



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE AVIDEZ EMPLEANDO UN  
SISTEMA MÚLTIPLE DE MICROESFERAS BASADO EN  
CITOMETRÍA DE FLUJO BIOPLEX, PARA LA DETECCIÓN DE  
AUTO-ANTICUERPOS CONTRA CITOCINAS HUMANAS  
(IL-6 E IFN- $\gamma$ )**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:  
CYNTHIA KARINA ZAVALA MORALES**

**ASESOR: DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES.  
CO-ASESOR: DR. RAINER DOFFINGER**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y Examen Profesional**

**Estandarización del ensayo de avidez empleando un sistema múltiple de microesferas basado en citometría de flujo BioPlex, para la detección de auto-anticuerpos contra citocinas humanas (IL-6 e IFN- $\gamma$ ).**

Que presenta la pasante: **Cynthia Karina Zavala Morales**

Con número de cuenta: **308281974** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Abril de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. René Damián Santos	
<b>VOCAL</b>	Dra. Gabriela Barcenas Morales	
<b>SECRETARIO</b>	M.V.Z. Angel German Martínez Sosa	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Bertha Ortiz Vázquez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga\*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al proyecto del programa **PAPIIT, UNAM**. “Análisis de la actividad biológica neutralizante de autoanticuerpos específicos contra citocinas y quimiocinas, y su relación con inmunodeficiencias secundarias” con Clave **IN220815**.

Al proyecto **PIAPI**, FES-Cuautitlán, UNAM. “Infección e inmunidad” con Clave **PIAPIC24**.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a mis profesores que me han forjado como persona y como profesionista desde mi adolescencia hasta la culminación de la licenciatura.

A la **Dr. Gabriela Barcenas Morales** por su tiempo, confianza, apoyo, paciencia y consejos recibidos en todo momento desde el punto de vista personal y académico.

Al **Dr. Rainer Doffinger** por apoyar siempre al equipo del Laboratorio de Inmunología de la FESC, por compartir sus conocimientos con nosotros y también a su equipo de trabajo por el apoyo recibido.

Al **equipo del Laboratorio de Inmunología** de la FESC por su apoyo, por compartir su conocimiento.

Al **jurado asignado** quienes han incrementado la calidad de este trabajo con sus revisiones.

Al proyecto del programa **PAPIIT, UNAM**. “Análisis de la actividad biológica neutralizante de autoanticuerpos específicos contra citocinas y quimiocinas, y su relación con inmunodeficiencias secundarias” con Clave **IN220815**.

Al proyecto **PIAPI**, FES-Cuautitlán, UNAM. “Infección e inmunidad” con Clave **PIAPIC24**.

## DEDICATORIAS

Este trabajo esta dedico a las personas más importantes en mi vida y a quienes les agradezco todo lo que soy es decir mi Familia.

A mi **Mamá**, gracias por apoyarme en todo momento por creer en mí, por no dejar que me diera por vencida, gracias por todo el esfuerzo que has puesto para que yo llegue hasta donde estoy, porque todo lo que nos has dado a mi hermano y a mí.

A mi **Papá**, por todos tus regaños, por apoyarme a terminar esta etapa de vida, por ser el mejor Papá del mundo, porque gracias a ti sé que no nos debemos de dar por vencidos, que siempre hay que luchar y que al final lo más importante es la Familia.

A mi **hermano**, Mauri gracias por tolerarme cuando estoy estresada por soportar mis malos ratos, por quererme tal como soy, y por apoyarme siempre.

A mi **abuelita Juanita**, por ser el ángel que me cuida, gracias por todo lo que me has dado, por consentirme, por las risas, los consejos por eso y muchas cosas más. Aquí esta chiquis lo que te prometí.

A **Felipe**, quien me ha apoyado, escuchado y acompañado durante esta gran etapa, a ti que has hecho de este trayecto algo inolvidable, porque al final hemos crecido juntos y hoy estamos concluyendo una parte de lo que iniciamos. ¡Te amo Pipe!

A mi **abuelito Roberto** por creerme en mí, por nunca dudar en que lo lograría y por siempre sacarme una sonrisa con sus ocurrencias.

A las **Familias Zavala, Morales y Cachon** quienes directamente me han apoyado en la conclusión de este proyecto y han creído en mí.

# CONTENIDO TEMÁTICO

<b>CONTENIDO TEMÁTICO</b>	<b><i>i</i></b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b><i>iii</i></b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b><i>iv</i></b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b><i>v</i></b>
<b>RESUMEN</b>	<b><i>vii</i></b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes	1
1.2. Anticuerpos	1
1.2.1. Estructura de los anticuerpos	5
1.2.2. Interacciones de antígenos-anticuerpos	9
1.2.3. Afinidad y avidéz de los anticuerpos	12
1.3. Cromatografía de afinidad	14
1.4. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión multi-Plex (Luminex)	17
1.5. Auto-Ac's contra citocinas y susceptibilidad a infecciones	20
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
5.1. Muestras séricas	26
5.2. Detección de los auto-Ac's anti-citocinas en muestras séricas mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple Luminex	27
5.3. Técnica de cromatografía de afinidad por columna	28
5.3.1. Preparación del material	29
5.3.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína (citocina IFN- $\gamma$ )	30
5.3.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad	32
5.3.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad	34
5.4. Estandarización del ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's mediante la técnica BioPlex en un sistema múltiple de microesferas	35
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
6.1. Muestras séricas y Ac's purificados	37
6.2. Purificación de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna	37
6.3. Determinación de los niveles de auto-Ac's anti-citocinas en muestras séricas humanas y en las preparaciones de los auto-Ac's purificados, mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión, multi-Plex (Luminex)	38

6.4. Estandarización del ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's empleando la técnica BioPlex en un sistema múltiple de microesferas	45
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1.</b> Muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's anti-citocinas con sus respectivos datos clínicos	26
<b>Tabla 2.</b> Niveles de auto-Ac's contra IL-6 presentes en las diferentes muestras séricas y auto-Ac's purificados	41
<b>Tabla 3.</b> Niveles de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ presentes en las diferentes muestras	43
<b>Tabla 4.</b> Valores promedio de intensidad de fluorescencia de diferentes muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's anti-IL-6 y de los auto-Ac's purificados, después del tratamiento con dos concentraciones de urea (6 y 9 M)	47
<b>Tabla 5.</b> Valores promedio de intensidad de fluorescencia de diferentes muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's anti- IFN- $\gamma$ y de los auto-Ac's purificados, después del tratamiento con dos concentraciones de urea (6 y 9 M)	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página.

<b>Figura 1.</b> Los anticuerpos pueden participar de tres modos en la defensa del hospedador	4
<b>Figura 2.</b> Estructura general de un anticuerpo	8
<b>Figura 3.</b> Fuerzas no covalentes que mantienen unido el complejo antígeno-anticuerpo	10
<b>Figura 4.</b> Afinidad y avidéz de anticuerpos	13
<b>Figura 5.</b> Formación de enlaces aminos estables entre la proteína y la resina contenida en las columnas de cromatografía por afinidad	16
<b>Figura 6.</b> Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex)	19
<b>Figura 7.</b> Purificación de auto-Ac's anti- IFN- $\gamma$ de muestras séricas	39
<b>Figura 8.</b> Determinación de los niveles de auto-Ac's anti-IL-6	42
<b>Figura 9.</b> Determinación de los niveles de auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$	44
<b>Figura 10.</b> Ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's contra IL-6 de las diferentes muestras empleando la técnica de Luminex	49
<b>Figura 11.</b> Ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ de la muestra S54.46-47 (R. S.) empleando la técnica de Luminex	51
<b>Figura 12.</b> Ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ de la muestra S52.49 (S. M.) empleando la técnica de Luminex	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

auto-Ac's	Auto-anticuerpos
Ac's	Anticuerpos
BCR	Receptor de células B
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados centígrados
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
C <sub>H</sub>	Dominios constantes de las cadenas pesadas
C <sub>L</sub>	Dominios constantes de las cadenas ligeras
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
Fab	Fragmentos de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristizable
FcR	Receptores para la fracción cristizable
g	Gravedades
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos
H	Cadena pesada
HCl	Ácido clorhídrico
IF	Intensidad de fluorescencia
IFN- $\gamma$	Interferón gama
IL	Interleucina
K <sup>+</sup>	Potasio
kDa	KDalton
L	Cadena ligera
M	Molar

mL	Mililitro
Na <sup>+</sup>	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaCNBH <sub>3</sub>	Cianoborohidruro de sodio
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH <sub>2</sub>	Aminas primarias
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	PBS-Tween-20
PE	Ficoeritrina
PVA	Poly(vinyl alcohol)
PVP	Poly(vinylpyrrolidinone)
rpm	Revoluciones por minuto
STAT-1	Transductor de la señal y activador transcripcional-1
STAT-3	Transductor de la señal y activador transcripcional-3
Strep	Estreptavidina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
μg	Microgramo.
V <sub>H</sub>	Regiones variables de las cadenas pesadas.
V <sub>L</sub>	Regiones variables de las cadenas ligeras.
μL	Microlitro.

## RESUMEN

Las infecciones diseminadas causadas por micobacterias no tuberculosas han sido descritas en pacientes con inmunodeficiencias. Particularmente individuos con defectos genéticos en la vía de la IL-12 dependiente de IFN- $\gamma$ , son altamente susceptibles a infecciones micobacterianas y salmonelosis (Altare et al. 1998; Döffinger et al. 2005). Por otra parte, los anticuerpos anti-citocinas se han descrito en los últimos años, como una importante y emergente causa de enfermedades. Sus manifestaciones son diversas e incluyen proteínosis alveolar pulmonar debido a auto-Ac's anti-GM-CSF, susceptibilidad adquirida a infecciones micobacterianas por la presencia de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ , auto-Ac's anti-IL-6 en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente; así mismo, auto-anticuerpos neutralizantes contra citocinas IL-12, IL-17A, IL-17F e IL-22 han sido reportados en pacientes con candidiasis mucocutánea crónica y/o con síndrome poli-endócrino autoinmune-1, timoma y miastenia gravis (Meager, et al. 2003; Zhang, et al. 2003; Doffinger, et al. 2004, Hoflich, et al. 2004; Puel, et al. 2008; Kisand, et al. 2010; Puel, et al. 2010).

**Objetivo:** Estandarizar el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión, multi-Plex (Luminex) con el uso de urea para determinar el grado de avidéz de auto- Ac's anti-citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-6) de muestras séricas humanas y de las fracciones de auto-Ac's purificados a partir del ensayo de cromatografía de afinidad por columna.

**Métodos.** Se analizaron 4 muestras séricas positivas a auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-6 que fueron donadas por el Dr. Rainer Döffinger del Department of Clinical Immunology and Biochemistry, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K. Los auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  presentes en las muestras séricas se purificaron mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna, empleando el kit de acoplamiento proteico de micro enlace (*Micro Link protein coupling kit*); se acopló a una columna la citocina humana recombinante (IFN- $\gamma$ ), y a otra la proteína BSA (como control negativo). La detección de los auto-Ac's purificados en las diferentes fracciones eluidas fue confirmada por el ensayo de Luminex. Mientras que los auto-Ac's anti-IL-6 purificados fueron proporcionados en el laboratorio de trabajo. Posteriormente, se determinaron los valores de índice de avidéz de los auto-Ac's comparando dos concentraciones de urea ( 6 y 9 M ) y utilizando la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex, basado en citometría de flujo; para la determinación de los índices de avidéz se trabajaron por triplicado las muestras séricas y los auto-Ac's purificados.

**Resultados.** La técnica de Luminex resultó ser útil para confirmar la presencia de auto-Ac's anti-citocinas en muestras séricas y en los eluidos de la purificación de los auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  e IL-6 obtenidos mediante cromatografía de afinidad en columna. Los auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$  purificados resultaron estar presente en las eluciones E1, E2 y E3 obtenidas de la columna que tenía acoplada el IFN- $\gamma$ . Sin embargo, es importante mencionar que cuando se realizó la disminución del pH de 2.8 a 2.0 (a partir de la elución E8 a la E12) se lograron obtener nuevamente auto-Ac's purificados en las E8 y E9

principalmente, aunque los niveles de éstos fueron menores a los presentados por las primeras eluciones.

Por otra parte, se estandarizó el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión, multi-Plex (Luminex) para determinar los valores de los índices de avidéz, este ensayo consistió en emplear un agente desestabilizante de puentes de hidrógeno, como es la urea; por lo cual se encontró que la concentración de 9 M es la más recomendable para determinar los índices de avidéz de los auto-Ac's contra citocinas, debido a que estos valores resultaron ser más definidos que cuando se utilizó la concentración de urea 6 M. Así mismo, los valores de los índices de avidéz de los auto-Ac's eluidos a un pH 2.0 (mezcla de fracciones E8-E10) resultaron más elevados que aquellos presentados por los auto-Ac's eluidos a un pH de 2.8 (mezcla E1-E3).

**Conclusiones.** Una vez que se realizó exitosamente la técnica de cromatografía de afinidad en columna para la purificación de los auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$  fue posible determinar los valores de los índices de avidéz de los auto-Ac's contra citocinas (IL-6 e IFN- $\gamma$ ), los cuales resultaron ser más definidos y consistentes cuando se emplearon las preparaciones purificadas que las muestras séricas completas; donde la mejor concentración de urea para la determinación de los índices de avidéz fue de 9 M.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes

En el curso normal de una infección, el agente infeccioso provoca una respuesta inmune innata que presenta los signos clínicos, seguida de una respuesta inmune adaptativa que elimina la infección y establece un estado de inmunidad protectora. Esto no siempre sucede, sobre todo cuando el individuo puede presentar alguna de las enfermedades de inmunodeficiencia, en las que la defensa del hospedero falla. Las infecciones en una inmunodeficiencia primaria (hereditaria) o secundaria (adquirida), pueden dirigirse a los componentes del sistema inmune que se ven afectados (Janeway, 2008).

La autoinmunidad se refiere a una respuesta inmune inapropiada contra componentes propios del hospedero que resulta en condiciones patológicas. Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una activación de las células T y B auto-reativas, y pueden ser asociadas con la producción de auto anticuerpos (auto-Ac's) contra moléculas propias, terminando en la inflamación y el daño del tejido (Shoenfeld, 1994; Kivity, 2009; Agmon, 2009; Invernizzi y Gershwin 2009; Hewagama y Richardson, 2009).

La importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de auto-Ac's anti-citocinas, donde altos títulos de estos auto-Ac's neutralizantes pueden predisponer a los pacientes a una susceptibilidad a infecciones por diversos microorganismos, así también a una amplia variedad de posibles enfermedades que amenazan la vida del individuo (Maddur, 2010; Browne y Holland, 2010).

Por lo anterior, el interés del presente proyecto, es realizar el análisis de muestras séricas para corroborar la presencia de auto-Ac's contra citocinas, detectados en pacientes con diversas enfermedades infecciosas, empleando un sistema de microesferas BioPlex, así mismo para la determinación de los índices de avidéz de los auto-Ac's contra estos mediadores químicos.

## 1.2. Anticuerpos

Las respuestas inmunitarias innatas al inicio defienden al cuerpo contra la infección, pero éstas sólo funcionan para controlar agentes patógenos que tienen ciertos modelos moleculares o que inducen interferones y otras defensas secretadas no específicas. Para

combatir con eficacia la amplia gama de agentes patógenos con la que un individuo se encuentra, los linfocitos del sistema inmunitario adaptativo han evolucionado para reconocer una gran variedad de antígenos provenientes de bacterias, virus y otros organismos que causan enfermedad. Las moléculas de reconocimiento de antígeno de las células B son los anticuerpos (Ac's).

Los Ac's son las formas secretadas de las proteínas conocidas más generalmente como inmunoglobulinas. La inmunoglobulina unida a la membrana sobre la superficie de células B sirve como el receptor de antígeno de ésta, y se conoce como receptor de células B (BCR). La inmunoglobulina de la misma especificidad para este antígeno se secreta como Ac's por células B terminales diferenciadas, denominadas como células plasmáticas. El repertorio de células B producen Ac's en una vasta gama de especificidades de antígeno, cada célula B produce inmunoglobulina de especificidad única.

Químicamente los Ac's son un conjunto heterogéneo de proteínas que se producen por la estimulación antigénica del sistema inmunológico y que tienen la propiedad de reaccionar, específicamente, con el antígeno inductor de su producción. Todos los Ac's incluyen en su molécula una cierta cantidad de carbohidrato, así que estrictamente hablando los Ac's son glicoproteínas aunque la porción de carbohidrato no participa en su actividad de Ac (Janeway, 2008).

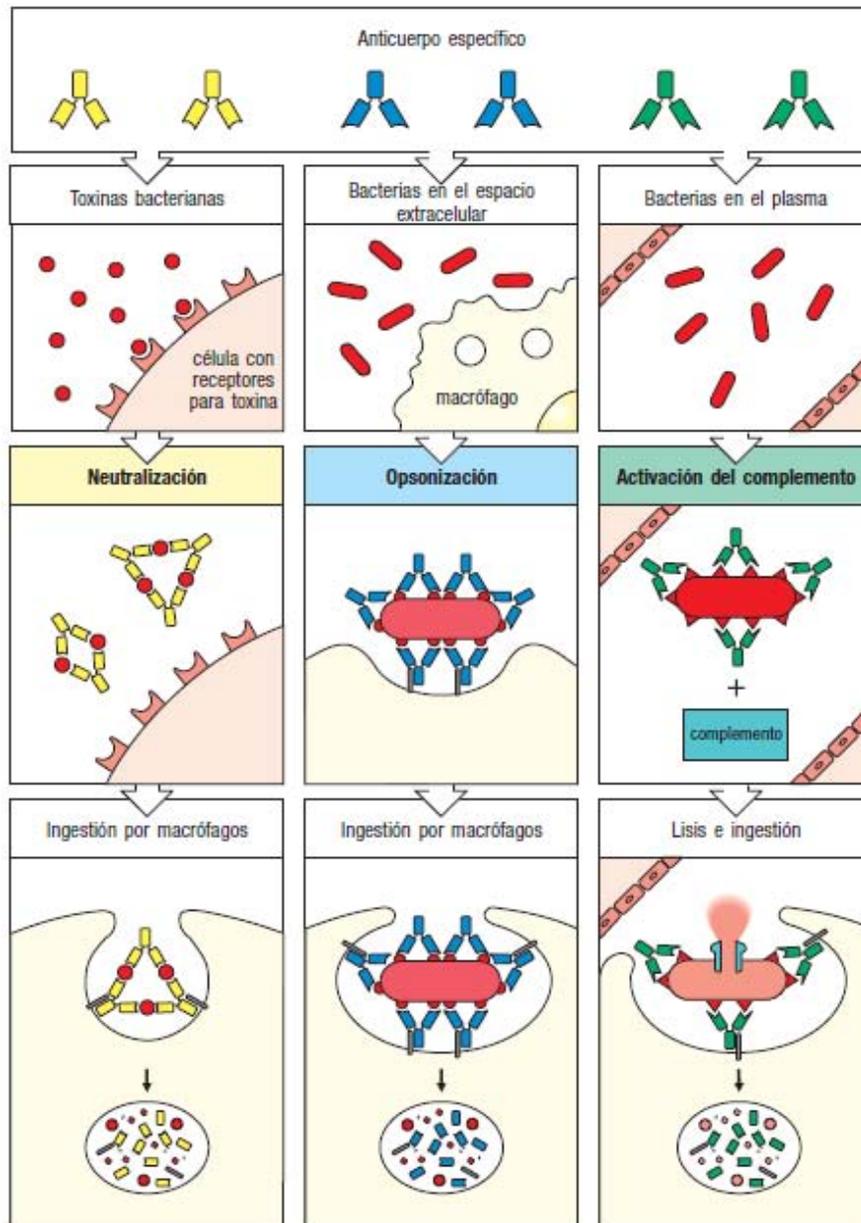
Los Ac's llevan a cabo tres funciones principales (ilustradas en la **Figura 1**):

1) **Neutralización.** Los Ac's pueden proteger contra agentes patógenos o sus productos al unirse a ellos, y así bloquear su acceso a células que podrían infectar o destruir, esta función de neutralización tiene mayor importancia para la protección contra virus (se evita que entren a células y se repliquen) y contra toxinas bacterianas.

2) **Opsonización y fagocitosis.** La unión de Ac's no siempre basta para evitar la multiplicación de una bacteria, por lo cual otra función de los Ac's es permitir con mayor facilidad que una célula fagocítica, como un neutrófilo o un macrófago, ingiera la bacteria y la destruya. Muchas bacterias evaden el sistema inmunitario innato porque tienen una cubierta externa; sin embargo, los antígenos en la cubierta pueden reconocerse mediante Ac's, y los fagocitos tienen receptores para la fracción cristalizable (FcR del inglés, *crystallizable fraction Receptor*) que se unen a las porciones Fc de los Ac's que cubren a la bacteria, lo que

conduce a la fagocitosis. El recubrimiento de agentes patógenos y partículas extrañas por moléculas de Ac's de esta manera se conoce como opsonización.

**3) Activación del complemento.** Las regiones constantes de los Ac's unidas a superficies bacterianas forman receptores para la primera proteína del sistema del complemento, de modo que una vez que se producen Ac's, la activación del complemento aumenta. La vía clásica a menudo empieza con la unión de C1q a Ac's que han reconocido específicamente estructuras sobre la superficie bacteriana, siendo esta una forma de activación de la cascada de complemento, algunos de los componentes del complemento que se depositan y unen a la superficie de los microorganismo pueden destruir de manera directa a ciertas bacterias, y esto tiene importancia en algunas infecciones bacterianas.



**Figura 1. Los anticuerpos pueden participar de tres modos en la defensa del hospedador.**

Los paneles izquierdos muestran Ac's que se unen y neutralizan a una toxina bacteriana, así evitan la interacción con las células del hospedero y que causen enfermedad. Una toxina no unida puede reaccionar con los receptores de las células del hospedero, mientras que el complejo toxina-Ac's no puede. Los Ac's también neutralizan las partículas de virus y células bacterianas por interactuar con ellos e inactivarlos. El complejo antígeno-Ac's es eventualmente degradado por macrófagos, el antígeno que está recubierto con Ac's es reconocido como extraño por fagocitos (macrófagos y neutrófilos) que luego ingieren y destruyen, eso es llamado opsonización. Los paneles de en medio muestran la opsonización y fagocitosis de una célula bacteriana. Los paneles de la derecha muestran la activación del complemento, los Ac's unidos a la superficie de la bacteria forman un receptor para la activación del complemento, que en algunos casos puede matar directamente a la bacteria. Generalmente el complemento favorece el recubrimiento y destrucción de la bacteria por fagocitosis, así que los Ac's tiene por objetivo la destrucción de patógenos y sus productos tóxicos para su eliminación por fagocitosis (Janeway, 2008).

Las funciones de reconocimiento y efectoras están separadas de forma estructural en la molécula de Ac, una parte del cual se une de modo específico al antígeno mientras que la otra emprende los diversos mecanismos de eliminación (Janeway, 2008).

En forma general, la estructura del Ac consiste en una región variable y una región constante. La región de unión al antígeno varía mucho entre moléculas de Ac's y se conoce como región variable. La variabilidad de las moléculas de Ac permite que cada Ac se una a un antígeno específico diferente, y el repertorio total de Ac's sintetizados por un individuo es de  $10^{11}$  BCRs diferentes para asegurar que pueda reconocerse casi cualquier estructura. La región de la molécula de Ac que emprende las funciones efectoras del sistema inmunitario no varía de la misma manera por lo que se conoce como región constante o región C (Janeway, 2008).

### 1.2.1. Estructura de los anticuerpos

Se utiliza la molécula de Ac IgG como ejemplo para describir las características estructurales generales de las inmunoglobulinas (Roitt, 2008).

Los Ac's IgG son moléculas grandes con un peso molecular de 150 kDa y están compuestos de dos clases de cadenas de polipéptidos. Una cadena, de casi 50kDa, se denomina cadena pesada (H, del inglés *heavy chain*), y la otra, de 25 kDa se llama cadena ligera (L, del inglés *light chain*). Cada molécula de IgG consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras; las dos primeras se unen entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada se enlaza a una ligera por medio de un enlace disulfuro, por lo tanto, una molécula de inmunoglobulina, consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, lo que le da a una molécula de Ac, dos sitios de unión a antígenos idénticos y así, la capacidad para unirse al mismo tiempo a dos estructuras iguales.

En los Ac's se encuentran dos tipos de cadenas ligeras, llamadas lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ); las inmunoglobulinas tienen sus dos cadenas  $\kappa$  o  $\lambda$ , nunca una de cada tipo (exclusión alélica).

La clase de un Ac, y por tanto la función efectora de éste, se define por la estructura de su cadena pesada. Hay cinco clases principales de cadenas pesadas o isotipos, algunas de

las cuales tienen varios subtipos, y éstos determinan la actividad funcional de una molécula de Ac. Las cinco clases principales de inmunoglobulina son inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE), sus cadenas pesadas se denotan por la letra griega minúscula correspondiente  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\epsilon$ , respectivamente. Sus propiedades funcionales distintivas son conferidas por la parte carboxilo terminal de la cadena pesada, donde no se relaciona con la cadena ligera.

La estructura de receptor de células B es idéntica a la de su Ac correspondiente salvo por una pequeña porción del grupo carboxilo terminal de la región C de la cadena pesada. En el receptor de células B el carboxilo terminal es una secuencia hidrofóbica que fija la molécula en la membrana, y en el Ac es una secuencia hidrofóbica que permite su secreción.

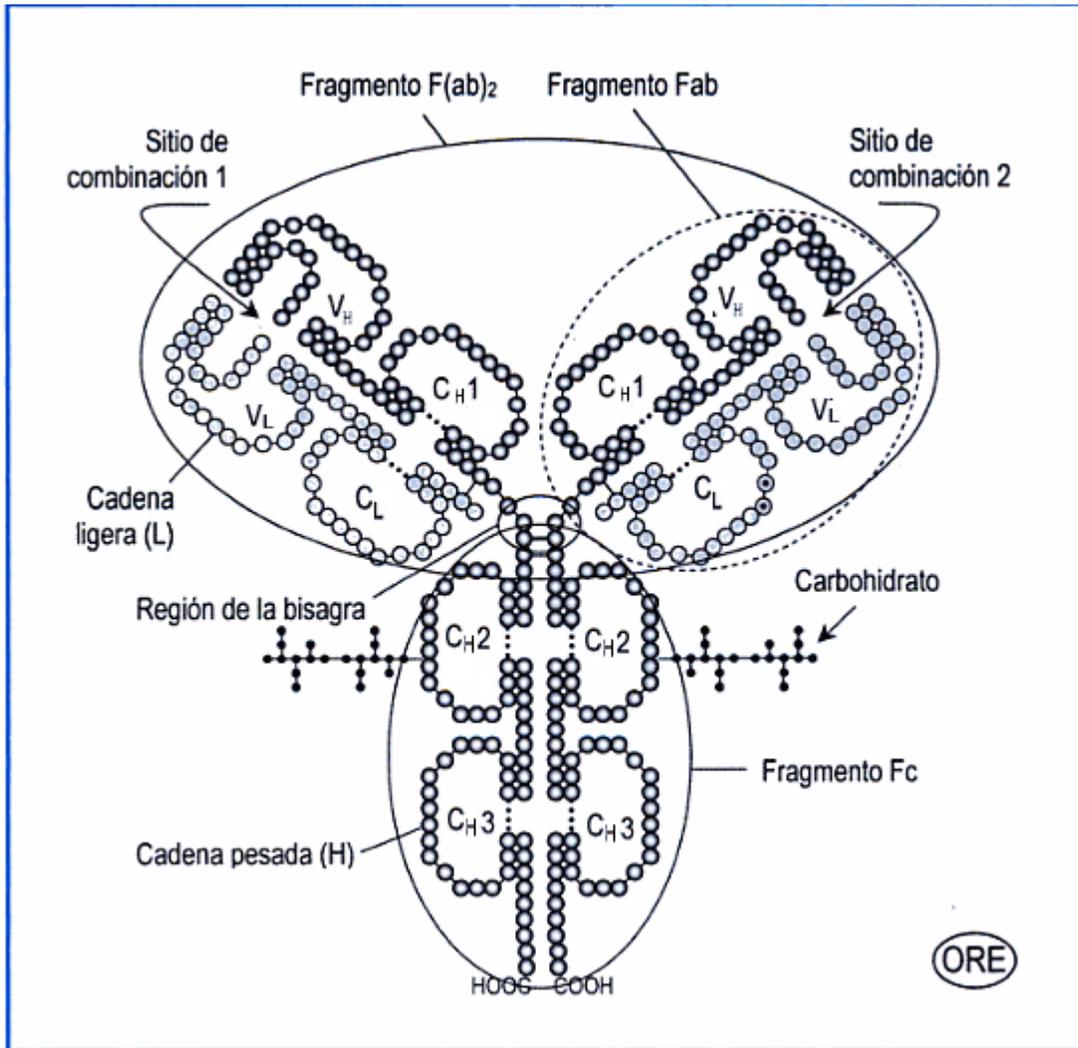
La región constante de las cadenas pesadas muestran una estructura organizada en dominios, esto es, bloques de secuencias repetidas (casi idénticas) de aproximadamente 110 aminoácidos de largo. Los dominios variables del grupo amino terminal (dominios V) de las cadenas pesadas y ligeras ( $V_H$  y  $V_L$ , respectivamente) juntos conforman la región V del Ac y le confieren la capacidad para unirse a antígenos específicos, mientras que los dominios constantes (dominios C) de las cadenas pesadas y ligeras ( $C_H$  y  $C_L$ , respectivamente) constituyen la región C. Los múltiples dominios C de cadenas pesadas se enumeran desde el extremo amino terminal hasta el grupo carboxilo terminal, por ejemplo  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , y así sucesivamente.

Los dominios de proteínas se asocian para formar dominios globulares de mayor tamaño. Con lo cual una molécula de Ac comprende tres porciones globulares de igual tamaño unidas por un tramo flexible de cadena de polipéptido conocido como región bisagra. Cada extremo de esta estructura en forma de Y está formado por la asociación de una cadena ligera con la mitad de amino terminal de una cadena pesada, mientras que el tronco de Y se forma por el pareado de las mitades grupo carboxilo terminal de las cadenas pesadas. La asociación de las cadenas pesadas y ligeras es tal que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  están pareados, al igual que los dominios  $C_{H1}$  y  $C_L$ .

En las regiones variables de las cadenas L y H hay subregiones que consisten en secuencias de aminoácidos con extrema variabilidad (hipervariables) que forman el sitio de unión con antígenos. Las regiones hipervariables forman el área de la molécula del Ac que es complementaria en estructura con el determinante antigénico o con el epítipo, y por tanto

también se conoce como regiones determinantes de complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*). Aproximadamente cinco aminoácidos en cada región hipervariable constituyen el sitio de unión a los antígenos.

En las cadenas H también existe una región adicional, que no forma parte de los dominios, denominada región bisagra. La región bisagra está localizada entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, y ésta permite la movilidad a las inmunoglobulinas. La región bisagra es en particular susceptible a la digestión proteolítica por la enzima papaína. El tratamiento de la molécula de inmunoglobulina con papaína provoca la división de esta molécula, obteniéndose tres fragmentos, de los cuales dos fragmentos son idénticos y contienen la actividad de reconocimiento y unión al antígeno; estos se denominan fragmentos de unión al antígeno, (Fab, *fragment antigen binding*), dichos fragmentos corresponden a los dos brazos idénticos de la molécula de Ac. El otro fragmento no contiene actividad de unión al antígeno, pero en estudios iniciales se observó que se cristaliza con facilidad, y por esta razón se le nombró fragmento cristalizable, (Fc, *crystallizable fraction*), es la parte efectora de la molécula de Ac que interactúa con moléculas y células. La estructura de la molécula del Ac se esquematiza en la **Figura 2** (Janeway, 2008).



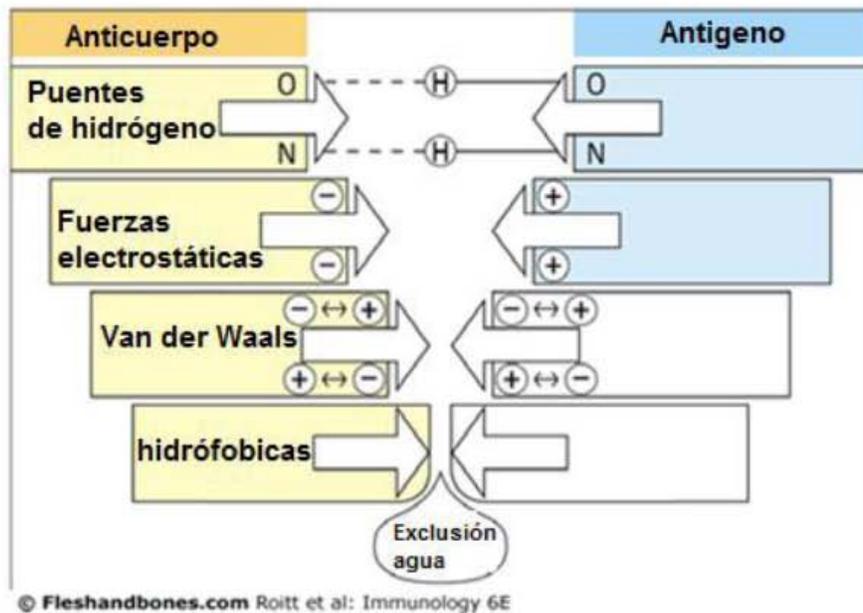
**Figura 2. Estructura general de un anticuerpo.** La unidad monomérica de cualquier molécula de anticuerpo consta de 2 cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H). Cada cadena polipeptídica tiene una región variable (V) y una región constante (C). La porción constante de la cadena pesada (CH) muestra unidades estructurales de repetición, conocidas como dominios. El sitio de combinación del anticuerpo está formado por las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas ( $V_H$  y  $V_L$ ). Entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$  se encuentra la llamada "región de bisagra" una zona con alto contenido de prolina e hidroxiprolina que le confiere gran flexibilidad a la molécula de anticuerpo. Usualmente en el dominio  $C_{H2}$  se encuentra insertado un residuo de carbohidrato cuya proporción varía para cada inmunoglobulina (Rojas, 2006).

### 1.2.2. Interacciones de antígenos-anticuerpos

Los Ac's reconocen formas moleculares (epítomos) en los antígenos. Por lo general cuanto mejor es la correspondencia del epítomo (en lo que se refiere a conformación y a las características químicas) con el sitio de combinación del Ac, más favorables son las interacciones que se forman entre el anticuerpo-antígeno y más elevada para la afinidad del uno por el otro. Los epítomos tienen una gran variedad de formas diferentes, como también tienen los sitios de combinación de los Ac's. Típicamente, las superficies proteicas son reconocidas por una superficie complementaria presente en el sitio de combinación del Ac, (Roitt,2008).

La interacción antígeno-anticuerpo es un fenómeno que depende de la complementariedad química de los reactantes. Ésta, depende a su vez de la conformación de las moléculas y de la carga de sus elementos constituyentes. Cuando tal interacción ha ocurrido se producen los complejos antígeno-anticuerpo, donde los reactantes se mantienen unidos a través de enlaces no covalentes reversibles. En la **Figura 3** se muestran las fuerzas o enlaces comprendidos en las interacciones no covalentes, las cuales están involucradas en la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

Fuerzas no covalentes	Origen	
<b>Fuerzas electrostáticas</b>	Atracción entre cargas opuestas	$\ominus \text{NH}_3 \quad \text{OOC} \ominus$
<b>Puentes de hidrógeno</b>	Hidrógeno compartido entre átomos electronegativos (N, O)	$\begin{array}{c} \diagup \text{N} - \text{H} \cdots \text{O} = \text{C} \diagdown \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$
<b>Fuerzas de van der Waals</b>	Las fluctuaciones de nubes de electrones alrededor de moléculas polarizan de modo opuesto átomos vecinos	
<b>Interacciones hidrófobas</b>	Los grupos hidrófobos interactúan de manera desfavorable con el agua y tienden a aglomerarse para excluir moléculas de agua. La atracción también comprende fuerzas de van der Waals	



**Figura 3. Fuerzas no covalentes que mantienen unido el complejo antígeno-anticuerpo.** Las cargas parciales se encuentran en dipolos eléctricos como  $\delta^+$  o  $\delta^-$ . Las fuerzas electrostáticas disminuyen como la inversa del cuadrado de la distancia que separa a las cargas, tanto las fuerzas de van der Waals, las cuales son más numerosas en casi todos los complejos antígeno-Ac's, sólo operan en rangos muy cortos. (Janeway, 2008; Roitt, 2008).

Las fuerzas o enlaces comprendidos en el reconocimiento de los antígenos por los Ac's específicos comprenden interacciones electrostáticas entre cadenas laterales de aminoácidos cargadas, como en puentes salinos (breve descripción de que son los puentes de sal). También ocurren interacciones entre dipolos eléctricos, como puentes de hidrógeno, o pueden comprender fuerzas de van der Waals de corto enlace. Las concentraciones altas de sal y los extremos de pH alteran la unión antígeno-anticuerpo al debilitar interacciones electrostáticas, o puentes de hidrógeno, o ambos. Este último principio se emplea en la purificación de antígenos al utilizar columnas de afinidad, de Ac's inmovilizados y viceversa para la purificación de Ac's este principio se utilizó para el ensayo de avidéz (Rojas, 2006).

Así mismo, se pueden llevar a cabo interacciones hidrófobas cuando dos superficies hidrófobas se unen para excluir moléculas de agua. La fuerza de dicha interacción es proporcional al área de superficie que está oculta del agua. Para algunos antígenos, estas interacciones probablemente expliquen la mayor parte de la energía de unión. En algunos casos, las moléculas de agua quedan atrapadas en hendiduras en la interfaz entre el antígeno y el Ac; estas moléculas de agua atrapadas en especial las que están entre residuos aminoácidos polares, también pueden contribuir a la unión y, por ende, a la especificidad del Ac (Voet,2009).

La contribución de cada una de estas fuerzas a la interacción general depende de los Ac's y antígenos particulares comprendidos. Una diferencia notoria entre las interacciones de Ac's con antígenos proteicos, y casi todas las otras interacciones naturales entre una proteína y otra, es que los Ac's a menudo tienen muchos aminoácidos aromáticos en sus sitios de unión a los antígenos. Estos aminoácidos participan de manera importante en interacciones de van der Waals, enlaces hidrofóbicos y a veces en puentes de hidrógeno. (Syed-Hussain, 2014).

### 1.2.3. Afinidad y avidéz de los anticuerpos

La afinidad de un Ac es la fuerza de la reacción entre un único determinante antigénico y un único sitio de combinación del Ac, siendo el resultado de la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas que operan entre un determinante antigénico y el sitio de combinación del Ac. Por otro lado, la avidéz de un Ac indica la fuerza total de la interacción entre los Ac's multivalentes y un antígeno con varios determinantes antigénicos. La avidéz es más que la suma de las afinidades individuales. Los conceptos tanto de afinidad como de avidéz se ilustran en la **Figura 4**.

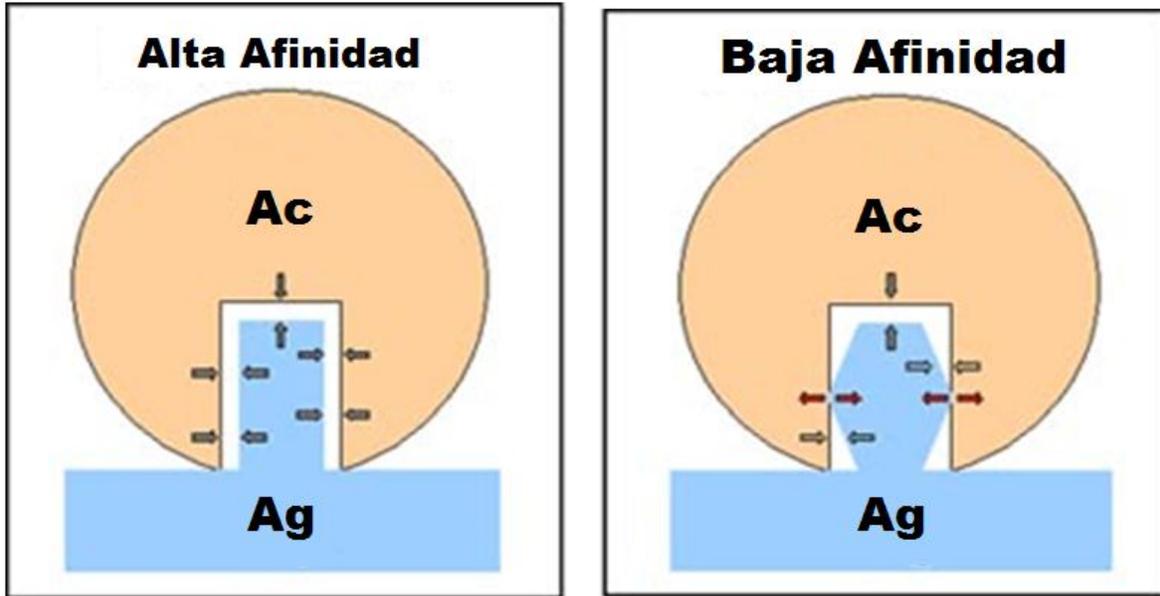
Por ejemplo, pudiera darse el caso de que un Ac de la clase IgG y uno IgM tuvieran la misma afinidad por un antígeno (igual energía de enlace), sin embargo, por razones relacionadas con la estructura, la avidéz de ambos Ac's es obligadamente diferente. Los Ac's IgM tienen una estructura polimérica y por tanto un mayor número de sitios de combinación, esto hace que los Ac's de la clase IgM tengan mayor avidéz que los Ac's de la clase IgG aun cuando ambos estén dirigidos contra el mismo determinante antigénico.

Reafirmando, afinidad se refiere a la fuerza de unión entre un único determinante antigénico y un sitio de combinación de un Ac, mientras que la avidéz se refiere a la fuerza unión total de una molécula de Ac con la unión a su antígeno multivalente (Rojas, 2006; Mayer, 2010).

Por otra parte, los agentes caotrópicos son iones o moléculas orgánicas pequeñas que aumentan la solubilidad de las sustancias no polares en agua. Su eficiencia como desnaturalizantes radica en su habilidad de romper interacciones hidrófobas, aunque su mecanismo de acción no se comprende bien.

Los agentes caotrópicos como la urea en concentraciones de 5 a 10 M, son los desnaturalizantes de proteínas más usados. Para la estimación de la avidéz, se utiliza un agente para interrumpir los puentes de hidrógeno, como la urea, que llevará que los Ac's con baja avidéz se disocien, mientras que los Ac's con alta avidéz permanecen unidos al antígeno (Voet, 2009; Syed-Hussain, 2014).

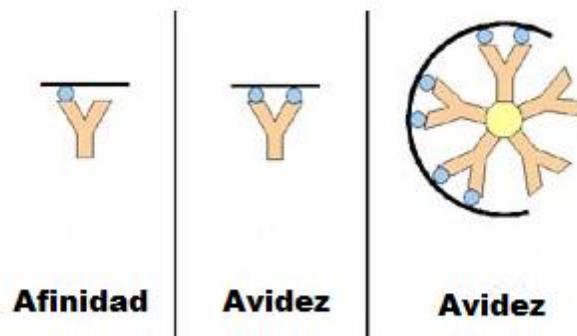
A



Alta atracción - baja repulsión.

Alta repulsión - baja atracción.

B



**Figura 4. Afinidad y avidéz de anticuerpos. (A)** La afinidad de los Ac's se define como la suma de las fuerzas de atracción y repulsión. **(B)** Avidéz es la suma de las afinidades individuales (Mayer, 2010).

### 1.3. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad por columna, es una técnica con una aplicación muy amplia, es usada en el aislamiento y purificación de Ac's o antígenos. El principio es simple, el antígeno o el Ac son unidos a través de sus grupos aminos libres a las partículas de agarosa activadas con bromuro de cianógeno. Con el uso de esta técnica puede purificarse un Ac o un antígeno a partir de una mezcla de donde puede obtenerse por elución; para ello se prepara un inmunoabsorbente en fase sólida, que es un antígeno o un Ac unido covalentemente a un soporte inerte, como ejemplo, bolitas de dextrano entrecruzadas, resina de agarosa, entre otros. El inmunoabsorbente, se coloca en una columna y la mezcla de Ac's o antígenos se hacen pasar a través de él bajo condiciones fisiológicas. Los residuos que no interesan son eliminados por lavado y el ligando requerido es liberado del absorbente de afinidad, mediante la ruptura de los enlaces antígeno-anticuerpo por variaciones de pH o por el agregado de iones caotrópicos como el tiocianato.

Para el caso particular de Ac's específicos estos reconocen a su antígeno que permanece unido a la columna, y aquellos residuos que no se unen, son eliminados mediante lavados. Posteriormente, se eluye la columna, usando un tampón de elución que disocia la unión antígeno-anticuerpo (por ej., variaciones de pH o por el agregado de iones caotrópicos) para obtener el Ac que se unió en forma específica al antígeno. A la inversa, colocando y uniendo Ac's (específicos hacia un antígeno) a la resina que funciona como soporte de la columna se logra la obtención de un antígeno puro; por lo que, esta técnica permite también realizar la purificación de otros tipos de moléculas.

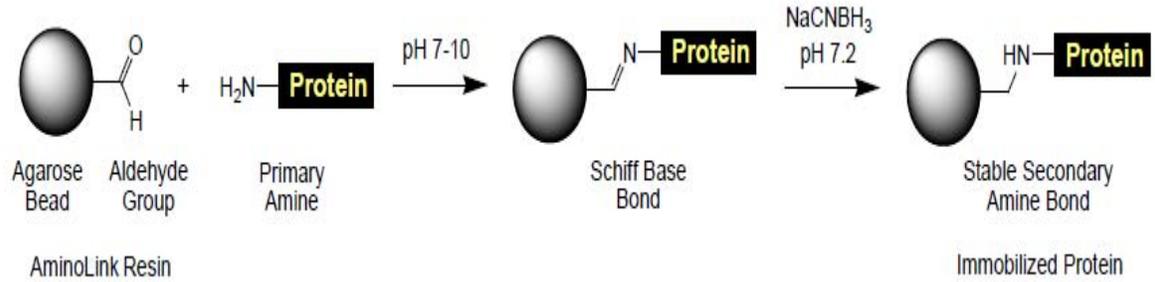
El Thermo Scientific Amino Link Plus Immobilization Kit contiene todos los componentes necesarios para pegar covalentemente las proteínas conteniendo aminos primarios y otros ligandos a un soporte de perlas de agarosa. El resultado de la inmovilización de una proteína es una columna de afinidad estable y reusable para la purificación de Ac's, antígenos y otras biomoléculas.

La resina Amino Link Plus contiene grupos aldehídos, que reaccionan específicamente con las aminos primarios (-NH<sub>2</sub>), lo cual ocurre sobre la superficie de las proteínas en las cadenas laterales que contienen residuos de lisina (K) y el amino terminal de cada polipéptido.

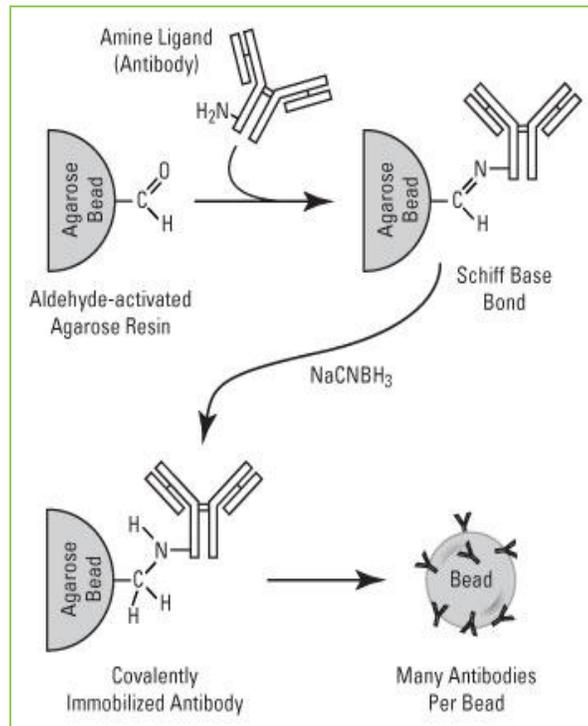
Después, la formación espontánea de enlaces de base de Schiff semi-estables, y la reducción con Cianoborohidruro de sodio resulta en enlaces aminos secundarios estables;

los Ac's, antígenos y otras proteínas teniendo diferentes pesos moleculares y puntos isoeléctricos se acoplan a la resina Amino Link con una eficiencia de acoplamiento promedio mayor al 80 % (Hermanson, et al., 1992). En la **Figura 5** se muestra el proceso de la unión de enlaces entre la proteína y la resina.

A



B



**Figura 5. Formación de enlaces aminos estables entre la proteína y la resina contenida en las columnas de cromatografía por afinidad. A y B** Acoplamiento de proteínas a un soporte inerte (Perlas de agarosa). La resina es aldehído activado de agarosa para que los Ac's, otras proteínas y moléculas se pueden unir covalentemente a través de aminas primarias. El resultado es una resina de afinidad reutilizable para su uso en una variedad de métodos de purificación (Scientific, 2010).

#### 1.4. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión multi-Plex (Luminex)

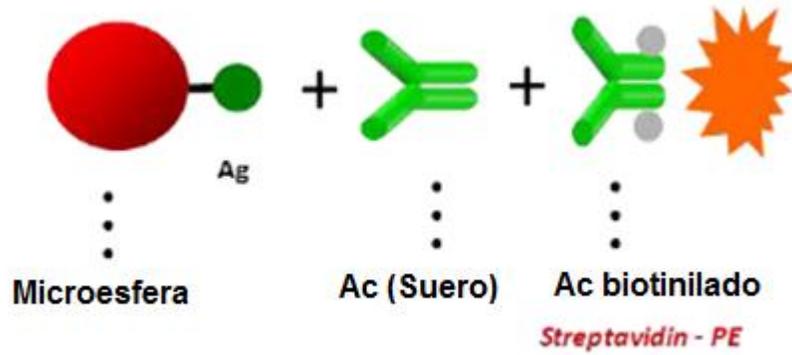
El luminex es un sistema basado en citometría de flujo, que utiliza partículas de poliestireno con un diámetro de 5.6 micras (llamadas microesferas) como el soporte sólido para un inmunoensayo convencional, pero en este caso se realiza en suspensión y puede ser múltiple; las microesferas son clasificadas en regiones que pueden ser identificadas con una proporción particular de dos fluorocromos, cada región de microesferas se puede utilizar para detectar un parámetro individual. Actualmente, hasta 100 parámetros individuales pueden ser medidos simultáneamente en una sola etapa del ensayo. Las microesferas se detectan utilizando un flujo de dos láseres del citómetro, un láser excita los colorantes internos que identifican la región de cada microesfera y el segundo láser excita el colorante informador capturado durante el ensayo. La sensibilidad de este método es comparable a un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*) convencional y permite investigaciones complejas usando muy pequeñas alícuotas de reactivos para realizar el ensayo.

El sistema Bio-Plex, es una técnica de matriz suspensión múltiple, se basa en la tecnología del Luminex xMAP® que es una tecnología probada en citometría de flujo, las microesferas, láser, procesamiento de señales digitales y la química tradicional se han combinado de una manera única; esta tecnología se puede configurar para realizar una amplia variedad de bioensayos con rapidez y precisión. Este sistema permite el análisis múltiple de hasta 100 ensayos de tipo ELISA diferentes dentro de una sola muestra, cada ensayo se realiza sobre la superficie de una microesfera. Las microesferas se llenan con diferentes proporciones de dos colorantes fluorescentes diferentes, cada conjunto de microesferas se puede conjugar con una molécula de captura diferente; las microesferas conjugadas por lo tanto pueden ser mezcladas para ser incubadas con la muestra en un pozo de microplaca de filtro de fondo para reaccionar con analitos específicos.

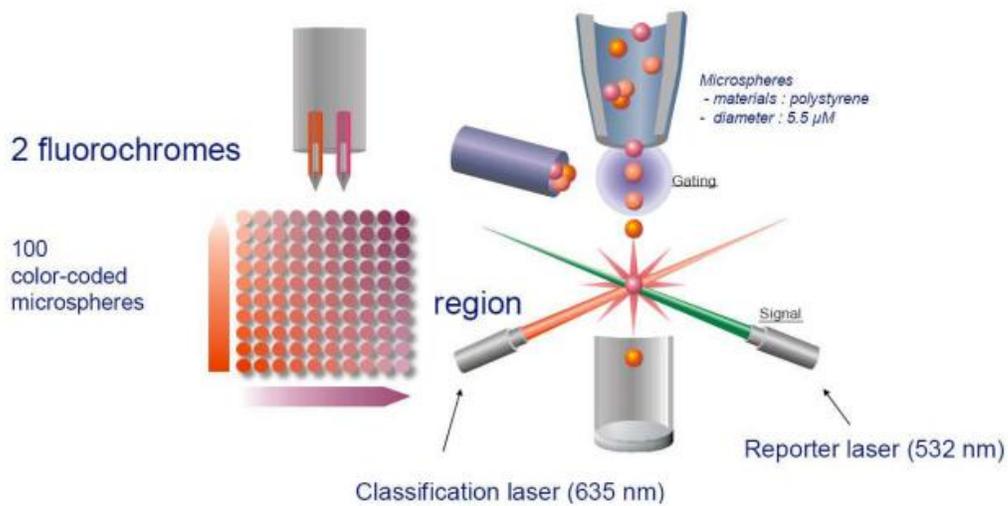
El principio básico se basa en la técnica de inmunoensayo, un Ac dirigido contra la citocina deseada se acopla covalentemente a las microesferas teñidas internamente, dejando a las microesferas acopladas reaccionar con una muestra que contiene los auto-Ac's en los pozos de la microplaca de filtro de fondo, para después de una serie de lavados para eliminar los auto-Ac's no unidos, Ac de detección biotinilado específico se añade a la reacción. El resultado es la formación de un sandwich de Ac's alrededor del auto-Ac diana. La Estreptavidina-ficoeritrina (estreptavidina-PE) es añadida para unirse a los Ac's de detección biotinilados en la superficie de la microesfera (Figura 6, A).

Después de la incubación, el contenido de cada pozo de microplaca se coloca en el lector de Bio-Plex y los fluidos de precisión alinean a las microesferas a través de una celda de flujo donde dos láseres excitan las microesferas individualmente, el láser de clasificación rojo excita los colorantes en cada microesfera, para su identificación específica, mientras que el láser verde excita la molécula indicadora asociada con la microesfera, lo que permite la cuantificación del analito capturado; los procesadores de alta velocidad de señal digital y el software Bio-Plex Manager emite señales fluorescentes simultáneamente para cada microesfera, traduciendo las señales en datos (valores de intensidad de fluorescencia) de cada muestra para todos los parámetros medidos (analitos); si fuera el caso también se generan automáticamente las curvas de calibración, calculando la concentración de la muestra desconocida (**Figura 6, B**).

A



B



**Figura 6. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).** **A** Inmunoensayo indirecto para la detección de auto-Ac's contra los diferentes mediadores químicos. **B** Microesferas codificadas ópticamente utilizando una mezcla de diferentes colorantes que son decodificados por un citómetro de flujo (Araujo, 2011).

## 1.5. Auto-Ac's contra citocinas y susceptibilidad a infecciones

El término de autoinmunidad se refiere a una inapropiada respuesta inmune contra componentes propios del hospedero que resulta en condiciones patológicas. En forma muy general las enfermedades autoinmunes son caracterizadas por una activación de células T y células B auto-rreactivas, y están asociadas en algunos casos con la producción de auto-Ac's contra moléculas propias, terminando en inflamación y daño del tejido (Agmon 2009; Invernizzi y Gershwin 2009; Hewagama y Richardson 2009).

Los auto-Ac's que pueden neutralizar los componentes principales del sistema inmune que son esenciales en el montaje de las respuestas anti-microbianas pueden ser producidos. Estos auto-Ac's pueden exacerbar las enfermedades infecciosas en curso o predisponer al individuo a un mayor riesgo de infecciones por hongos, bacterias, virus, y cualquier microorganismo oportunista (Puel et. al 2008; Bettelli et al 2008).

Considerando que, las citocinas juegan un papel crítico en el proceso de montaje de las respuestas anti-microbiana, debido a su capacidad de regular el sistema inmune innato y adaptativo, en la polarización de las respuestas de células T, y actuando como moléculas efectoras. Por ejemplo, la Interleucina 12 (IL-12) interviene en la diferenciación celular de Th1, e IL-4 influye en la diferenciación de células Th2. La IL-6, IL-21, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), IL-1 $\beta$ , e IL-23, son críticas para la diferenciación y la expansión de las células Th17. Las células Th1 producen citocinas Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-2, y confieren protección frente a patógenos intracelulares (virus y bacterias intracelulares como *Mycobacterium* y *Salmonella*). Las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, y son importantes para eliminar los patógenos extracelulares y parásitos. Las células Th-17 secretan IL-17, IL-21 e IL-22, y ofrecen protección contra varios patógenos extracelulares, incluyendo hongos como *Candida*. Además, el IFN de tipo I tiene un papel fundamental en la inmunidad antiviral y en la modulación de las respuestas de células B y T. Por lo tanto, se puede concebir que el desarrollo de los Ac's neutralizantes contra cualquiera de estas citocinas, como una consecuencia de la autoinmunidad, afecta a las funciones celulares, a la eliminación de patógenos y predispone al hospedero a enfermedades infecciosas (Maddur, 2010).

Una correlación entre la presencia de auto-Ac's neutralizantes hacia IFN- $\gamma$  e infecciones micobacterianas ha sido reportada, en estos estudios se ha demostrado pacientes con una deficiencia adquirida en la inmunidad mediada por el IFN- $\gamma$ , caracterizada por la presencia de auto-Ac's con una alta afinidad y actividad neutralizantes contra esta

citocina, ya que IFN- $\gamma$  es producido tanto por células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) como por las células NK (natural killer) en una respuesta a una serie de estímulos inflamatorios y/o autorregulación inmune, esta citocina es clave en el control de la infección contra *Mycobacterium* porque estimula el desarrollo y función de células efectoras, y es requerida para la producción de óxido nítrico (NO) por el macrófago, además de favorecer la producción de citocinas pro-inflamatorias (Madariaga et al. 1998; Doffinger et al. 2004; Hoflich et al. 2004; Kampmann et al. 2005; Patel et al. 2005).

Así mismo, la presencia de auto-Ac's contra IL-6 se ha reportado en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente y por el curso de los eventos clínicos en el paciente los autores mencionan que la presencia de auto-Ac's anti-IL-6 precede a una infección estafilococal. Esta citocina no causa daño tisular ni aumento de la coagulación, y es sintetizada por los fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y otras células, como las células cebadas, en respuesta a la IL-1 y al Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), aunque en menor grado a esta última, también puede ser producida por algunas células T activadas (Puel, et al. 2008).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La importancia de las inmunodeficiencias secundarias (adquiridas) causadas por altos niveles de auto- Ac's contra algunos mediadores químicos, como son las citocinas, afectan las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, donde finalmente predispone al hospedador a enfermedades infecciosas producidas por hongos, bacterias, virus, o cualquier microorganismo oportunista (Doffinger et al. 2004; Hoflich et al. 2004; Kampmann et al. 2005; Patel et al. 2005; Puel et al. 2008; Dubin 2008; Maddur, 2010, Browne y Holland, 2010).

Se ha demostrado que la presencia de auto- Ac's neutralizantes contra citocinas en pacientes con infecciones, proveen una visión interesante hacia un enlace desconocido entre la respuesta autoinmune y la predisposición a enfermedades infecciosas; sin embargo, hasta donde sabemos, no existen reportes con respecto a la función y caracterización detallada de estos auto-Ac's presentes en las muestras séricas.

Por lo anterior, y considerando la importancia que tienen las citocinas en el desarrollo y regulación de la respuesta inmune necesaria para el control de las infecciones, resultó de interés realizar la purificación de auto-Ac's específicos contra citocinas utilizando la técnica de cromatografía de afinidad por columna, a partir de muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's contra citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-6), lo cual permitió realizar en forma más exacta la determinación de los índices de avidéz; así mismo, la purificación de estos auto-Ac's permitirán llevar a cabo en estudios futuros una caracterización más completa de éstos auto-Ac's. Por otra parte, para la evaluación de las eluciones obtenidas de la purificación de los auto-Ac's se empleó la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex, basado en citometría de flujo; esta misma técnica con el uso de urea permitió determinar el grado de avidéz de auto-Ac's contra citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-6).

Considerando que los auto-Ac's anti-citocinas se encuentran presentes en pacientes con infecciones atípicas recurrentes y/o diseminadas, sin embargo, no existen trabajos con respecto a una caracterización más detallada de dichos auto-Ac's anti-citocina, por lo cual el análisis de estos auto-Ac's es de suma importancia; y por lo tanto, las preparaciones de auto-Ac's purificados serían más recomendables para llevar a cabo estudios empleando ensayos de neutralización *in vitro* de la fosforilación de STAT-1 y STAT-3, pruebas de inhibición de la producción de citocinas, identificación de los epítomos reconocidos por los

auto-Ac's mediante microarreglos, lo cual permitirá una caracterización más completa de éstos auto-Ac's.

### **3. HIPÓTESIS**

La técnica de cromatografía de afinidad en columna permitirá la purificación de los auto-Ac's anti-citocinas a partir de muestras séricas, lo cual facilitará la determinación de los índices de avidéz comparando dos concentraciones de urea (6 y 9 M) que afectará la unión del complejo antígeno-anticuerpo formado.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Estandarizar la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex con el uso de urea para determinar el grado de avidéz de auto- Ac's anti-citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-6) de muestras séricas humanas y de las fracciones de auto-Ac's purificados a partir del ensayo de cromatografía de afinidad por columna, para llevar a cabo en el futuro un análisis confiable y elucidar la importancia de los auto-Ac's que pudieran estar contribuyendo al incremento en la susceptibilidad a infecciones recurrentes y/o severas causadas por diversos grupos de patógenos microbianos (bacterias u hongos).

### **4.2. Objetivos específicos**

**4.2.1.** Corroborar la presencia de auto-Ac's en las muestras séricas positivas a auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  e IL-6, empleando los sistemas de citocinas humanas recombinantes acopladas a micropartículas, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).

**4.2.2.** Realizar la purificación de los auto-Ac's anti-citocinas (IFN- $\gamma$ ) de muestras séricas de pacientes, con enfermedades infecciosas recurrentes, empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna.

**4.2.3.** Identificar las fracciones eluidas que contengan los auto-Ac's anti-citocinas específicos purificados, mediante el ensayo de arreglo de partículas en suspensión múltiple (Luminex).

**4.2.4.** Comparar dos concentraciones de urea (6 y 9 M) empleando la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex basado en citometría de flujo, para determinar el índice de avidéz de auto-Ac's anti-citocinas en muestras séricas de pacientes con características clínicas de susceptibilidad de inicio tardío a diversas infecciones.

**4.2.5.** Determinar el índice de avidéz de los auto-Ac's presentes en las muestras y de los auto-Ac's purificados con el uso de la urea empleando el ensayo de Luminex.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Muestras séricas

La colección de muestras séricas que se emplearán en este estudio fue donada por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.).

Las muestras séricas positivas a la presencia de auto Ac's anti-citocina (IFN- $\gamma$  e IL-6), provenían de pacientes con las características clínicas pertenecientes a la susceptibilidad selectiva de inicio tardío a infecciones atípicas o recurrentes causadas por bacterias, virus y hongos; así como de pacientes con enfermedades autoinmunes, dichas muestras séricas fueron enlistadas como se observa en la **Tabla 1**.

Muestra sérica.	Positivos a auto-Ac's.	Datos clínicos.
RL250167 (BC602735, 15/10/13).	anti-IL-6	Varón de 34 años fiebre recurrente. Celulitis estafilococal. Infección diseminada severa, ausencia de inflamación.
RW120963 (BC761842, 17/12/2013).		Varón de 48 años ausencia de fiebre, autoinmunidad multiorgánica, infección diseminada por estafilococos, linfoma de Hodgkin.
S54.46-47 (R. S.)	anti-IFN- $\gamma$	Bronquiectasias, infección con pseudomonas, linfopenia, timoma y poliendocrinopatías.
S52.49 (S. M.).		Proteinosis alveolar pulmonar, candidiasis mucocutánea crónica, infección por mycobacterium no tuberculosa, infecciones secundarias oportunistas e infecciones virales.

**Tabla 1. Muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's anti-citocinas con sus respectivos datos clínicos.** Dichas muestras fueron proporcionadas por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.).

## **5.2. Detección de los auto-Ac's anti-citocinas en muestras séricas mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple Luminex**

1. La microplaca de 96 pozos con filtro-BV de 1.2  $\mu\text{m}$  el tamaño del poro, (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) se humedeció agregando 150  $\mu\text{L}$  por pozo de solución de lavado (PBS-T: 10 mM PBS pH 7.4, 0.05 % vol/vol Tween 20), después de 1 a 2 minutos el líquido se extrajo empleando un sistema de vacío.
2. La suspensión de trabajo de las microesferas acopladas a una citocina en particular se preparó a partir de alícuotas (20  $\mu\text{L}$ ), los sistemas de citocinas necesarios para el análisis (incluyendo el control negativo, BSA) se diluyeron en un volumen final de 5,000  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora pre-bloqueadora (10 mM PBS pH 7.4, 1 % BSA, 0.05 % de  $\text{NaN}_3$ ).
3. Posteriormente 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de trabajo de las microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex) se agregaron a cada pozo, y el líquido se removió por medio de filtración a vacío.
4. En los pozos correspondientes se agregaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de cada una de las muestras problemas diluidas 1/50, 1/100, 1/1 000 y/o 1/10 000 (según el caso), empleando la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1 %, PVA 0.5 %, PVP 0.8 %,  $\text{NaN}_3$  0.05 %) como diluyente, así mismo, en los pozos correspondientes se incluyó el control positivo (Ac's biotinilados contra IFN- $\gamma$  o IL-6) diluido 1/50, y la microplaca se incubó durante 90 min, con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.
5. Se removió el líquido con un sistema de vacío y posteriormente se realizaron tres lavados con 200  $\mu\text{L}$  de PBS-T con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 1-2 minutos entre lavado.
6. A los pozos donde se llevó a cabo la incubación con las muestras séricas se le agregaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo del Ac secundario anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina (PE), producido en ratón (Leinco Technologies, Cat. No. I-127) a una dilución de 1/50, y en los pozos donde se utilizaron los Ac's anti-citocinas biotinilados se agregó la solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (Strep-PE, R&D Systems, 892525 Lot Num. 308958 y 316378) previamente diluida 1/50, se empleó la solución bloqueadora como diluyente. La microplaca se incubó protegida de la luz durante 60 min a temperatura ambiente con una agitación lenta (500 rpm) empleando un agitador orbital horizontal para microplacas.

7. Se removió el líquido y posteriormente se repitió la serie de tres lavados con 200  $\mu$ L de PBS-T.
8. Finalmente se adicionaron 150  $\mu$ L/pozo de PBS-T, se agitó la microplaca en un agitador orbital (500 rpm) durante 2-3 minutos para resuspender las micropartículas. Y fue colocada en el lector Luminex 100 para realizar el análisis correspondiente (software BP manager V 5.0).

**Nota:** Los Ac's biotinilados específicos contra las citocinas que se utilizaron como controles positivos en este ensayo fueron los siguientes: Human IFN- $\gamma$  Biotynilated Antibody (1/500), (R&D Systems, BAF 285, Lot Number ZX1314101); Human IL-6 Biotynilated Antibody (1/500), (R&D Systems, BAF 206 Lot Number SV2314031).

### 5.3. Técnica de cromatografía de afinidad por columna

Para llevar a cabo este ensayo se empleó el kit de acoplamiento proteico de micro enlace (*Micro Link protein coupling kit*, Thermo Scientific Núm. Cat. 20475). De forma general algunos de los reactivos y materiales más importantes que se usaron en la realización de esta técnica se describen a continuación:

- a) **Columnas de centrifugación con resina de acoplamiento amino enlace:** cada columna contiene 400  $\mu$ l de una suspensión al 4 % de perlas de agarosa con 25 % de un compuesto acuoso.
- b) **Solución amortiguadora de acoplamiento pH= 7.2 (*Coupling Buffer*):** Solución salina amortiguadora de fosfatos, 1 paquete rinde en fosfato de sodio [0.1 M] , Cloruro de sodio [0.15 M], pH 7.2 cuando se reconstituye con 500 mL de agua.
- c) **Solución amortiguadora de enfriamiento (*Quenching Buffer*):** 50 mL, 1 M Tris-HCl, 0.05% de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), pH= 7.4.
- d) **Solución de Cianoborohidruro de sodio al 5 M ( $\text{NaCNBH}_3$ , mw 62.84):** 0.5 mL, disuelto en NaOH 0.01 M.
- e) **Solución de lavado (*Wash Solution*):** 25 mL, 1 M NaCl, 0.05 %  $\text{NaN}_3$ .
- f) **Solución amortiguadora de Elución (*Elution Buffer*):** 50 mL, pH 2.8, contiene aminos primarios.

- g) Tubos de colección para microcentrifuga:** Viales con tapa y con una capacidad de 0.5 mL.
- h) Solución amortiguadora de almacenamiento:** Sé preparó la solución amortiguadora de fosfatos (PBS; igual que la solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2) conteniendo 0.05 % de  $\text{NaN}_3$ .

Almacenamiento del kit: almacenar a 4° C, aunque el producto sea transportado a temperatura ambiente.

### 5.3.1. Preparación del material

**Solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2:** Se disolvió el contenido del sobre en 500 mL de agua ultrapura; cuando fue necesario obtener una solución a 10X se disolvió todo el contenido en 50 mL. Para un almacenamiento por largos periodos de la solución amortiguadora filtrar la solución empleando una membrana con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  o añadir azida de sodio a una concentración final de 0.02% y almacenar a 4 °C.

**Muestra de proteína:** Disolver la proteína a inmovilizar en 200-300  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de acoplamiento, tratando de ajustar a una concentración final de 0.5-1 mg/mL. Si la solución de proteínas contiene aminas primarias (e.g., Tris o glicina), estos componentes deberán ser removidos completamente o ellos competirán con la reacción de acoplamiento de la proteína ya prevista.

En el presente estudio se utilizó el producto comercial Immukin (Boehringer Ingelheim), Interferon gamma-1b (100  $\mu\text{g}/0.5 \text{ mL} = 2 \times 10^6$  IU por 0.5 mL), para llevar a cabo la purificación de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ . Se dializó utilizando una unidad de mini diálisis Slide-A-Lyzer™ 10000MWCO (Thermo Scientific No. Cat. 69574) siguiendo las indicaciones del proveedor, dicha diálisis fue necesaria debido a la presencia de diferentes componentes (e.g., manitol, succinato de sodio, ácido succinico, polisorbato-20) que pueden interaccionar, bloquear o interferir en la unión antígeno-anticuerpo de interés.

### 5.3.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína (citocina IFN- $\gamma$ )

#### A) Preparación de la columna e inmovilización de la proteína.

Para todos los pasos se requirió mezclar la resina de acoplamiento con la solución amortiguadora suavemente golpear la columna cerca del paquete de la resina varias veces hasta resuspender y luego cuidadosamente se agitó la columna en un vórtex a baja velocidad. Se aseguró que la resina permaneciera húmeda todo el tiempo se realizaron los pasos de centrifugación a 1,000 x g (~3 300 rpm en la centrifuga IEC MicroMAX RF-Thermo, o ~3 500 en BioFugePico-Heraeus) por 1 minuto.

1. La columna de centrifugación conteniendo la resina de acoplamiento amino enlace, y todos los reactivos a utilizar se equilibraron a temperatura ambiente (37 °C).
2. Primero se aflojó la tapa superior de la columna y luego se removió el tapón inferior para evitar aspirar aire dentro de ésta. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó a 1,000 x g por 30 segundos, para remover la solución amortiguadora de almacenamiento.
3. Se removió la tapa superior y se insertó el tapón. La resina fue suspendida, adicionando 400  $\mu$ l de la solución amortiguadora de acoplamiento utilizado para disolver la muestra. Después se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó a 1,000 x g por 1 minuto y se descartó el fluido pasante. Este paso se repitió dos veces más.
4. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 500  $\mu$ l de la muestra (0.5 mg/mL) directamente en la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló. Para determinar la eficiencia del acoplamiento, se reservó una porción de la muestra (3  $\mu$ l) que fue utilizada como referencia de la cantidad inicial de proteínas (Vial: A).

**Nota:** Para todos los pasos se mezcló la resina, agitando la columna suavemente o cuidadosamente en un vórtex a baja velocidad.

5. En una campana de extracción, se destapó la columna y se añadieron 5  $\mu$ l de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se volvió a colocar la tapa y se mezcló.
6. Se dejó incubar la columna durante 2 horas a temperatura ambiente (37 °C), para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.

**Nota:** Antes de incubar durante toda la noche se aseguró que la resina se mezclara adecuadamente, por lo que se adicionó una concentración final de 0.05% de Tween-20 (se agregaron a la columna 0.3 µl de Tween-20 para 500 µl de muestra utilizada), esto ayudó para que la resina fluyera libremente en la columna.

7. Posteriormente, se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó 1,000 x g por 1 minuto (para coleccionar el fluido con la proteína no unida). Para determinar la eficacia del acoplamiento, se evaluó el fluido pasante con un ensayo de proteínas y compararlo con la concentración o la cantidad inicial. (Vial: B, de 5 µl).

8. Se removió la tapa de la columna y se insertó el tapón. Se adicionaron 500 µl de la solución amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió el tapón, después se aflojó la tapa, y se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó. Se repitió este paso dos veces más. Se guardó el fluido pasante para evaluar la eficiencia de acoplamiento (Vial: C y D).

**Nota:** Como la reacción fue incubada toda la noche, se invirtió cuidadosamente la columna 10 veces para desalojar cualquier resina restante en la tapa. Se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó, se guardó el fluido pasante para evaluar la eficacia del acoplamiento. Se repitió este paso dos veces más.

## **B) Bloqueo de los sitios activos de unión remanentes.**

1. Se destapó la columna y se insertó el tapón. Posteriormente se adicionaron 500 µl de solución amortiguadora de enfriamiento a la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló.

2. Se retiró la tapa de la columna y el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.

3. Se repitieron los pasos 1-2.

4. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 500 µl de solución amortiguadora de enfriamiento directamente a la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló.

5. En una campana de extracción se quitó la tapa de la columna y se adicionaron 10 µl de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se tapó la columna y se mezcló. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos, mezclando cada 15 minutos.

6. Se quitó el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso. Nota: Como la columna se utilizó en forma inmediata fue necesario equilibrarla adicionando 500 µl de solución amortiguadora de acoplamiento y se centrifugó a 1,000 x g por 1 minuto, se realizó esto dos veces. Y se continuó con el paso 2 del Procedimiento general para la purificación por afinidad.

### **5.3.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad**

#### **C) Formación del complejo unido a la resina.**

1. La columna con la resina conteniendo la proteína inmovilizada (antígeno, e.g., citocina, se equilibró a temperatura ambiente (37 °C).

2. Se removi6 primero la tapa de la columna y despu6s el tap6n. Se coloc6 la columna en un tubo de colecci6n, se centrifug6 y se descart6 el fluido que paso.

3. Se coloc6 el tap6n a la columna y se adicionaron 400 µl de la muestra s6rica diluida vol:vol en soluci6n amortiguadora de acoplamiento directamente en la resina, se reemplaz6 la tapa y se mezcl6.

4. Se incub6 la reacci6n con un mezclado suave en forma de rotaci6n. Se dej6 incubar la columna durante 2 horas a temperatura ambiente (37 °C), para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.

5. Se afloj6 la tapa de la columna y se removi6 el tap6n. Se coloc6 la columna en un tubo de colecci6n y se centrifug6. Se guard6 el fluido pasante para an6lisis (Vial: E). Para la evaluaci6n se utiliz6 el sistema citocina-microesfera Bio-Plex.

6. Para reducir las posibles interacciones no espec6ficas (opcional) se prepar6 1 mL de una soluci6n de NaCl a 0.5 M, con la cual se diluy6 la soluci6n de lavado vol:vol, y se le adicion6 Tween-20 para una concentraci6n final de 0.05%. Se quit6 la tapa de la columna, se insert6 el tap6n y se adicionaron 300 µl de la soluci6n. Se reemplaz6 la tapa y cuidadosamente se invirti6 la columna 10 veces. Se afloj6 la tapa, se removi6 el tap6n y se coloc6 la columna en

un tubo de colección. Se centrifugó el tubo y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más (Viales: F, G y H).

7. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 µl de solución de amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y gentilmente se invirtió el tubo (columna) 10 veces. Se aflojó la tapa y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido obtenido en el vial, se repitió esta paso una vez más. (Viales: I y J).

8. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 µl de de la solución amortiguadora de acoplamiento, en incrementos de 100 µl, en la superficie interior de la columna para lavar y bajar la resina, fue muy importante no mezclar la resina. Se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, centrifugar y colectar el fluido pasante (Vial: K).

#### **D) Elución.**

1. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 100 µl de la solución amortiguadora de Elución a lo largo de los lados de la columna sobre la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló. La columna se incubó durante 5-15 minutos a temperatura ambiente (37 °C).

2. Se destapó la columna y se colocó el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y centrifugar (Vial: E-1). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 5 µl de Tris 1M, pH 9.0 (para 100 µl de volumen de elución) o dializando inmediatamente contra PBS usando una Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit (e.g., Thermo Scientific, Núm. Cat. 69576).

3. Se repitieron los pasos 1 y 2 seis veces o según sea necesario (mínimo 3 veces) (Viales: E-2, E-3, E-4, E-5 E-6 y E-7).

4. Para asegurar la elución completa del Ac de la columna se realizó un cambio de pH de la solución amortiguadora de elución, ajustando 5 mL de esta solución amortiguadora a un pH 2.0 (empleando una solución 1 M de HCl), y un aumento en el volumen empleado, como se indica en los pasos posteriores.

5. Se colocó el tapón a la columna y adicionar 300 µl de la solución amortiguadora de Elución a lo largo de los lados de la columna sobre la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se incubó la columna durante 5 minutos a temperatura ambiente (37 °C).

6. Se destapó la columna y se colocó el tapón. La columna se coloca en un tubo de colección y se centrifuga (Vial: E-5). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 18 µl de Tris 1M, pH 9.0 (para 500 µl de volumen de elución).

7. Se repitieron los pasos 5 y 6 según sea necesario (Viales: E-9, E-10, E-11 y E-12).

8. Se regeneró la resina tan pronto como fue posible después de la elución mediante el lavado una vez con 300 µl de Buffer de acoplamiento conteniendo azida de sodio al 0.02%. Almacenar la columna a 4 °C.

9. Finalmente, a cada fracción de eluido (12 fracciones) se le agregaron 30 ul de una solución de BSA al 4.5%; y se conservaron en refrigeración hasta el análisis.

**Nota:** La purificación de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  se realizó a partir de dos muestras séricas positivas a la presencia de estos auto-Ac's, siendo el suero RL250167 (BC602735, 15/10/13) y el plasma RW120963 (BC761842, 17/12/2013). Mientras que las preparaciones de los auto-Ac's anti-IL-6 purificados fueron proporcionados en el laboratorio de trabajo.

#### **5.3.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad**

**Nota:** Para un almacenamiento por largos periodos (e.g., > 2 semanas), adicionar azida de sodio a la solución amortiguadora de acoplamiento hasta obtener una concentración final de 0.02 %.

1. Se tapó la parte inferior de la columna y se adiciona 500 µL de la solución de lavado. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.
2. Se tapó la parte inferior de la columna y se adiciona 400 µL de Buffer de acoplamiento, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón inferior, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.
3. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 300 µL de solución amortiguadora de acoplamiento a lo largo de los lados de la columna para lavar la resina. Se reemplazó la tapa y se almacena a 4°C.

#### **5.4. Estandarización del ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's mediante la técnica BioPlex en un sistema múltiple de microesferas**

Las muestras séricas humanas que resultaron ser positivas en estudios anteriores a la presencia de auto-Ac's contra citocinas se utilizaron para este ensayo de avidéz basado en una técnica descrita por Rachel M. Stenger (Stenger, 2011). Por lo tanto, para las muestras séricas positivas a auto-Ac's contra IL-6 se emplearon las siguientes diluciones 1/50, 1/100 y 1/1 000; mientras que para auto-Ac's hacia INF- $\gamma$  fueron 1/100, 1/1 000 y 1/10 000.

Cada dilución se realizó por triplicado para todas las condiciones trabajadas. La metodología se describe a continuación:

1. La microplaca de 96 pozos con filtro-BV de 1.2  $\mu$ m el tamaño del poro, (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) se humedeció agregando 150  $\mu$ L por pozo de solución de lavado (PBS-T: 10 mM PBS pH 7.4, 0.05 % vol/vol Tween 20), después de 1 a 2 minutos el líquido se extrajo empleando un sistema de vacío.
2. La suspensión de trabajo de las microesferas acopladas a una citocina en particular se preparó a partir de alícuotas (20  $\mu$ L), los sistemas de citocinas necesarios para el análisis (incluyendo el control negativo, BSA) se diluyeron en un volumen final de 5,000  $\mu$ l de solución amortiguadora pre-bloqueadora (10 mM PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.05% de  $\text{NaN}_3$ ).
3. Posteriormente 50  $\mu$ L de la suspensión de trabajo de las microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex) se agregaron a cada pozo, y el líquido fue removido por medio de filtración a vacío.
4. En los pozos correspondientes se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de cada una de las muestras problemas (suero, plasmas o Ac's purificados) o el human IL-6 o IFN- $\gamma$  Biotynilated Ab (control positivo). Las muestra séricas fueron diluidas 1/50, 1/100 y 1/1 000 para IL-6, en cuanto a IFN- $\gamma$  las diluciones utilizadas fueron 1/100, 1/1 000 y 1/10 000, cada dilución se trabajó por triplicado empleando la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1%, PVA 0.5%,PVP 0.8%, $\text{NaN}_3$  0.05%).como diluyente y la microplaca se incubó por 90 min con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.
5. Se removió el líquido con un sistema de vacío y se adicionaron 200  $\mu$ L de urea 6 o 9 M preparada en PBS-T (10 mM PBS pH 7.4, 0.05 % vol/vol Tween 20) a los pozos

correspondientes, y al resto se les agregó 200  $\mu$ L de PBS-T, las microplacas se incubaron por 10 min, con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.

6. De la microplaca se removió el líquido con un sistema de vacío y posteriormente se realizaron una serie de tres lavados con 200  $\mu$ L de PBS-T con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 1 - 2 minutos entre cada lavado.
7. Se agregaron 50  $\mu$ L/pozo del Ac secundario anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina (PE) (Leinco Technologies, Cat. No. I-127) a una dilución de 1/50, y en los pozos donde se utilizaron los Ac's anti-citoinas biotinilados se agregó la solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (Strep-PE, R&D Systems, 892525 Lot Num. 308958 y 316378) previamente diluida 1/50 se empleó la solución bloqueadora como diluyente. La microplaca se incubó protegida de la luz durante 60 min a temperatura ambiente con una agitación lenta (500 rpm) empleando un agitador orbital horizontal para microplacas.
8. Se removió el líquido y se repitió la serie de tres lavados con 200  $\mu$ L de PBS-T.
9. Finalmente se adicionaron 150  $\mu$ L/pozo de PBS-T, se agitan las microplacas en un agitador orbital (500 rpm) durante 2-3 minutos para resuspender las micropartículas. Se colocó la microplaca en el lector Luminex 100 para realizar el análisis correspondiente (software BP manager V 5.0).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Muestras séricas y Ac's purificados

Se trabajaron 4 muestras séricas, a las cuales se les corroboró la presencia de auto-Ac's hacia citocinas, para confirmar los resultados obtenidos en previos estudios; así mismo se trabajaron con algunos Ac's anti-citocinas purificados. Estas presentaron auto-Ac's anti-IL-6, correspondiendo a las muestras RL250167 (BC602735, 15/10/13) y RW120963 (BC761842, 17/12/2013) suero y plasma, respectivamente; otros 2 sueros S54.46-47 (R. S.) y S52.49 (S. M.) fueron positivos a la presencia de auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$ .

También se trabajaron con los auto-Ac's purificados a partir de las muestras séricas positivas a anti-IL-6 y anti-IFN- $\gamma$ . Para el análisis de los Ac's purificados se consideraron las mezclas de las fracciones que resultaron positivas a la presencia de los auto-Ac's purificados. Para el caso de los auto-Ac's purificados contra IFN- $\gamma$  se trabajaron dos mezclas diferentes de los eluidos obtenidos en cada columna, una correspondiendo a las fracciones eluidas de la E1 a la E3 para cada una de las purificaciones; en las otras mezclas, una se realizó de las fracciones eluidas de la E8 y E9, y para la otra se mezclaron las fracciones de la E8 a la E10. Las purificaciones de los auto-Ac's específicos para IFN- $\gamma$  a partir de las muestras séricas se realizaron en el presente trabajo siguiendo la metodología que se indica en el punto 5.3. Mientras que para los auto-Ac's anti-IL-6 se dispuso de las muestras purificadas resultantes de la mezcla de las fracciones eluidas de la E1 a la E3 a partir de cada muestra sérica; estas muestras de auto-Ac's purificados contra-IL-6 fueron proporcionados en el laboratorio de trabajo.

### 6.2. Purificación de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna

Se obtuvo la purificación de 2 muestras séricas positivas a auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ . Una vez que se realizó el proceso de purificación, se evaluó la eficiencia de la técnica y se identificó la presencia de los auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$ , empleando el ensayo de arreglo de

micropartículas en suspensión múltiple (Luminex) para el sistema de IFN- $\gamma$  -microesfera, se incluyó el sistema de BSA-microesfera como control negativo.

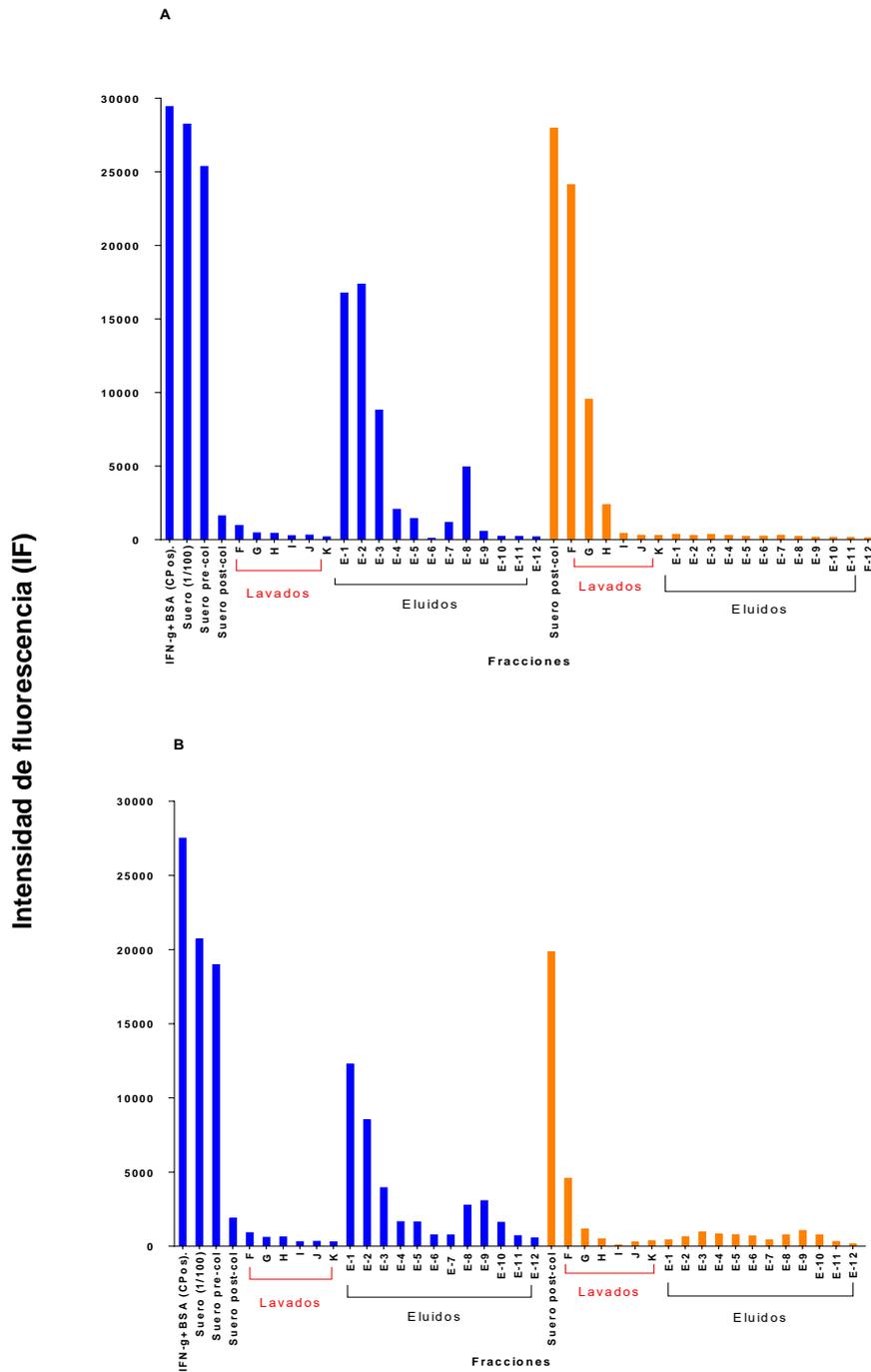
En la **Figura 7** se observan los resultados de la purificación de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  a partir de cada una muestras séricas S54.46-47 (R. S.) y S52.49 (S. M.) positivas a la presencia de éste, las Col-IFN- $\gamma$  muestran en la primera barra el control positivo con altos niveles de intensidad de fluorescencia (IF); en la segunda barra el mismo suero pre-columna diluido 1/2 cuyos niveles siguen siendo altos. La fracción E (suero post-columna) de la Col-IFN- $\gamma$  contiene un bajo nivel de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$ , demostrando que la mayoría de los auto-Ac's se unieron a la Col-IFN- $\gamma$ ; mientras que en la Col-BSA resultó ser lo contrario, donde se obtuvo un valor alto de IF. Los lavados de ambas columnas previos a la elución, corresponden a las fracciones de la F a la K, por lo que la IF va disminuyendo para ambas.

En los eluidos de E-1 a E-7 el enlace antígeno-Ac se rompe con el empleo del buffer de elución (pH 2.8), por lo tanto, el primer eluido dio un valor alto de IF, disminuyendo en los eluidos sucesivos. El cambio a un pH más ácido (de 2.0) favoreció el rompimiento de la unión Ag-Ac's (eluidos E-8 y E-9). En cambio los valores de IF para los eluidos de la Col-BSA fueron negativos debido a que nunca ocurrió la unión antígeno-Ac.

### **6.3. Determinación de los niveles de auto-Ac's anti-citocinas en muestras séricas humanas y en las preparaciones de los auto-Ac's purificados, mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión, multi-Plex (Luminex)**

La presencia auto-Ac's anti-citocinas presentes en las muestras séricas fue confirmada, así mismo fueron determinados los niveles de éstos, tanto en las muestras séricas como en las mezclas obtenidas de la purificación.

Los valores de IF que presentaron las muestras séricas y las preparaciones de auto-Ac's purificados de IFN- $\gamma$  resultaron ser más altos en comparación con los valores reportados para los auto-Ac's contra la IL-6; por lo cual cuando se realizó la determinación de los niveles de auto-Ac's se utilizaron diluciones diferentes dependiendo de cada auto-Ac anti-citocina. Por lo tanto, en el caso de las muestras positivas a Ac's anti-IL-6 se trabajaron las diluciones 1/50; 1/100 y 1/1 000, y para anti-IFN- $\gamma$  se usaron 1/100; 1/1 000 y 1/10 000.



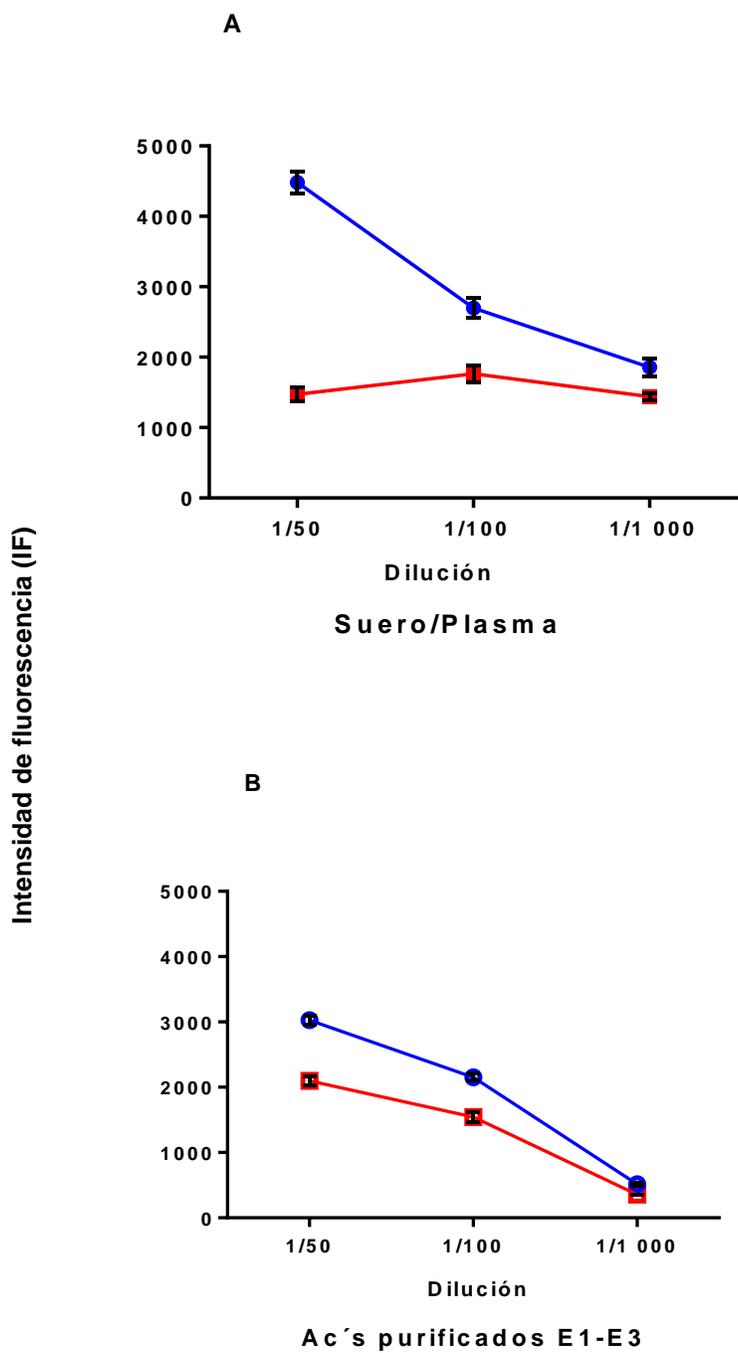
**Figura 7. Purificación de auto-Ac's anti- IFN- $\gamma$  de muestras séricas.** Valores de Intensidad de fluorescencia para las diferentes muestras séricas, fracciones de lavado y de elución, obtenidos por el ensayo Luminex. **A:** Fracciones correspondientes al suero S54.46-47 (R. S.), **B:** Suero S52.49 (S. M.), mediante la técnica cromatografía de afinidad. Las barras de color azul se refieren a la columna acoplada con IFN- $\gamma$ ; (■) mientras que las barras de color naranja representan a la columna acoplada con BSA (■). Todas las fracciones se trabajaron empleando una dilución de 1/50.

En la **Tabla 2** se observan los valores promedio  $\pm$ SEM de IF correspondientes a los niveles de auto-Ac's contra IL-6 presentes en las diferentes muestras. Dichos valores se observan graficados en la **Figura 8**, para muestras séricas (A) y para las preparaciones de auto- Ac's purificados (B).

En la **Tabla 3** se presentan los valores promedio  $\pm$  SEM de IF correspondientes a las muestras con presencia de auto-Ac's anti- IFN- $\gamma$  donde se observan valores de IF mayores a 25,000. Estos valores se muestran graficados en la **Figura 9** para muestras séricas (A), auto-Ac's purificados de los eluidos del E1 al E3 (B) y auto-Ac's purificados fracciones de los eluidos del E8 a E9 y E8 al E10 respectivamente. (C).

Muestra (anti-IL-6)	Fracción analizada	Dilución	Valor promedio de intensidad de fluorescencia (IF) $\pm$ SEM
RL250167	-	1/50	4482.5 $\pm$ 152.0
		1/100	2697.8 $\pm$ 140.2
		1/1 000	1857.4 $\pm$ 128.0
Auto-Ac's purificados del suero RL250167	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3	1/50	3028.1 $\pm$ 64.8
		1/100	2153.3 $\pm$ 55.8
		1/1 000	513.6 $\pm$ 20.2
RW120963	-	1/50	1473.7 $\pm$ 95.2
		1/100	1762.9 $\pm$ 121.7
		1/1 000	1438.0 $\pm$ 56.3
Auto-Ac's purificados del plasma RW120963	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3	1/50	2098.6 $\pm$ 71.2
		1/100	1541.9 $\pm$ 70.0
		1/1 000	356.3 $\pm$ 6.2

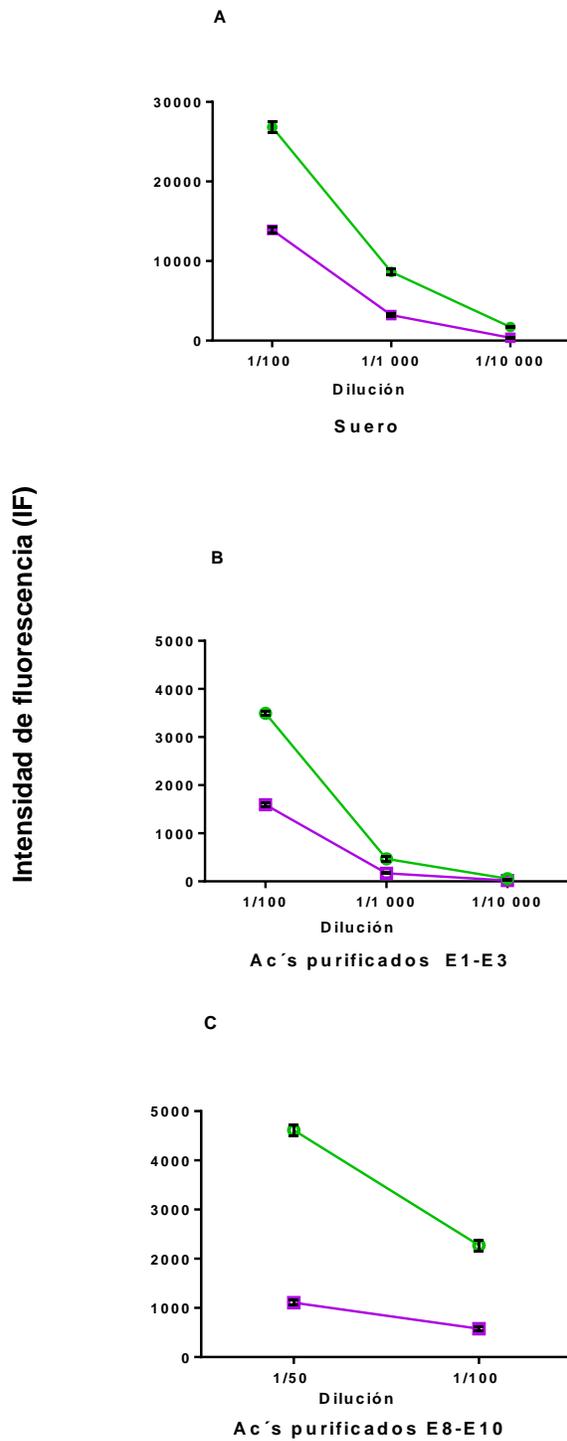
**Tabla 2. Niveles de auto-Ac's contra IL-6 presentes en las diferentes muestras séricas y auto-Ac's purificados.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia  $\pm$ SEM empleando tres diferentes diluciones (1/50,1/100 y 1/1 000), todas las muestras y cada una de las diluciones se trabajaron por triplicado.



**Figura 8. Determinación de los niveles de auto-Ac's anti-IL-6.** Se grafican los valores promedio de la Intensidad de fluorescencia  $\pm$ SEM para las diferentes muestras. **A:** muestras séricas, donde (●) corresponde al suero RL250167 y (■) al plasma RW120963, **B:** Auto-Ac's purificados a partir de las muestras séricas (●) RL250167 y (■) RW120963 mencionadas en el Panel A.

Muestra sérica IFN- $\gamma$	Fracción analizada	Dilución	Valor promedio de intensidad de fluorescencia (IF) $\pm$ SEM
S54.46-47 (R. S.).	-	1/100	26842.7 $\pm$ 656.4
		1/1 000	8649.0 $\pm$ 343.5
		1/10 000	1721.1 $\pm$ 42.9
Auto-Ac's purificados del suero S54.46-47.	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3	1/100	3494.1 $\pm$ 38.7
		1/1 000	468.7 $\pm$ 48.2
		1/10 000	54.3 $\pm$ 3.6
Auto-Ac's purificados del suero S54.46-47.	Mezclas de las fracciones eluidas de la E8 y E9	1/50	4615.3 $\pm$ 112.1
		1/100	2271.5 $\pm$ 111.2
Suero: S52.49..	-	1/100	13905.6 $\pm$ 335.6
		1/1 000	3218.3 $\pm$ 154.4
		1/10 000	364.3 $\pm$ 25.4
Auto-Ac's purificados del suero S52.49 (S. M.).	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3	1/100	1592.9 $\pm$ 41.1
		1/1 000	170.6 $\pm$ 11.4
		1/10 000	19.3 $\pm$ 2.7
Auto-Ac's purificados del suero S52.49.	Mezclas de las fracciones eluidas de la E8 a la E10	1/50	1243.0 $\pm$ 140.0
		1/100	576 $\pm$ 47.0

**Tabla 3. Niveles de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  presentes en las diferentes muestras.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia  $\pm$  SEM empleando tres diferentes diluciones (1/100, 1/1 000 y 1/10 1000), todas las muestras se trabajaron por triplicado.



**Figura 9. Determinación de los niveles de auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$ .** Valores promedio de la Intensidad de fluorescencia  $\pm$ SEM para las diferentes muestras séricas. **A:** Referente a los sueros S54.46-47 (R. S.) (—●—) y S52.49 (S. M.) (—■—). El Panel B y C corresponden a los auto-Ac's purificados de ambas muestras, S54.46-47 (R. S.) (—●—) y S52.49 (S. M.) (—■—); donde **B:** Mezcla de las fracciones de los eluidos del E1 al E3, y **C:** Mezclas de los eluidos de E8 a E9 y de E8 a E10 para S54.46-47 (R. S.) y S52.49 (S. M.), respectivamente.

#### 6.4. Estandarización del ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's empleando la técnica BioPlex en un sistema múltiple de microesferas

El ensayo de avidéz se realizó empleando dos concentraciones de urea (6 y 9 M), estas dos concentraciones se eligieron considerando publicaciones de reportes de estudio de avidéz (Stenger, 2011).

Los valores de IF promedio  $\pm$ SEM obtenidos de las muestras séricas positivas a auto-Ac's contra IL-6, así como de las preparaciones de Ac's purificados correspondientes, después del tratamiento con dos diferentes concentraciones de urea (6 y 9M) y empleando tres diferentes diluciones se reportan en **Tabla 4**.

En la **Tabla 5** se presentan los niveles de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  presentes en las muestras séricas, así como en las mezclas de los fracciones de eluidos después del tratamiento de lavado con urea 6 M ó 9 M; los valores promedio de IF $\pm$ SEM se obtuvieron de triplicados de cada una de las muestras empleando tres diferentes diluciones.

El índice de avidéz (%) de los auto-Ac's anti-citocina del isotipo IgG se calculó con base a la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de avidéz(\%)} = \frac{\text{IF pocillos tratados con urea}}{\text{IF pocillos en ausencia de urea}} \times 100$$

En la **Figura 10** se presentan los valores de los índices de avidéz (%) de los auto-Ac's específicos para IL-6, comparando dos concentraciones de urea (6 y 9 M). En **A** se grafican los valores promedio correspondientes al suero RL250167, mientras que en **B** corresponde al plasma RW120963, así mismo los valores obtenidos empleando sus auto-Ac's purificados respectivos. Estos resultados mostraron que no existió ninguna variación en los valores de los porcentajes de índices de avidéz, entre las tres diferentes diluciones de las muestras séricas o de las preparaciones de los auto-Ac's purificados; sin embargo los valores de los índices de avidéz en las todas las muestras resultaron ser más bajos cuando se utilizó la concentración 9 M que con 6 M de urea.

Los valores de índice de avidéz que presentó la muestra de suero (RL250167) fueron más altos que los encontrados para el plasma (RW120963), siendo más evidentes los resultados obtenidos con las preparaciones de los auto-Ac's purificados.

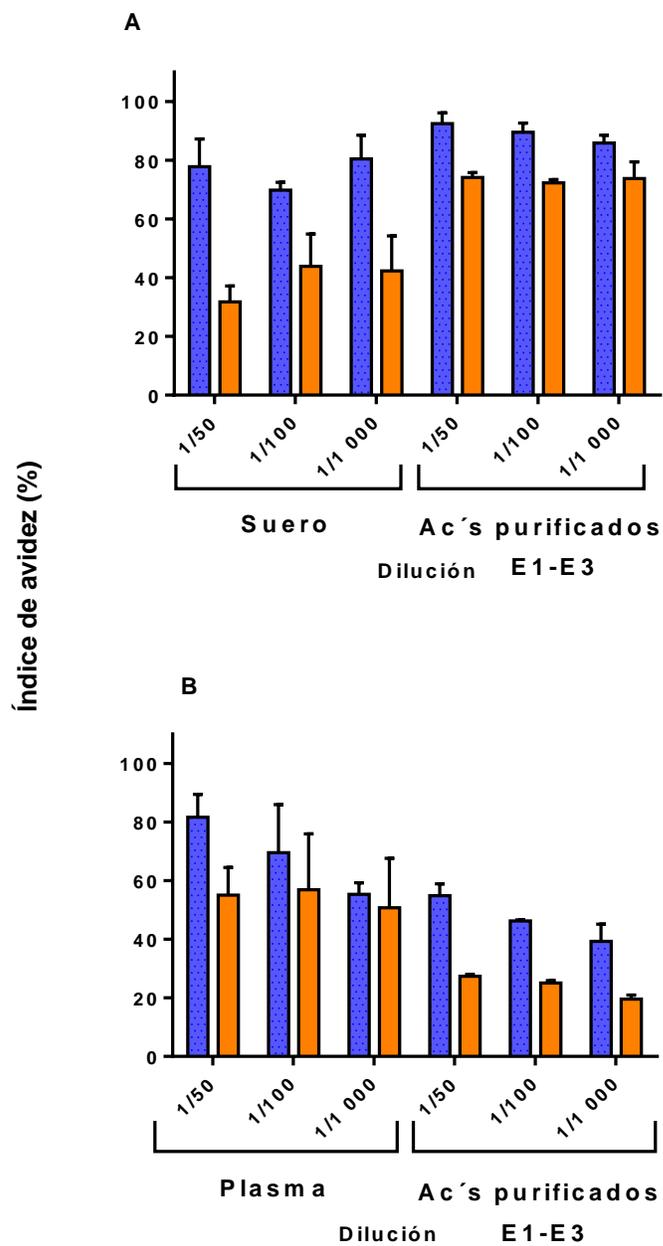
Cuando se determinó el índice de avidéz de los auto-Ac's empleando el suero se observó una mayor variación en los valores de éstos, resultando ser menores, en comparación con los valores obtenidos a partir de la preparación de auto-Ac's purificados correspondiente, observándose más marcado a la concentración de urea 9 M (**Figura 10, A**); estas diferencias se pueden deber a que posiblemente hay más interferencias con todos los componentes existentes en las muestras séricas completas, a cuando sólo se analiza la preparación de los auto-Ac's purificados.

Muestra IL-6	Fracción analizada	Dilución	Valor promedio de intensidad de fluorescencia (IF)±SEM a diferente concentración de urea	
			6 M	9 M
RL250167	-	1/50	3115.5 ±394.9	1514.0 ±135.1
		1/100	2009.7 ±202.9	1102.9 ±274.1
		1/1 000	1405.3 ±177.6	881.7±346.2
Ac's purificados del suero RL250167.	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3.	1/50	2864.16 ±17.1	2184.0 ±9.83
		1/100	1995.0 ±52.2	1499.2 ±24.5
		1/1 000	467.7 ±10.9	353.9 ±24.1
RW120963.	-	1/50	1200.8 ±121.9	520.9 ±170.2
		1/100	1127.8 ±207.4	1114.5 ±427.2
		1/1 000	801.5 ±87.3	720.2 ±228.9
Ac's purificados del suero RW120963.	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3	1/50	1219.8 ±66.7	538.7 ±20.0
		1/100	784.7 ±13.2	348.0 ±6.1
		1/1 000	140.8 ±23.0	69.9 ±6.1

**Tabla 4. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de diferentes muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's anti-IL-6 y de los auto-Ac's purificados, después del tratamiento con dos concentraciones de urea (6 y 9 M).** Valores empleados para la determinación de los índices de avidéz. Se utilizaron, tres diferentes diluciones de cada una de las muestras trabajadas por triplicado.

Muestra sérica IFN- $\gamma$	Fracción analizada	Dilución	Valor promedio de intensidad de fluorescencia (IF) $\pm$ SEM a diferente concentración de urea (M)	
			6 M.	9 M.
Suero S54.46-47.	-	1/100	14799.30 $\pm$ 968.63	13230.00 $\pm$ 573.505
		1/1 000	5096.80 $\pm$ 364.31	4090.33 $\pm$ 63.833
		1/10 000	921.13 $\pm$ 5.26	799.00 $\pm$ 64.073
Ac's purificados del suero S54.46- 47.	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3	1/100	1721.63 $\pm$ 108.09	1236.00 $\pm$ 84.914
		1/1,000	204.30 $\pm$ 7.50	131.16 $\pm$ 1.691
		1/10 000	29.96 $\pm$ 5.60	10.50 $\pm$ 1.756
Ac's purificados del suero S54.46- 47.	Mezclas de las fracciones eluidas de la E8 y E9	1/50	4193.63 $\pm$ 81.26	3468.96 $\pm$ 209.739
		1/100	2074.46 $\pm$ 83.60	1753.13 $\pm$ 128.524
Suero S52.49.	-	1/100	4479.13 $\pm$ 370.31	3608.66 $\pm$ 88.254
		1/1 000	859.96 $\pm$ 61.80	687.00 $\pm$ 22.590
		1/10 000	128.96 $\pm$ 11.60	133.50 $\pm$ 5.635
Ac's purificados del suero S52.49 (S. M.).	Mezclas de las fracciones eluidas de la E1 a la E3	1/100	676.96 $\pm$ 21.45	610.00 $\pm$ 36.709
		1/1 000	72.13 $\pm$ 10.63	64.16 $\pm$ 4.323
		1/10 000	8.96 $\pm$ 2.72	36.66 $\pm$ 24.950
Ac's purificados del suero S52.49 (S. M.)	Mezclas de las fracciones eluidas de la E8 a la E10	1/50	1043.80 $\pm$ 183.04	605.63 $\pm$ 52.12
		1/100	404.80 $\pm$ 41.47	269.80 $\pm$ 18.87

**Tabla 5. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de diferentes muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's anti- IFN- $\gamma$  y de los auto-Ac's purificados, después del tratamiento con dos concentraciones de urea (6 y 9 M).** Valores empleados para la determinación de los índices de avidéz. Se utilizaron, tres diferentes diluciones de cada una de las muestras trabajadas por triplicado.



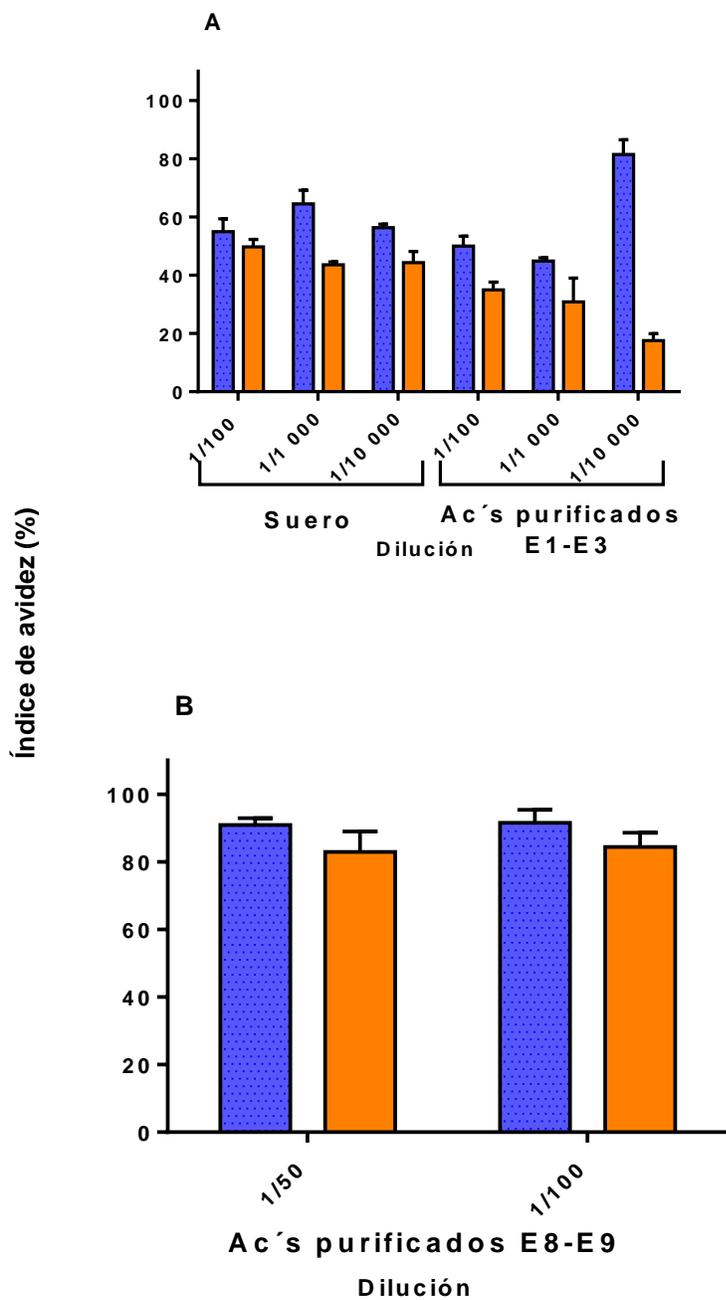
**Figura 10. Ensayo de avidez para el análisis de los auto-Ac's contra IL-6 de las diferentes muestras empleando la técnica de Luminex. A:** muestra sérica RL250167 y la preparación de las fracciones de los eluidos del E1 al E3 de auto-Ac's purificados. **B:** muestra sérica RW120963 y la preparación de las fracciones de los eluidos del E1 al E3 de auto-Ac's purificados, tratados con urea 6 M (■) y urea 9 M (■). Trabajando tres diluciones de las muestras (1/50, 1/100, 1/1 000).

En la **Figura 11** se grafican los valores de los índices de avidéz determinados para los Ac's específicos a IFN- $\gamma$  presentes en la muestra sérica S54.46-47 (R. S.), así como los valores obtenidos empleando la preparación de los auto-Ac's purificados anti-IFN- $\gamma$ . En **A** se representan los porcentajes de índice de avidéz para el suero y la preparación de auto-Ac's purificados (mezcla de las fracciones eluidas: E1 a la E3). Cuando se utilizó la concentración de urea 6 M, con el suero se observan valores de índice de avidéz muy similares para las tres diluciones empleadas de la muestra (entre un rango del 40-50%); así mismo, cuando se empleó la concentración de urea 9 M los valores de índice de avidéz resultaron ser más bajos (30-40%) pero con la misma tendencia, a excepción de la muestra de los anti-Ac's purificados diluidos 1/10 000.

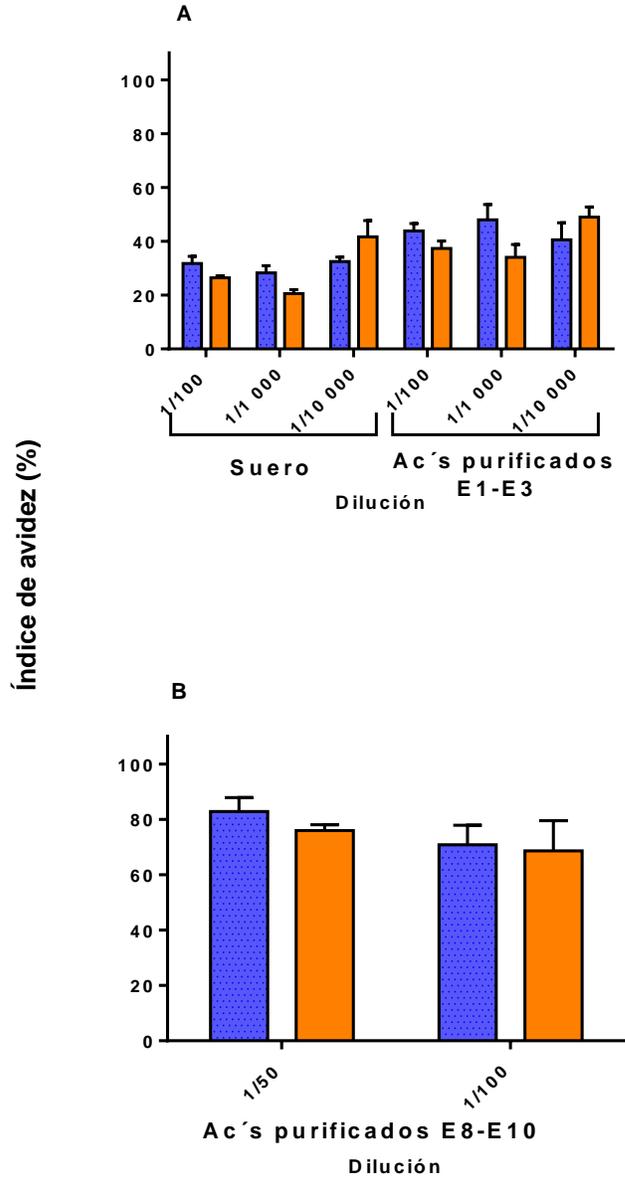
Mientras que en **B** corresponde a la preparación de auto-Ac's purificados (mezcla de las fracciones eluidas: E8 y E9), empleando las diluciones de 1/50 y 1/100; estos auto-Ac's presentaron valores de índice de avidéz altos, mayor al 80%. Dichos resultados corresponden a lo esperado ya que para obtener el desprendimiento de los auto-Ac's de la columna de afinidad se necesitó utilizar un pH más ácido (pH 2.0), para favorecer el rompimiento de la interacción antígeno-anticuerpo.

En la **Figura 12** se grafican los valores de los índices de avidéz determinados para los auto-Ac's específicos para IFN- $\gamma$  presentes en la muestra sérica S52.49 (S. M.), así como los valores obtenidos empleando la preparación de los auto-Ac's purificados anti-IFN- $\gamma$ . En **A** se representan los porcentajes de índice de avidéz para el suero y la preparación de auto-Ac's purificados (mezcla de las fracciones eluidas de la E1 a la E3), obteniéndose valores de 20-41% y 34-48%, respectivamente. Mientras que en **B** se grafican los valores de los índices de avidéz de la mezcla de las fracciones E8, E9 y E10 de los auto-Ac's purificados, en la cual se observa que el porcentaje de índice de avidéz resultó ser mayor (68-75%), correspondiendo a lo esperado.

Por otra parte, con estos resultados se corroboró que la dilución empleada de las muestras séricas no interfiere con los valores de índice de avidéz, siendo menores en la mayoría de los casos cuando se emplea la concentración de urea 9 M.



**Figura 11. Ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  de la muestra S54.46-47 (R. S.) empleando la técnica de Luminex. A:** muestra sérica y la preparación de las fracciones de los eluidos del E1 al E3 de auto-Ac's purificados **B:** mezclas de las fracciones de los eluidos del E8 a E9 de los auto-Ac's purificados y donde ■ representa urea 6 M y ■ es urea 9 M.



**Figura 12. Ensayo de avidéz para el análisis de los auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  de la muestra S52.49 (S. M.) empleando la técnica de Luminex. A: muestra sérica y Auto-Ac's purificados fracciones de los eluidos del E1 al E3 de auto-Ac's purificados. B: mezclas de las fracciones de los eluidos del E8- E10 de los auto-Ac's purificados y donde ■ representa urea 6 M y ■ es urea 9 M.**

## 7. DISCUSIÓN

Las inmunodeficiencias heredadas ilustran el papel vital, tanto de la respuesta inmune adaptativa de las células T y de las células B en particular, así como la importancia de la respuesta inmune innata en particular de los fagocitos y complemento a muchos trastornos hereditarios inmunes, las causas permanecen aún sin explicación (Janeway 2008).

Las inmunodeficiencias secundarias (adquiridas) causadas por altos niveles de auto-Ac's neutralizantes contra citocinas pueden causar una amplia variedad de posibles enfermedades que amenazan la vida del individuo (Maddur, et al., 2010).

Los Ac's anti-citocinas se han descrito, a últimos días, como una importante y emergente causa de enfermedades. Sus manifestaciones son diversas e incluyen proteínosis alveolar pulmonar debido a auto-anticuerpos anti- el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF, *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), infecciones con micobacterias no tuberculosas debido a auto-anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , también individuos con miastenia gravis y timoma con prevalencia de auto-Ac's contra IL-12 e IFN- $\gamma$ . (Meager, et al., 2003; Browne y Holland, 2010).

Pacientes con severa susceptibilidad a infecciones producidas por bacterias intracelulares pueden presentar altos niveles de auto-Ac's hacia IFN- $\gamma$ , una citocina, la cual es de crucial importancia para la eliminación de este tipo de patógenos tales como *Mycobacterium* y *Salmonella*. También los auto-Ac's contra IL-6 se encontraron en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente. Más reciente, una susceptibilidad a infecciones por hongos se ligó a auto-Ac's contra IL-17 e IL-22 (Zhu y Paul 2008; Dubin y Kolls 2008, Bettelli et al. 2008).

Además de estas presentaciones altamente patológicas mencionadas anteriormente, los auto-Ac's anti-citocinas también se manifiestan en artritis reumatoide, timoma, y ciertos tipos de cánceres (Meager, et al., 2003).

Sin embargo, hasta donde se sabe no existen estudios con respecto a una caracterización más detallada de dichos auto-Ac's anti-citocinas, por lo que lograr la purificación de los mismos es de suma importancia para la realización de análisis más específicos y claros sobre la función que se le podría atribuir a la presencia de auto-Ac's

contra citocinas involucrados en la susceptibilidad a algún tipo de infección. Por ejemplo, ensayos de neutralización *in vitro* de la fosforilación de STAT-1 y STAT-3, pruebas de inhibición de la producción de citocinas, identificación de los epítomos reconocidos por los auto-Ac's mediante microarreglos; así como, el estudio realizado en el presente trabajo, donde se llevó a cabo la estandarización de la técnica para determinar el índice de avidéz de auto-Ac's anti-citocinas.

En el presente trabajo se analizaron 4 muestras séricas, dos de ellas positivas a auto-Ac's contra IL-6 y las dos restantes positivas a auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$ ; en forma general se menciona que los pacientes sufrían de severas y/o recurrentes infecciones, sus manifestaciones son diversas e incluyen proteínosis alveolar pulmonar, celulitis estafilocicie, timoma, candidiasis mucocutánea crónica, entre otras. Para la descripción particular de cada muestra Ver **Tabla 1**.

Por otro lado, también se trabajó con los auto-Ac's purificados a partir de estas muestras séricas, empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna, este método aprovecha la característica de que para la formación del complejo antígeno-anticuerpo intervienen enlaces no covalentes. Por lo tanto, inicialmente se unió el antígeno (citocina) a la resina de agarosa a través de aminas primarias, cuando la muestra sérica pasa a través de la matriz (columna), el suero o plasma que presenta los auto-Ac's es considerado impuro, ya que además contiene proteínas, (albúmina, globulinas), electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  etc.), urea, ácido úrico, creatinina, glucosa, lípidos, aminoácidos, oxígeno, dióxido de carbono, hormonas, enzimas; sin embargo, mientras que los Ac's específicos contra la citocina permanecieron unidos a su antígeno en la columna, los otros componentes y los otros Ac's que no se unieron específicamente fueron eliminados mediante los lavados. Así mismo, la unión específica de los auto-Ac's a la citocina se corroboró al utilizar también una columna de afinidad que tiene acoplada una proteína ajena (BSA) a la proteína de interés (citocina), en la cual se demostró que nada se unió inespecíficamente. Después en la elución de las columnas se disoció la unión antígeno-anticuerpo mediante la variación de pH, primero un pH de 2.8 y después se baja a 2.0, para así obtener en forma purificada los auto-Ac's que se unieron al inmunoabsorbente (Ross,2008).

Las condiciones de trabajo empleadas para la realización de esta técnica de cromatografía de afinidad son importantes, por lo cual la solución amortiguadora que es utilizada para la unión óptima de los auto-Ac's debe presentar un valor de pH similar al que

se tiene en condiciones fisiológicas, por lo tanto, se usó una solución amortiguadora de un pH neutro (es decir pH 7.2). Por otra parte, las condiciones de pH para la elución de los auto-Ac's inmovilizados en el presente estudio fueron ácidas (de un pH de 2 a 2.8). Tales condiciones concuerdan con un trabajo reportado por Moser y colaboradores, donde se menciona que el método más popular y mejor para lograr una separación adecuada de la reacción antígeno-anticuerpo es la aplicación a la columna de una solución amortiguadora ácida, entre un pH de 1 a 3; así mismo, ellos mencionan que en condiciones alcalinas se ha obtenido un bajo rendimiento del soporte, debido a la inestabilidad de estos soportes tal como perlas de vidrio o sílice a un pH mayor a 8.0. Sin embargo, Moser refiere que se ha demostrado que estas columnas son muy estables cuando se utilizan los cambios de pH moderados en un intervalo de 2.5 a 3.0 para la elución (Moser *et al*, 2010; Ross,2008).

Así mismo, Moser y sus colaboradores también refieren, al igual que en las notas técnicas y en el instructivo del producto AminoLink, que se pueden usar agentes caotrópicos, se ha demostrado que la capacidad de afinidad de la columna se ve disminuida, en las notas técnicas del producto también se menciona que al usar la urea como agente caotrópico está contiene amoniaco el cual tiene una amina primaria, por lo tanto competiría con la reacción del soporte, además de que la urea aumenta la solubilidad de las moléculas hidrófobas y además desnaturalizan las proteínas, es decir alteran sus estructuras tridimensionales, en consecuencia algunas proteínas sufren cambios alterando irreversiblemente su estructura y de tal forma pueden perder su función de unión.

Con respecto, al proceso de purificación que se realizó en el presente estudio se puede mencionar que resultó exitoso, lo cual se demostró cuando se evaluó la eficiencia de la técnica de purificación de los auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$ , empleando el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex). Donde los valores de IF indicaron la presencia o la ausencia de los auto-Ac's purificados en las diferentes fracciones eluidas obtenidas durante el proceso; así mismo, estos resultados reflejaron el efecto de disociación del pH sobre la unión de los auto-Ac's al IFN- $\gamma$  que formaron los complejos antígeno-anticuerpo en la columna de cromatografía de afinidad.

Las muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  presentaron un comportamiento muy similar en las fracciones eluidas con presencia de auto-Ac's purificados. Por lo tanto, con base a los valores de las IF de cada fracción se tomó el criterio para realizar las mezclas de las fracciones eluidas positivas a la presencia de los auto-Ac's

purificados. Otro criterio fue tomar los eluidos donde ocurrió el cambio de pH de 2.8 a 2.0 que favoreció el rompimiento de la interacción antígeno-anticuerpo. Reverberi *et al* en el año 2007 menciona el efecto que tiene el pH en la interacción antígeno-anticuerpo en los lados extremos tanto ácidos como básicos, el pH ácido debilita las interacciones electrostáticas, o puentes de hidrógeno. Por lo tanto, la observación de que nuevamente se lograron eluir auto-Ac's purificados de la columna con el cambio de pH de 2.8 a 2.0, indica que estos auto-Ac's necesitaron un pH más ácido para disociar su interacción con el antígeno (Reverberi *et al*, 2007).

Es importante mencionar que la unión de los auto-Ac's contra la citocina fue específica, debido a que solo en la columna donde se acopló la citocina de trabajo (IFN- $\gamma$ ) se vieron disminuidos los niveles de auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$  en las muestras séricas después del paso de éstas a través de dicha columna, efecto que no se observó cuando se utilizó la columna que tenía acoplada la BSA. Así mismo, la presencia de los auto-Ac's purificados solo fue detectada en algunas de las fracciones eluidas de la columna-IFN- $\gamma$ , y en ninguna de las fracciones eluidas de la columna-BSA.

Por lo tanto, para la muestra sérica S54.46-47 (R. S.) los primeros tres eluidos a pH 2.8 (E1, E2 y E3) obtenidos de la columna-IFN- $\gamma$  presentaron los valores de IF más altos (16,760, 17,362 y 8,806, respectivamente), por lo que estos eluidos se mezclaron; cuando se realizó la disminución del pH de 2.8 a 2.0 a partir de la elución E8 a la E12, la IF se observó aumentada en el eluido E8 (4,931) en comparación al eluido E7 que la IF fue de 1,185, los eluidos E8 y E9 constituyeron la segunda mezcla. En cuanto a la muestra S52.49 (S. M.) se tomaron los mismos criterios para realizar la mezcla de las tres primeras eluciones E1, E2 y E3 que registraron valores de IF de 12,265, 8,518 y 3,950, respectivamente; la segunda mezcla de las fracciones eluidas correspondió a los eluidos E8, E9 y E10 con valores de IF de 2,772, 3,074 y 1,608, respectivamente.

En 2011 Stenger y colaboradores comparan el ensayo de ELISA contra el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión multi-Plex, en donde describen los requerimientos para cada una de las técnicas en la cual los más notables son que la técnica de ELISA requiere más tiempo (por lo menos 2 días), y que además requiere cantidades sustanciales de antígeno específico para el recubrimiento; en contraste con inmunoensayos basados en citometría de flujo, el empleo de sustancias fluorescentes incrementa la sensibilidad de la técnica y otra de las ventajas importantes del Luminex, es que requiere cantidades pequeñas

de las proteínas (5-20 µg) que deseen acoplarse a las diferentes microesferas, así como de muestras séricas (1-3 µl); otra ventaja es que existe el análisis de antígenos múltiples realizado en un solo pozo, esto resulta muy conveniente para el empleo de muestras donde los volúmenes disponibles son relativamente bajos, ya que nos permite la detección de varios antígenos a la vez empleando el mismo volumen de muestra (Stenger, 2011).

Considerando el objetivo del presente estudio que fue estandarizar la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex basado en citometría de flujo con el uso de urea para determinar los valores de índice de avidéz de los auto-Ac's contra citocinas; este ensayo consistió en emplear un agente caotrópico como es la urea, ya que se ha reportado que altera el entorno del disolvente rompiendo los enlaces no covalentes de la interacción antígeno-anticuerpo (Bennion 2003). Por lo tanto, el uso de un desestabilizante de puentes de hidrógeno, como es la urea, para disociar la unión entre el Ac específico y el antígeno, conlleva a que los Ac's de baja avidéz se disocian más fácilmente del antígeno, mientras que los que tienen alto índice de avidéz pueden permanecer unidos al antígeno después del tratamiento con la urea (Meurman, 1992; Schoenardie, 2014). Como se mencionó anteriormente, la avidéz es el término utilizado para expresar la fuerza de unión entre un Ac y un antígeno multivalente; así mismo, existen estudios donde mencionan que la avidéz de los Ac's va aumentando con el tiempo de la estimulación antigénica (Hubner et al.,2001; Rojas, 2006).

En el presente estudio se emplearon dos concentraciones de urea (6 y 9 M) para determinar las condiciones óptimas de trabajo para realizar el análisis de los índices de avidéz presentados por los auto-Ac's contra citocinas; el uso de estas dos concentraciones de urea se basó en varios reportes donde prueban diferentes concentraciones (4, 6, 8 o 9 M), y en donde los mejores resultados que se obtuvieron fue cuando se emplearon las concentraciones 6 y 9 M de urea dependiendo del antígeno analizado (Stenger, 2011; Syed-Hussain, 2014 y Paule, 2003). De forma similar los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que al determinar el índice de avidéz de los auto-Ac's contra citocinas empleando el uso de la urea (6 y 9 M) como agente caotrópico funcionaron bien ambas concentraciones; sin embargo, los valores de índice de avidéz resultaron ser más definidos cuando se utilizó la concentración 9 M de urea que con la de 6 M, por lo cual se definió que la concentración de 9 M es la más recomendable para determinar los valores de los índices de avidéz de los auto-Ac's contra citocinas (IL-6 e IFN-  $\gamma$ ) empleando el ensayo de Luminex.

Así mismo, estos resultados son comparables con los obtenidos por Stenger y colaboradores, donde ellos utilizaron la técnica de inmunoensayo multiplex (MIA), comparando las concentraciones 6 y 9 M de urea; finalmente ellos sugieren usar la concentración 9 M de urea para la determinación de los índices de avidéz cuando se realiza el ensayo el inmunoensayo multiplex, aunque concluyen que se necesitan utilizar las dos concentraciones de urea para poder definir la más adecuada dependiendo de los diferentes antígenos estudiados. Por otro lado, en este mismo estudio ellos emplearon otro agente caotrópico como es el tiocianato de sodio (NaSCN) a diferentes concentraciones (0.5 a 3 M), utilizando las técnicas de ELISA e inmunoensayo multiplex; sin embargo, aunque para ELISA los resultados fueron apropiados, para el inmunoensayo multiplex la señal de fondo resultaba elevada por la unión no específica del conjugado a las microesferas (Stenger, 2011).

La determinación de los valores de índice de avidéz en la presente tesis se realizó en dos tipos de muestras, una analizando los auto-Ac's anti-citocinas (anti-IL-6 y anti-IFN- $\gamma$ ) presentes en las muestras séricas y la otra utilizando los auto-Ac's purificados. Al emplear diferentes diluciones de ambos tipos de muestras, los resultados obtenidos mostraron que los valores de índice de avidéz fueron más consistentes con los auto-Ac's purificados que cuando se emplearon las muestras séricas completas; esto se puede deber a que al pasar la muestra completa por la columna de purificación se eliminan todas las impurezas que pudieran estar interfiriendo con la determinación de los valores de índice de avidéz de los auto-Ac's en la muestra sérica, y que por lo tanto, los valores de índice de avidéz se observan con mayor claridad y consistencia en las preparaciones de los auto-Ac's purificados independientemente de la dilución utilizada. Sin embargo, estos resultados no se pueden comparar con otros estudios debido a la falta de reportes similares, donde empleen preparaciones purificadas de Ac's.

Con respecto a la diferencia que resultó en los valores de índice de avidéz que presentaron las dos preparaciones obtenidas de auto-Ac's purificados contra IFN- $\gamma$  en la misma muestra, es decir los eluidos con un pH de 2.8 (E1 a E3) tuvieron valores menores (30-50 %) que los eluidos con un pH de 2.0 (E8, E9 y E10) (mayores al 70%). Se puede mencionar que considerando la fuerza de unión que presentan los auto-Ac's contra la citocina, estos resultados de avidéz confirman el comportamiento presentado por estos auto-Ac's al ser eluidos de las columnas de cromatografía de afinidad. En este punto es importante considerar que posiblemente los auto-Ac's eluidos a pH 2.0 presentaban una interacción más fuerte hacia al antígeno (citocina) que los eluidos a pH 2.8, refiriéndose esto

a sus afinidades; lo cual también se ve reflejado en los valores de los índices de avidéz presentados por estos auto-Ac's, que dependen del total de las afinidades individuales de los Ac's por los determinantes antigénicos que sean reconocidos (Silberman, 2007).

Los auto-Ac's contra IL-6 purificados de las muestras séricas RL250167 y RW120963 se comportaron de diferente manera, es decir los auto-Ac's de la muestra RL250167 presentaron valores de índice de avidéz más altos que los de la muestra RW120963. Una posible explicación de la diferencia que existe entre los índices de avidéz determinados para estas dos muestras, es realizando una especulación con trabajos actuales donde se analizan los valores de los índices de avidéz para determinar y distinguir entre una infección aguda y una crónica, donde los autores mencionan que durante la fase inicial de una infección la avidéz de los Ac's es baja y a medida que transcurre el tiempo esta aumenta progresivamente Schoenardie y colaboradores mencionan que el determinar la avidéz es una alternativa para discriminar las etapas de la infección (Schoenardie, 2014).

Realizando una comparación similar con los valores de índices de avidéz de los auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$  purificados a partir de dos muestras séricas diferentes, estos presentaron un comportamiento muy similar; sin embargo, los auto-Ac's eluidos a un pH de 2.0 presentaron valores de índice de avidéz mayores que los auto-Ac's eluidos a un pH de 2.8.

Finalmente, la aportación de los resultados obtenidos hasta el momento en el presente trabajo, específicamente con respecto a la estandarización de la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex, basado en citometría de flujo, para determinar los valores de índice de avidéz de los auto-Ac's anti-citocinas nos indican que es recomendable utilizar las preparaciones de los auto-Ac's purificados más que las muestras séricas completas, debido a los valores de los índices de avidéz hacia la misma citocina porque son más definidos y consistentes. Esto nos permite en futuro continuar con el interés de analizar a más detalle los valores de los índices de avidéz de los auto-Ac's contra estos mediadores químicos. Así mismo, la purificación de estos auto-Ac's permitirá realizar estudios más detallados de ensayos de neutralización *in vitro* de la fosforilación de STAT-1 y STAT-3, pruebas de inhibición de la producción de citocinas, identificación de los epítomos reconocidos por los auto-Ac's mediante microarreglos lo cual llevará a una caracterización más completa de éstos auto-Ac's.

## 8. CONCLUSIONES

1. Se corroboró la presencia de auto-Ac's contra IFN- $\gamma$  e IL-6 en muestras séricas mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).
2. Se realizó exitosamente la técnica de cromatografía de afinidad en columna para la purificación de los auto-Ac's anti-IFN- $\gamma$  a partir de muestras séricas positivas a la presencia de éstos.
3. Se determinaron los niveles de auto-Ac's anti-citocinas (IL-6 e IFN- $\gamma$ ) detectados así como en las preparaciones de los auto-Ac's purificados, mediante el ensayo de Luminex.
4. Se estandarizó el ensayo de avidéz empleando dos concentraciones de urea (6 y 9 M) mediante la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex, basado en citometría de flujo, donde la mejor concentración de urea para la determinación del índice de avidéz fue de 9 M.
5. El análisis para la determinación de los índices de avidéz resultó ser mejor empleando las preparaciones de los auto-Ac's purificados que las muestras séricas completas.
6. Los auto-Ac's purificados empleando la solución de elución a pH de 2.0 presentaron valores de índice de avidéz mayores que aquellos eluidos a un pH de 2.8.
7. Las preparaciones de auto-Ac's purificados serían más recomendables para la realización de estudios empleando ensayos de neutralización *in vitro* de la fosforilación de STAT-1 y STAT-3, pruebas de inhibición de la producción de citocinas, identificación de los epítomos reconocidos por los auto-Ac's mediante microarreglos lo permitirá una caracterización más completa de éstos auto-Ac's.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Agmon-Levin N, Paz Z, Israeli E. et al. (2009). Vaccines and autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 5: 648–652.

Altare, et al. (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human IL-12 receptor deficiency. *Science* 280, 1432-1435.

Araujo, A. C. (2011). Antibody Avidity and Antigen-Specific. CDC, 26.

Bennion, B. J., and V. Daggett. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5142– 5147.

Bettelli E, Korn T, Oukka M. et al. VK. (2008). Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453: 1051–1057.

Browne y Holland. (2010). Anticytokine autoantibodies in infectious diseases: pathogenesis and mechanisms. *Lancet Infect Dis* 2010;10: 875–85

Doffinger Rainer, R. Helbert Matthew, Barcenas-Morales Gabriela. et al. (2004). Autoantibodies to IFN- $\gamma$  in a Patient with Selective Susceptibility to Mycobacterial Infection and Organ-Specific Autoimmunity. *Clinical Infectious Diseases.* 38:10–4.

Döffinger, R., Patel, S. and Kumararatne, D. (2005). Human immunodeficiencies which predispose to intracellular bacterial infection. *Current Opinion in Rheumatology*, 17, 440-6.

Dubin PJ, Kolls JK. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 226: 160–171.

Hermanson, G.T., et al. (1992). Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, Inc.: San Diego, CA.

Hewagama A, Richardson B (2009). The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 33: 3–11.

Hoflich C, Sabat R, Rosseau S. et al. (2004). Naturally occurring anti-IFN- $\gamma$  autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia coccovenans*. *Blood* 103: 673–675.

Hubner J, Uhliková M, Leissová M. (2001). Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*; 50(2):67-70.

Invernizzi P, Gershwin ME (2009). The genetics of human autoimmune disease. *J Autoimmun* 33:290–299.

Janeway Charles A, Travers Paul, Walport Mark, Sholmchik Mark. (2008). Immunobiology: The immune system in health and disease. Editores: Austin Penelope, Lawrence Eleanor. 5ta ed. Garland Publishing, New York.

Kampmann B, Hemingway C, Stephens A. et al. (2005). Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN- $\gamma$ . J Clin Invest 115:2480–2488.

Kisand. et al. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. J Exp Med 207:299–308.

Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, et al. (2009). Infections and autoimmunity friends or foes? Trends Immunol 30: 409–414.

Madariaga L, Amurrio C, Martin G, et al. (1998). Detection of anti-IFN-  $\gamma$  autoantibodies in subjects infected by Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2: 62–68.

Maddur. (2010). Autoimmunity as a predisposition of infectious diseases. PLOS Pathogens. 6(11)

Mayer, G. (julio de 2010). microbiology. Recuperado el 25 de 02 de 2016, de <http://www.microbiologybook.org/mayer/ab-ag-rx.htm>

Meager, Wadhwa, Dilger, *et al.* 2003. Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against IFN- $\alpha$ , IFN- $\omega$  and IL-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. Clin Exp Immunol 132: 128 136.

Meurman O. et al. (1992) Immunoglobulin G Antibody Avidity in Patients with Respiratory Syncytial Virus Infection. Journal of clinical microbiology, p. 1479-1484

Moser, A. et al (2010). Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. NIH Public Access, 769–790.

Patel, Ding, Brown, et al. (2005). Anti-IFN-  $\gamma$  autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. J Immunol 175: 4769–4776.

Paule, B. (2003). Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis primary. Elsevier, 129-139.

Puel, Picard et al. (2008). Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. J Immunol 180:647–654.

Puel, Doffinger, Natividad, Chrabieh, Barcenás-Morales, et al. (2010). Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 207: 291–297.

Reverberi, R. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus*, 227-240.

Roitt, I. (2008). *Inmunología. Fundamentos*. Buenos Aires: Medica Panamericana.

Rojas-Espinosa, Ó. (2006). *Inmunología (de memoria) (3ra ed.)*. México: Medica Panamericana.

Ross, M. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos Aires: Medica Panamericana.

Schoenardie, E. R. (2014). Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. Post-Graduate Program in Parasitology, Department of Microbiology and, 403-406.

Scientific, T. F. (2010). MicroLink™ Protein Coupling Kit. Recuperado el 25 de 02 de 2016, de [www.thermo.com/pierce](http://www.thermo.com/pierce).

Shoenfeld. (1994). Idiotypic induction of autoimmunity: a new aspect of the idiotypic network. *FASEB J* 8: 1296–1301.

Silberman, R. P. (2011). Instituto de biotecnología. Recuperado el 24 de 02 de 2016, de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>

Stenger, R. M. (2011). Fast, Antigen-Saving Multiplex Immunoassay To Determine Levels and Avidity. *Clinical and vaccine immunology*, 595–603.

Syed-Hussain. (2014). Adaptation of a commercial ELISA to determine the IgG avidity in sheep experimentally and naturally infected with *Neospora caninum*. *Elsevier*, 21-28.

Voet, D. (2009). *Fundamentos de Bioquímica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Zhang, Liu, et al. (2003). Autoantibodies to IL-12 in myasthenia gravis patients with thymoma; effects on the IFN- $\gamma$  responses of healthy CD4<sup>+</sup> T cells. *J Neuroimmunol* 139: 102–108.

Zhu, Paul. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112: 1557–1569.