como el promedio de 4 animales (OVA) y 2 animales (PBS) \pm EEM (error estándar de la media).

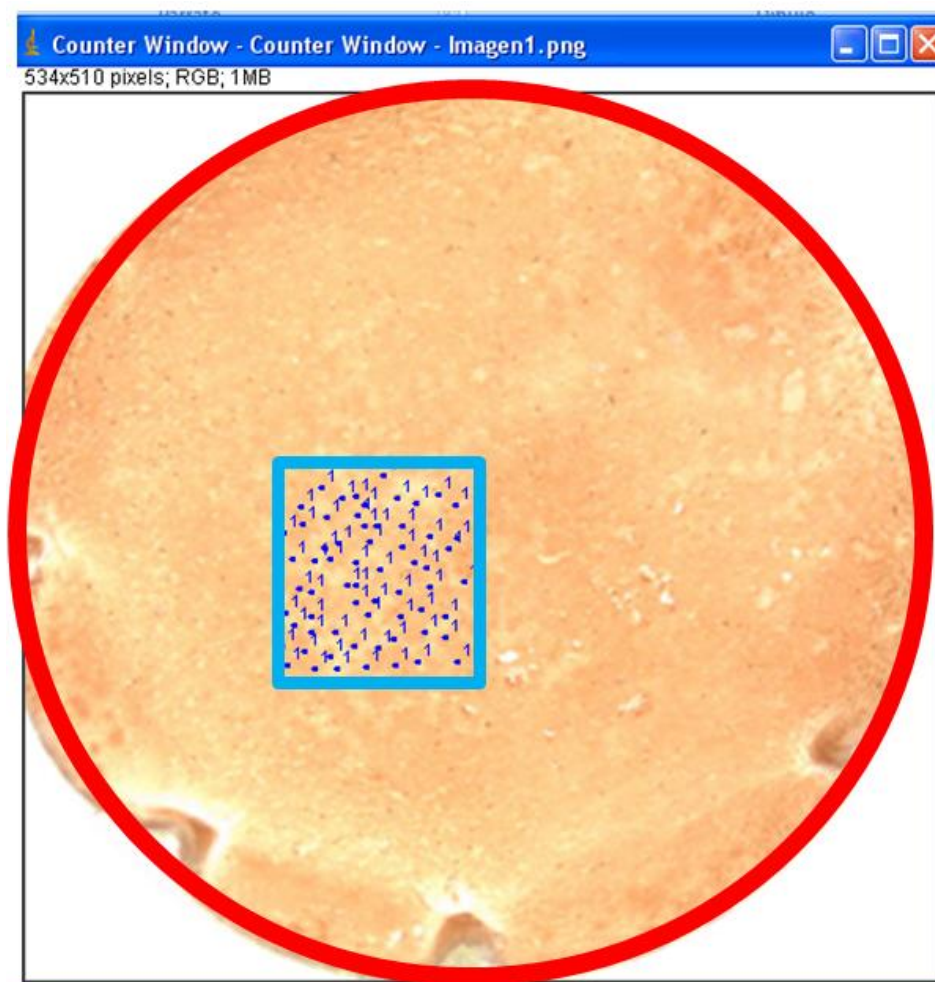


Figura 34. Ejemplo del conteo por estimados en membrana para la detección de AbPC- IgA en pulmón. Determinando área total (círculo rojo) y área representativa (rectángulo azul) en una membrana de pulmón por Image J®.

Como se muestra en el gráfico, para las AbPC-IgA totales (figura 35 A) no hay diferencias entre estímulos y entre grupos experimentales. Sin embargo, en la respuesta específica (figura 35 B) es clara la diferencia entre grupos aunque los animales inmunizados con PBS presentaron mayores respuestas que los inmunizados con OVA.

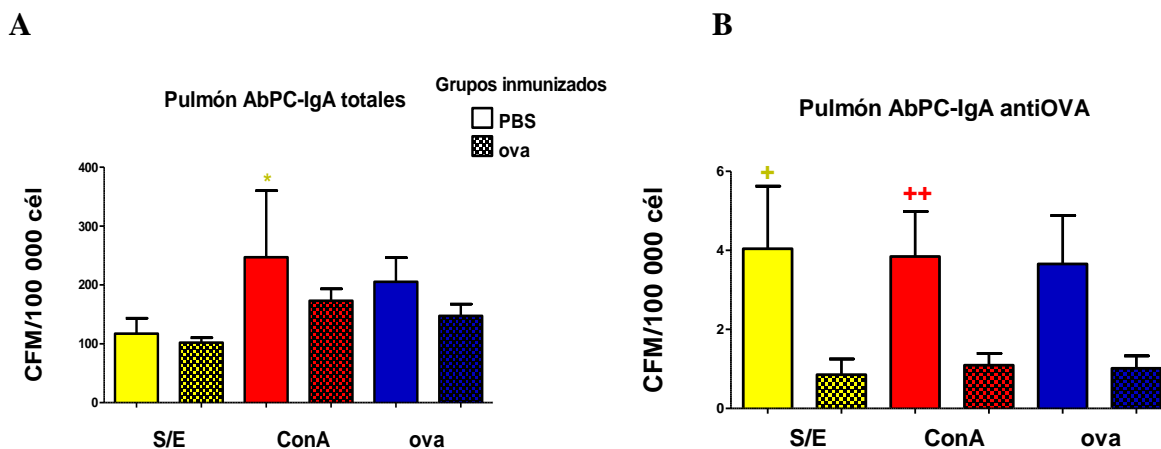


Figura 35. Células productoras de IgA totales (A) y antiOVA (B) en pulmón de cerdos inmunizados, determinadas por ELISPOT. Los gráficos muestran el comparativo entre respuesta de grupos de animales inmunizados con OVA (barras con cuadrículas) y no inmunizados (barras vacías). El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. El + corresponde a diferencias evaluadas entre respuestas totales y antiOVA). Los resultados son presentados como el promedio de 4 animales (OVA) y 2 animales (PBS) \pm EEM (error estándar de la media).

Ya que el método de conteo estimado no aseguraba que los valores obtenidos fueran confiables, se decidió probar diferentes variables en la técnica de ELISPOT para mejorar la definición de manchas obtenidas y asegurar la confiabilidad de los conteos de AbPC-IgA en pulmón. Por lo cual, se decidió evaluar si un menor número de células por pozo mejoraba la definición de manchas, si el cultivo no generaba la pérdida en la cantidad de células de interés por adherencia en la placa y finalmente determinar si una técnica de revelado sin anticuerpo secundario para AbPC-IgA podía emplearse en ELISPOT evitando la respuesta inespecífica observada en los pozos testigo en el revelado con anticuerpo secundario.

Análisis del número de células de pulmón en la placa de ELISPOT

En la figura 36 se muestran las membranas obtenidas en la comparación de dos cantidades de células, en función del estímulo empleado en el cultivo. Como se observa no hubo mejora significativa para prescindir del método estimado y tampoco se mostró una mejoría clara en el fondo del pozo sin anticuerpo primario.



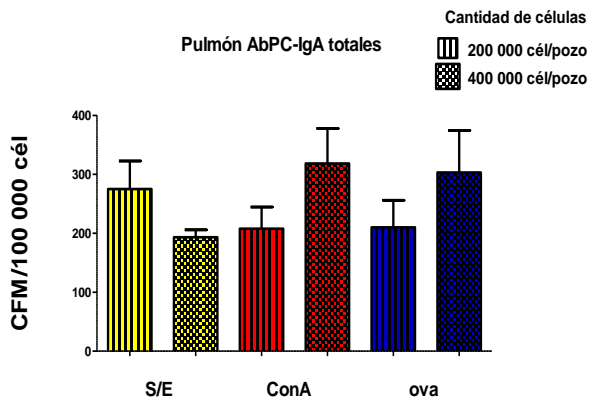
Pulmón Anticuerpo secundario	Número de células/pozo	Sin Ag	Sin Ab 1°	Sin Ab biot	Sin ST-HRP	Todo	Sin células
s/e	200 000						
	400 000						
ConA	200 000						
	400 000						
OVA	200 000						
	400 000						

Figura 36. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la respuesta con 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica con anticuerpo secundario. Para determinar si dicha variable mejoraba la definición de manchas y disminuía los fondos por técnica de revelado con anticuerpo secundario. No se observaron mejoras significativas aunque como se esperaba disminuyó la cantidad de manchas en 200 000 cél/pozo, sin embargo no existe suficiente definición para optar por conteos directos.

Los conteos se realizaron por estimados debido a la confluencia obtenida en las membranas. Los gráficos muestran la comparación estadística entre el número de células probado en AbPC-IgA total (figura 37 A) y antiOVA (figura 37 B) reportadas como CFM /100 000 cél.



A



B

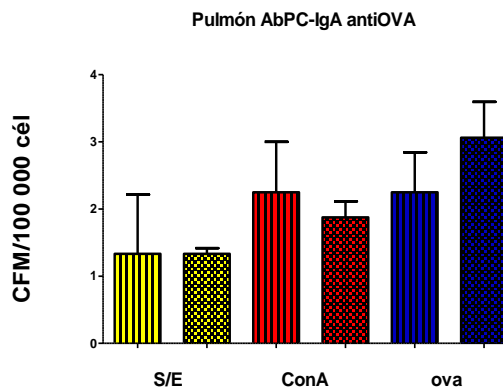


Figura 37. Células productoras de IgA totales (A) y antiOVA (B) en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta entre 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica con anticuerpo secundario. Las cantidades de células cultivadas 200 000 cél/pozo (barras con líneas) y 400 000 cél/pozo (barras con cuadrículas) comparadas en los tres estímulos (s/e, ConA y OVA) no presentaron diferencias significativas en pulmón por ELISPOT de CFM IgA total (A) y antiOVA (B) por la técnica de revelado con anticuerpo secundario. Los resultados son presentados como el promedio de 4 repeticiones de un animal \pm EEM (error estándar de la media).

En la figura 38 se muestran las membranas obtenidas en la comparación de los dos números de células en función del estímulo empleado en el cultivo. Como se puede observar, no hay una mejora significativa para prescindir del método estimado. El revelado sin anticuerpo secundario no presenta los fondos por unión inespecífica.



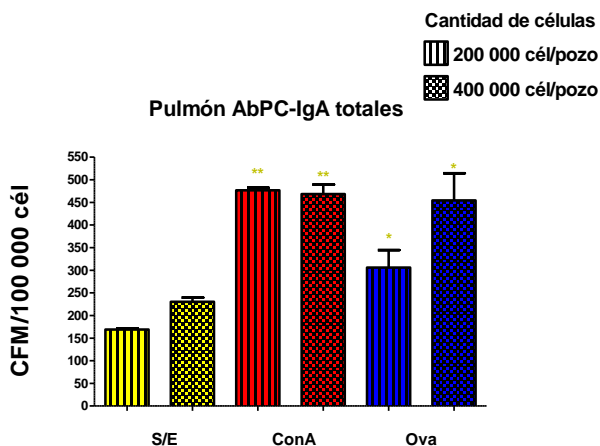
Pulmón sin Anticuerpo secundario	Número de células/pozo	Sin Ag	Sin Ab HRP	Todo	Sin células
s/e	200 000				
	400 000				
ConA	200 000				
	400 000				
OVA	200 000				
	400 000				

Figura 38. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la respuesta en 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica sin anticuerpo secundario. Se comparan por estímulo de cultivo los dos diferentes números de células por pozo para determinar si dicha variable mejoraba la definición de manchas y disminuía los fondos por técnica de revelado sin anticuerpo secundario. No se observaron mejoras significativas aunque disminuyó la cantidad de manchas en 200 000 cél/pozo. No existieron respuestas en los pozos testigo de la técnica o dicha respuesta fue muy baja.

Los gráficos muestran la comparación estadística entre el número de células probado en cada caso tanto para AbPC-IgA total (figura 39 A) como antiOVA (figura 39 B) reportadas como CFM /100 000 cél. En general, no se observaron diferencias significativas entre los estímulos ni entre grupos, excepto en la cantidad de AbPC-IgA total en ConA y OVA con respecto a s/e (figura 39 A).



A



B

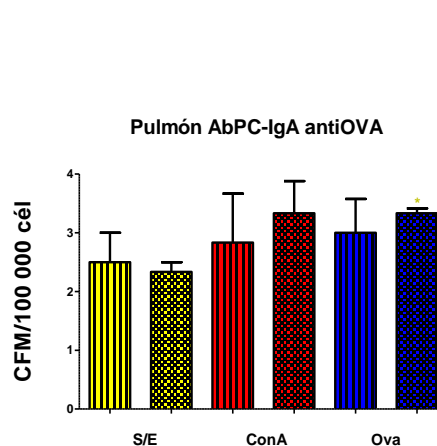


Figura 39. Células productoras de IgA totales (A) y antiOVA (B) en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta entre 200 000 y 400 000 células por pozo por técnica sin anticuerpo secundario. Las cantidades de células cultivadas 200 000 cél/pozo (barras con líneas) y 400 000 cél/pozo (barras con cuadrículas) comparadas entre los tres estímulos (se, ConA y OVA) no presentaron diferencias significativas en pulmón por ELISPOT de CFM IgA total (A) y antiOVA (B) por la técnica de revelado sin anticuerpo secundario. El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. (* $P < 0.05$) (** $P < 0.01$). Los resultados son presentados como el promedio de 3 repeticiones de un animal \pm EEM (error estándar de la media).

La confluencia no se eliminó a pesar de utilizar una cantidad menor de células por lo que se decidió mantener el uso de 400 000 cél/pozo en las determinaciones de AbPC-IgA en pulmón ya que al disminuir dicha cantidad existe el riesgo de no detectar las AbPC específicas.

Respuesta entre técnicas de revelado en AbPC-IgA de pulmón con 400 000 cél/pozo

Por las ventajas de la técnica de revelado sin anticuerpo secundario ya utilizada para AbPC-IgA, se decidió probar si se había diferencias entre ambas técnicas usando 400 000 cél/pozo. En los gráficos se muestran las respuestas totales (figura 40 A) y específicas (figura 40 B) reportadas como CFM /100 000 cél. En general no hubo diferencias entre los estímulos ni entre técnicas comparadas.



A

B

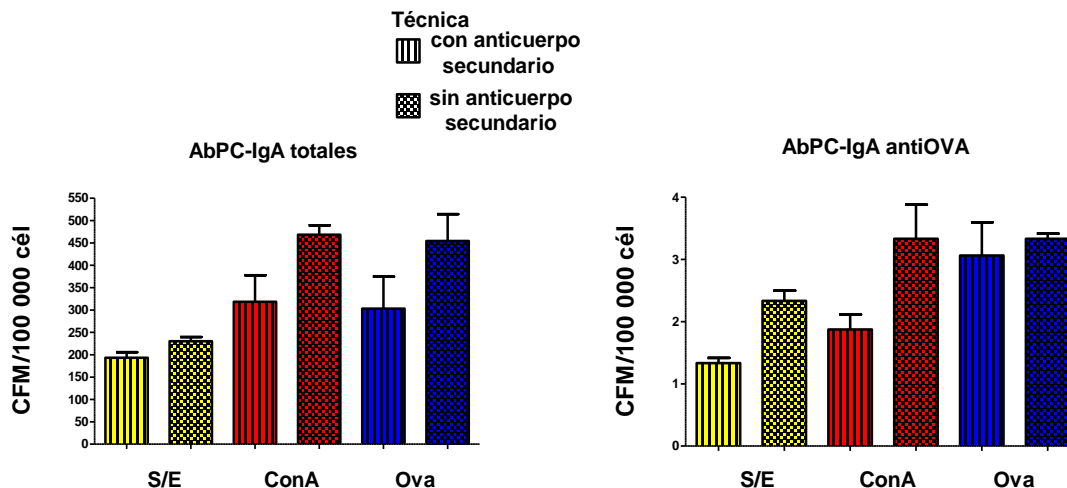


Figura 40. Células productoras de IgA totales (A) y antiOVA (B) en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta de 400 000 células por pozo por técnicas con y sin anticuerpo secundario. La respuesta obtenida de 400 000 cél/pozo, comparando los tres estímulos (se, ConA y OVA) no presentó diferencias significativas en pulmón por ELISPOT de CFM IgA total (A) y antiOVA (B) entre técnicas de revelado con anticuerpo secundario (barras con líneas) y sin anticuerpo secundario (barras con cuadrículas). El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. El + corresponde a diferencias evaluadas entre técnicas de revelado (* P<0.05) (** P<0.01) (***) P<0.001). Los resultados son presentados como el promedio de 4 repeticiones de un animal ±EEM (error estándar de la media).

La técnica de revelado sin anticuerpo secundario es adecuada para la detección de AbPC-IgA en pulmón. Sin embargo, ésta había requerido de conteos estimados, por ello se decidió realizar una prueba y determinar si el cultivo estaba generando una pérdida de células por adherencia a la placa o una sobre estimulación que generaría la producción de peroxidases por células presentes en el cultivo.

Comparación de la respuesta entre células cultivadas y sin estímulo *in vitro* por AbPC-IgA de pulmón comparando 200 000 y 400 000 cél por pozo

El uso de células sin cultivo facilitaría la técnica y permitiría determinar una respuesta mucho más cercana al proceso *in vivo* y no evaluar una respuesta bajo estímulo *in vitro*.

En la figura 41 se muestran las membranas de AbPC-IgA de pulmón sin cultivo, comparando entre dos cantidades de células (400 000 y 200 000 cél/pozo) por técnica de



revelado sin anticuerpo secundario, ya que no se podía asegurar el comportamiento de estas poblaciones celulares sin el tratamiento del cultivo, además de evaluar si se disminuía la confluencia de manchas.

Como se observa hay mejoría en la confluencia al disminuir el número de células a la mitad, sin embargo, esta respuesta no es suficientemente clara y se recurrió al conteo estimado.

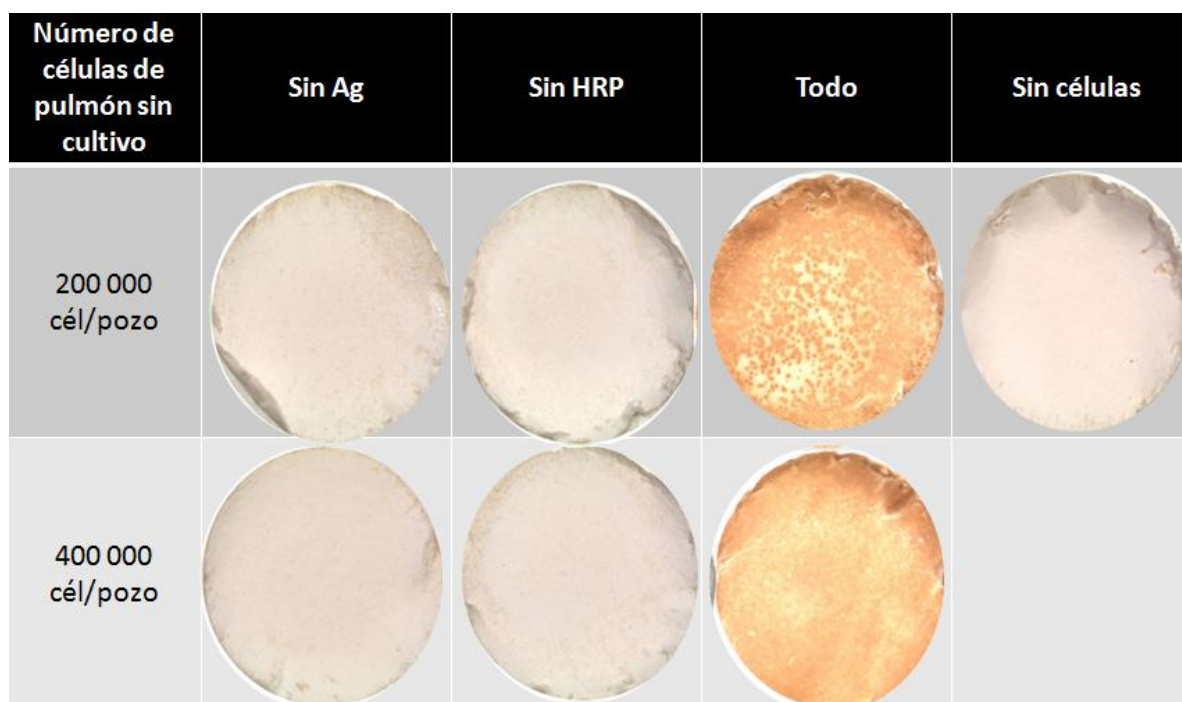


Figura 41. Fotografías de membranas representativas de ELISPOT para AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la respuesta en 200 000 y 400 000 células no estimuladas *in vitro* por técnica sin anticuerpo secundario. Prácticamente la respuesta es muy parecida a la técnica de células cultivadas. En igual forma la confluencia de las manchas no permite realizar conteos directos.

En el análisis cuantitativo los gráficos muestran las cantidades de AbPC-IgA totales (figura 42 A) y antiOVA (figura 42 B), donde las respuestas son mayores para AbPC-IgA totales de células sin cultivo en 400 000 cél/pozo. En el caso de AbPC-IgA antiOVA no se



presentan diferencias en entre los dos números de células, contrario a lo esperado, no hay una proporcionalidad al comparar sus valores reportados como CFM /100 000 cél.

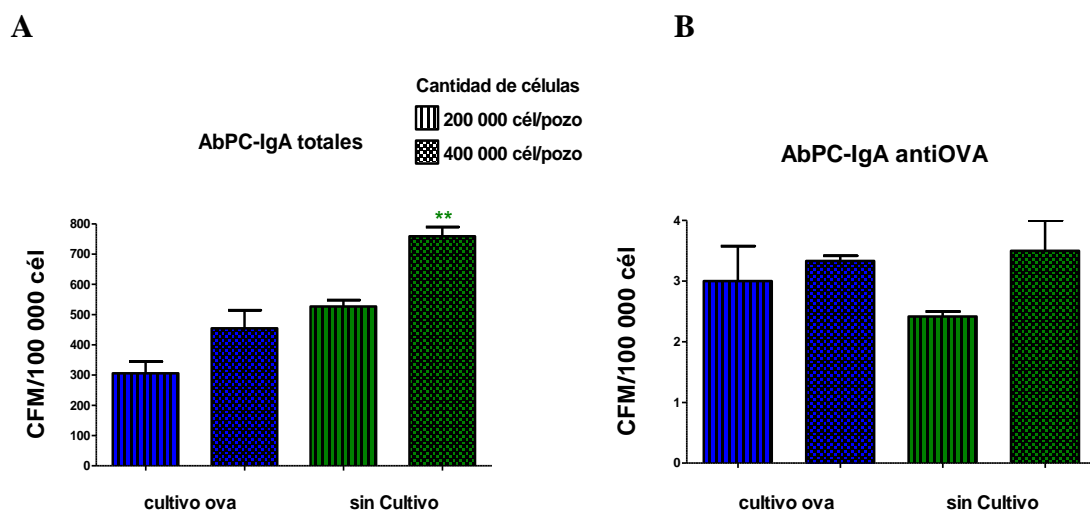


Figura 42. Células productoras de IgA totales (A) y antiOVA (B) en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta de 200 000 y 400 000 células estimuladas y no estimuladas *in vitro* por técnica sin anticuerpo secundario. Las respuestas entre células estimuladas en cultivo (OVA) y células sin cultivar 20h (sin Cultivo) entre número de células cultivadas 200 000 cél/pozo (barras con líneas) y 400 000 cél/pozo (barras con cuadrículas) no presentaron diferencias significativas en pulmón IgA total (A) y antiOVA (B) por técnica de revelado sin anticuerpo secundario, excepto entre las células totales sin cultivo comparando los dos números de cantidades de células. El * corresponde a diferencias evaluadas entre cantidades de células (** P<0.01) Los resultados son presentados como el promedio de 3 repeticiones de un animal \pm EEM (error estándar de la media).

Como la respuesta entre células cultivadas y sin cultivar fue la misma se decidió el uso de estas últimas para la detección de AbPC-IgA en pulmón.

Comparación del efecto de la semipurificación de células de pulmón de cerdo por gradiente discontinuo con Percoll

Ya que la confluencia detectada parecía ser el resultado del efecto directo de poblaciones celulares presentes en el cultivo, se decidió realizar un proceso de semipurificación con el uso de un gradiente discontinuo de densidad como Percoll, como se observa en la figura 43, la mejoría fue evidente.

Estimulo de cultivo celular	Sin semipurificación	Semipurificación
s/e		
ConA		
OVA		

Figura 43. Fotografías de membranas reveladas de ELISPOT para la detección de AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando la repuesta de 400 000 células por técnica sin anticuerpo secundario semipurificadas con Percoll y sin semipurificación. El número de células/ pozo es el mismo en ambos casos. La cantidad de respuesta inespecífica o fondo en las células sin tratamiento es demasiada, a tal grado, que únicamente permite obtener estimaciones de conteos. Se hace evidente la definición de manchas en la membrana cuya respuesta es resultado del tratamiento con el gradiente de Percoll (Fotografías de membrana de nitrocelulosa tomadas en microscopio estereoscópico Leica EZ4d)

En la figura 44 se muestran las respuestas totales comparando las poblaciones de células tratadas con Percoll y no tratadas con Percoll estimuladas con OVA en un cultivo de 20 horas y de células sin cultivo. Las respuestas presentan diferencias significativas entre los tratamientos de semipurificación de las células, además los conteos obtenidos de los estimados presentan mayores desviaciones que los conteos directos en las células con Percoll.



Tratamiento de células

 s/ Percoll

 Percoll

Pulmón AbPC-IgA

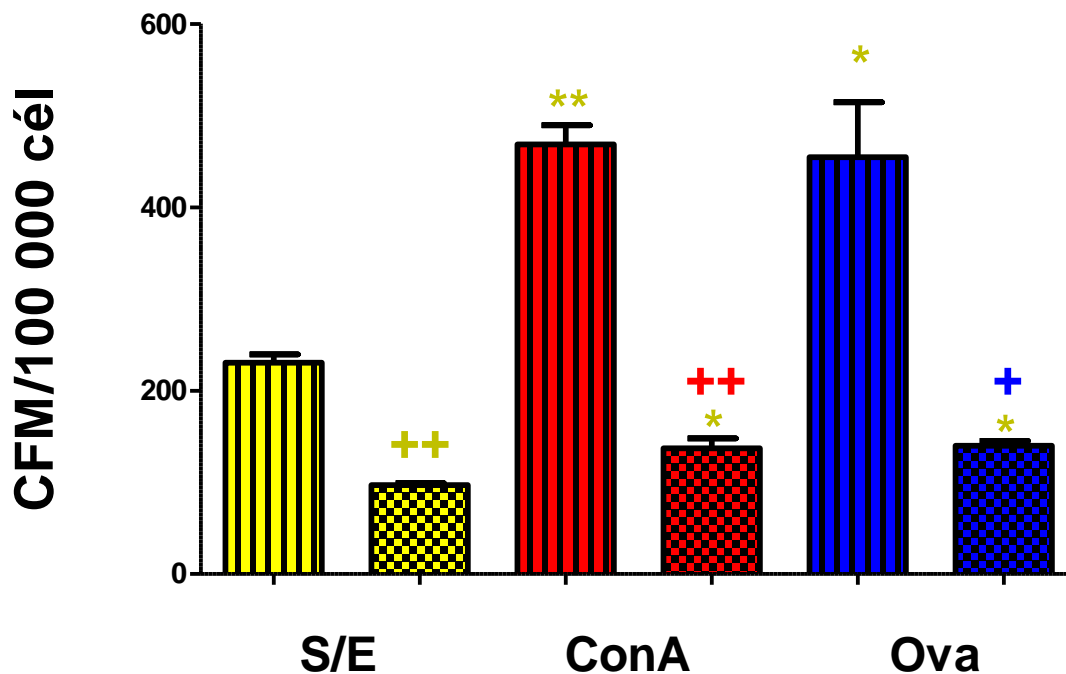


Figura 44. Células productoras de IgA totales en pulmón de cerdo, determinadas por ELISPOT comparando la respuesta detectada en células semipurificadas con Percoll y sin semipurificación. Las respuestas se muestran comparando entre cada estímulo en cultivo (s/e, ConA y OVA) tanto en las células tratadas con Percoll (barras con líneas) y no tratadas (barras con cuadrículas). El * corresponde a diferencias evaluadas entre estímulos. El + corresponde a diferencias evaluadas entre tratamiento con y sin Percoll. (* $P < 0.05$) (** $P < 0.01$). Los resultados son presentados como el promedio de 3 repeticiones de un animal \pm EEM (error estándar de la media).



DISCUSIÓN

Monitoreo del protocolo de inmunización por ELISA en suero y secreciones mucosales

El tipo de respuesta que se obtiene frente a una inmunización depende de la naturaleza del antígeno, así como la vía de inmunización empleada (Fujihashi y col., 1993; Ogra y col., 2001). El protocolo de inmunización que se utilizó, ya ha sido probado en el laboratorio y se demostró la inducción de respuesta en mucosas tras la aplicación de una dosis vía parenteral y un refuerzo por vía mucosal, generando también respuesta inmunológica sistémica (Brandtzaeg y col., 1999, Gama y García, 2011; Salinas, 2011).

Para determinar si los animales estaban produciendo anticuerpos circulantes como resultado de la inmunización, se cuantificó la concentración de IgG e IgA antiOVA en suero por medio de ELISA cuantitativa. Los Ab se mantuvieron en circulación por la producción de las células plasmáticas secretoras presentes en tejidos efectores y médula ósea como el reservorio de células plasmáticas productoras de IgG e IgA específicas de antígeno (Benedetti y col., 1995; Manz, 1997; Cerutti y col., 2011).

El comportamiento observado en las curvas de IgG (figura 15 A) e IgA (figura 15 B) en suero ya se había reportado en trabajos anteriores (Van der Stede y col., 2001; Halliley y col., 2010). La concentración de anticuerpos IgG en suero se mantuvo por su liberación desde médula ósea y tejidos hacia sangre y persistieron hasta después de 60 días (figura 15 A), no fue así el caso de IgA, cuya recirculación es corta y prácticamente la ecotaxia de células plasmáticas productoras de IgA es principalmente local en sitios efectores de mucosas (Labrousse y col., 1982; Brandtzaeg y col., 1999; Bianchi y col., 1999; Radbruch y col., 2006).

El refuerzo intranasal no generó aumento en la cantidad de AbPC en sangre debido a la presencia de poblaciones de células B de memoria en pulmones y tejidos periféricos que



persisten en centros germinales junto a linfocitos T y células plasmáticas para generar aumento en la afinidad y no para ingresar a circulación sistémica antes de los quince días posteriores a la inmunización. (Manz, 1997; Takahashi, 2007).

Los resultados muestran que el protocolo de inmunización funcionó ya que se detectaron AbPC-IgG e IgA totales y antiOVA circulantes probablemente en el proceso de ecotaxia.

Como comparación, en las secreciones mucosales, la cantidad de AbPC aumentó con el tiempo, tanto en secreción nasal como en saliva. Los resultados mostraron una respuesta ligeramente mayor de IgG que de IgA para ambos tipos de secreciones. Esto se explica porque las células circulantes arriban a los tejidos mucosales después de la presentación del antígeno en órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos cervicales y peritraqueales) y por lo observado en estudios anteriores que afirman la inducción de IgG por una inmunización con adyuvante completo de Freund (Claassen y col., 1992).

La presencia de IgG en la mucosa se da por la liberación de la inmunoglobulina de células plasmáticas presentes en el tejido mucosal y las moléculas de IgG que pasan por difusión a la luz de la mucosa sobretodo en tracto respiratorio bajo (Vega-López y col., 2012). En secreción nasal, tanto la cantidad de IgG como en IgA aumentaron como respuesta a las dos primeras inmunizaciones. El descenso que se registró previo al día 21 se mantuvo hasta el refuerzo intranasal donde ambas inmunoglobulinas aumentaron. Una clara diferencia fue la respuesta en IgG, mucho más alta y temprana que la curva de IgA. Sin embargo, mientras la primera, descendió para la fecha de sacrificios la curva de IgA pareció ir en aumento. Es decir, una vez pasado el efecto de las inmunizaciones con adyuvante de Freund; el perfil de inmunoglobulina que se definió fue el de IgA en secreción nasal como respuesta al refuerzo intranasal (figura 16 A y B).

Las mucosas tienen la característica de compartimentalización de la respuesta (Vega-López y col., 2012) por lo que con la inmunización vía intranasal se obtuvo respuesta detectable



en otra mucosa como la oral (saliva). La respuesta de ambas inmunoglobulinas, como en el caso anterior, aumentó por las dos inmunizaciones subcutáneas. Esta respuesta se mantuvo y registró una meseta incluso después del refuerzo intranasal. De igual manera que el caso de secreción nasal, en saliva se observó una respuesta ligeramente favorecida hacia el isotipo IgG por el efecto del adyuvante (Claassen y col., 1992).

El modelo funcionó ya que se cuantificó IgG e IgA a nivel sistémico y de secreciones mucosales específicas de antígeno y por ende pudo llevarse a cabo el ELISPOT para detectar AbPC.

Condiciones para la elaboración de las placas de ELISPOT

El empleo de placas comerciales para ELISPOT es costoso, la característica distintiva de este tipo de placas es que incluyen en el fondo de cada pozo una membrana de material adsorbente para proteínas (nitrocelulosa o PVDF). Las placas se esterilizan por ozono o radiación y son capaces de liberar el fondo para tener fácil acceso a las membranas reveladas, poder capturar las imágenes y procesarlas mediante *software* diseñado para las placas comerciales (Klencke y col., 2002). Tampoco se empleó ningún *kit* RTU, ya que no existe alguno en el mercado que permita detectar AbPC específicas de antígeno en tejidos porcinos. Por lo tanto, por cuestiones de accesibilidad y economía se decidió utilizar placas elaboradas en el laboratorio.

El trabajo en el diseño de placas ya había sido probado con anterioridad y se retomó para la estandarización. Como variante de la técnica se ha sugerido el uso de poliestireno como soporte, en lugar de membranas de nitrocelulosa y PVDF. Sin embargo, estos materiales poseen un área de contacto mayor y no tienen variaciones en el número de manchas contadas. Además, la nitrocelulosa presenta la ventaja de no requerir activación previa con metanol como en el caso del PVDF (McCutcheon y col., 1997; Rönnelid y Klareskog, 1997).



La membrana de nitrocelulosa posee una buena capacidad de unión a proteínas ($250 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) éstas quedan unidas de forma no covalente mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, en medios básicos o alcalinos, por lo que la sensibilización con antígeno o anticuerpo de captura se realiza con amortiguador de carbonato de sodio (pH 9.6). El grado en que el material adsorbe dependerá del coeficiente de difusión de la molécula, su peso molecular y del volumen de la solución a adsorber, la concentración de la sustancia adsorbente, la temperatura, el pH y el tiempo de adsorción (Morilla y Bautista, 1986; Rönnelid y Klareskog, 1997).

Se necesitaba obtener membranas circulares que se amoldaran al fondo de las placas y cuidar su integridad para un mejor revelado, definición de manchas y confiabilidad en los conteos. El problema se resolvió utilizando una perforadora de papel manual convencional, pues el diámetro de los cortes fue de 0.6cm (tabla 1), ligeramente mayor que el diámetro del fondo de un pozo de las placas utilizadas (aproximadamente 0.6 cm). Este exceso diametral permitió el ajuste a las paredes internas del pozo y conservó la integridad de cada membrana.

Para esterilizar las placas se empleo la radiación de microondas, por ser el método más seguro y viable. Las microondas son un tipo de radiación no ionizante de onda corta cuyas propiedades permiten la excitación de moléculas de agua, generando calor para la desnaturalización de proteínas bacterianas (Sanborn y col., 1982). Ensayos previos en el laboratorio determinaron la potencia de 60 Watts en horno SHARP Carousel® como la más efectiva (Sanborn y col., 1982) (tabla 1).

Prueba de las placas elaboradas en el laboratorio para la detección de AbPC en sangre de animales inmunizados por ELISPOT

Se decidió tomar muestras de sangre cinco días después de la inmunización para detectar AbPC circulantes como respuesta a la administración del antígeno (figura 6), ya que se ha



reportado que después de la activación en tejidos linfoides secundarios, las células linfoides pasan a torrente sanguíneo en un plazo de entre 5 a 7 días para colonizar tejidos efectores (Manz, 1997; Rothkötter y col., 1999a; Rothkötter y col., 1999b; Descotes, 2004; Halliley y col., 2010).

En las condiciones *in vitro* del cultivo celular, el proceso de la activación, diferenciación y proliferación del linfocito B a plasmablasto y a célula plasmática, como respuesta al estímulo, tarda entre 4 a 10 días (Radbruch y col., 2006; Jourdan y col., 2009). El tiempo de 20 horas para el cultivo celular aseguró la estimulación *in vitro* de las AbPC obtenidas de la respuesta *in vivo* y no para la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas. (Dearman y col., 2001; Israf y col., 2004; Janetzki, 2004; Jourdan y col., 2009; Afonso y col., 2010; Halliley y col., 2010).

Al observar el cultivo antes de cosechar las células (figura 17) se hicieron evidentes las formaciones de roseta con el mitógeno (debido a la capacidad de ConA de aglutinar glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares) (Abbas y col., 2002), ligeras agrupaciones para el antígeno específico y células aisladas para el cultivo sin estímulo.

La ConA es una lectina obtenida del *jack bean* *Canavalia ensiformis*, tiene la capacidad de unirse a fragmentos de carbohidratos, específicamente fragmentos α -Dmannosil y α -Dglucosil, lo cual permite su interacción con una amplia cantidad de receptores, puede inducir una mayor estimulación que la PHA con menor toxicidad en concentraciones de entre 5-100 μ g/mL de cultivo (Milthorp y Forsdyke, 1973; de Petris, 1975; Glaser, 1979; Neveu y col., 1982; Katsumoto y Kurimura, 1988; Joling y col., 1993; Israf y col., 2004; Vetri y col., 2010). Aunque la ConA se consideraba un mitógeno exclusivo para linfocitos T se ha reportado que puede generar activación de las células plasmáticas y linfocitos B, desde las primeras 18 horas (Glaser, 1979; Möller y col., 1986).

En el cultivo, la ConA pudo estimular al linfocito T cooperador (Th) a través de APC y generó un medio de citocinas que activó y mantuvo estadios de plasmablasto (IL-2, IL-4 y



IL-6) o de células plasmáticas (IL-10 e IL-15 principalmente), además la capacidad de presentar antígenos del linfocito B (Viau y Zouali, 2005) influyó en el reconocimiento de la ConA por el linfocito Th o en la activación directa de plasmablastos y células plasmáticas (Swain y col., 2012). Por el contrario, la OVA, por su naturaleza proteica, activó linfocitos T a través de APC y generó el medio de citocinas propició para el plasmablasto y la célula plasmática (Glaser, 1979; Neveu y col., 1982; Dearman y col., 2001; Israf y col., 2004; Shapiro-Shelef y Calame, 2005; Jourdan y col., 2009). Se ha demostrado que en tiempos de cultivo de menos de un día se detectan los anticuerpos sintetizados por las células plasmáticas y no anticuerpos solubles en el medio de cultivo (Cukrowska y col., 1998).

Cualitativamente, el cultivo funcionó, activando a las células por los estímulos utilizados en cada caso (ConA y OVA). Una vez estimuladas, las células se cosecharon, ajustaron y sembraron en las placas sensibilizadas de ELISPOT. Las AbPC cosechadas del cultivo se sembraron en la placa sensibilizada de ELISPOT durante 16 horas para asegurar mejores definiciones de manchas por la unión de los anticuerpos producidos al antígeno OVA o al anticuerpo de captura (Dearman y col., 2001; Israf y col., 2004; Janetzki, 2004; Jourdan y col., 2009; Afonso y col., 2010; Halliley y col., 2010).

Durante el proceso de revelado, el uso de anticuerpo directo conjugado con enzima (sin anticuerpo secundario) permitió detectar AbPC-IgG totales y anti OVA. La apariencia de las manchas en IgG fue menos definida probablemente por las características de sensibilidad de la técnica. La baja concentración de IgA en suero requiere en ELISA el uso de la técnica con anticuerpo secundario, la cual presenta mayor sensibilidad por las características de unión entre moléculas de Ig y complejos. Ya que el ELISPOT usa el mismo fundamento de ELISA, se adoptó el revelado para el ELISPOT (Barington y col., 1992).

Los resultados mostraron que la estrategia seguida para la detección de AbPC-IgG e IgA totales y antiOVA pareció funcionar ya que fue posible detectar las AbPC mediante la



formación de manchas observadas en las membranas reveladas y esto se respaldó por la detección de inmunoglobulinas séricas por ELISA (figura 15).

Métodos de conteo manual y automático bajo las condiciones de uso de las placas de ELISPOT elaboradas

Cada mancha generada correspondió a la actividad secretora de una sola célula. Las manchas definidas y pequeñas representan una secreción rápida y de poca cantidad, mientras que las manchas difusas y grandes indican una secreción lenta y abundante (Lehmann, 2005). En cualquiera de los dos casos, fue evidente que las manchas deben ser claras y aisladas para poder hacer un conteo confiable (figura 18 y 19). En 2004 Turner, y col. comprobaron que el método de ELISPOT es confiable y que las manchas obtenidas tienen una relación lineal con el número de células cultivadas (Turner y col., 2004).

El término “células formadoras de manchas” o CFM, se emplea como una medida cuantitativa de la actividad secretora en los ensayos de ELISPOT. Cuando el ensayo termina, las manchas pueden contarse manualmente o con un *software* de análisis de imágenes. Cuando se emplean sistemas semiautomatizados el operador debe mover la placa de ELISPOT, mientras que con lectores completamente automatizados la placa es movida de acuerdo a la secuencia que el operador haya establecido. El principal componente de cada lector de ELISPOT es el *software* que permite capturar las imágenes y la cuantificación de las manchas. Los sistemas automatizados son más rápidos y costosos pero no necesariamente más precisos que los semiautomatizados (Kalyuzhny, 2005).

Aunque algunos trabajos afirman que la variabilidad de los conteos podría descender con el uso de aparatos automatizados (Janetzki y col., 2004; Zeng y col., 2005), se ha demostrado que la variación entre los valores con el uso del conteo manual es menor (Janetzki, 2004; Almeida y col., 2009). Además de que la programación de parámetros, que requiere el conteo automático, resulta ser más complicada por las diversas tonalidades y diámetros que



presentan las manchas de acuerdo a la respuesta celular, por lo que debe modificarse de membrana a membrana, resultando en un método mucho más tedioso, poco práctico y con mayor rango de error (Janetzki, 2004; Almeida y col., 2009).

El conteo manual se realiza en un microscopio estereoscópico con un contador de mano o con las imágenes capturadas de las membranas y su conteo en un procesador con el uso de un *software* adecuado. El conteo manual parece ser el de mayor sensibilidad, permitiendo al investigador identificar manchas difusas de tamaños más pequeños y diferenciar cuando la mancha corresponde a AbPC o se trata de un artefacto. Además de que se recomienda el uso de pozos para realizar repeticiones y obtener datos más confiables (Janetzki, 2004; Almeida y col., 2009).

Con el conteo automático (parámetros del *software*: número de píxeles $0-0.5 \times 10^2$, circularidad: 0-1, distancia en píxeles: 100; de acuerdo al manual de uso del programa), el *software* contó marcas e imperfecciones como reacciones positivas (figura 20 A y B), lo cual generó variaciones altas entre repeticiones de una misma muestra (figura 21). En contraste, el conteo manual no presentó variaciones significativas entre las repeticiones (tabla 2). Por lo que los resultados obtenidos pueden considerarse confiables.

Detección del número de AbPC-IgG y AbPC-IgA en sangre por la técnica de ELISPOT en grupo de cerdos inmunizados con OVA

En general, la técnica de ELISPOT no solo detectó AbPC-IgG e IgA totales sino también antiOVA, las cuales se encontraron en torrente sanguíneo incluso 31 días después del inicio del protocolo de inmunización. Sin embargo, al final de dicho protocolo la presencia de células disminuye debido a su distribución en tejidos efectores. (Labrousse y col., 1982; Brandtzaeg y col., 1999; Bianchi y col., 1999; Rothkötter y col., 1999b; Takahashi, 2007; Bonilla y Oettgen, 2010; Cerutti y col., 2011).



Detección del número de AbPC-IgG totales y antiOVA en sangre por la técnica de ELISPOT en grupo de cerdos inmunizados con OVA

En la detección de AbPC-IgG total, las manchas obtenidas fueron el resultado de la actividad de células productoras de un isotipo en general y no como respuesta específica, lo cual se reflejó en curvas semejantes en ambos estímulos (ConA y OVA) y no así en el testigo negativo. Los gráficos muestran que la técnica funciona y determina AbPC-IgG totales bajo las condiciones de trabajo (figura 22 A).

En la detección de AbPC-IgG antiOVA se observó aumento de cantidades de células mucho más tardío, el cual disminuyó al final del protocolo debido a la necesidad de un procesamiento mucho más prolongado por ser respuesta específica de antígeno y la posterior redistribución de AbPC a sitios efectores. Esta curva ya se había observado para IgG en otros trabajos previos de ELISPOT en sangre (Cerutti y col., 2011) (figura 22 B).

Detección del número de AbPC-IgA totales y antiOVA en sangre por la técnica de ELISPOT en grupo de cerdos inmunizados con OVA

El aumento del número de AbPC-IgA totales al final del protocolo se debió seguramente al descenso del efecto generado con el uso del adyuvante completo de Freund que estimula la producción de IgG y no de IgA a nivel sistémico (Cox y Coulter, 1997; Marciani, 2003), además su ecotaxia les permite llegar a tejidos mucosales en un corto tiempo. El número obtenido de AbPC-IgA antiOVA es muy bajo comparado con las AbPC-IgG antiOVA debido a que la mayor cantidad de AbPC en sangre son las de IgG además de que estas células pueden mantenerse más tiempo en sangre, no así las AbPC-IgA (Labrousse y col., 1982; Brandtzaeg y col., 1999; Bianchi y col., 1999; Rothkötter y col., 1999a; Takahashi, 2007; Bonilla y Oettgen, 2010).



Detección de AbPC-IgG totales y antiOVA en ganglio linfático por ELISPOT

Una vez que se demostró que la técnica permite detectar AbPC totales y específicas en sangre, se probó en ganglio linfático. El cual en diversos experimentos refleja el comportamiento sistémico además de la sangre.

Las manchas generadas en las membranas de AbPC-IgG tuvieron la misma definición que las de sangre y no se detectaron fondos (figura 26). Específicamente, en el caso de AbPC-IgG totales las respuestas no tuvieron diferencia entre grupos (OVA vs PBS) (figura 27), similar a la cinética de sangre, lo cual demuestra que los ganglios están muy ligados a la circulación sanguínea donde las células viajan hasta llegar al sitio efector pasando por linfa (figura 27 A y B).

La recirculación de células específicas de sangre hacia los tejidos linfáticos de la zona de inmunización se explica por la cantidad de células que son activadas y proliferan tras ser presentadas con el antígeno en tejidos secundarios (figura 27 B). Lo que explica que los ganglios de la zona de inmunización contuvieron AbPC-IgG antiOVA .

Aunque el tiempo de vida de las células plasmáticas es muy corto, típicamente de unos pocos días a semanas (Goldsby y col., 2003), las células plasmáticas también pudieron sobrevivir y continuar secretando altos niveles de anticuerpos sin interacción directa con el antígeno tanto en médula ósea como en bazo donde se han descrito linfocitos B transicionales con perfiles de memoria y en centros germinales (Viau y Zoulai, 2004; Shapiro-Shelef y Calame., 2005; Radbruch y col., 2006).

Detección de AbPC-IgA totales y antiOVA en ganglio linfático por ELISPOT

En ganglio para AbPC-IgA la respuesta fue mucho menor que en sangre y no se observaron fondos debido al efecto ya comentado sobre la distribución temprana de las AbPC-IgA para



ingresar a sitios efectores, además de que el ganglio linfático es un tejido con mayor presencia de AbPC-IgG (figura 30 A y B) (Goldsby y col., 2003).

Estandarización de la técnica de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA totales y antiOVA en pulmón de cerdo

En el pulmón se conjuntan diversos tipos de células, por tal motivo debió procesarse una mayor cantidad de muestra (figura 24). Una vez cosechadas las células del cultivo, éstas se contaron y se determinó si el cultivo generaba pérdida de células en diferentes estímulos, por la influencia de la heterogenicidad de las poblaciones celulares en cada uno de ellos. Como se observa en la figura 25 el contacto directo con la placa generó pérdida de células por adherencia, sin variación entre los estímulos

AbPC-IgG totales y antiOVA

Las membranas de AbPC-IgG de pulmón mostraron manchas cuya definición no fue tan clara como en los dos casos anteriores en sangre y ganglio (figura 28). Además, la respuesta pareció ser un tanto excesiva en cuanto al tamaño de manchas y no así en su número (figura 29 A y B).

Las manchas poco definidas en el caso de pulmón se podrían explicar por la heterogenicidad de las células obtenidas, específicamente células con peroxidasas (macrófagos y neutrófilos) las cuales no se eliminaron en el paso de adherencia al plástico porque la mayoría de ellas no poseen propiedades adherentes y su cantidad en el tejido es muy elevada para poder garantizar su completa adherencia como lo muestra la figura 25.

El parénquima pulmonar presentó una respuesta elevada en los grupos inmunizados en AbPC-IgG total (figura 29), debido a que la IgG se ha reportado como el isotipo más abundante en el tracto respiratorio bajo (Manz, 1997; Brandtzaeg y col., 1999; Bianchi y col., 1999; Abbas y col., 2002; Zeng y col., 2005; Bonilla y Oettgen, 2010; Talamás, 2010).



AbPC-IgA totales y antiOVA

En las AbPC-IgA de pulmón se observaron los fondos de los pozos testigo sin anticuerpo primario, como en el caso de sangre, por la técnica de revelado con anticuerpo secundario, debido a la unión inespecífica del anticuerpo biotinilado por entrecruzamiento con fragmentos de otras moléculas presentes en el cultivo, esta respuesta tuvo que restarse al conteo estimado de pozos adicionados con todo, disminuyendo los valores obtenidos.

La característica observada en la determinación de AbPC-IgA fueron las manchas confluentes (figura 32) debido a la presencia de otras poblaciones celulares que interfieren en el ensayo como macrófagos y neutrófilos con peroxidasas (Kiyono y Fukuyama, 2004), los cuales no presentan características de adherencia tan elevadas como las células epiteliales y fibroblastos y por ello se mantuvieron presentes en el cultivo después del proceso de contacto con la placa para eliminar células adherentes. En adición a esto, la mayor presencia de AbPC-IgA en tejidos relacionados con mucosas como el pulmón generó una respuesta excesiva que disminuyó aun más la definición de manchas y dificultó su posterior conteo por el método manual (Bernard y Lantier, 1985; Kiyono y Fukuyama, 2004).

Se debió optar por estimaciones matemáticas y funciones de área, para hacer conteos aproximados por medio del *software* utilizado para los conteos, como se describió anteriormente.

El número de AbPC-IgA totales (figura 35 A) no presentó diferencias entre los grupos inmunizados, aunque hubo una mayor presencia de células en pulmón a comparación de los otros dos tejidos evaluados. En comparación, con el número de AbPC-IgA antiOVA (figura 35 B) se observó una mayor respuesta en los animales sin inmunizar frente a los inmunizados con OVA por el efecto del adyuvante utilizado y la presencia de células de memoria en los animales no inmunizados (transferencia materna) que propiciaron



mayoritariamente respuestas de producción de IgG y no así de IgA antiOVA (Cox y Coulter, 1997; Van der Stede y col., 2001; Marciani, 2003).

Desde la perspectiva de la técnica, los errores que pueden estar involucrados y que influyeron en este resultado fueron principalmente el tipo de conteo estimado que se tuvo que utilizar para determinar la cantidad de AbPC-IgA en pulmón y el restado de respuesta inespecífica obtenida en los pozos testigo.

La técnica, aunque con ciertos problemas, como se describe más adelante, detectó AbPC-IgA totales y específicas en pulmón como respuesta a la inmunización.

Análisis comparativo de dos cantidades de células de pulmón en la placa de ELISPOT

Ya que los conteos de AbPC-IgA total en pulmón fueron estimados, se decidió determinar si una menor cantidad de células podría generar menores fondos en las membranas. La técnica de ELISPOT requiere una cantidad elevada de células, se ha reportado que el óptimo por pozo varía entre 200 000 y 500 000 células en sangre y timo. Debajo de este número las manchas pierden definición o las desviaciones entre conteos se ven aumentadas y con un número mayor se hace imposible el conteo por la excesiva respuesta (Czerkinsky y col., 1988; Okamoto y col., 2004; Zeng y col., 2005). Al utilizar 200 000 cél/pozo se pretendió reducir las células que causaban interferencia en el ensayo, así mismo se comparó la técnica de revelado sin anticuerpo secundario para ver si de esta forma era posible disminuir los fondos obtenidos en AbPC-IgA total (figuras 36 y 38).

La técnica de ELISPOT tiene una sensibilidad 400 veces mayor que el ELISA (Helms y col., 2000), por lo cual fue posible detectar AbPC-IgA mediante el revelado sin anticuerpo secundario (figuras 37 y 39).



Aunque con el uso de 200 000 cél/pozo la confluencia de las manchas disminuyó ligeramente, los resultados fueron estadísticamente iguales a los obtenidos en 400 000 cél/pozo, por lo que fue preferible utilizar una cantidad de células que estuviera dentro del intervalo aceptable según lo reportado (200 000 a 500 000 cél/pozo) y no en el margen inferior, lo cual puede generar respuestas más dispersas (Czerkinsky y col., 1988; Zeng y col., 2005). Cabe aclarar que las respuestas entre 200 000 cél/pozo y 400 000 cél/pozo no fueron proporcionales en ninguno de los conteos, este fenómeno ya había sido reportado en estudios donde se emplea un modelo de regresión lineal para determinar por interpolación la concentración específica de células efectoras (Zeng y col., 2005).

Análisis comparativo entre técnicas de revelado con y sin anticuerpo secundario para la detección de AbPC-IgA de pulmón

Una vez determinada la cantidad de células, se compararon las respuestas total (figura 40 A) y específica de antígeno (figura 40 B) entre técnicas de revelado con y sin anticuerpo secundario.

Las respuestas obtenidas en la detección de AbPC-IgA totales comparando ambas técnicas de revelado fueron iguales, probablemente debido a los fondos restados a los conteos en la técnica con anticuerpo secundario. En el caso de la respuesta antiOVA se obtuvo una respuesta prácticamente idéntica. Lo anterior se explica porque no se restaron valores de fondos, aunado al aumento de sensibilidad que representó la serie de anticuerpos utilizados en la técnica de revelado con Ab biotinilado. Por lo que se observó, la técnica sin anticuerpo secundario presentó ventajas en la limpieza de los fondos, que por entrecruzamiento generaba respuestas inespecíficas y se reduce la cantidad de pozos testigo que se requieren, permitiendo realizar mayor número de repeticiones por placa; además del menor tiempo de revelado en la técnica y su mayor facilidad en su desarrollo.



Análisis comparativo del efecto de la estimulación *in vitro* en la detección de AbPC-IgA de pulmón entre técnicas de revelado y cantidades de células

La capacidad de secreción de las células puede ser probada de dos maneras: las células son cultivadas en una placa y luego transferidas a placas de ELISPOT o las células cultivadas directamente en placas de ELISPOT donde se mide directamente la respuesta *in vivo* es decir, células activadas en el animal y no en la placa de cultivo (Favre y col., 1997; Janetzki y col., 2000; Kalyuzhny, 2005). Por lo que se realizó una evaluación con la idea de determinar si la influencia del cultivo afectaba la respuesta de las células y por consiguiente los conteos obtenidos. Al comparar el aspecto de las membranas obtenidas de células sin cultivar no se observó mejoría entre las células cultivadas (figuras 41).

Al comparar el número de AbPC de las células sin cultivo contra las células estimuladas con OVA, se observó una disminución en estas últimas debido a la eliminación de células adherentes.

En el caso de células sin cultivar existieron diferencias entre 400 000 cél/pozo y 200 000 cél/pozo por la respuesta tan elevada de AbPC-IgA totales, además no hubo eliminación de células adherentes como en el cultivo. En el caso de AbPC-IgA antiOVA se detectó un número menor de células (figura 42 A y B).

El hecho de utilizar células directamente del tejido, mostró respuestas más cercanas a lo que ocurre en el organismo, pues no se someten a estímulos *in vitro*. Al no existir cultivo de 20 horas se disminuyó la pérdida de células en la placa (figura 25), finalmente el tiempo de la prueba de ELISPOT se redujo de tres a dos días.

El revelado se realizó mediante la reacción enzimática de HRP sobre el sustrato DAB (diaminobenzidina) (Zhang y col., 2008). Como ya se comentó, en los cultivos de células procedentes de órganos están presentes diversas poblaciones celulares entre ellas macrófagos y células epiteliales, que por su actividad de peroxidasa, producen reacciones que no permitieron observar manchas definidas, así como la facilidad que tienen estas



células de adherirse a superficies adsorbentes como el caso de la nitrocelulosa, por lo que se hizo necesario minimizar estos efectos o aislar las poblaciones celulares de interés para ser estudiadas.

Recientes trabajos sobre el empleo de células adherentes en la técnica de ELISPOT, como son fibroblastos productores de interleucinas, han revelado que deben emplearse entre 50 y 100 células por pozo, aunque dichas células han sido previamente teñidas con marcadores específicos de superficie y separadas por *sorting* (Turner y col., 2004). Sin embargo, disminuir tanto el número de células, no permitiría detectar AbPC específicas de antígeno ya que son bajas a comparación a las AbPC-Ig totales. En base a esto y con los resultados obtenidos anteriormente, se decidió cultivar únicamente células mononucleares, eliminando poblaciones con propiedades adherentes que pudieran generar fondos inespecíficos.

Análisis comparativo del efecto de semipurificación de células de pulmón de cerdo por gradiente discontinuo con Percoll para detectar AbPC-IgA

Una alternativa para aislar o semipurificar poblaciones celulares es el gradiente de Percoll que permite extraer las células de interés, desechando aquellas que pudieran causar interferencia. Además es una técnica económica y sencilla comparada con el *sorting* y es capaz de mantener una alta viabilidad de las células en comparación con métodos mecánicos de purificación como el uso de perlas sensibilizadas. El Percoll se utiliza para el aislamiento de células, orgánulos y/o virus por densidad de centrifugación. El Percoll se compone de partículas de sílice coloidal de 15 a 30 nm de diámetro (23% en agua) que han sido recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El Percoll posee una viscosidad baja, una baja



osmolaridad y no produce citotoxicidad. Se han usado concentraciones de Percoll entre 40 y 60% donde, de acuerdo a algunos reportes, se encuentran la mayoría de los linfocitos y monocitos activados con ConA (Gutierrez y col., 1979; Hamburger y col., 1985).

La respuesta en células de pulmón obtenidas por Percoll no mostró la excesiva pigmentación en las membranas durante el revelado (figura 43). El valor de los conteos (con Percoll) fue menor a los conteos aproximados (sin Percoll), sin embargo, presentaron desviaciones mucho menores que en el caso de las células no tratadas. La mayor respuesta en las células no tratadas con Percoll se debió a que los aproximados se obtenían de membranas con manchas muy confluentes y excesivo fondo.

De acuerdo a los resultados (figura 44), existió una clara mejoría en la definición de manchas y su consecuente facilidad en el conteo después del aislamiento celular. Por las características de la técnica de ELISPOT fue necesaria la buena y clara definición de manchas generadas tras el proceso de revelado para asegurar así, una mayor confiabilidad en los resultados (Lehmann, 2005).

La técnica estandarizada de ELISPOT permite detectar células presentes en el tejido, sin embargo no describe su conformación y ubicación de la forma en que técnicas como inmunohistoquímica e inmunofluorescencia lo harían. Aunque por sus características de sensibilidad en sangre es comparable con técnicas como la citometría de flujo y el *sorting*. Por lo anterior, la técnica puede ser utilizada como una prueba complementaria que genere información sobre la cantidad de células presentes en el tejido o secreción evaluado.

Por las características del ELISPOT es necesario el trabajo en condiciones estériles, el uso de placas especiales con pozos recubiertos con materiales adsorbentes que pueden ser elaboradas en el laboratorio, así como prescindir de costosos aparatos para el conteo de las manchas al acondicionar el conteo manual con el uso de un *software* de fácil acceso. Como se observó durante la estandarización, el tejido pulmonar requiere de la purificación de las



células de interés para poder obtener valores confiables. La condición de interés en el ELISPOT es el cuidado de la integridad de las membranas utilizadas y la buena definición de las manchas que facilite su conteo y el tratamiento de resultados.

CONCLUSIONES

- Se determinaron las condiciones para la elaboración y uso de placas de ELISPOT, utilizando versiones comerciales de placas para ELISA Costar® y membranas de nitrocelulosa de 0.6cm de diámetro recortadas en el laboratorio, colocadas con el uso de guantes, pinzas de punta fina y esterilizadas por microondas a 60 Watts, con 5 ciclos de 4 minutos e intervalos de 10 minutos.
- Se seleccionó el conteo manual sobre el automático para las placas de ELISPOT, por la menor variación de resultados, su menor costo y accesibilidad.
- Se determinaron las condiciones para la detección de AbPC-IgG, tanto totales como específicas de antígeno, en todos los tejidos con el uso de 400 000 cél/pozo y la técnica sin anticuerpo secundario para el revelado.
- Se determinaron las condiciones para la detección de AbPC-IgA tanto totales como específicas de antígeno en sangre y ganglio con el uso de 400 000 cél/pozo y la técnica sin anticuerpo secundario para el revelado.
- Se determinó que para la detección de AbPC-IgA en pulmón es recomendable la técnica sin anticuerpo secundario para el revelado por la respuesta inespecífica observada por la técnica con anticuerpo secundario, el uso de 400 000 cél/pozo, el procesamiento del tejido pulmonar mediante un gradiente de Percoll, para tener resultados más confiables respecto a la población celular de interés.
- Fue posible detectar AbPC sin cultivar por medio del ensayo de ELISPOT, cuya respuesta refleja de forma más cercana el fenómeno en el organismo, sin factores ni estímulos *in vitro*; así como asegurar el mayor número de células que se pueden perder al adherirse en la placa durante el cultivo.



PERSPECTIVAS

Se requiere de un proceso de validación en el laboratorio de la técnica estandarizada de ELISPOT para la detección de AbPC-IgG y AbPC-IgA en pulmón de cerdo comparando los resultados y datos obtenidos con una prueba de oro, para determinar la sensibilidad y la especificidad de la técnica.

Las condiciones determinadas en la estandarización de la técnica de ELISPOT podrán aplicarse para la evaluación de la respuesta inmunológica en mucosa respiratoria frente a la inmunización con antígenos de interés clínico humano (Virus de la influenza) y veterinario (Virus de la Enfermedad de Aujeszky).

Es necesario el desarrollo de ELISPOT para la evaluación de respuesta inmunológica celular (producción de interleucinas) y diferenciación de perfiles de citocinas por las poblaciones celulares de tejido pulmonar en modelo porcino.

Se requiere de la estandarización de la técnica de ELISPOT en la detección de AbPC-IgM en tejidos, por la importancia de este isotipo en la respuesta inmunológica temprana y en secreciones mucosales.

ANEXO

Soluciones estériles para ELISPOT

Solución salina fisiológica (SSF)

Cloruro de sodio (NaCl).....0.9 %

Agua destilada

ESTERILIZACION POR AUTOCLAVE, autoclave programada para 15 a 20 lb de presión y de 115 °C a 120 °C de temperatura por 20 minutos con escape lento.



Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4

Cloruro de sodio (NaCl)..... 137 mM
Cloruro de potasio (KCl)..... 2.7 mM

Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄)..... 4.3 mM

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄)..... 1.4 mM

Agua destilada

ESTERILIZACION POR AUTOCLAVE

Solución PBS-Tween

Solución de PBS..... c.b.p.

Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C₅₈H₁₁₄O₂₆).....0.05 %

Agua destilada

ESTERILIZACION POR AUTOCLAVE

Amortiguador de lisis de eritrocitos

Cloruro de amonio (NH₄Cl)..... 0.14 M

Bicarbonato de potasio (KHCO₃)..... 1 mM

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (C₁₀H₁₆N₂O₈)..... 0.1 mM

Agua destilada

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN membrana de 0.22 µm.

Medio RPMI-1640 incompleto

RPMI-1640 *Medium* (Sigma-Aldrich® No. Catálogo R4130-10X1L).....1frasco

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)..... 2 g

Agua bidestilada..... c.b.p. 900 mL

Ajustar pH a 7.2 DEBE AFORARSE A 1 L

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN.

Realizar pruebas de esterilidad.



Medio RPMI-1640 completo

Medio RPMI-1640 incompleto.....	450 ml
Glutamina (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃).....	0.2 mM
Piruvato de sodio (C ₃ H ₃ NaO ₃).....	0.1 mM
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanol sulfónico (HEPES) (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S).....	1 mM
β-mercaptoetanol (HOCH ₂ CH ₂ SH).....	0.1 μM
Gentamicina (C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇).....	40 μg/mL
Suero fetal bovino (SFB).....	10 %

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN.

Solución con enzima (colagenasa)

Colagenasa tipo IV (Worthington Biochemical Corporation, USA).....150 UI/mL

Medio RPMI-1640 incompleto

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN.

Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6

Carbonato de sodio (Na₂CO₃) 0.5 M.....2.5 mL

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.5 M.....7.5 mL

Agua destilada.....c.b.p. 100 mL

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN.

Solución salina amortiguadora de fosfatos 10X (PBS 10X) pH 7.2-7.4

Cloruro de sodio (NaCl)..... 1370 mM

Cloruro de potasio (KCl)..... 27 mM

Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄)..... 43 mM

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄).....14 mM

Agua destilada

ESTERILIZACIÓN POR AUTOCLAVE



Solución de Percoll al 100%

Percoll estéril comercial.....	9 mL
Solución PBS 10X estéril.....	c.b.p.10 mL

Solución de Percoll al 44%

Solución de percoll al 100%.....	4.4 mL
Solución PBS 1X estéril.....	c.b.p.10 mL

Solución de Percoll al 67%

Solución de percoll al 100%.....	6.7 mL
Solución PBS 1X estéril.....	c.b.p.10 mL

Soluciones no estériles para ELISPOT

Solución de azul de tripano

Azul de tripano.....	0.4 %
Solución salina fisiológica	

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4

Cloruro de sodio (NaCl).....	137 mM
Cloruro de potasio (KCl).....	2.7 mM
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄).....	4.3 mM
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	1.4 mM
Agua destilada	

Solución PBS-Tween

Solución de PBS.....	c.b.p.
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆).....	0.05 %
Agua destilada	



Solución PBST-BSA

Solución de PBS.....	c.b.p.
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆).....	0.05 %
Albúmina sérica bovina (BSA).....	1 %
Agua destilada	

Soluciones para ELISA

Solución general para la técnica de ELISA IgG pH 8.0

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂].....	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl).....	0.14 M
Agua destilada	

Solución de lavado para la técnica de ELISA IgG

Tris (hidroximetil) aminometano [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂].....	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl).....	0.14 M
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆).....	0.05 %
Agua destilada	

Solución de bloqueo para la técnica de ELISA IgG

Tris (hidroximetil) aminometano [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂].....	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl).....	0.14 M
Albúmina sérica bovina (BSA).....	1 %
Agua destilada	



Solución de dilución para la técnica de ELISA IgG

Tris (hidroximetil) aminometano [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂]	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl)	0.14 M
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	0.05 %
Albúmina sérica bovina (BSA)	1 %
Agua destilada	

Solución amortiguadora de citratos pH 5.0

Citrato de sodio dihidratado (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2 H ₂ O)	0.02 M
Ácido cítrico monohidratado (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	0.01 M
Agua destilada	

Solución de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina

3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) (C ₁₆ H ₂₀ N ₂)	1 mg/mL
Dimetilsulfóxido (DMSO) (CH ₃ SOCH ₃)	
Mantener a -20 °C	

Solución de revelado para la técnica de ELISA IgG

3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) (C ₁₆ H ₂₀ N ₂) [1 mg/mL]	1 mL
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) al 30% (v/v)	2 µL
Solución amortiguadora de citratos pH 5.0	10 mL

Solución de paro para la técnica de ELISA IgG

Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	2 M
Agua destilada	



Solución general para la técnica de ELISA IgA (PBS-Tween) pH 7.4

Solución de PBS.....	c.b.p.
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆).....	0.05 %
Agua destilada	

Solución amortiguadora de dietanolamina

Dietanolamina (C ₄ H ₁₁ NO ₂).....	1 mM
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 0.5 M.....	1 mL
Agua destilada.....	c.b.p. 1000 mL

Solución *stock* de *p*-nitrofenil fosfato (PNPP)

<i>p</i> -nitrofenilfosfato (PNPP).....	1 g/10 mL
Solución amortiguadora de dietanolamina	
Mantener a -20 °C	

Solución de revelado para la técnica de ELISA IgA

<i>p</i> -nitrofenilfosfato (PNPP) [1g/10 mL].....	100 µL
Solución amortiguadora de dietanolamina.....	10 mL

REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A y Pober J (2002). Inmunología Celular y Molecular. 4ª edición, Editorial Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, España. Pp. 32-40.
- Afonso G, Scotto M, Renand A, Arvastsson J, Vassilieff D, Cilio CM y Mallone R (2010). Critical parameters in blood processing for T-cell assays: Validation on ELISpot and tetramer platforms. *Journal of Immunological Methods* 359(1-2): 28-36.
- Alberts B, Bray J, Lewis J, Raff J, Roberts M, Watson K y James D (2004). *Biología Molecular de la Célula*. 4a edición, Editorial Omega, Barcelona, España. Pp. 1312-1313.
- Almeida C, Roberts S, Laird R, McKinnon E, Ahmed I, Pfafferott K, Turley J, Keane N, Lucas A, Rushton B, Chopra A, Mallal S y John M (2009). Automation of the ELISpot assay for high-throughput detection of antigen-specific T-cell responses. *Journal of Immunological Methods* 344(1): 1-5.



- Avrameas S y Guilber B (1971). A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *European Journal of Immunology* 1(1): 394-396.
- Baba TW, Liska V, Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Xu W, Ayehunie S, Cavacini L, Posner M, Katinger H, Stiegler G, Bernacky B, Rizvi T, Schimdt R, Hill L, Keeling M, Lu Y, Wright J, Chou T y Ruprecht R (2000). Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nature Methods* 6(2): 200–206.
- Bailey M, Plunkett F, Rothkötter H, Vega-López M, Haverson K y Stokes C (2001). Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proceedings of the Nutrition Society* 60(4): 427-435.
- Barington T, Sparholt S, Juul L y Heilmann C (1992). A simplification of the enzyme-linked immunospot technique. Increased sensitivity for cells secreting IgG antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *Journal of Immunological Methods* 156(2): 191-198.
- Baumgarth, N (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature* 11(1): 34-46.
- Benedetti R, Massouh E y Fló J (1995). The bone marrow as a site of antibody production after a mucosal immunization. *Immunology Letters* 48(2): 109-115.
- Bernard S y Lantier I (1985). A New Conjugate for the ELISA Quantitation of Porcine IgA. *Journal of Immunological Methods* 83(1): 97-100.
- Bianchi A, Scholten J, Jongenelen I y Koch G (1990). The use of monoclonal antibodies in an enzyme immunospot assay to detect isotype-specific antibody-secreting cells in pigs and chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 24(2):125-134.
- Bianchi A, Scholten J, Moonen y Boersma W (1999). Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Developmental & Comparative Immunology* 23(6): 511-520.
- Bianchi A, Zwart R, Jeurissen S y Moonen H (1992). Development of the B- and T- cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 33(3): 201-221.
- Bienenstock J y McDermott M (2005). Bronchus-and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunological Reviews* 206: 22-31.
- Binns R (1982). Organization of lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 3(1-2): 95-146.
- Bluter J, Zhao Y, Sinkora M, Wertz N y Kacs Kovics I (2009). Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Developmental and comparative Immunology* 33(3): 321-333.
- Bonilla F y Oettgen H (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 125(1): 33-40.
- Bora U, Chugh L y Nahar P (2002). Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures. *Journal Immunology Methods* 268(5): 171-177.



- Boulet S, Ndongala M, Peretz Y, Boisvert M, Boulassel M, Tremblay C, Routy J, Sekaly R y Bernard N (2007). A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN- γ HIV-specific immune responses. *Journal of Immunological Methods* 320(1-2): 18-29.
- Bouvet J y Fischetti V (1999). Minireview. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infection and Immunity* 67(6): 2687-2691.
- Brandtzaeg P, Baekkevold E, Farstad I, Jahnsen F, Johansen F, Nilsen E y Yamanaka T (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunology Today* 20(3): 141-151.
- Butler J, Sun J, Wertz N y Sinkora M (2006). Antibody repertoire development in swine. *Developmental & Comparative Immunology* 30(1-2): 199-221.
- Cerutti A, Cheng K y Chorny A (2011). Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annual Review of Immunology* 23(29): 273-293.
- Claassen E, de Leeuw W, de Greeve P, Hendriksen C y Boersma W (1992). Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Research in Immunology* 143(5): 478-483
- Cox J y Coulter A (1997). Adjuvants-A classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15(3): 246-256.
- Cukrowska B, Trebichavsky I, Rossmann P, Reháková Z, Sinkora J, Haverson K, Lodinová-Zádníková R y Tlaskalová-Hogenová H (1998). Antigenic Stimuli do not Influence Thymic B Lymphocytes: A Morphological and functional study in germ-free and conventionally reared piglets. *Developmental Immunology* 6(3-4): 171-178.
- Cunningham A (1965). A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature* 50(1): 1106-1107.
- Czerkinsky C, Moldoveanu Z, Mestecky J, Nilsson L y Ouchterlony Ö (1988). A novel two colour ELISPOT assay. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *Journal of Immunology Methods* 115(1): 31-37.
- Czerkinsky C, Nilsson L, Nygren H, Ouchterlony Ö y Tarkowski A (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunology Methods* 65(1-2): 109-121.
- Czerkinsky C, Tarkowski A, Nilsson L, Ouchterlony Ö, Nygren H y Gretzer C (1984). Reverse Enzyme-linked immunospot assay (RELISPOT) for the detection of cells secreting immunoreactive substances. *Journal of Immunological Methods* 72(2): 489-491.
- de Petris S (1975). Concanavalin A receptors. Immunoglobulins and antigen of the Lymphocyte Surface. *The Journal of Cell Biology* 65(1): 123-146.
- Dearman R, Caddick H, Stone S, Basketter D y Kimber I (2001). Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology* 167(3): 217-231.



- Debertin A, Schering T, Tönjes H, Kleemann J, Tröger, H y Pabst R (2003). Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clinical Experimental Immunology* 134(3): 503-507.
- Descotes J (2004). *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals: an Experimental and Clinical Approach. Volume I: Principles and Methods of Immunotoxicology*. 3^a edición, Editorial Elsevier, Amsterdam, Netherlands. Pp. 175-176.
- Díaz I y Mateu E (2005). Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN- γ , IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Veterinary immunology and immunopathology* 106(1-2): 107-112.
- Elgert K (2009). *Immunology. Understanding the Immune System*. 2^a Edición, Editorial Wiley-Blackwell, New Jersey, USA. Pp. 149-150.
- Engvall E (1980) Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Methods in Enzymology* 70(28): 419-439.
- Engvall E y Perlman P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9): 871-874.
- Estes D (2010). Regulation of IgA responses in cattle, humans and mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 138(4):312-317.
- Falkoff R, Zhu L y Fauci A (1983). The relationship between immunization and circulating antigen-specific plaque-forming cells. *Cellular Immunology* 78(2): 392-399.
- Fauci A y Pratt K (1976). Activation of human B lymphocytes. Direct plaque-forming cell assay for the measurement of polyclonal activation and antigenic stimulation of human B lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 144(3): 674-684.
- Favre N, Bordmann G y Rudin W (1997). Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Immunology Methods* 204(1): 57-66.
- Finke D y Acha-Orbea H (2001). Differential migration of in vivo primed B and T lymphocytes to lymphoid and non-lymphoid organs. *Journal of Immunology* 31(9): 2603-2611.
- Foo S y Phipps S (2010). Regulation of inducible BALT formation and contribution to immunity and pathology. *Mucosal Immunology* 3(6): 537-544.
- Fujihashi K, McGhee J, Beagley K, McPherson D, McPherson S, Huang C y Kiyono H (1993). Cytokine-specific ELISPOT assay. Single cell analysis of IL-2, IL-4 and IL-6 producing cells. *Journal of Immunological Methods* 160(2): 181-189.
- Gama A y García C (2011). Evaluación de la respuesta inmune sistémica y mucosal ante la inmunización perinatal en un modelo porcino. Tesis de licenciatura para QFB de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán-UNAM.
- Garvey J, Cremer N y Sussdorf D (1977). Chapter 42. Antibody formation by single cells. En "Methods in immunology. A laboratory text for instruction and research". Editado por J. Garvey. 3^a edición, Editorial W.A. Benjamin, USA. 411-428pp.
- Geffner J y Fainboim L (2008). Introducción a la inmunología humana. 5^a edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Pp. 262-263, 311.



- Glaser M (1979). Concanavalin A-mediated *in vitro* activation of lymphocytes primed against syngeneic SV40-induced tumor-associated antigens in mice into secondary effector cells capable of specifically preventing tumor growth. *Celular Immunology* 46(1): 201-207.
- Goldsby R, Kindt T, Osborne B y Kuby J (2003). *Inmunología*. 5a edición, Editorial McGraw Hill, México, D.F. Pp. 94-101.
- Gutierrez C, Bernabe R, Vega J y Kreisler M (1979). Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of Percoll. *Journal of Immunological Methods* 29(1): 57-63.
- Hall H (1985). A simple, rapid, reliable reverse haemolytic plaque assay and positive quality control test for routine use. *Journal of Immunology Methods* 80(1): 125-135.
- Halliley J, Kyu S, Kobie J, Walsh E, Falsey A, Randall T, Treanor J, Feng C, Sanz I y Lee E (2010). Peak frequencies of circulating human influenza-specific secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine* 28(20): 3582-3587.
- Hamburger A, Dunn F y White C (1985). Percoll density gradient separation of cells from human malignant effusions. *Journal of Cancer* 51(1): 253-258.
- Helms T, Boelhm B, Assad R, Trezza R, Lehmann P y Tary-Lehmann M (2000). Direct visualization of cytokine-producing recall antigen-specific CD4 memory T cells in healthy individuals and HIV patients. *Journal of Immunology* 164(7): 3723-3732.
- Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K y Mharandi A (2003). Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 21: S89-S95.
- Israfi D, Lajis N, Somchit M y Sulaiman M (2004). Enhancement of Ovalbumin-specific IgA responses via oral boosting with antigen co-administered with an aqueous *Solanum torvum* extract. *Life sciences* 75(4): 397-406.
- Janetzki S (2004). Automation of the ELISPOT technique: past, present, and future. *Scientific Brief* 291(1): 175-183
- Janetzki S, Schaed S, Blachere N, Ben-Porat L, Houghton A y Panageas K (2004). Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability results. *Journal of Immunological Methods* 291(1-2): 175-183.
- Janetzki S, Song P, Gupta V, Lewis J y Houghton A (2000). Insect cells as HLA-restricted antigen-presenting cells for the IFN- γ ELISPOT assay. *Journal of Immunology Methods* 234(1-2): 1-12.
- Jerne N y Nordin A (1963). Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140(3565): 405.
- Joling P, Wever P, Oskam J y Henken A (1993). Lymphocyte stimulation by phytohaemagglutinin and concanavalin A in different swine breeds. *Science* 35(3-4): 341-350.
- Jourdan M, Caraux A, De Vous J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, Bret C, Duperray C, Hose D y Klein B (2009). An *in vitro* model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 114(25): 5173-5181.



- Kalyuzhny A (2005). Handbook of ELISPOT: methods and protocols. En “Methods in molecular biology”. Editado por A. Kalyuzhny. Humana Press, New Jersey, USA. Pp. 15-24
- Kalyuzhny A (2009). Chapter 37. ELISPOT assay on membrane microplates. En “Methods in molecular biology, protein blotting and detection” Editado por B. Kurien y R. Scofield. Humana Press, Oklahoma, USA. Pp.355-365.
- Kalyuzhny A y Stark S (2001). A simple method to reduce the background and improve well-to-well reproducibility of staining in ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods* 257(1-2): 93-97.
- Karlsson A, Martin J, Younger S, Brecht B, Epling L, Ronquillo R, Varma A, Deeks S, McCune J, Nixon D y Sinclair E (2003). Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *Journal of Immunological Methods* 283(1-2): 141-153.
- Katsumoto T y Kurimura T (1988). Ultrastructural localization of concanavalin A receptors in the plasma membrane: association with underlying actin filaments. *Biology of the Cell* 62(1): 1-10.
- Kemeny D (1997). Enzyme-linked immunoassays. En “Immunochemistry 1”. Editado por A. Johnstone y M. Turner. Oxford University Press, UK. Pp. 147-175.
- Kennedy J y Axelrad M (1971). An improved assay for haemolytic plaque-forming cells. *Journal of immunology* 20(1): 253-257.
- Kiyono H y Fukuyama S. (2004). NALT-versus Peyer’s-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Reviews of Immunology* 4(9): 699–710.
- Klencke B, Matijevic M, Urban R, Lathey J, Hedley M, Berry M, Thatcher J, Weinberg V, Wilson J, Darragh T, Jay N, Da Costa M y Palefsky J (2002). Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a Phase I study of ZYC101. *Clinical Cancer Research* 8(5): 1028-1037.
- Labrousse H, Guesdon J, Ragimbeau J y Avrameas S (1982). Miniaturization of β -galactosidase immunoassays using chromogenic and fluorogenic substrates. *Journal of Immunology Methods* 48(2): 133-147.
- Lefrançois L y Puddington L (2006). Intestinal and pulmonary mucosal T cells: local heroes fight to maintain the *status quo*. *Annual Review of Immunology*. 24: 681-704.
- Lehmann P (2005). Chapter 7. Image analysis and data management of ELISPOT assay results. En “Methods in molecular biology. Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols”. Editado por A. Kalyuzhny. Editorial Humana Press Inc, Minneapolis, USA. 302: 117-131.
- Loaftger M, Höier-Madsen M, Kochi C y Andersen V (1988). An haemolytic plaque forming assay for identifying cells producing anti-DNA antibodies. *Clinical Experimental Immunology* 74(2): 242-246.
- Luttmann W, Bratke K, Kupper M y Myrtek D (2006). Immunology. The experimenter series. Academic Press, Oxford, UK. Pp. 92-94.
- Mäkitalo B, Andersson M, Areström I, Karlén K, Villinger F, Ansari A, Paulie S, Thorstenson R y Ahlborg N (2002). ELISPOT and ELISA analysis of spontaneous, mitogen-induced and antigen-specific cytokine production in *cynomolgus* and *rhesus macaques*. *Journal of Immunological Methods* 270(1): 85-97.



- Maloy K, Donachie A, O'Hagan D y Nowat A (1994). Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with ovalbumin entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Journal of Immunology* 81(4): 661-667.
- Manz R (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388(6638): 133-134.
- Marciani D (2003). Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today* 8(20): 934-943.
- McCutcheon M, Wehner N, Wensky A, Kushner M, Doan S, Hsiao L, Calabresi P, Ha T, Tran T, Tate K, Winkelhake J y Spack E (1997). A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T-lymphocytes. *Journal of Immunology Methods* 210(2): 149-166.
- Milthorp P y Forsdyke D (1973). A comparison of the activation of thymus and lymph-node cells by concanavalin-A and phytohaemagglutinin, effects or complement. *Journal of Immunological Methods* 2(3): 269-277.
- Möller S, Danielsson L y Borrebaeck C (1986). Concanavalin A-induced B-cell proliferation mediated by allogeneically derived helper factors. *Immunology* 57(3): 387-393.
- Morilla A y Bautista G (1986). Manual de Inmunología. Editorial Diana Técnico, México, D.F. Pp. 48-50.
- Neveu P, Perdoux D y Reiss D (1982). Regulation of lymphocyte transformation responses to phytohaemagglutinin, Concanavalin A or lipopolysaccharide by normal serum. *Annual Immunology Review* 133(1):69-82.
- Nuntaprasert A, Mori Y, Fujita K, Yoneda M, Miura R, Tsukiyama-Kohara K y Kai C (2004). Characterization of specific antibodies and the establishment of sandwich ELISA and ELISPOT system for swine IL-4. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27(6): 457-470.
- Ogra P, Faden H y Welliver R (2001). Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clinical Microbiology Reviews* 14(2): 430-445.
- Okamoto Y, Abe T, Niwa T, Mizuhashi S and Nishida M (1998). Development of dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1- and T helper type 2- cells. *Immunopharmacology* 39(2): 107-116.
- Okamoto Y, Gotoh Y, Shiraishi H y Nishida M (2004). A human dual-color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of interleukin 2- and interleukin 4-secreting cells. *International Immunopharmacology* 4(1): 149-156.
- Okamoto Y, Gotoh Y, Tokui H, Mizuno A, Kobayashi Y y Nishida M (2000). Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using dual color ELISPOT assay. *Journal of Interferon Cytokine Research* 20(1): 55-61.
- Pabst R y Binns R (1994). The immune system of the respiratory tract in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology* 43(1-3): 151-156.
- Pilette Y, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman J y Silbille Y (2001). Lung mucosal immunity: Immunoglobulin-A revisited. *European Respiratory Journal* 18(3): 571-588.
- Plaut A (1972). A review of secretory immune mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition* 25(12): 1344-1350.



- Porstmann T y Kiessig S (1992). Enzyme immunoassay techniques. An overview. *Journal of Immunology Methods* 150(1-2): 5-21.
- Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger E, Inamine A, Smith K, Dörner T y Hiepe F (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature* 6(10): 741-750.
- Randall T (2010). Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT): structure and function. *Advances in Immunology* 107: 187-241.
- Rönnelid J y Klareskog L (1997). A comparison between ELISPOT methods for the detection of cytokine producing cells: greater sensitivity and specificity using ELISA plates as compared to nitrocellulose membranes. *Journal of Immunological Methods* 200(1-2): 17-26.
- Rothkötter H (2009). Anatomical particularities of the porcine immune system- A physician's view. *Developmental and Comparative Immunology* 33(3): 267-272.
- Rothkötter H, Hriesik C, Nagendra N, Pabst B y Pabst R (1999). B and also T lymphocytes migrate via gut lymph to all lymphoid organs and the gut wall, but only IgA+ cells accumulate in the lamina propria of the intestinal mucosa. *European Journal of Immunology* 29(1): 327-333.
- Rothkötter H, Pabst R y Bailey M (1999). Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72(1): 157-165.
- Rothkötter H, Sowa E y Pabst R (2002). The pig as a model of developmental immunology. *Human and Experimental Toxicology* 21(9-10): 533-536.
- Russell M, Moldoveanu Z, White P, Sibert G, Mestecky J y Michalek M (1996). Salivary, nasal, genital and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit. *Infection and Immunity* 64(4): 1272-1283.
- Salinas I (2011). Análisis de la respuesta inmune de anticuerpos en suero y de linfocitos T en pulmón ante la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos convencionales destetados. Tesis de licenciatura para QFB de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán-UNAM.
- Sanborn M, Wan S y Bulard R (1982). Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Applied and Environmental Microbiology* 44(4):960-964.
- Santos A, Matos D, Bertho A, Mendonça S y Marcovistz R (2008). Detection of T_H1/T_H2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISPOT assay. *Cytokine* 42(2):152-155.
- Savage M, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S y Conklin E (1992). *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*. Editorial Pierce Chemical, Illinois, USA. Pp.467.
- Schielen P, van Rodijnen W, Tekstra J, Alberts R y Seinen W (1995). Quantification of natural antibody producing B-cells in rats by an improved ELISPOT technique using the polyvinylidene difluoride membrane as the solid support. *Journal of Immunology Methods* 188(1): 33-41.
- Secombes C, White A, Fletcher T y Houlihan D (1991). The development of an ELISPOT assay to quantify total and specific antibody-secreting cells in dab *Limanda limanda* (L.) *Fish & Shellfish Immunology* 1(2):87-97.



- Sedwick J y Czerkinsky C (1992). Detection of cell-surface molecules, secreted products of single cells and cellular proliferation by enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods* 150(1-2): 159-175.
- Sedwick J y Holt P (1983). A solid-phase immunoenzymatic technique for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunology Methods* 57(1-3): 301-309.
- Shapiro-Shelef M y Calame K (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nature* 5: 230-242.
- Sinkora M y Butler J (2009). The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental and Comparative Immunology* 33(3): 273-283.
- Sinkora M, Butler J, Holtmeier W y Sinkorova J (2005). Lymphocyte development in fetal piglets: Facts and surprises. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108(1-2): 177-184.
- Swain S, McKinstry K y Strutt T (2012). Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nature Reviews. Immunology* 12(2): 136-148.
- Taguchi T, McGhee J, Coffman R, Beagley K, Eldridge J, Takatsu K y Kiyono H (1990). Detection of individual mouse splenic T-cells producing IFN- γ and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *Journal of Immunological Methods* 128(1): 65-73.
- Takahashi Y (2007). Memory B cells in systemic and mucosal immune response: implications for successful vaccination. *Biosciences Biotechnology Biochemistry* 71(10): 2358-2362.
- Talamás P (2010). Capítulo 24. Bases celulares y moleculares del sistema inmunitario. En "Fisiología Médica". Editado por J. Fernández-Tresguerres. 4ª edición, Editorial Mc Graw Hill, México, D.F. Pp. 318-323.
- Tanguay S y Killion J (1994). Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Research* 13(4), 259-263.
- Tjarkowski A, Czekinsky C, Nilsson L, Nygren H y Ouchterlony Ö (1984). Solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of IgG rheumatoid factor-secreting cells. *Journal of immunological methods* 72(2):451-459.
- Truffa-Biachi P y Bordenave G (1980). A reverse hemolytic plaque assay for detection and the enumeration of immunoglobulin allotype-secreting cells. *Celular Immunology* 50(2): 261-270.
- Turner C, Blieden T, Smith T, Feldon S, Foster D, Sime P y Phipps R (2004). A novel ELISpot method for adherent cells. *Journal of Immunological Methods* 291(1-2): 63-70.
- Van der Stede Y, Cox E, Van der Broeck W y Goddeeris B (2001). Enhanced induction of the IgA response in pigs by calcitriol after intramuscular immunization. *Vaccine* 19(15-16): 1870-1878.
- Vega-López M, Cole M y Bellanti J (2012). Chapter 8. The mucosal immune system in health and disease. En "Immunology IV. Clinical applications in health and disease". 4ª edición. Editado por J. Bellanti, A. Escobar-Gutierrez y G. Tsokos. I Care Press, Boston, USA. Pp. 255-283.



- Vetri V, Carrotta R, Picone P, Di Carlo M y Militello V (2010). Concanavalin A aggregation and toxicity on cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804(1): 173-183.
- Viau M y Zouali M (2004). B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clinical Immunology* 114(1): 17-26.
- Vora K, Tumas-Brundage K y Manser T (1999). Contrasting the in situ behavior of a memory B cell clone during primary and secondary immune responses. *Journal of Immunology* 163(8): 4315-4327.
- Wakefield E, Shelton M y Hosking C (1982). A quantitative ELISA for IgG in cell culture supernatants. *Clinica Chimica Acta* 123(3): 303-310.
- Waldman R y Henney C (1971). Cell-mediated immunity and antibody responses in the respiratory tract after local and systemic immunization. *Journal of Experimental Medicine* 134(2): 482-495.
- Xu Z, Chen C, Mao Z y Zhu W (2009). Detection of serum and mucosal antibody production and antibody secreting cells (ASCs) in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) following vaccination with *Vibrio harveyi* via different routes. *Aquaculture* 287(3-4): 243-247.
- Zeng C, MaWhinney S, Barón A y McFarland E (2005). Evaluating ELISPOT summary measures with criteria for obtaining reliable estimates. *Journal of Immunology Methods* 297(1-2): 97-108.
- Zhang S, Yang J y Lin J (2008). 3,3'-diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂-HRP voltammetric enzyme-linked immunoassay for the detection of carcionembryonic antigen. *Journal of Bioelectrochemistry* 72(1): 47-52.