



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“Estandarización de técnicas serológicas para el análisis de  
reconocimiento del IFN- $\gamma$  natural producido por células  
mononucleares de sangre periférica”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADA EN  
BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA.

PRESENTA:

Anayeli Ramírez Hernández

Asesora: Dra. Gabriela Barcenás Morales

Co-asesor: Dr. Rainer Doffinger.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



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**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa 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 la: **Tesis y Examen Profesional**

**Estandarización de técnicas serológicas para el análisis de reconocimiento de IFN-g natural producido por células mononucleares de sangre periférica.**

Que presenta la pasante: **Anayeli Ramírez Hernández**

Con número de cuenta: **304298448** 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 13 de Enero de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
<b>VOCAL</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Gabriela Bárcenas Morales	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. René Damián Santos	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	

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

LMCF/cga\*

## AGRADECIMIENTOS

Primordialmente quiero agradecer a **mis padres** por su amor incondicional, esfuerzo, apoyo y confianza que me han entregado a lo largo de mi vida. Gracias mami por nunca dejarme caer, acompañarme y guiar mi camino; a ti papá por tu impresionante empeño y dedicación para que hoy pueda culminar esta etapa de mi vida, gracias a ambos por ser el sustento de mis anhelos, y por ser un excepcional ejemplo para mí.

A mi hermano **José Luis** porque tu apoyo y cuidado me han hecho llegar a mis metas, porque tú me has enseñado a ser una mejor persona y me has motivado en cada momento.

A mi hermano **Rene** que aunque no te encuentras hoy conmigo sé que me procuras y estarías feliz con este logro.

A mi tía **Abigail** por tu cuidado y cariño que siempre llevó en mi corazón.

A la **Dra. Gabriela Barcenás**, gracias por su orientación, conocimientos, paciencia y apoyo en la elaboración de este trabajo; a **Marcela** y **Pau** por su apoyo y contribuciones que me permitieron terminar esta tesis.

A la **UNAM** y **académicos** por abrirme las puertas al conocimiento.

A mis amigos porque un amigo es alguien que te conoce y te acepta tal y como eres, te acompaña en tus logros y fracasos, te engrandece en tus días más difíciles, y te perdona cuando olvidas sus nombres (pero esta vez no los olvide), hoy quiero agradecerles a ustedes: **Roberto, Alejandra, Dominik, Luis, Gabi, Josué, Juan Pablo, Consuelo, Fernando, y Emmanuel** por su apoyo, cariño, consejos, por alegrar mis días y porque conocerlos ha sido una sublime experiencia, pero sobre todo porque se convirtieron en una familia para mí, creo que no tengo palabras para expresarles mi cariño y decirles lo afortunada que me siento al tenerlos conmigo y compartir este logro con ustedes, los quiero mucho.

Y finalmente a **Dios** porque a pesar de todos los obstáculos, nunca me abandonas, siempre me das la solución y pones en mi camino a buenas personas que me extienden la mano

# ÍNDICE

	Pagina
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
RESUMEN .....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Interferones. ....	1
1.2. Funciones de los interferones.....	3
1.3. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).....	5
1.3.1. Síntesis de IFN- $\gamma$ .....	7
1.3.2. Receptor de IFN- $\gamma$ (IFN $\gamma$ R).....	8
1.3.3. Transducción de la señal por el receptor del IFN- $\gamma$ .....	9
1.4. El papel patofisiológico del IFN- $\gamma$ . ....	11
1.5. Auto-anticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones.....	13
1.6. Auto-anticuerpos contra IFN- $\gamma$ y susceptibilidad a infecciones. ....	14
1.7. Interacciones de antígenos-anticuerpos.....	15
1.8. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión (Luminex).....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS .....	22
4. OBJETIVOS .....	23
4.1. Objetivo General.....	23
4.2. Objetivos particulares. ....	23
5. METODOLOGÍA.....	24
5.1. Recolección de muestras.....	24

5.2. Purificación de células mononucleares de sangre periférica .....	26
5.2.1. Obtención de muestras sanguíneas y purificación de PBMC mediante un gradiente de densidad obtenidas de individuos clínicamente sanos.....	27
5.2.2. Conteo celular y evaluación de la viabilidad por exclusión del colorante Azul de Tripan.....	29
5.3. Estimulación celular <i>in vitro</i> .....	30
5.3.1. Preparación y conservación de los mitógenos empleados en la estimulación <i>in vitro</i> .	31
5.3.2. Estimulación celular <i>in vitro</i> de sangre completa y PBMC.....	35
5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida. ....	36
5.4.1. Detección de la presencia de IFN- $\gamma$ natural producido <i>in vitro</i> por PBMC y sangre completa, empleando la técnica SDS-PAGE.....	38
5.4.1.1. Preparación de geles SDS-PAGE. ....	39
5.4.1.2. Preparación y corrimiento de las muestras. ....	41
5.4.2. Tinción de geles de SDS-PAGE con azul de Coomassie.....	42
5.4.3. Análisis de geles por medio del programa analizador de imágenes KODAK GelLogic 100 System.....	42
5.4.4. Cálculo del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas.....	44
5.5. Técnica de ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay). ....	45
5.5.1. Determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ en sobrenadantes de cultivos de PBMC y de sangre completa, mediante la técnica de ELISA.....	47
5.5.2. Titulación de Streptavidina-HRP y anti-IFN- $\gamma$ biotinilado mediante la técnica de Dot-ELISA.....	50
5.5.3 Estandarización de la técnica de ELISA para el reconocimiento del IFN- $\gamma$ .....	52
5.6. Reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ por anticuerpos específicos mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión (Luminex). ....	54
5.6.1. Titulación de anticuerpos (anti IFN- $\gamma$ biotinilados).....	54
5.6.2. Ensayo de neutralización de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ para el reconocimiento del anti-IFN- $\gamma$ natural mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión.....	56

6. RESULTADOS .....	59
6.1. Muestras séricas. ....	59
6.2 Purificación y estimulación <i>in vitro</i> de PBMC y sangre completa. ....	59
6.3. Determinación de la presencia de IFN- $\gamma$ natural en sobrenadantes de PBMC mediante la técnica de electroforesis.....	62
6.4. Determinación de la producción <i>in vitro</i> de IFN- $\gamma$ natural presente en sobrenadantes de PBMC y sangre completa mediante la técnica de ELISA.....	70
6.5. Determinación de la dilución óptima de trabajo del anticuerpo anti-IFN- $\gamma$ biotinilado y de la estreptavidina-HRP mediante la técnica de Dot-ELISA. ....	73
6.6. Estandarización de la técnica de ELISA para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ natural presente en sobrenadantes de PBMC. ....	75
6.7. Reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ natural por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión (Luminex).....	78
6.7.1. Titulación de anticuerpos biotinilados contra IFN- $\gamma$ mediante la técnica de Luminex...78	
6.7.2. Ensayo de neutralización para evaluar el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ natural por auto-Anticuerpos presentes en muestras séricas empleando la técnica de Luminex....	84
7. DISCUSIÓN.....	90
8. CONCLUSIONES .....	98
9. REFERENCIAS .....	99
APÉNDICE .....	104

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti IFN- $\gamma$ .	25
<b>Tabla 2.</b> Preparación y concentración final de estímulos empleados en la estimulación <i>in vitro</i> de PBMC y sangre completa obtenidas de donadores clínicamente sanos.	34
<b>Tabla 3.</b> Análisis de las bandas identificadas en el corrimiento electroforético correspondientes a rh IFN- $\gamma$ y sobrenadantes de PBMC estimuladas de manera <i>in vitro</i> con PHA (10 $\mu$ g/mL) y Pokeweed (10 $\mu$ g/mL).	67
<b>Tabla 4.</b> Análisis de las bandas correspondientes a la citocina IFN- $\gamma$ en su forma recombinante y natural presente en los sobrenadante de PBMC estimuladas con PHA (10 $\mu$ g/mL).	69
<b>Tabla 5.</b> Valores de concentración y densidad óptica empleadas en la elaboración de la curva patrón para la cuantificación de la citocina IFN- $\gamma$ natural.	71
<b>Tabla 6.</b> Valores de densidad óptica (450 nm) obtenidos mediante la técnica de ELISA empleados en la interpolación en la curva patrón, para la determinación de la concentración de IFN- $\gamma$ natural en sobrenadantes de PBMC y células de sangre completa.	72
<b>Tabla 7.</b> Valores promedio de densidad óptica (490 nm) de anticuerpos anti IFN- $\gamma$ empleados para el reconocimiento de la citocina en su forma natural presente en sobrenadantes de PBMC, estimuladas de manera <i>in vitro</i> .	76
<b>Tabla 8.</b> Valores promedio de intensidad de fluorescencia $\pm$ DS obtenidos de la titulación de anticuerpos biotilnilados anti-IFN- $\gamma$ empleando la técnica de Luminex.	80
<b>Tabla 9.</b> Valores de IF $\pm$ SD y porcentaje de inhibición obtenidos mediante el ensayo de neutralización para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas.	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura y mecanismos de señalización del receptor del IFN- $\gamma$ .	10
<b>Figura 2.</b> Estructura y mecanismos de señalización del receptor del IFN- $\gamma$	16
<b>Figura 3.</b> Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).	19
<b>Figura 4.</b> Esquema de la distribución de los componentes sanguíneos para la purificación de células mononucleares empleando un gradiente de densidad (Ficoll-diatrizoato de sodio).	27
<b>Figura 5.</b> Esquema de la cámara de Neubauer.	30
<b>Figura 6.</b> Estimulación <i>in vitro</i> de PBMC empleando diversos mitógenos para la producción de IFN- $\gamma$ natural.	61
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de sobrenadantes de PBMC estimuladas <i>in vitro</i> con diferentes mitógenos.	64
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de sobrenadantes de PBMC estimuladas <i>in vitro</i> con diferentes mitógenos.	65
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida para la identificación de la citocina IFN- $\gamma$ natural en sobrenadantes de PBMC estimuladas <i>in vitro</i> .	69
<b>Figura 10.</b> Curva patrón para la determinación de la concentración de la citocina IFN- $\gamma$ natural en sobrenadantes de PBMC y células de sangre completa estimuladas con PHA.	71
<b>Figura 11.</b> Titulación del anticuerpo anti IFN- $\gamma$ biotinilado (R&D) y de la estreptavidina-HRP (ICN biomedical) mediante la técnica Dot-ELISA.	74
<b>Figura 12.</b> Representación gráfica de los valores promedio de densidad óptica (490 nm) de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , empleados para el reconocimiento de la citocina en su forma natural en sobrenadantes de PBMC, mediante la técnica de ELISA.	77
<b>Figura 13.</b> Determinación de la dilución óptima del anticuerpo Hu IFN- $\gamma$ biotinilado R&D empleando la técnica de Luminex.	81

<b>Figura 14.</b> Determinación de la dilución óptima del anticuerpo MAb Hu IFN- $\gamma$ Mabtech biotinilado empleando la técnica de Luminex.	82
<b>Figura 15.</b> Determinación de la dilución óptima del anticuerpo Mab Hu IFN- $\gamma$ Thermo biotinilado empleando la técnica de Luminex.	83
<b>Figura 16.</b> Valores promedio de IF $\pm$ SD obtenidos mediante el ensayo de neutralización para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ (20 $\mu$ g/mL y 2 $\mu$ g/mL) por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas, empleando la técnica de Luminex.	87
<b>Figura 17.</b> Valores de porcentaje de inhibición para el reconocimiento de la citocina rh IFN- $\gamma$ (20 $\mu$ g/mL y 2 $\mu$ g/mL) por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas.	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

auto-Ab	Auto anticuerpo.
Ab	Anticuerpo.
Ag	Antígeno.
Ag-Ab	Antígeno-anticuerpo.
BCR	Receptor de células B
BSA	Albúmina sérica bovina.
°C	Grados centígrados.
D.O.	Densidad óptica.
g	Gravedades
HCl	Ácido clorhídrico.
HRP	Peroxidasa de rabano picante.
IFN	Interferón.
IFN- $\gamma$	Interferón gamma.
rh IFN- $\gamma$	Interferón gamma recombinante humano
IL	Interleucina.
IF	Intensidad de fluorescencia.
kDa	Kilodaltones.
IN	Intensidad neta.
mL	Mililitro.
mpm	Marcador de peso molecular.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaCNB <sub>3</sub>	Cianoborohidruro de sodio.
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NK	Natural killer.
NO	Óxido nítrico.
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica.
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos.
PBS-T	PBS-Tween.
PE	Ficoeritrina.
pg	Picogramos
PVA	Poly(vinyl alcohol).

PVP	Poly(vinylpyrrolidinone).
Rf	Coeficiente de movilidad relativa
rpm	Revoluciones por minuto
Strep-HRP	Estreptavidina peroxidada.
Strep-PE	Estreptavidina-ficoeritrina.
TCR	Receptor de células T
UA	Unidades arbitrarias.
μg	Microgramo.
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 han incluido la susceptibilidad adquirida a infecciones por micobacterias debido a la presencia de auto-anticuerpos contra IFN- $\gamma$ ; 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-endocrino autoinmune-1, timoma y miastenia gravis (Meager y Wadhwa, 1003; Doffinger, *et al.* 2004, Hoflich, *et al.* 2004; Puel, *et al.* 2008; Kisand, *et al.* 2010; Puel, *et al.* 2010).

En el presente estudio se llevó a cabo la determinación de la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  humano natural producido por PBMC y células de sangre completa mediante la estimulación con Con A, LPS, LTA, PHA, PMA/IONO y Poweeked; la identificación de dicha citocina se realizó a través de la estandarización de las técnicas de electroforesis, ELISA y el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión (Luminex).

La evaluación de estimulación *in vitro* de PBMC demostró una mejor producción de la citocina IFN- $\gamma$  natural al emplear como mitógeno a la lectina PHA (10  $\mu$ g/mL), dicha producción se confirmó mediante la presencia de una banda correspondiente a la citocina IFN- $\gamma$  en geles de poliacrilamida, con un peso molecular de 16.8 kD y comparado con el control positivo rh IFN- $\gamma$  con un peso de 16.9 kD. Con respecto a las muestras estimuladas con sangre completa no fue posible visualizar la banda correspondiente a la citocina de interés en geles de poliacrilamida, sin embargo estas muestras fueron incluidas en la

cuantificación de los niveles de IFN- $\gamma$  natural empleando la técnica de ELISA (Kit Pelikine compac<sup>TM</sup>), en la cual se observó una mayor concentración de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de PBMC estimulados con PHA, con respecto a las muestras de sangre completa.

En la estandarización de la técnica de ELISA, se trabajaron los sobrenadantes obtenidos de la estimulación de PBMC con PHA, Pokeweed, y PMA/IONO, y se analizaron tres anticuerpos biotinilados, además de las muestras séricas positivas a auto-anticuerpos purificados contra IFN- $\gamma$  (S.M. y H.V.P.). Mientras que para el ensayo de neutralización mediante la técnica de luminex, se empleó un sistema de microesferas con estreptavidina y BSA (control negativo) acopladas, las muestras analizadas incluyeron los auto-anticuerpos anti IFN- $\gamma$  (R.S. y A.A.), y se evaluaron diferentes condiciones de trabajo incluyendo tres anticuerpos de captura biotinilados previamente titulados, así como el empleo de dos concentraciones (2  $\mu\text{g/mL}$  y 20  $\mu\text{g/mL}$ ) de rh IFN- $\gamma$  (controles positivos), además de los sobrenadantes de PBMC estimulados y no estimulados.

Los resultados obtenidos para ambas técnicas mostraron un débil reconocimiento del IFN- $\gamma$  natural presente en los diferentes sobrenadantes estimulados *in vitro*, por los anticuerpos anti-citocina analizados, debido a las bajas cantidades de esta citocina empleadas en ambos ensayos. Por otra parte, al evaluar las diferentes condiciones analizadas en el ensayo de neutralización se mostró un mayor porcentaje de inhibición por los auto-anticuerpos (R.S y A.A.), al emplear como anticuerpo de captura a Hu IFN. $\gamma$  biotin Mabtech y una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  del rh IFN- $\gamma$ . Por lo tanto, se determinó que para la estandarización de las técnicas de ELISA y luminex, la concentración de la citocina IFN- $\gamma$  es un factor crítico para su reconocimiento por los anticuerpos específicos analizados en este estudio, por lo que se estableció una concentración de al menos 2  $\mu\text{g/mL}$  para su reconocimiento efectivo en ambas técnicas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Interferones.

En 1957 Isaacs y Lindenmann identificaron una sustancia que confería a las células resistencia a ser infectadas por virus, dicha sustancia era producida por células de membrana coriónica cultivadas de manera *in vitro*, al ser enfrentadas con el virus de *Influenza A*. Posteriormente en colaboración con Valentine describieron a esta sustancia como *virus interference*, observando que ésta tenía la capacidad de inhibir la replicación viral dentro de la célula hospedera y que más tarde sus descubridores la denominaron interferón. Este interferón podía ser estable por 2 semanas a 2°C, termosensible a 56°C por una hora y no inactivado por anticuerpos séricos (Mata y Hernández, 2008; Ramos y Ramos, 2008).

Actualmente sabemos que los interferones (IFN's) son una familia de citocinas pleiotrópicas, de naturaleza proteica o glicoproteica producidas como respuesta a diversos estímulos, entre los que destacan las infecciones virales; éstos presentan funciones inmunorreguladoras, anti-proliferativas, con potencial anti-inflamatorio y con una actividad especie-específica (Mata y Hernández 2008; Ramos y Ramos, 2008).

La clasificación de los interferones está basada principalmente en las diferencias y similitudes de su estructura así como sus receptores diana, es así que se conocen tres tipos: a) interferones tipo I o clásicos que se dividen a su vez en IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\epsilon$ , b) el interferón tipo II o IFN- $\gamma$ , y c) los interferones tipo III o IFN- $\lambda$  (Borden, 2014).

Los interferones IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  son secretados por células infectadas por virus después del reconocimiento de componentes virales por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), ubicados en la superficie celular o dentro de las células. Estos interferones presentan similitud en su conformación estructural

en un 22%, lo que les permite compartir receptores celulares, factores de transcripción y mecanismos de acción (Luna, 2011).

El IFN- $\alpha$  humano es codificado por distintos genes que se localizan en el brazo corto del cromosoma 9, mientras que los genes de su receptor se localizan en el brazo corto del cromosoma 21. Es sintetizado principalmente por células mononucleares de sangre periférica, por lo cual es conocido como interferón leucocitario, presenta una naturaleza polipeptídica glicosilada, con pesos moleculares entre 16 y 23 kDa. Las subpoblaciones de células naturales productoras de interferón y células dendríticas plasmocitoides inmaduras (NIPC *Natural Interferon Producing Cells*; PDC *Immatura Plasmacytoid Dendritic Cells*), parecen ser las más especializadas para su producción (Avedaño, 2009).

Existen estudios que han enfatizado su actividad con niveles elevados en pacientes con Lupus eritematoso generalizado, sugiriendo que esta citocina puede contribuir a la patogénesis a través de la disminución de la tolerancia inmunológica y por tanto favorecer la autorreactividad. Por otra parte se han desarrollado tratamientos con IFN- $\alpha$  recombinantes en procesos antineoplásicos y anti-virales (Ramos y Ramos, 2008).

El IFN $\beta$  es una glicoproteína de 166 aminoácidos y es codificada por un sólo gen, compartiendo los mismos cromosomas que el IFN- $\alpha$ . Es producido por fibroblastos y células epiteliales. Estos interferones  $\alpha$  y  $\beta$ , son sintetizados en respuesta a virus e inductores de tipo I (dsRNA, ssRNA, dsDNA y constituyentes de la pared celular de procariontes), cumplen con un papel importante en la respuesta a infecciones virales agudas como mediadores de la respuesta viral inespecífica precediendo a la respuesta inmunitaria adaptativa, así mismo poseen actividades anti-proliferativas, anti-tumorales y efectos inmunomoduladores (Avedaño, 2009; Mata y Hernández, 2008; Ramos y Ramos 2008; Borden, 2014).

Los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  tienen afinidad por el mismo receptor y presentan mayor capacidad para inducir actividad antiviral que el IFN- $\gamma$ . El receptor para el

interferón tipo I presenta dos subunidades denominadas IFNR1 e IFNR2. Por su parte, el receptor para el interferon tipo II (IFN $\gamma$ R) es un complejo tetrámerico formado por dos tipos de cadena, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  (Avedaño, 2009; Mata y Hernández, 2008; Ramos y Ramos 2008; Borden, 2014).

El interferón gama (IFN- $\gamma$ ) o tipo II presenta una naturaleza glicoproteica y es producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, LT $\gamma/\delta$  y células NK (*Natural killer*), como respuesta a estímulos inmunológicos, ante la presencia de células tumorales o procesos inflamatorios. Recientemente se ha demostrado que células dendríticas, macrófagos y neutrófilos son capaces de producir esta citocina, a través de la estimulación con interleucina 12 (IL-12) e IL-18. Este interferón no comparte receptores con los interferones tipo I, está constituido por una proteína de 146 aminoácidos y actúan casi exclusivamente sobre las células del sistema inmunitario (Mata y Hernández, 2008; Borden, 2014).

Recientemente se han descrito los IFN's tipo III conocidos como IFN- $\lambda$  o IL-28/29, éstos presentan 3 subtipos: el IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), el IFN $\lambda$ -2 (IL-28A) y el IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), producidos por células epiteliales de la mucosa. Estructuralmente comparten características con los IFN's tipo I, pero difieren en la unión de su receptor de membrana, restringido a células epiteliales y células dendríticas plasmocitoides (pDCs, *Plasmacytoid Dendritic Cells*) (Borden, 2014).

## **1.2. Funciones de los interferones.**

La principal actividad antiviral de los interferones se debe al bloqueo de la síntesis de proteínas virales y la inducción de la apoptosis. Algunas proteínas que cumplen esta función son: la proteína cinasa R (PKR, *Protein Kinase R*) con capacidad de fosforilar a la unidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción, llamado eIF2, y así evitar que el ARN de transferencia (RNAt) se una a ribosomas, impidiendo la elongación del péptido; las proteínas Mx que tienen

actividad de GTPasas e inhiben a las polimerasas virales; y la adenosindeaminasa (ADAR, *Adenosine Deaminases Acting on RNA*) enzima que actúa sobre el dsRNA sustituyendo adenosinas con inosinas, provocando un efecto mutagénico en el virus (Gutiérrez, 2010).

De manera indirecta se ha descrito que los interferones estimulan en las células no infectadas la síntesis de proteínas antivirales como es la 2'5'-oligo adenilato sintasa, que sintetiza un 2',5'-oligoadenilato el cual se enlaza y activa a la ribonucleasa-L (RNasa-L) generando la degradación de RNA mensajeros (RNAm) virales. Esta función es llevada de forma especializada por los interferones tipo I (Gutiérrez, 2010).

Dentro de sus efectos inmunorreguladores, los interferones inducen la maduración y activación de células dendríticas, incrementa en las mismas la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) de clase I y II, citocinas y receptores de citocinas, así como moléculas coestimuladoras, lo cual facilita la presentación de antígenos y activación de células inmunológicas. En macrófagos y monocitos incrementan la expresión de TLR1, TLR2, TLR3 para el reconocimiento de dsRNA, TLR7/8 que reconocen ssRNA, y TLR9 que reconoce dsDNA; así como el aumento de su actividad microbicida y especies reactivas de óxido nítrico. El IFN- $\alpha$  disminuye la proliferación de linfocitos B (LB) y fibroblastos, además bloquea la producción de Ac desarrollada por los LB (Ramos y Ramos, 2008, Borden 2014; Rojas, 2006; Rojas 2012).

La actividad anti-proliferativa de los interferones fue identificada desde 1969 en modelos murinos por Gresser y colaboradores, y derivan en mecanismo inmunológicos y no inmunológicos. Los mecanismo inmunológicos directos se enfatizan en la propiedad de inhibir el crecimiento de células tumorales en diferentes etapas del ciclo celular mediada a través de los productos de genes estimulados por interferón, (ISG, *Interferon-Stimulated Genes*), que incluyen la síntesis de la cadena pesada  $\beta$ 2-microglobulina para la unión al péptido antigénico que llevan a cabo las MHC I, la síntesis de las subunidades (LMP-2 y

LMP-7) que conforman al proteasoma, así como los transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAP, *Transporter Associated with Antigen Processing*), y el factor trans-activador de MHC II (CIITA), éste último inducido por IFN- $\gamma$ . Además de sus efectos proapoptóticos a través de la inducción de componentes intracelulares que promueven la muerte celular programada.

Dentro de los mecanismos indirectos los IFN's tiene la propiedad de activar linfocitos T citotóxicos, NK y macrófagos, contribuyendo de manera indirecta a la destrucción de células tumorales. Por último, dentro de los efectos no inmunológicos los IFN's poseen una propiedad antiangiogénica mediada por la supresión de factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*, FGF), así como la inhibición del factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) (Ramos y Ramos, 2008, Borden, 2014).

Con respecto a la actividad anti-inflamatoria, Jacobs y colaboradores han mencionado el papel del IFN- $\beta$  como tratamiento en la esclerosis múltiple (EM), sus efectos se relacionan con su capacidad de inhibir la activación de células T *in vivo e in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*), así como inhibición la acción del IFN- $\gamma$  (Carretero, 2009; Ramos y Ramos, 2008).

### **1.3. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).**

Esta citocina fue aislada inicialmente en 1965 por Wheelock y colaboradores, del sobrenadante de cultivos de linfocitos que habían sido estimulados con fitohemaglutinina (PHA). Debido a su actividad sobre los macrófagos fue en algún tiempo denominada como factor activador de macrófagos. Este interferón es producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, LT $\gamma/\delta$ , así como por células NK. En los últimos años algunos estudios *in vitro* han demostrado que células dendríticas, macrófagos y neutrófilos también son capaces de producir IFN- $\gamma$ , a través de la estimulación con IL-12 e IL-18, dicha producción de este interferón por las células presentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cells*) juega un

papel importante actuando de manera autocrina en la activación de células circundantes. Su receptor es un complejo tetramérico formado por dos tipos de cadenas, una cadena alfa o IFN $\gamma$ R1 y una beta o IFN $\gamma$ R2, el cual se expresa en prácticamente todas las células nucleadas del organismo (Mata y Hernández 2008; Borden 2014, Ramos y Ramos, 2008).

El IFN- $\gamma$  regula la presentación de antígenos mediante el aumento de la expresión de moléculas MHC-I y MHC-II en APC, ampliando la capacidad para reconocer y presentar antígenos células T cooperadoras. Los macrófagos activados por IFN- $\gamma$ , aumentan su capacidad fagocítica y citotóxica al inducir la producción de radicales libre de oxígeno y nitrógeno. Otro mecanismo de regulación del IFN- $\gamma$  es la inducción de la apoptosis. Las células Th2 y las células T “naive” son sensibles a éste interferón porque expresan ambas cadenas del receptor de IFN- $\gamma$  y al unirse éste se induce apoptosis; en cambio la pérdida de la cadena IFN $\gamma$ R2 en las células Th1 hace a éstas células resistentes y en su lugar induce la proliferación de células Th1 (Mata y Hernández, 2008).

La activación de los macrófagos es un proceso complejo, que involucra el contacto con microorganismos o moléculas microbianas como lipopolisacáridos (LPS), ésteres de forbol, bacterias gram positivas inactivadas por calor, entre otros y que bajo la influencia de citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , son diferenciados en macrófagos clásicamente activados (M1), con capacidad de producir citocinas como IL-12, IL-18, IL-1 $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*), así como aumentar la expresión de moléculas MHC-II y CD86 que favorecen la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes y la diferenciación de células TCD4<sup>+</sup> en un perfil Th1. Esta diferenciación de linfocitos en un perfil Th1 es favorecida por la secreción de IL-12 e IL-18 producida por macrófagos y células dendríticas activadas. La IL-12 ejerce sus efectos mediante su receptor de alta afinidad (IL12R) expresado en células Th1, que señala a través de la vía JAK/STAT e involucra a los factores de transcripción conocidos como transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT, *Signal*

*Transducer and Activators of Transcription*) STAT-1, STAT-3 y STAT-4, que se asocian de manera directa o indirecta a la transcripción del IFN- $\gamma$ . Por otra parte citocinas como IL-18, IL-23 e IL-27 también potencian la capacidad de la IL-12 de inducir la producción del IFN- $\gamma$  por parte de la células Th1, creando así un sistema de retroalimentación positiva (Fainboin y Geffner, 2008; Arpa, 2008).

El IFN- $\gamma$  también aumenta la expresión de receptores para moléculas del complemento (C3b y C4b) en la superficie de macrófagos, aumenta la expresión de receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las IgG's y promueve el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (Ig's) en los linfocitos B, en la especie humana induce el isotipo IgG1 e IgG3, mientras que en ratones promueve los isotipos IgG2a e IgG3 (Arpa, 2008; Parham, 2006).

### **1.3.1. Síntesis de IFN- $\gamma$ .**

El gen que codifica al IFN- $\gamma$  humano está constituido por cuatro exones y tres intrones, localizado en el cromosoma 12, la forma biológicamente activa de esta citocina es un homodímero estabilizado por el entrecruzamiento de sus  $\alpha$ -helices mediante fuerzas covalentes. Es sintetizado como una proteína precursora de 166 aminoácidos, con un peso molecular de 17.1 kDa, sensible a pH 2 y a temperatura de 65 °C por 1 hora (Mata y Hernández, 2008).

La producción del IFN- $\gamma$ , es inducida por diversos mecanismos como son el entrecruzamiento de moléculas de superficie antígenos específicos, la activación del receptor de célula T (TCR, *T cell receptor*) y receptores de células NK, o por estimuladores de células T no específicos como PHA, concanavalina A, ésteres de forbol e ionóforos; también es estimulada por algunas citocinas, como IL-1, IL-2, IL-12, IL-18 y el factor estimulante de colonias 1 (CSF1, *Colony Stimulating Factor 1*). Por otra parte la expresión de IFN- $\gamma$ , es inhibida por glucocorticoides, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ , *Transforming Growth Factor  $\beta$* ), IL-4, IL-10, e inmunosupresores (Mata y Hernández, 2008; Rodríguez, 2015).

La producción de IFN- $\gamma$  se ve afectada por varios otros miembros de la respuesta inmunológica, a través de la acción de diversos factores de transcripción que activan o reprimen su expresión. La IL-12 aumenta la producción de IFN- $\gamma$  a través de la activación de STAT 4. Así mismo, la IL-18 (factor inductor de IFN) en conjunto con IL-12 exhiben un marcado sinergismo para la inducción de IFN- $\gamma$  en células T, aumentando la expresión del receptor de IL-18 en células productora de IFN- $\gamma$  y favoreciendo en los linfocitos T CD4+ la diferenciación en un perfil Th1 (Fainboin y Geffner, 2008; Rodríguez, 2015).

### **1.3.2. Receptor de IFN- $\gamma$ (IFN $\gamma$ R).**

La actividad biológica del IFN- $\gamma$  es mediada por su receptor, el cual se expresa en todas las células con excepción de los eritrocitos maduros y es especie-específico en la capacidad de unión a su ligando. Este receptor está constituido por dos subunidades, la subunidad IFN $\gamma$ R1 o cadena  $\alpha$  y la subunidad IFN $\gamma$ R2 o cadena  $\beta$ , cada una de ellas a su vez está integrada por dos proteínas. La cadena alfa o también conocida como cadena de unión al ligando o CD119W, es codificada en el cromosoma 6 y posee un peso molecular de 90 kDa; mientras de la cadena  $\beta$  o también denominada como cadena de transducción de señales o factor accesorio, es codificada en el cromosoma 21 y presenta un peso molecular de 60 kDa (Arpa, 2008; Mata y Hernández, 2008).

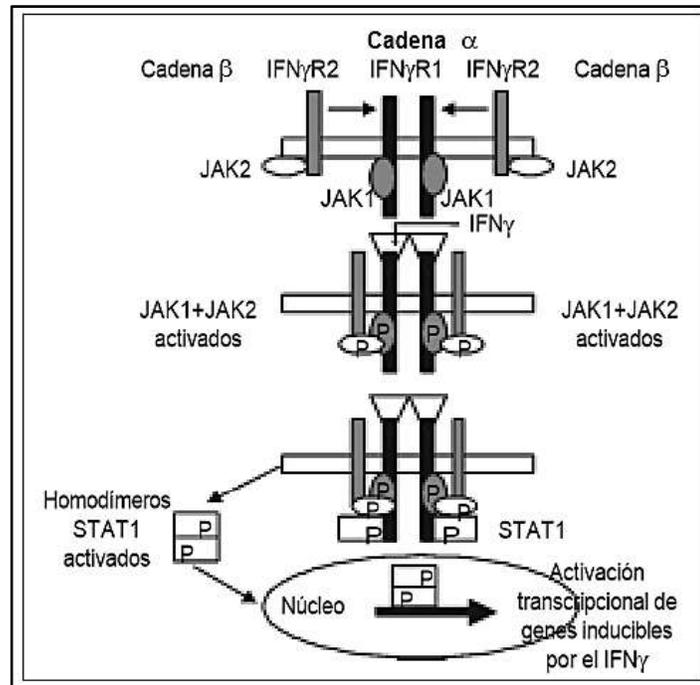
La porción extracelular de IFN  $\gamma$ R1 contiene el dominio de unión al ligando, mientras que la porción intracelular contiene los dominios necesarios para la transducción de señales y el reciclamiento del receptor. Por otra parte, la porción extracelular de IFN $\gamma$ R2 interacciona con el complejo IFN $\gamma$ R1/IFN- $\gamma$  y su porción intracelular es necesaria para la transducción de señales. En las células los niveles de expresión de estas cadenas difieren significativamente, debido a que las cadenas  $\alpha$  se expresan constitutivamente de forma moderada, a diferencia de las cadenas  $\beta$  cuyo nivel de expresión es bajo y regulado por estímulos

externos, así las cadenas  $\beta$  son un factor determinante para la proliferación o apoptosis celular ante la respuesta a IFN- $\gamma$  (Mata y Hernández, 2008).

### 1.3.3. Transducción de la señal por el receptor del IFN- $\gamma$ .

La unión de la citocina IFN- $\gamma$  a su receptor (IFN- $\gamma$ -IFN $\gamma$ R) permite que los dominios intracelulares de los receptores se aproximen induciendo la asociación con las tirosin cinasas, JAK 1 y JAK 2 de la familia de las *Janus Kinase*, esta unión tiene como resultado la fosforilación de la tirosina del IFN $\gamma$ R1 por las JAK y la transfosforilación de estas últimas. Posteriormente, se inicia la activación de la señalización mediante el reconocimiento de cada sitio de las tirosinas fosforiladas del IFN $\gamma$ R1, que sirven como sitios de acoplamiento para factores de transcripción conocidos como STAT, que se unen a través de sus dominios SH2 a la fosfotirosina del receptor. Los STAT asociados al IFN $\gamma$ R1 experimentan una fosforilación mediada por las cinasas JAK y se activan formando homodímeros de STAT1, que se translocan al núcleo, donde se unen a secuencias de activación de IFN- $\gamma$  (GAS, *gamma-interferon activated sequences*), activando un conjunto de genes estimulados por interferón (ISG, *interferón stimulated genes*), que conlleva a la transcripción de genes que poseen estas secuencias específicas en sus promotores (**Figura 1**).

Así mismo, la activación de la vía JAK/STAT por interferones, conduce a la regulación transcripcional de cientos de ISG, que tienen efecto sobre la producción de quimiocinas, citocinas y receptores que refuerzan la respuesta inmunológica contra patógenos. Por otra parte, la alteración de esta vía se asocia a enfermedades autoinmunes y al desarrollo de neoplasias (Duarte, 2010; Mata y Hernández, 2008; Owen, 2014).



**Figura 1. Estructura y mecanismos de señalización del receptor del IFN- $\gamma$**   
(Mata y Hernández, 2008).

Una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento pueden activar a STAT1, y su especificidad es dependiente del reclutamiento específico de STAT1 al receptor al IFN $\gamma$ R activado en la membrana plasmática y la inducción específica en el núcleo de la transcripción de ISG por los dímeros de STAT1. Sin embargo, además del mecanismo descrito previamente, el IFN $\gamma$  induce la transcripción a través de otras vías, algunas de las cuales requieren la expresión de nuevas proteínas celulares (Mata y Hernández, 2008).

Los genes que codifican para las JAK, STATS, los factores reguladores de interferon (IRF, *Interferon regulatory factors*) y el factor supresor de señalización de citocinas (SOCS, *Suppresors Of Cytokine Signaling*), son reguladas transcripcionalmente por IFN- $\gamma$ , estas vías pueden traslaparse generando un efecto antagónico o sinérgico sobre la producción de esta citocina.

Los SOCS que incluyen a SOCS1-SOCS7 y CEI, son proteínas que modulan la señalización por varios mecanismos, incluyendo la inactivación de las JAK,

mediante el bloqueo de los receptores de unión de STAT. Estudios en ratones SOCS1 (-/-), han revelado que la SOCS1 juega un papel importante en la inhibición del efecto del IFN- $\gamma$ , incluso en la presencia continua de esta citocina. Estos animales *knock-out* para SOCS mueren en etapas tempranas por la infiltración de macrófagos en varios órganos y múltiples anomalías hematopoyéticas. (Krebs, 2007).

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs, *Proteins Tyrosine Phosphatases*) también tiene un papel importante en la supresión de la señalización de JAK-STAT del IFN al provocar la desfosforilación y separación de los dímeros de STAT, que repercute en la actividad de células T, NK y células tumorales. Su inhibición puede prolongar la señalización y potenciar la actividad antitumoral de los interferones (Borden, 2014).

#### **1.4. El papel patofisiológico del IFN- $\gamma$ .**

El IFN- $\gamma$  se produce en grandes cantidades bajo circunstancias patológicas tales como trauma, inflamación, infección, cáncer y autoinmunidad. Su producción ante la respuesta inmunológica puede inhibir o potenciar la inflamación y causar daño tisular, a través de la inducción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), caspasa-1, gp91 phox y factores de transcripción pro inflamatorios como NF $\kappa$ B. Sin embargo, su acción depende del tipo celular y de citocinas que sinergizan (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\alpha$  o IL-18) o antagonizan (IL-4) sus efectos.

Inicialmente algunos estudios reportaron la presencia de altos niveles de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 en tejidos y sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, particularmente en las etapas tardías de la enfermedad. Así mismo, trabajos en modelos murinos han demostrado que el IFN- $\gamma$  es una citocina esencial para el desarrollo de nefritis lúpica, y que su aumento durante la

activación de la enfermedad puede estimular la producción de Ac IgG2 e IgG3, la cual empeora dicho cuadro de nefritis (Argyrios, 2001; Romero, 2009).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC), sus causas no son bien esclarecidas, pero se han identificado variantes asociadas con la respuesta inmunológica, sugiriendo la neurodegeneración como resultado de procesos inflamatorios. Dentro de los mecanismos inmunopatológicos de la EM podemos encontrar la activación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Entre las células T CD4<sup>+</sup> efectoras, las más importantes para la patogenia son las Th1 y Th17 con la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-17, respectivamente; estas citocinas contribuyen a la neuroinflamación y la expresión de moléculas MHC de clase I en las neuronas lesionadas regulada por la presencia de IFN- $\gamma$  (Quintana, 2014).

Además de estas patologías el IFN- $\gamma$  está asociado a la diabetes tipo I, que se desarrolla como consecuencia de la destrucción de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, debido al ataque crónico de un infiltrado inflamatorio autoinmune con gran cantidad de productos entre los que se encuentran citocinas y derivados de oxidación. Las citocinas pro-inflamatorias más destacadas y que tienen efectos directos sobre las células  $\beta$  son: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ; dentro de los efectos negativos del IFN- $\gamma$  en células pancreáticas  $\beta$ , se ha observado la reducción de la insulina ante su respuesta a la glucosa, la inducción de la expresión de iNOS, que en sinergia con la IL-1 $\beta$  conlleva a la producción de óxido nítrico (NO) el cual es citotóxico para los islotes pancreáticos, y por último el IFN- $\gamma$  influye en expresión de Fas en las células pancreáticas (Manrique y Silva, 2010).

### **1.5. Auto-anticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones.**

El término de autoinmunidad se refiere a una inapropiada respuesta inmunológica 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-reactivas, y están asociadas con la producción de auto-anticuerpos contra moléculas propias, terminando en inflamación y daño del tejido (Hewagama y Richardson 2009).

La presencia de auto-anticuerpos que tienen la capacidad de neutralizar los componentes principales del sistema inmunológico que son esenciales para activar los mecanismos de respuesta anti-microbiana, 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 (Bettelli *et al* 2008).

Las citocinas juegan un papel crítico en el proceso de montaje de las respuestas anti-microbiana, debido a su capacidad de regular el sistema inmunológico innato y adaptativo, en la polarización de las respuestas de células T, y actuando como moléculas efectoras. Por ejemplo, la 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 las citocinas 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, IL-10 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, los interferones de tipo I tienen un papel fundamental en la inmunidad antiviral y en la modulación de las respuestas de células B. Por lo tanto, se puede concebir que el desarrollo

de Ac 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).

### **1.6. Auto-anticuerpos contra IFN- $\gamma$ y susceptibilidad a infecciones.**

Evidencia reciente exalta la importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por auto-anticuerpos anti-citocinas. La presencia de altos títulos de auto-anticuerpos neutralizantes podrían causar una amplia variedad de posibles enfermedades que amenazan la vida del individuo (Maddur, 2010).

Actualmente existen estudios donde se reporta una correlación entre Ac neutralizantes contra el IFN- $\gamma$  e infecciones por micobacterias. Así mismo, las características clínicas de los pacientes con IgG anti-IFN- $\gamma$  son análogas a aquellos con defectos genéticos en la vía IFN- $\gamma$ /IL-12, que se caracteriza por una infección diseminada por micobacterias de baja virulencia, indicando que IgG anti-IFN- $\gamma$  induce un estado de inmunodeficiencia adquirida y de predisposición a infecciones por micobacterias; éstos auto-anticuerpos neutralizan el IFN- $\gamma$  en cultivos de sangre completa, inhiben la fosforilación de STAT-1 dependiente del IFN- $\gamma$ , y la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12 por PBMC y macrófagos (Zhang, *et al.* 2008).

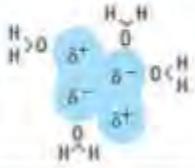
La diferenciación de las células Th1 y la producción de citocinas características de este perfil como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, tiene un papel crítico en la respuesta inmunitaria a las infecciones por micobacterias, y siendo una evidencia directa de como los auto-anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  y mutaciones en los receptores IFN $\gamma$ R1 y IFN $\gamma$ R2 pueden afectar la protección de la inmunidad contra micobacterias de baja virulencia, además de otras bacterias como *Salmonella typhimurium*, *Lysteria monocytogenes* y rara vez por parasitos como *Toxoplasma gondii* Por otra parte la neutralización de IFN- $\gamma$  por auto-anticuerpos bloquea a

los genes de respuesta de IFN- $\gamma$  y la expresión de HLA de clase II, que conlleva a una disminución del reconocimiento de antígenos por parte de las APC y aumento de la susceptibilidad a infecciones por patógenos extracelulares (Madariaga 1998; Meager 2003; Doffinger 2004; Hoflich 2004; Kampmann 2005; Patel 2005).

### **1.7. Interacciones de antígenos-anticuerpos.**

La interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ab) es un fenómeno que depende de la complementariedad química de los reactantes, ésta depende a su vez de la conformación tridimensional de las moléculas y de la carga de sus elementos constituyentes. Cuando tal interacción ha ocurrido se producen los complejos Ag-Ab, donde los reactantes se mantienen unidos a través de enlaces no covalentes reversibles como son puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas entre cadenas laterales de aminoácidos cargadas y las fuerzas de van der Waals. Más aun cada una de estas interacciones operan a distancias cortas, en consecuencia, una interacción Ag-Ab potente depende de una estrecha complementariedad entre ambos (**Figura 2**) (Rojas, 2006; Stock y Calderon, 2010; Owen *et al*, 2014).

Así mismo, las fuerzas o enlaces comprendidos en el reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos específicos comprenden interacciones electrostáticas entre cadenas laterales de aminoácidos cargadas, sin embargo, esta energía de enlace es baja (4 kcal/mol), comparada con la energía contenida en los enlaces covalentes (32-100 kcal/mol). Por lo tanto, la participación de los enlaces de baja energía en las reacciones Ag-Ab pueden deducirse porque los complejos inmunes son fácilmente disociados al someterlos a temperaturas cercanas a 60°C, al someterlos a altas concentraciones de sales, o bien por cambios extremos de pH que alteran la unión Ag-Ab al debilitar interacciones electrostáticas, éstos dos últimos principios se emplean en la purificación de Ag o Ab al utilizar la técnica de cromatografía de afinidad (Rojas-Espinosa, 2006).

Fuerzas no covalentes	Origen	
Fuerzas electrostáticas	Atracción entre cargas opuestas	$\ominus \text{NH}_3 \quad \ominus \text{COO}^-$
Enlaces de hidrógeno	Hidrógeno compartido entre átomos electronegativos (N, O)	$\begin{array}{c} > \text{N} - \text{H} \cdots \text{O} = \text{C} < \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$
Fuerzas de van der Waals	Las fluctuaciones de nubes de electrones alrededor de moléculas polarizan de modo opuesto átomos vecinos	$\begin{array}{c} \delta^+ \quad \delta^- \\ \delta^- \quad \delta^+ \end{array}$
Fuerzas hidrofóbicas	Los grupos hidrofóbicos 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 2. Fuerzas no covalentes que mantienen unido el complejo antígeno-anticuerpo.** Los antígenos interactúan con los anticuerpos a través de enlaces no covalentes de baja energía, estos enlaces incluyen los enlaces hidrofóbicos, las interacciones entre dipolos donde las cargas parciales se encuentran como dipolos  $\delta^+$  o  $\delta^-$ , los puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals. 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 Ag-Ac, sólo operan en rangos muy cortos (Kenneth, 2009; Rojas-Espinosa, 2006).

Los anticuerpos 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 Ab, más favorables son las interacciones que se forman entre el complejo Ag-Ab 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 Ab. Típicamente las superficies proteínicas son reconocidas por una superficie complementaria presente en el sitio de combinación del Ab (Delves, 2014).

La afinidad de un Ab se refiere a la energía de enlace potencial contenida en cada uno de los sitios de combinación del anticuerpo y en ella participan todas las posibles interacciones con el Ag. Estas a su vez están determinadas por el

número y tipo de grupos químicos reactivos presentes en el sitio de combinación. La avidéz se refiere más bien al grado de interacción entre un Ab y su Ag homólogo, ésta es influida por la estructura y la distribución espacial de los reactantes (Rojas-Espinosa, 2006).

### **1.8. Ensayo de arreglo de microparticulas en suspensión (Luminex).**

El ensayo de luminex es un sistema basado en citometría de flujo, que utiliza partículas de poliestireno con un diámetro de 5.6  $\mu\text{m}$  (llamadas microesferas), empleadas como un soporte sólido para un inmunoensayo convencional, sin embargo, éste se realiza en suspensión y posee la capacidad de medir diferentes analitos específicos en una sola muestra. Las microesferas son clasificadas en regiones y pueden ser identificadas con una proporción particular de dos fluorocromos y cada región de microesferas se emplea para detectar un parámetro individual, actualmente hasta 100 parámetros individuales pueden ser medidos simultáneamente en una sola etapa del ensayo.

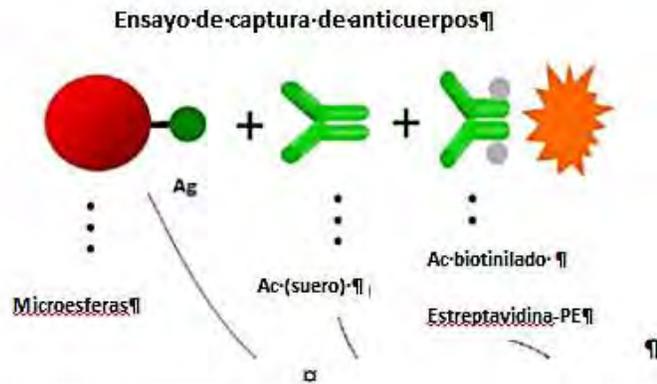
Las microesferas se detectan utilizando un flujo de dos láseres del citómetro, un láser excita los colorantes internos que identifican la región de cada microesfera y el segundo láser excita el colorante informador capturado durante el ensayo. La sensibilidad de este método es comparable a un ELISA convencional y permite investigaciones complejas usando muy pequeñas alícuotas de reactivos para realizar el ensayo.

El principio básico de esta técnica se basa en la técnica de inmunoensayo, por ejemplo al emplear una citocina recombinante de estudio acoplada covalentemente a las microesferas teñidas internamente, permite que dichas microesferas reaccionen con la muestra problema (que puede o no contener auto-anticuerpos anti-citocina), empleando una microplaca con filtro de fondo como soporte. Posteriormente a través de una serie de lavados se eliminan los elementos no unidos específicamente, seguido de la adición de un Ac de detección biotinilado específico, a su vez a estreptavidina-ficoeritrina (Strep-PE)

es añadida para unirse a los anticuerpos de detección biotinilados en la superficie de la microesfera (**Figura 3, Panel A**).

Después de la última incubación y lavado, el contenido de cada pozo de la 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 a 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 3, Panel B**).

Panel A



Panel B

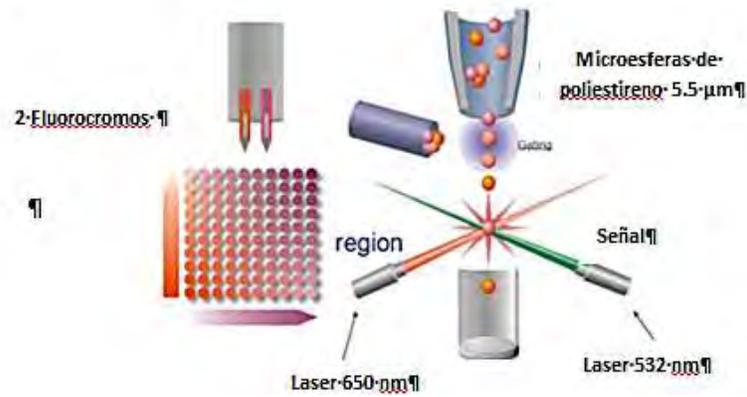


Figura 3. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex). **Panel A** Inmunoensayo indirecto para la detección de auto-anticuerpos contra los diferentes mediadores químicos. **Panel B** Microesferas codificadas ópticamente utilizando una mezcla de diferentes colorantes que son decodificados por un citómetro de flujo (Araujo, 2011).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La importancia de las inmunodeficiencias secundarias (adquiridas) causadas por altos niveles de auto-anticuerpos 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; Maddur, 2010, Browne y Holland, 2010).

La presencia de auto-anticuerpos neutralizantes contra citocinas en pacientes con diversas patologías, proveen una visión interesante hacia una conexión poco esclarecida entre la respuesta autoinmune y la predisposición a enfermedades infecciosas. Es así, que considerando la importancia que tienen los mediadores químicos como las citocinas en el desarrollo y la regulación de la respuesta inmunológica contra infecciones, el presente estudio se enfocó en el análisis y reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  natural, dando continuidad a los estudios realizados hasta el momento que han relacionado a dicha citocina con enfermedades autoinmunes, así como la presencia de auto-anticuerpos anti-IFN $\gamma$  que conllevan a la predisposición a enfermedades infecciosas.

Por lo tanto, resulta de gran interés determinar las condiciones adecuadas para la obtención de IFN- $\gamma$  natural mediante la estimulación de PBMC y sangre completa, para su posterior análisis y reconocimiento mediante el desarrollo y estandarización de las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay*), electroforesis (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) y el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión (Luminex) basado en citometría de flujo, que nos permitan lograr la identificación de la citocina IFN- $\gamma$  natural, para que en estudios futuros se determine su reconocimiento por auto-anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  presentes en muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes y/o autoinmunes.

La disponibilidad de este tipo de ensayos permitirá en un futuro realizar un análisis más claro y preciso para poder esclarecer la función de dichos auto-anticuerpos presentes en este tipo de muestras séricas, así como su aplicación en otras especies.

### 3. HIPÓTESIS

La estandarización del reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  natural producida *in vitro* por PBMC y células de sangre completa mediante las técnicas de ELISA, SDS-PAGE y luminex, permitirá realizar en futuros estudios la detección y el análisis de auto-anticuerpos contra esta citocina en pacientes con enfermedades autoinmunes e infecciones atípicas o recurrentes.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General.

Determinar la presencia de IFN- $\gamma$  humano natural producido por PBMC y sangre completa de individuos clínicamente sanos, mediante su reconocimiento por anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  empleados en la estandarización de las técnicas de ELISA, SDS-PAGE y el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión (Luminex), para su posterior empleo en la caracterización del IFN- $\gamma$ .

### 4.2. Objetivos particulares.

- 4.2.1. Realizar la purificación y obtención de PBMC de donadores clínicamente sanos empleando un gradiente de densidad.
- 4.2.2. Analizar y comparar la producción de IFN- $\gamma$  natural en el ensayo de estimulación *in vitro* de PBMC y células de sangre completa de humanos clínicamente sanos, empleando diferentes mitogénos.
- 4.2.3. Determinar la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural en el corrimiento electroforético de los sobrenadantes obtenidos de la estimulación *in vitro* de PBMC y sangre completa de individuos clínicamente sanos.
- 4.2.4. Cuantificar los niveles de IFN- $\gamma$  presente en sobrenadantes de PBMC y células sangre completa mediante la técnica de ELISA, empleando un kit comercial.
- 4.2.5. Determinar las condiciones óptimas de trabajo para la estandarización de las técnicas de ELISA y SDS-PAGE, para la identificación de la citocina IFN- $\gamma$  natural.
- 4.2.6. Realizar el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  natural por auto-anticuerpos presente en muestras séricas a través de un ensayo de neutralización empleando la técnica de luminex.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Recolección de muestras.

Las muestras sanguíneas donadas de pacientes clínicamente sanos se obtuvieron mediante punción venosa con sistema al vacío empleando como anticoagulante tubos con heparina, de esta forma fueron utilizadas para la obtención de PBMC y de sangre completa, para posteriormente realizar la estimulación *in vitro* de ambas.

Por otra parte las muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  empleados en la técnica de ELISA y el ensayo de neutralización por la técnica de luminex, fueron donadas por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.), las cuales provenían de pacientes con características clínicas a infecciones atípicas o recurrentes causadas por bacterias, virus y hongos, así como de pacientes con enfermedades autoinmunes, dichas muestras se enlistan en la **Tabla 1**.

Muestra sérica	Intensidad de fluorescencia (IF)	Datos clínicos
Suero A.A.	24,233	Infección diseminada con infecciones recurrentes por micobacterias no tuberculosas, linfadenopatía generalizada, fiebre y esputo.
Suero H.V.P	17,887	Infección por micobacterias, candidiasis mucocutánea crónica, e infección diseminada.
Suero S.M.	26, 327	Proteinosis alveolar pulmonar, candidiasis mucocutánea crónica, infección por mycobacterium no tuberculosa, infecciones secundarias oportunistas e infecciones virales.
Suero R.S.	16, 129	Bronquiectasias, infección con pseudomonas, linfopenia, timoma y poliendocrinopatías.

**Tabla 1. Muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti IFN- $\gamma$ .** Estas muestras fueron proporcionadas y cuantificadas por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.).

## 5.2. Purificación de células mononucleares de sangre periférica.

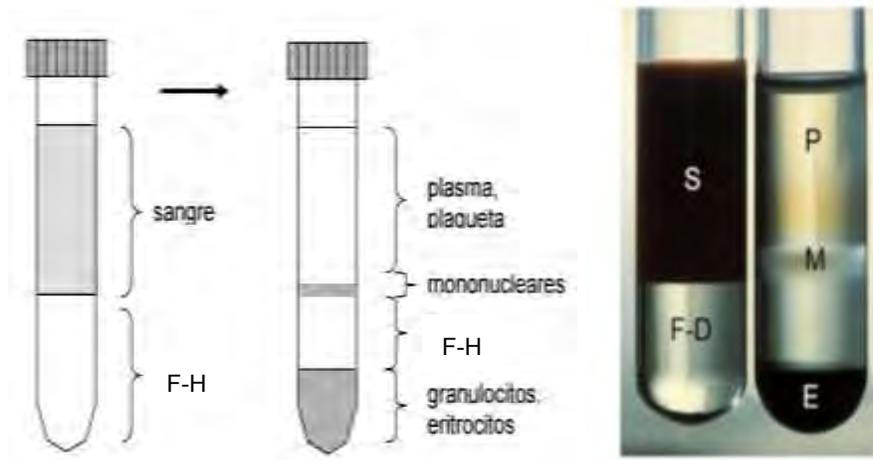
La proliferación de PBMC como respuesta a la estimulación con diferentes mitógenos utilizados en la experimentación, tuvo como paso previo la purificación de las PBMC, obtenidas a partir de la centrifugación de la muestra de sangre heparinizada sobre un gradiente de densidad discontinuo, cuyo medio consiste en una mezcla de Ficoll y diatrizoato de sodio con una densidad de  $1.077 \text{ g/cm}^3$ . Este método es utilizado comúnmente para la obtención de preparaciones enriquecidas de células mononucleares (Lomonte, 2009).

El Ficoll es un polímero sintético de sacarosa y epíclorhidrina (400,000 daltons), soluble en agua, que aglutina a los eritrocitos facilitando su sedimentación. Por otra parte, el diatrizoato de sodio es un compuesto, que al ser mezclado con el Ficoll forma soluciones de baja viscosidad y alta densidad, su función es proveer la densidad óptima para la separación y a la vez la osmolaridad adecuada para mantener la viabilidad de las células (Lomonte, 2009).

De tal manera que este método se fundamenta en la estratificación de una muestra de sangre sobre el Ficoll-diatrizoato que al centrifugar permite la separación de las PBMC de las demás células debido a diferencias de densidad. Los eritrocitos se aglutinan y sedimentan al fondo, seguidos de los granulocitos que también sedimentan por su tamaño, densidad y tendencia a formar agregados; posteriormente los mononucleares por su menor densidad se quedan en la interfase entre el plasma y el medio, con una contaminación relativamente baja de plaquetas y otros tipos celulares, que son eliminados con soluciones balanceadas o con el medio a utilizar en la prueba en particular (**Figura 4**). Este procedimiento permite recuperar cerca de un 50% de los linfocitos presentes en la muestra, con una viabilidad mayor al 90%, que es determinada mediante la exclusión con azul de tripán (Lomonte, 2009).

El azul de tripán es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas, y permite evaluar la viabilidad de

las células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas integrales (Facultad de Medicina UASLP, 2011).



**Figura 4. Esquema de la distribución de los componentes sanguíneos para la purificación de células mononucleares empleando un gradiente de densidad (Ficoll-diatrizoato de sodio).** Se observa la formación de capas y sus componentes antes (izquierda) y después (derecha) de la migración diferencial durante la centrifugación (Lomonte, 2009).

### **5.2.1. Obtención de muestras sanguíneas y purificación de PBMC mediante un gradiente de densidad obtenidas de individuos clínicamente sanos.**

1. De un individuo se obtuvieron aproximadamente 10 mL de sangre por venopunción mediante sistema Vacutainer en tubos con heparina (BD Vacutainer SodiumHeparin, No. Cat. 367874) y se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL.
2. La sangre heparinizada se diluyó 1:2 con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, *Phosphate Solución amortiguadoraed Saline*) estéril a pH 7.2-7.4 y 0.1% de albumina sérica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*) mezclando por inversión.
3. Se agregaron 3 mL de Ficoll Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich No. Cat. H8889, No. Lot. RNBB9249) a dos tubos cónicos de 15 mL.

4. Cuidadosamente se depositaron aproximadamente 10 mL de sangre diluida sobre la solución de Ficoll-Histopaque en cada tubo con una micropipeta de 1 mL.
5. Los tubos se centrifugaron a 450 g (1800) rpm durante 40 min a temperatura ambiente (Centrífuga refrigerada HeraeusBiofuge Primo R).
6. Se colectaron las PBMC de la interfase del Plasma/Ficoll con una micropipeta y se depositaron en un tubo nuevo de 15 mL, adicionando suficiente PBS hasta llegar a 15 mL. Cuando fue necesario, las células polimorfonucleares (PMN) se colectaron de la superficie del paquete celular de los glóbulos rojos y se realizó el mismo tratamiento de lavados que a las PBMC que a continuación se detalla.
7. Centrifugar las PBMC a 450 g (1800 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente.
8. El sobrenadante se descartó por inversión y se agregaron 15 mL de PBS al 0.1% BSA y se centrifugó a 450 g (1800 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
9. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5.5 mL de RPMI-1640 suplementado\*, volumen a partir del cual se llevó a cabo el conteo celular y se determinó la concentración de células.

\*Medio RPMI 1640-Suplementado (RPMI-S) con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*) (No. Cat. 103703, No. Lot. 4825H y filtro de 0.22  $\mu$ m), L-glutamina y 25 mM Hepes (GIBCOBRL, No. Cat.22400-089)

### 5.2.2. **Conteo celular y evaluación de la viabilidad por exclusión del colorante Azul de Tripan.**

1. Se diluyeron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular en 10  $\mu\text{L}$  de Azul de Tripan 0.4% (Factor de dilución 1:2).

Nota: Evitar la exposición de las células al Azul de Tripan 0.04% (GIBCOBRL, No. Cat.15250-061) por un período de más de 5 minutos, ya que es posible observar un incremento en la población de células muertas (Azul de Tripan positivo) debido a su toxicidad.

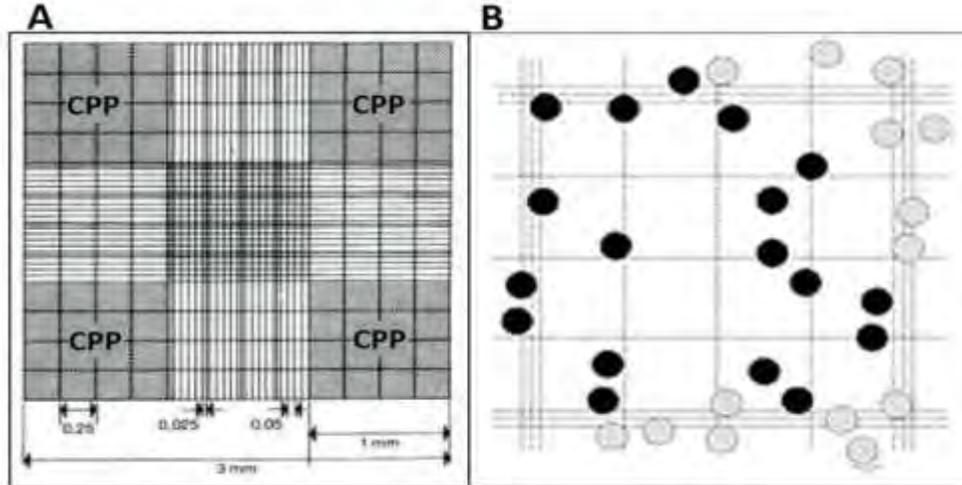
2. Llenar la cámara de Neubauer con 10  $\mu\text{L}$  de la dilución anterior, para llevar a cabo el conteo celular en los 4 cuadros primarios periféricos (CPP) de la cámara (**Figura 5, Panel A**).
3. Se contaron las células no teñidas (viables), omitiendo aquellas que se encontraban teñidas (no viables).

Así mismo, para realizar el conteo celular se tomaron en cuenta las células que se encuentren dentro de los 16 cuadros secundario periféricos (CSP) que constituyen a cada uno de los CPP, además de las que toquen la primera y segunda línea periférica del lado superior e izquierdo, no contando a las que rebasen la segunda y tercera línea periférica del lado derecho e inferior, como se muestra en la **Figura 5, Panel B**.

4. Una vez realizado el conteo celular se dividió entre 4 el total de número de células contadas (es importante contar al menos 40 células en cada cuadrante). Éste valor promedio se multiplica por el factor de dilución (1:2) y por 10,000 para calcular el número de células por mL. Los datos se sustituyeron en la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\text{Células contadas}}{4}\right) (\text{Factor de dilución})(10,000) = \text{Células/mL}$$

Nota: Para obtener el número total de células en la estimulación *in vitro* es necesario considerar el volumen (mL) de la resuspensión celular de trabajo.



**Figura 5. Esquema de la cámara de Neubauer. Panel A.** Esquema de los cuatro cuadros primarios periféricos (CPP) presentes en la cámara de Neubauer. **Panel B.** Esquema de conteo celular dentro de los 16 cuadros secundarios periféricos (CSP) considerando para el conteo los círculos negros y no contables los círculos blancos.

### 5.3. Estimulación celular *in vitro*.

Los linfocitos pueden ser inducidos a dividirse, mediante una variedad de estímulos, su capacidad de realizar mitosis *in vitro* se ha utilizado como un criterio para evaluar la funcionalidad de los mecanismos de activación celular y proliferación durante las respuestas inmunológicas en el organismo.

Los estímulos mitogénicos en cultivo se pueden dividir en tres grupos principales: a) activación por antígenos del MHC alogénicos, por ejemplo la técnica del cultivo mixto de linfocitos, b) activación por un Ag exógeno como son estructuras o productos de bacterias, hongos y virus, además de haptenos, en organismos que estuvieron o no previamente expuestos al mismo *in vivo*; y c) activación por mitogénos policlonales, tales como algunas lectinas vegetales como lectina de *Phytolacca Americana* (*Pokeweed*), la fitohemaglutinina (PHA) y la Concanavalina A (Con A), entre otros (Lomonte; 2009).

En el presente estudio se llevó a cabo la estimulación *in vitro* de PBMC y sangre completa empleando diferentes mitógenos, que fueron preparados y conservados de acuerdo a las especificaciones del productor, las cuales se indican de forma más específica en los párrafos posteriores.

### **5.3.1. Preparación y conservación de los mitógenos empleados en la estimulación *in vitro*.**

- 1) **Ácido Lipoteicoico (LTA, Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*):** Se preparó una solución concentrada de LTA (SIGMA, L2515, No. Lot. 017k4004) a 2.5 mg/mL en PBS estéril, realizando alícuotas de 100  $\mu$ L por vial para su posterior almacenamiento a -20 °C hasta su fecha de caducidad o hasta que exista contaminación. Para la estimulación se empleó una concentración final de 50  $\mu$ g/mL por pozo, para esto se recomienda adicionar 100  $\mu$ L de la solución concentrada a 900  $\mu$ L de medio y, finalmente agregar 50  $\mu$ L de esta solución de trabajo a cada pozo, para llevar a un volumen final de 250  $\mu$ L/pozo.
  
- 2) **Concanavalina A (Concanavalin A from *Canavalia ensiformis*):** Se preparó una solución concentrada de Con A a 5 mg/mL (SIGMA, C0412, No. Lot. 090M870V) en PBS estéril, realizando alícuotas de 10  $\mu$ L por vial y almacenando a -20 °C hasta la fecha de caducidad o hasta que exista contaminación. Para la estimulación se empleó una concentración final de 1  $\mu$ g/mL por pozo, para esto se adicionaron 10  $\mu$ L de la solución concentrada a 990  $\mu$ L de medio y, finalmente agregar 50  $\mu$ L de esta solución de trabajo a cada pozo, para llevar a un volumen final de 250  $\mu$ L/pozo.

- 3) **Fitohemaglutinina (PHA-P, Lectin from *Phaseolus vulgaris*):** Se preparó una solución concentrada de PHA (SIGMA, L8754, No. Lot. 25F-9640) a 5 mg/mL en PBS estéril, evitando la filtración después de la reconstitución. Se realizaron alícuotas de 50  $\mu$ L/vial de la solución concentrada y se almacenaron en refrigeración (2 a 8 °C), siendo estable durante un año o hasta que exista contaminación. Para la estimulación se empleó una concentración final de 10  $\mu$ g/mL por pozo, para esto se preparó una solución de trabajo mezclando 10  $\mu$ L de la solución concentrada y 990  $\mu$ L de PBS estéril y, finalmente agregar 50  $\mu$ L de esta solución a cada pozo, para llevar a un volumen final de 250  $\mu$ L/pozo.
- 4) **Lipopolisacarido (LPS, Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*):** Se preparó una solución concentrada de LPS (SIGMA, 4391, No. Lot. 127K4037) a una concentración de 1 mg/mL en PBS estéril, realizando alícuotas de 10  $\mu$ L por vial y almacenando a -20 °C hasta la fecha de caducidad o hasta que exista contaminación. Para la estimulación se empleó una concentración final de 1  $\mu$ g/mL por pozo, para esto se recomienda adicionar 5  $\mu$ L de la solución concentrada a 1 mL de medio y, finalmente agregar 50  $\mu$ L de esta solución de trabajo a cada pozo, para llevar a un volumen final de 250  $\mu$ L/pozo.
- 5) **PMA/IONO (Phorbol-12-Myristate-13-acetate/Ionomycin calcium salt from *Streptomyces conglobatus*):** Se preparó por separado una solución concentrada de PMA (SIGMA, P-1585, No. Lot. SLBJ4560V) a una concentración de 1 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) y una solución concentrada de IONO (SIGMA, I-0634, No. Lot. 054M4022V) a una concentración de 1 mg/mL en DMSO, realizando alícuotas de 10  $\mu$ L por vial de cada una de ellas y almacenando a -20 °C hasta la fecha de caducidad o hasta que exista contaminación. Para la estimulación se empleó a una concentración final de 1 ng/mL por pozo y de 1  $\mu$ g/mL por

pozo de PMA y IONO, respectivamente. Para PMA se realizó una dilución previa de 1:1,000, es decir se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de la solución concentrada a 999  $\mu\text{L}$  de PBS estéril (Solución pre-trabajo). Para adicionar ambos mitógenos a los pozos se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de la solución concentrada de IONO y 50  $\mu\text{L}$  de la solución pre-trabajo de PMA a 945  $\mu\text{L}$  del medio y, finalmente agregar 50  $\mu\text{L}$  de esta solución de trabajo a cada pozo, para llevar a un volumen final de 250  $\mu\text{L}$ /pozo.

- 6) ***Pokeweed (Lectin from *Phytolacca americana*)***: Se preparó una solución stock (SIGMA, L877, No. Lot. 110M77102V) a 5 mg/mL en PBS estéril, realizando alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  por vial y almacenando a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la fecha de caducidad o hasta que exista contaminación. Para la estimulación se empleó a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por pozo, para esto se recomienda adicionar 10  $\mu\text{L}$  de la solución stock a 990  $\mu\text{L}$  de medio, y finalmente agregar 50  $\mu\text{L}$  de esta solución de trabajo a cada pozo, para llevar a un volumen final de 250  $\mu\text{L}$ /pozo.

Nota: La preparación de estos estímulos se resume en la **Tabla 2**.

No.	Mitógenos	Concentración de la solución concentrada	Solución de trabajo		Concentración final/pozo
			Volumen de la solución concentrada $\mu\text{L}$	Diluyente (RPMI-S) $\mu\text{L}$	
1	Lipotechoic acid from <i>Staphylococcus</i> (LTA)	2.5 mg/mL	100	900	50 $\mu\text{g/mL}$
2	Concanavalina A (Con A)	5 mg/mL	10	990	10 $\mu\text{g/mL}$
3	Lectin from <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)	5 mg/mL	10	990	10 $\mu\text{g/mL}$
5	Lipopolysaccharides from <i>E. coli</i> (LPS)	1 mg/mL	5	995	1 $\mu\text{g/mL}$
8	PMA	1 mg/mL	1	999	----
	PMA	1 $\mu\text{g/mL}$ (Solución Pre-Trabajo)	50	945	10 ng/mL
	IONO	1 mg/mL	5		1 $\mu\text{g/mL}$
9	Lectin from <i>Phytolacca americana</i> (Pokeweed)	5 mg/mL	10	990	10 $\mu\text{g/mL}$

**Tabla 2. Preparación y concentración final de estímulos empleados en la estimulación *in vitro* de PBMC y sangre completa obtenidas de donadores clínicamente sanos.**

### **5.3.2. Estimulación celular *in vitro* de sangre completa y PBMC.**

La estimulación de PBMC y sangre completa se llevó a cabo en placas para cultivo celular de 96 pozos (Placas con fondo plano, estériles, CELLSTAR® Greiner Bio-one, No. Cat.655180), tomando como controles negativos a aquellas células incubadas únicamente con el medio (RPMI-S) sin la adicción de los estímulos y sometidas a las mismas condiciones de trabajo.

1. A los pozos designados para la estimulación con los diferentes mitógenos se agregaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de cada una de las soluciones de trabajo.
2. Se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  y 200  $\mu\text{L}$  de RPMI-S para los pozos con estímulos y sin estimular, respectivamente.
3. Posteriormente se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de sangre completa heparinizada o 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular en cada pozo, hasta obtener un volumen final de 250  $\mu\text{L}$ /pozo.
4. Se incubó a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad.
5. Los sobrenadantes fueron recolectados a las 48 hrs evitando tomar células, y para su conservación se mantuvieron a -20°C (para periodos menores de 1 mes) o a -70°C (para periodos más prolongados). Finalmente se determinó la presencia y concentración de IFN- $\gamma$  producido empleando las técnicas de electroforesis y ELISA, respectivamente.

Nota: Para el análisis de los sobrenadantes se recomienda evitar su descongelación en más de tres ocasiones.

#### 5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La electroforesis es una técnica que se basa en la migración de moléculas iónicas bajo la influencia de un campo eléctrico, estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo, y dependen de una combinación de la carga, peso molecular y estructura tridimensional de la molécula en estudio. Los métodos electroforéticos permiten la separación de mezclas complejas como ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas, presentando alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad (Morales, et. al. 2006).

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es la electroforesis en gel de policacrilamida (PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis*) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS, *sodium docecyl sulfato*), dicha técnica es conocida como SDS-PAGE (Morales, et al. 2006).

El sistema SDS-PAGE de Laemmli es un sistema discontinuo que consiste en un gel de concentración superior y un gel de separación inferior, los cuales presentan diferentes valores de pH y concentraciones de poliacrilamida. El gel de concentración superior tiene un menor porcentaje de poliacrilamida permitiendo que las proteínas presentes en las muestras se muevan a través de éste en forma rápida, formando una banda estrecha antes de entrar en el gel de separación que contiene un mayor porcentaje de poliacrilamida. Este gel de separación puede ser optimizado dependiendo del rango de tamaño de las moléculas presentes en las diferentes muestras analizadas (Brunelle, 2014).

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: son químicamente inertes, transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos, de porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. Se forman como resultado de la polimerización de la acrilamida y su entrecruzamiento con N-N-metilen bisacrilamida, la formación del poro dependerá de las concentraciones

relativas de ambos reactivos durante la polimerización. Para el comienzo de la polimerización de la acrilamida es necesario el uso de un iniciador como es el persulfato de amonio, además añadir aminas terciarias, como el N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED), como catalizador de esta reacción, que causa la formación de radicales libres del persulfato dando inicio a la polimerización (Palomar, 2013; Morales y Gallo 2006).

El SDS es un detergente utilizado en el corrimiento electroforético, que desnaturaliza las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas y afecta sus interacciones con otras moléculas, ya que estas interacciones son sustituidas por interacciones SDS-proteína. El SDS elimina la carga intrínseca del péptido ante su exceso de carga negativa, como consecuencia la carga de todas las moléculas será prácticamente idéntica y su desplazamiento en un campo eléctrico en un gel de determinada porosidad dependerá exclusivamente de su masa molecular (Palomar, 2013; Morales y Gallo, 2006).

Las condiciones de la muestra previas al corrimiento electroforético pueden ser desnaturalizantes, utilizando agentes reductores que producen el desplegamiento de la proteína y la pérdida de su organización tridimensional característica de su funcionalidad, tal es el caso del 2-mercaptoetanol el cual provoca que los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios se disocien, perdiéndose la estructura terciaria o cuaternaria y separando a las unidades polipeptídicas individualmente. Por lo tanto la ausencia de reductores se traduce en que si las proteínas poseen puentes disulfuro, el SDS sólo producirá una desorganización parcial de la estructura, manteniendo sin desplegar la zona que abarca los enlaces disulfuro intercatenarios. Así mismo, se añaden compuestos que aumentan la densidad de la muestra como son el glicerol o sacarosa, además de marcadores electroforéticos como el azul de bromofenol para determinar el frente del corrimiento electroforético (Morales y Gallo, 2006).

Al finalizar el corrimiento electroforético de las muestras, éstas pueden ser visualizadas mediante la adición de colorantes específicos. El colorante azul de Coomassie es comúnmente empleado en la determinación de proteínas cuando

son abundantes, pero no para la determinación de proteínas trazas; es un colorante aniónico que se une de manera inespecífica a residuos de serina de las proteínas y precipita a los componentes en la posición en la que se encuentran.

Este colorante permite detectar cantidades desde 0.1 a 0.5  $\mu\text{g}$  de proteínas en una banda fina. Dado que el colorante es preparado con metanol-ácido acético, la fijación de las proteínas y su coloración ocurren al mismo tiempo, la presencia de un medio ácido permite la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos aminos de las proteínas formando complejos que son mediados por fuerzas de Van der Waals. (Palomares, 2013; Morales, 2006, Carrillo, 2013).

#### **5.4.1. Detección de la presencia de IFN- $\gamma$ natural producido *in vitro* por PBMC y sangre completa, empleando la técnica SDS-PAGE.**

Las PBMC poseen propiedades de crecimiento adherentes, que bajo ciertas condiciones de cultivo son capaces de producir diferentes mediadores químicos como son las citocinas. Como se ha mencionado anteriormente, en este estudio empleamos diferentes mitógenos con el fin de lograr la estimulación de estas células para la producción de la citocina IFN- $\gamma$  natural. Es así que para la identificación del IFN- $\gamma$  natural presente en los sobrenadantes de PBMC purificadas y de células de sangre completa estimuladas, se llevó a cabo el desarrollo y la estandarización de la técnica de SDS-PAGE. La presencia de la banda correspondiente a dicha citocina fue identificada de acuerdo a su tamaño molecular al compararse con el uso de marcadores de peso molecular (*Low Molecular Weight Calibration Kit*, Biotech No. Cat.17-0446-01-01), y con la citocina IFN- $\gamma$  en su forma recombinante (rh- IFN- $\gamma$ , IMMUKIN No. Lote 107661D) empleada como control positivo.

#### 5.4.1.1. Preparación de geles SDS-PAGE.

1. Se realizó la elaboración de las siguientes soluciones: Solución amortiguadora de corrida para electroforesis, pH 8.3 (ver Apéndice).
2. Se empleó un sistema de geles discontinuos de acuerdo al procedimiento de Laemmli empleando un gel de separación al 12%, un gel de concentración al 4% y la solución amortiguadora de corrida pH 8.3.
3. Las cantidades de las soluciones amortiguadoras y de los reactivos se mezclaron y se vertieron al molde de la cámara de electroforesis. Para la preparación del gel de separación y de acuerdo al número de geles que se trabajaron, se utilizaron las siguientes cantidades:

<i>Reactivo</i>	<i>1 gel</i>	<i>2 geles</i>
Acrilamida/bis acrilamida (solución de monómeros)	1.8 mL	3.3 mL
Amortiguador tris-HCl 1.5m, pH 8.8	1.5 mL	2.75 mL
Solución de SDS al 10%	60.0 µL	110.0 µL
Agua destilada	2.61mL	4.78. mL
TEMED	3.0 µL	5.5 µL
Persulfato de amonio al 10%	30.0 µL	55.0 µL
<b>Volumen total</b>	6.003 mL	11.005 mL

Para llenar la cámara con el gel de separación se utilizaron 4.3 mL de la mezcla, el sobrante se empleó para monitorear el momento en que el gel se encuentra totalmente polimerizado. Posteriormente se adicionó una capa de isopropanol sobre el gel de separación con el cuidado de no perder la interfase.

4. Posterior a la polimerización del gel de separación se realizaron lavados con agua destilada hasta eliminar la capa de isopropanol y se adicionó la

mezcla correspondiente al gel de concentración. De acuerdo al número de geles que se requirieron se utilizaron las siguientes cantidades:

<b>Reactivo</b>	<b>1 gel</b>	<b>2 geles</b>
Acrilamida/bis acrilamida (solución de monómeros)	400.0 µL	600 µL
Amortiguador tris-HCl 1.5m, pH 6.8	1.0 mL	1.51mL
Solución de SDS al 10%	40.0 µL	60.0 µL
Agua destilada	2.54mL	3.815 mL
TEMED	4.0 µL	6.0 µL
Persulfato de amonio al 10%	20.0 µL	30.0 µL
<b>Volumen total</b>	<b>4.004 MI</b>	<b>6.021 mL</b>

Para llenar la cámara con el gel de concentración se utilizaron 2.0 mL, el sobrante se utilizó para monitorear el momento en que el gel se encuentra totalmente polimerizado.

5. Posterior al llenado de la cámara con el gel de concentración, colocar el peine para que de esta forma los carriles queden definidos y retirar éste cuando el gel haya polimerizado o antes de su uso. En caso de no realizar el corrimiento electroforético los geles se conservan en refrigeración llenando la cámara interior con solución amortiguadora de corrimiento.

#### 5.4.1.2. Preparación y corrimiento de las muestras.

1. Antes del corrimiento electroforético se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes recolectados de PBMC en tubos de poliestireno de 100  $\mu\text{L}$  debidamente etiquetados y se concentraron de 10 a 15  $\mu\text{L}$  a una temperatura de 30°C, empleando la centrifuga LABCONCO.
2. Posteriormente se agregó el mismo volumen de solución digestora (ver Apéndice) a las muestras concentradas, mezclando y llevando a ebullición en baño maria durante 3 minutos.
3. Transferir la cámara de electroforesis al tanque en la orientación correcta, con el electrodo positivo alineado con el positivo del tanque y el electrodo negativo alineado con el negativo del tanque.
4. El tanque interno se llenó con solución amortiguadora de corrida para electroforesis cubriendo los carriles a llenar, mientras que el tanque externo se llenó hasta la línea de llenado máximo (1200 mL).
5. Dejar enfriar las muestras y depositarlas en los carriles del gel de concentración con un volumen de 20 a 30  $\mu\text{L}$ /carril. En un carril adyacente colocar los marcadores de peso molecular, con el fin de tomarlos de referencia y poder identificar los pesos moleculares de las proteínas presentes en las muestras. Así mismo, en otro carril depositar el rh IFN- $\gamma$ .
6. Colocar la tapa y conectar los electrodos a la fuente de poder.
7. La electroforesis se corrió a 70 volts/35mA durante el corrimiento en el gel concentrador, y al entrar al gel separador se aumentó a 150 volts/65mA, hasta el momento en que el colorante marca el final del gel de separación (cuando el frente del colorante se encuentre a aproximadamente 1 cm de la parte inferior, apagar la fuente de alimentación).  
*Importante:* Desconectar el cable de alimentación de la fuente de poder antes de retirar la tapa.
8. Retirar la cámara de electroforesis y desechar la solución amortiguadora de la cámara interna, mientras que la solución amortiguadora de la

cámara externa puede ser recolectado y almacenado en refrigeración (2-8°C) para su posterior empleo.

9. Aflojar los tornillos de presión para liberar las placas de vidrio y hacer una ligera acción de palanca entre las placas de vidrio.

#### **5.4.2. Tinción de geles de SDS-PAGE con azul de Coomassie.**

1. Con el gel desprendido de las placas de vidrio, cortar el gel concentrador del gel separador y colocar este último en la solución desteñidora I (ver Apéndice) durante 8-12 horas.
2. Una vez transcurrido el tiempo sacar cuidadosamente y colocar durante 2 horas en la solución desteñidora II (ver Apéndice) en agitación constante hasta que el colorante en el gel se elimine y las bandas de proteínas se distingan perfectamente.

#### **5.4.3. Análisis de geles por medio del programa analizador de imágenes KODAK GelLogic 100 System.**

##### **a) Captura de la imagen e identificación de bandas.**

1. Seleccionar con un doble clic el icono del programa Kodak ID 3.6 en el escritorio.
2. Cuando se abre la aplicación seleccionar el botón de Captura GL-100 y se muestra la ventana de captura.
3. Abrir la puerta deslizante en la parte inferior de la caja y colocar el gel en el centro de la caja de luz.
4. Cerrar la puerta deslizante y encender el transiluminador.
5. Utilizar el cuadro desplegable “Type” para establecer el tipo de transiluminación y escoger “White Light Transillumination”.

6. Dar clic en el botón "*Preview*" y la imagen del gel debe aparecer en la ventanilla de la parte superior izquierda.
7. En caso de ser necesario ajustar el *zoom* y la *apertura del obturador* directo de la parte superior de la cámara.
8. Cuando se tiene la exposición correcta, dar clic en el botón "*Capture*" (justo debajo del botón *Preview*). En un momento, la pantalla de vista previa debe cerrarse y aparecer una nueva pantalla con el gel imagen.
9. Para guardar esta imagen dar click en el botón guardar y el archivo se almacena en un formato (BIP), que es reconocido por el Software Kodak.
10. Para exportar la imagen en formato *JPEG* dando click en el cuadro de diálogo "*File>Export data >Image*"; y seleccionar *Guardar como*, eligiendo la ubicación en la que desee guardar el archivo y desplegar el recuadro "*Tipo*" para seleccionar "*JPEG Files \*.jpg*" (se debe considerar que para realizar el análisis de del gel debe guardar la imagen en el formato BIP).
11. Una vez capturada la imagen dar click al ícono "*Select image*" y seleccionar el área que comprende el gel completo.
12. Una vez seleccionada la imagen dar click en la pestaña *Lanes* y seleccionar el botón "*Find Lanes*", el programa detecta automáticamente los carriles donde se corrió la muestra. Para modificar el número o posición de las líneas de los carriles dar click en el botón "*Adjust lanes*" y seleccionar la forma automática o manual para el número y alineación de las líneas.
13. Una vez ajustadas las líneas de los carriles dar click en el botón "*Find bands*" el programa detecta automáticamente las bandas donde se encuentre la muestra corrida.

**Nota:** Para tinciones con Azul de Coomassie no debe usarse filtro y debe colocarse el transiluminador de luz blanca.

## b) Análisis de bandas.

1. Una vez identificadas las bandas en la imagen dar click en el menú desplegable “*Options*” y después en “*Lane Analysis Data*”.
2. Se muestra una ventana con los datos de las bandas seleccionadas, dar doble click sobre el encabezado de la columna que corresponda al standard de peso molecular (Marcador PM) para abrir la ventana “*Lane Information*”; en el menú desplegable “*Lane Type*” seleccionar estándar y después dar click en el botón “*Select*” y escoger el standard correspondiente a la muestra. Para el caso de proteínas escoja: “*Protein MW Std High Range.std*” y dar click en “*Select*”. Introducir en el campo “*Total Mass in Lane*” la cantidad de  $\mu\text{g}$  correspondientes al inserto del standard de peso molecular.
3. La columna y marcadores de bandas se muestran de un color diferentes para ser identificadas, dar click en *Display* y seleccione la casilla “*Molecular Weight*”, para determinar el peso molecular de las muestras analizadas. De la misma forma, es posible analizar la movilidad relativa de las proteínas y la intensidad neta de las bandas correspondientes a las muestras de interés, seleccionando las casillas “*Mob*” y “*Net Int*” respectivamente.

### 5.4.4. Cálculo del coeficiente de movilidad relativa (Rf) de las proteínas.

1. La movilidad relativa de las proteínas contenidas en las muestras consiste en el desplazamiento que tienen éstas con respecto a la distancia total que se corre la muestra, y se obtiene con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la proteína (banda)}}{\text{Distancia total recorrida por la muestra}}$$

2. Para determinar el peso molecular de las proteínas presentes en las muestras analizadas es necesario elaborar una curva patrón que muestre el logaritmo de los pesos moleculares de los estándares (eje de las Y) e interpolar la movilidad relativa de estas proteínas en el gel de poliacrilamida (eje de las X), para obtener una relación lineal.

### **5.5. Técnica de ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay).**

El ensayo por inmunoadsorción ligado a una enzima (ELISA, (*Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*), es una técnica inmunoenzimática ampliamente utilizada en la cuantificación de diversas moléculas de interés, que se basa en la inmovilización de un Ag o Ab solubles a una matriz sólida y su reconocimiento con el reactante complementario a través de una unión específica Ag-Ab. Esta reacción es evidenciada por el empleo de marcadores enzimáticos unidos al Ag o al Ab que en presencia del sustrato enzimático y un cromógeno se produce una reacción catalítica dando un producto colorido soluble y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro, permitiendo así determinar la concentración o el nivel de Ag o Ab que es proporcional a la intensidad de color producida. Existen diferentes tipos de ELISA comúnmente empleados para la determinación de Ag como es el caso de los tipos directo y sandwich, y los que permiten identificar Ab como son el tipo Indirecto y el Competitivo (Stock y Calderon, 2010, Rojas-Espinosa, 2006).

Estos ensayos inmunoenzimáticos presentan ventajas por su elevada especificidad dada por los anticuerpos y la estabilidad de las enzimas utilizadas, son económicos, sencillos y con una gran variedad de sustratos y cromógenos que incrementan su versatilidad. La detectabilidad de estos ensayos puede incrementarse usando métodos de amplificación no inmunológico, como son el sistema avidina-biotina, estreptavidina-biotina y/o cascadas enzimáticas; y los inmunológicos como el sistema peroxidasa-antiperoxidasa.

La avidina, una glicoproteína presente en la clara de huevo que tiene una marcada afinidad por la biotina, una vitamina de bajo peso molecular, mientras que la estreptavidina es una proteína producida por las bacterias del género *Streptomyces*. La afinidad entre estos sistemas es  $10^6$  veces mayor que la mostrada por la unión común Ag-Ac. La biotina puede unirse a un Ac de forma covalentemente a través de un grupo amina, carboxilo o sulfhídrico, y dada la afinidad biotina-avidina, se genera una amplificación de la respuesta por cada molécula del Ac unido a la biotina (Ochoa, 2012; Guzmán, 2004).

Para definir la enzima de elección como marcador ésta debe unirse fácilmente al Ag o al Ac, encontrarse en estado puro, presentar estabilidad en forma libre y conjugada, ser soluble y tener un sustrato cromogénico de fácil preparación y estable después de finalizar la reacción. Las enzimas comúnmente utilizadas en ensayos inmunoenzimáticos incluyen a la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina, la  $\beta$ -galactosidasa, la ureasa, la anhidrasa carbónica, entre otras. (Ochoa, 2014).

Los ensayos inmunoenzimáticos incluyen el uso de soluciones de bloqueo con moléculas inertes inmunológicamente (albúmina, gelatina, caseína o leche descremada) que permiten saturar los sitios no ocupados en el soporte sólido y evitar la adsorción inespecífica de otros reactantes. Por otra parte los factores físicos como el pH y la fuerza iónica que permiten la reacción Ag-Ac son controlados mediante el uso de solución amortiguadoras (Rojas-Espinosa, 2006).

### **5.5.1. Determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ en sobrenadantes de cultivos de PBMC y de sangre completa, mediante la técnica de ELISA.**

Para la determinación de los niveles de IFN- $\gamma$  natural en los sobrenadantes de cultivos de PBMC y de sangre completa, se llevó a cabo la técnica de ELISA empleando un kit comercial disponible (Pelikine compac<sup>TM</sup> human IFN- $\gamma$ , No. Cat. M1933), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cabe mencionar que sólo se realizó la cuantificación de los sobrenadantes considerando sólo el empleo de PHA (10 $\mu$ g/mL) y se empleó una concentración de PBMC de  $1.5 \times 10^6$  cél/mL para la estimulación *in vitro*.

#### **a) Preparación de la curva de calibración.**

Para la elaboración de la curva de calibración, se empleó una solución de IFN- $\gamma$  estándar proporcionada por el kit, la cual ha sido calibrada frente al estándar internacional de la WHO (*World Health Organization*), 1Unidad WHO = 53 pg IFN- $\gamma$ . El kit contiene un vial liofilizado del estándar con 4,500 pg/mL IFN- $\gamma$  natural humano.

1. Reconstituir el vial de IFN- $\gamma$  estándar liofilizado agregando 500  $\mu$ L de agua destilada, mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Después de la reconstitución preservar en refrigeración de 2-8°C, y después de su uso conservar en congelación a -18°C o preferentemente a -70°C.
2. Etiquetar 7 tubos para cada una de las siguientes concentraciones: 500, 200, 80, 32, 12.8, 5.1 y 2.0 pg/mL
3. Agregar 600  $\mu$ L de la solución amortiguadora *working-strenght HPE-dilution* en el tubo etiquetado para la dilución de 500 pg/mL y 300  $\mu$ L para los tubos restantes.

- Transferir 75  $\mu$ L de la solución estándar de IFN- $\gamma$  (4,500 pg/mL) al tubo etiquetado para 500 pg/mL, mezclar y transferir 200  $\mu$ L de esta dilución al segundo tubo marcado como 200 pg/mL y repetir este último paso para las siguientes diluciones.
- Incluir un tubo etiquetado como 0 pg/mL adicionando sólo la solución amortiguadora *working-strenght HPE-dilution*.

Nota: Para la cuantificación de las muestras se recomienda diluir estas 1:2 con solución amortiguadora *working-strenght HPE-dilution*. Si se esperan muestras con niveles altos de IFN- $\gamma$  que se encuentren fuera de la curva de calibración, se recomienda realizar diluciones adicionales como 1:10 o 1:50. Los valores de IFN- $\gamma$  en suero y plasma fresco de individuos clínicamente sanos son menores a 10 pg/mL.

#### **b) Ensayo para la determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ .**

- Realizar una dilución 1:100 mezclando 120  $\mu$ L del Ac de revestimiento en 12 mL de solución amortiguadora de revestimiento (ver Apéndice) y adicionar 100  $\mu$ L de esta solución a todos los pozos, cubrir e incubar la microplaca toda la noche de 18-25°C.
- Después de la incubación eliminar el contenido de la placa y realizar 4 lavados con 300  $\mu$ L/pozo de solución de PBS, y finalizar los lavados aspirando el exceso presente en los pozos.

Nota: es importante atemperar los reactivos antes de su uso a 18-25°C, con excepción de la estreptavidina-peroxidada (Strep-HRP) la cual debe mantenerse a -18 a -32°C para asegurar su estabilidad.

- Realizar una dilución 1:50 de la solución de bloqueo empleando como diluyente PBS y adicionar a todos los pozos 200  $\mu$ L, cubrir la placa, agitar suavemente e incubar a de 18-25°C por 2 horas.
- Preparar la solución amortiguadora *working-strength HPE-dilution* adicionando 15 mL de la solución amortiguadora concentrada *HPE-*

*dilution* en 60 mL de agua destilada, esta solución se emplea para diluir las muestras, así como estándar IFN- $\gamma$ .

5. Preparar las diluciones de la curva estándar como se indica en la sección anterior, evitando más de 3 ciclos de congelación y descongelación del estándar de IFN- $\gamma$ . Además de realizar una dilución 1:5 para las muestras a analizar.
6. Realizar 5 lavados con 300  $\mu$ L/pozo de la solución de lavado (ver Apéndice) y al finalizar los lavados aspirando el exceso presente en los pozos.
7. Adicionar por duplicado 100  $\mu$ L/pozo de las muestras a analizar, así como de las diluciones para la curva estándar, dejando los pozos correspondientes al blanco de sustrato vacíos y por último cubrir, agitar e incubar la placa a 18 a 25°C por una hora.
8. Repetir los lavados descritos en el paso 6.
9. Preparar el Ac biotinilado a una dilución 1:100 adicionando 120  $\mu$ L de éste a 12 mL de *working-strength HPE-dilution* y adicionar 100  $\mu$ L a todos los pozos, dejando los pozos correspondientes al blanco vacíos. Cubrir, agitar e incubar la placa a 18-25°C por una hora.
10. Repetir los lavados descritos en el paso 6.
11. Diluir 3  $\mu$ L de la esteptavidina-HRP con 30 mL de *working-strength HPE-dilution* justo antes de su empleo y agregar 100  $\mu$ L a todos los pozos, dejando los pozos correspondientes al blanco vacíos. Cubrir, agitar e incubar la placa a 18-25°C por 30 minutos.
12. Repetir los lavados descritos en el paso 6.
13. Aproximadamente 10 minutos antes de su uso preparar la solución sustrato (ver Apéndice) evitando su exposición a la luz y adicionar 100  $\mu$ L de ésta a todos los pozos, incluyendo los pozos correspondientes a los blancos. Cubrir, agitar e incubar la placa a 18-25°C por 30 minutos en la oscuridad.

14. Adicionar 100  $\mu$ L de la solución de paro ( $H_2SO_4$  a 1.8 M) a todos los pozos (después de detener la reacción esta es estable por 30 minutos máximo) y finalmente leer la placa a 450 nm en un lector de ELISA.
15. Calcular la cantidad de IFN- $\gamma$  en las muestras.

### **5.5.2. Titulación de Streptavidina-HRP y anti-IFN- $\gamma$ biotinilado mediante la técnica de Dot-ELISA.**

La técnica Dot-ELISA, es un inmunoensayo en la fase sólida altamente versátil para la detección de un Ac o Ag. El método permite detectar proteínas (antígenos en solución) tras su fijación sobre membranas de nitrocelulosa (NC), y su identificación mediante la adición de Ac específicos que pueden estar marcados con enzimas o el uso de Ac secundarios especie específicos. Dicha técnica utiliza pequeñas cantidades de reactivo y permite la fijación de proteínas con gran avidez y por lo tanto, la detección de componentes que se encuentran en pequeñas cantidades en una mezcla compleja, que se visualizan como puntos (Dot) de color sobre una membrana de NC tras la adición de un sustrato cromogénico precipitable. Es una técnica cualitativa, no necesita equipo de lectura, y es posible analizar diferentes muestras (Albrechtsen, 2006)

Para el estudio y reconocimiento del IFN- $\gamma$  mediante la técnica de ELISA fue necesario determinar las diluciones óptimas de Streptavidina-peroxidada (ICN biomedicals, No. Lot. 6429C) y del antisuero policlonal IFN- $\gamma$  (R&D Systems, No. Cat. BAF285, No. Lot. ZX1314101), empleando la técnica de Dot-ELISA como se describe a continuación:

a) Fijación del antígeno.

1. Cortar y colocar cuidadosamente discos de Nitrocelulosa (NC) en una microplaca de poliestireno de 96 pozos (NUNCTM Brand Products, No. Cat 439454).
2. Empleando como Ag el rh-IFN- $\gamma$  (IMMUKIN No. Lot.107661D) depositar cuidadosamente 5  $\mu$ L en el centro de la membrana de NC, evitando perforar la misma. Repetir el mismo procedimiento utilizando como blanco PBS en la membrana contenida en los pozos correspondientes e incubar a 37°C la placa aproximadamente por 10 min o hasta que se absorban ambos reactivos y la NC seque, y mantener en refrigeración a 4°C toda la noche.

b) Ensayo

3. Después de la incubación realizar 3 lavados/1 min cada uno con 200  $\mu$ L/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T), eliminando la mayor cantidad de éste aspirando por vacío evitando perforar los discos de NC.
4. Añadir 200  $\mu$ L/pozo de solución de bloqueo PBS-T- BSA 2%, agitar la placa a 500 rpm por 10 minutos en el agitador (Thermo-Shaker mrc) e incubar a 37 °C/2 hrs.
5. Repetir el paso 3 con lavados de 3 minutos cada uno.
6. Se realizaron 2 diluciones, 1:100 y 1:500 de anti-IFN- $\gamma$  biotinilado empleando como diluyente la solución Pre-bloqueadora PBS-BSA al 0.5% y se adicionaron 100  $\mu$ L/pozo de cada dilución a los pozos correspondientes. En este mismo paso se adicionaron 4 membranas de NC (para las columna 3 y las filas A, B, D y E) y se adicionaron 5 $\mu$ L de estas diluciones a los pozos correspondientes dejando difundir en toda la superficie de la membrana.
7. Agitar a 500 rpm por 10 minutos e incubar a 37°C/2 hrs.

8. Repetir el paso 3 con lavados de 3 minutos cada uno.
9. Para la titulación de la Streptavidina-HRP se realizaron 2 diluciones 1:100 y 1:500 empleando como diluyente la solución Pre-bloqueadora, y dispensando 100  $\mu$ L a cada uno de los pozos correspondientes. Posteriormente incubar a 37 °C/40 minutos. A partir de este paso cubrir la placa de la luz.
10. Repetir el paso 3 con lavados de 3 minutos cada uno.
11. Para el revelado disolver una tableta de 3,3'-Diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB, SIGMA, No. Cat. D5905) en 15 mL de solución amortiguadora-Tris a pH 7.6, justo antes de su uso agregar 12  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno al 30% (Sigma Product, No. Cat. H-1009) mezclar y adicionar 200  $\mu$ L/pozo, cubrir la placa de la luz con papel aluminio agitar levemente la placa y esperar la aparición de color.
12. Detener la reacción aproximadamente a los 30 minutos o cuando en la membrana correspondiente al blanco inicie la aparición de color.
13. Realizar de 2 a 3 lavados con PBS o agua destilada y aspirar el exceso, dejando secar los discos de NC.

### **5.5.3 Estandarización de la técnica de ELISA para el reconocimiento del IFN- $\gamma$ .**

- 1) Previamente a la fijación de los sobrenadantes de PBMC estimuladas con PHA, así como los sobrenadantes no estimulados empleados como control negativo, se tomaron 600  $\mu$ L de cada uno y se concentraron a un volumen de 20  $\mu$ L aproximadamente para posteriormente adicionar 530  $\mu$ L de solución amortiguadora de carbonatos 0.05M a pH 9.6 (BBC) (ver Apéndice). Para el caso de la citocina rh IFN- $\gamma$  (IMMUKIN, No. Lot. 107661D) empleada como control positivo se trabajó con una concentración de 2 $\mu$ g/mL. Así mismo, se utilizaron como blanco aquellos pozos sin antígeno y con BBC.

1. En una microplaca de poliestireno de 96 pozos (NUNC™ Brand Products, No. Cat 439454) se depositaron por duplicado 50  $\mu$ L de estas diluciones y blancos, y se llevó a incubación a 37°C/2 hrs, seguida de una incubación de 4°C toda la noche.
2. Posteriormente se descartó el contenido de la placa y se realizaron 3 lavados/1 min a 650 rpm cada uno con 350  $\mu$ L/pozo PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T).
3. Se agregaron 300  $\mu$ L/pozo de solución de bloqueo BSA-PVA-PVP (ver Apéndice) y se incubó la placa a 37°C/2 hrs, seguida de una incubación de 4°C toda la noche. Posterior a la incubación se repitió el paso 3.
4. Se adicionaron 50  $\mu$ L/pozo de los anti-sueros a analizar diluidos 1:200 con solución pre-bloqueadora PBS-BSA, y se consideraron en esta primera incubación 50  $\mu$ L/pozo de los controles positivos (anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  humano biotinilados empleando las siguientes diluciones: 1:200 para Hu-IFN- $\gamma$  R&D, 1:50 para MAb Hu-IFN- $\gamma$  Mabtech y 1:200 MAb Hu-IFN- $\gamma$  Thermo) y se incubó la placa a 37°C/2 hrs, seguidos de 5 lavados con PBS-T/5 minutos a 650 rpm cada uno.
5. Se adicionaron 50  $\mu$ L/pozo de Streptavidina-HRP (ICN Biomedicals, No. Lot.6429C) a una dilución 1:300 empleando como diluyente la solución Pre-bloqueadora PBS-BSA (ver Apéndice) para los pozos con Ac biotinilados, mientras que para los pozos con muestras séricas se adicionaron 50  $\mu$ L/pozo de una dilución 1:500 del anti-human IgG (H+L)-HRP (PIERCE, No. Cat.21410), empleando como diluyente solución Pre-bloqueadora y finalmente se realizó la incubación a 37°C/90 min, evitando exponer la placa a la luz.
  6. Se realizaron 5 lavados con PBS-T/5 minutos a 650 rpm cada uno, considerando que el último lavado se realizó sólo con PBS.
7. Para revelar la reacción se utilizó como sustrato la O-fenilendiamina (OPD, *O-Phenylenediamine Dihydrochloride*, Sigma ImmunoChemicals, No. Cat. P-6662) disolviendo una tableta (1 mg) por cada 5 mL de solución amortiguadora de fosfato-citratos 0.05 M a pH 5.0,

posteriormente adicionar con 90  $\mu\text{L}$  de Peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma Product, No. Cat. H-1009) justo antes de su uso y adicionar 150  $\mu\text{L}$ /pozo e incubar por 45 min cubriendo la placa de la luz.

8. Para detener la reacción se adicionaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 3M y finalmente, se leyó la microplaca en el Elisómetro (*OPSYS MR<sup>TM</sup>*) para obtener los valores de absorbancia empleando un Test Filter de 490 nm.

### **5.6. Reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ por anticuerpos específicos mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión (Luminex).**

El sistema Bio-Plex, es una técnica de matriz en suspensión múltiplex, se basa en la tecnología del Luminex xMAP® que es una tecnología probada en citometría de flujo, las microesferas, el láser, procesamiento de señales digitales y la química tradicional se combinan, 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 contienen distintas proporciones de dos colorantes fluorescentes, cada región de microesferas se puede conjugar con una molécula de captura (Ab o Ag) diferente y ser incubadas con la muestra en un pozo de la microplaca con filtro en el fondo para reaccionar con los analitos específicos mediante una reacción Ag-Ac.

#### **5.6.1. Titulación de anticuerpos (anti IFN- $\gamma$ biotinilados).**

1. Humedecer una microplaca de 96 pozos con filtro-BV de 1.2  $\mu\text{m}$  de tamaño del poro, (MILLIPORE, Núm. No. Cat. MSBVN1210) agregando 150  $\mu\text{L}$ /pozo de solución de lavado (PBS-T: 10 mM, PBS pH 7.4, 0.05 %

vol/vol Tween 20), y después de 1 a 2 minutos se extrajo el líquido empleando un sistema de vacío.

2. Se empleó una suspensión de trabajo de microesferas con la citocina IFN- $\gamma$  acoplada (región 71), así como el sistema BSA (región 4) empleado control negativo, preparada a partir de alícuotas 20  $\mu$ L de cada sistema de microesferas y diluidas 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 NaN<sub>3</sub>).
3. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de esta suspensión de microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex), y se removió el líquido por medio de filtración a vacío.
4. En los pozos correspondientes se adicionaron 50  $\mu$ L/pozo de cada una de las diluciones trabajadas de los anticuerpos biotinilados, como se indica a continuación: 1:500, 1:1,000, 1:2,000 y 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000 y 1:64,000 para el Ab Hu anti-IFN- $\gamma$  R&D; 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200, 1:6,400, y 1: 12,800 para el Ab Mab Hu anti-IFN- $\gamma$  MABTECH; 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200, 1:6,400, y 1: 12,800 para el Ab Mab Hu anti-IFN- $\gamma$  THERMO, empleando como diluyente la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1%, PVA 0.5%, PVP 0.8%, NaN<sub>3</sub> 0.05%) y finalmente incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 60 min, con agitación lenta 500 rpm en un agitador orbital.
5. Se removió el líquido con un sistema de vacío, seguido de 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.
6. Remover el líquido de cada pozo por sistema al vacío.

7. Agregar 50  $\mu\text{L}$ /pozo de la solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (Strep-PE, R&D Systems, No.cat 892525) diluida 1:100 en los pozos correspondientes, empleando como diluyente la solución bloqueadora e incubar la placa protegida de la luz durante 60 min a temperatura ambiente con una agitación lenta 500 rpm empleando un agitador orbital.
8. Repetir los lavados descritos en el paso 5.
9. Adicionar 100  $\mu\text{L}$ /pozo de la solución PBS-T, y agitar la microplaca a 500 rpm durante 2-3 minutos para resuspender las micropartículas, y finalmente colocarla en el lector Luminex 100 para realizar el análisis correspondiente (software BP manager V 5.0).

#### **5.6.2. Ensayo de neutralización de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ para el reconocimiento de IFN- $\gamma$ natural mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión.**

1. Preparar las muestras pre-diluidas en viales etiquetados para la primera preincubación, dependiendo de cada condición de inhibición del rh IFN- $\gamma$  o del IFN- $\gamma$  natural (sobrenadantes de PBMC) incubados con sueros o auto-anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  purificados e incubar durante 120 min en agitación lenta (300 rpm.)
2. Preparar las diluciones correspondientes a cada uno de los anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  biotinilados.
3. Humedecer una microplaca de 96 pozos con filtro-BV de 1.2  $\mu\text{m}$  de tamaño del poro (MILLIPORE, Núm. No. Cat. MSBVN1210), 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), y después de 1 a 2 minutos extraer el líquido mediante un sistema de vacío.

4. Se empleó una suspensión de trabajo de las microesferas acopladas a estreptavidina (región 20, Beads-Strep) y los sistemas de citocinas necesarios para el análisis (incluyendo el control negativo, BSA región 4), preparadas a partir de alícuotas (20  $\mu\text{L}$ ) y diluidas 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  $\text{NaN}_3$ ).
5. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de esta suspensión de trabajo de las microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex), y se removió por medio de filtración a vacío.
6. Depositar en los pozos correspondientes 50  $\mu\text{L}$ /pozo de cada uno de los Ac biotinilados diluidos, empleando como diluyente la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1%, PVA 0.5%, PVP 0.8%,  $\text{NaN}_3$  0.05%) e incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 30 o 60 min, con agitación lenta (500 g) utilizando un agitador orbital.
7. Remover el líquido con un sistema de vacío y posteriormente se realizó una serie de 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.
8. Remover el líquido de cada pozo por vacío nuevamente.
9. Adicionar 50  $\mu\text{L}$ /pozo de las muestras preincubadas con rh IFN- $\gamma$ , sobrenadantes de PBMC estimulados y no estimulados, con o sin auto-anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  (según el caso), empleando como diluyente la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1%, PVA 0.5%, PVP 0.8%,  $\text{NaN}_3$  0.05%) y se incubo la placa por 60 minutos, con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.
10. Depositar en los pozos correspondientes 50  $\mu\text{L}$ /pozo de cada una de las muestras diluidas y previamente incubadas de rh IFN- $\gamma$ , sobrenadantes de PBMC estimulados y no estimulado, (según sea el caso), empleando

como diluyente la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1%, PVA 0.5%, PVP 0.8%, NaN<sub>3</sub> 0.05%) e incubar la microplaca a temperatura ambiente durante una hora, con agitación lenta (500 g) utilizando un agitador orbital.

11. Repetir el paso 5.
12. Agregar 50 µL/pozo en los pozos correspondientes del anti-IFN- $\gamma$  acoplado a ficoeritrina (R&D Systems, No. Cat. IC284P, Lote LJC06) a una dilución 1:100, empleando como diluyente la solución bloqueadora y se llevar a incubación la placa protegida de la luz a temperatura ambiente durante 30 a 90 minutos, con una agitación lenta (500 g) empleando un agitador orbital.
13. Repetir el paso 5.
14. Finalmente se adicionaron 150 µL/pozo de PBS-T, se agitó la microplaca en un agitador orbital (500 g) durante 2-3 minutos para resuspender las micropartículas, y se colocó la microplaca en el lector Luminex 100 para realizar el análisis correspondiente (software BP manager V 5.0).
15. Para evaluar la capacidad el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  de los auto-anticuerpos presentes en muestras séricas, se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{\text{IF (Preincubación: IFN}\gamma \text{ + diluyente)}}{\text{IF (Preincubación: IFN}\gamma \text{ + muestra)}} \times 100 \right) - 100$$

Nota: el porcentaje de inhibición fue calculado para cada una de las condiciones trabajadas, considerando los diferentes anticuerpos de captura y las concentraciones de rh IFN- $\gamma$ .

## 6. RESULTADOS

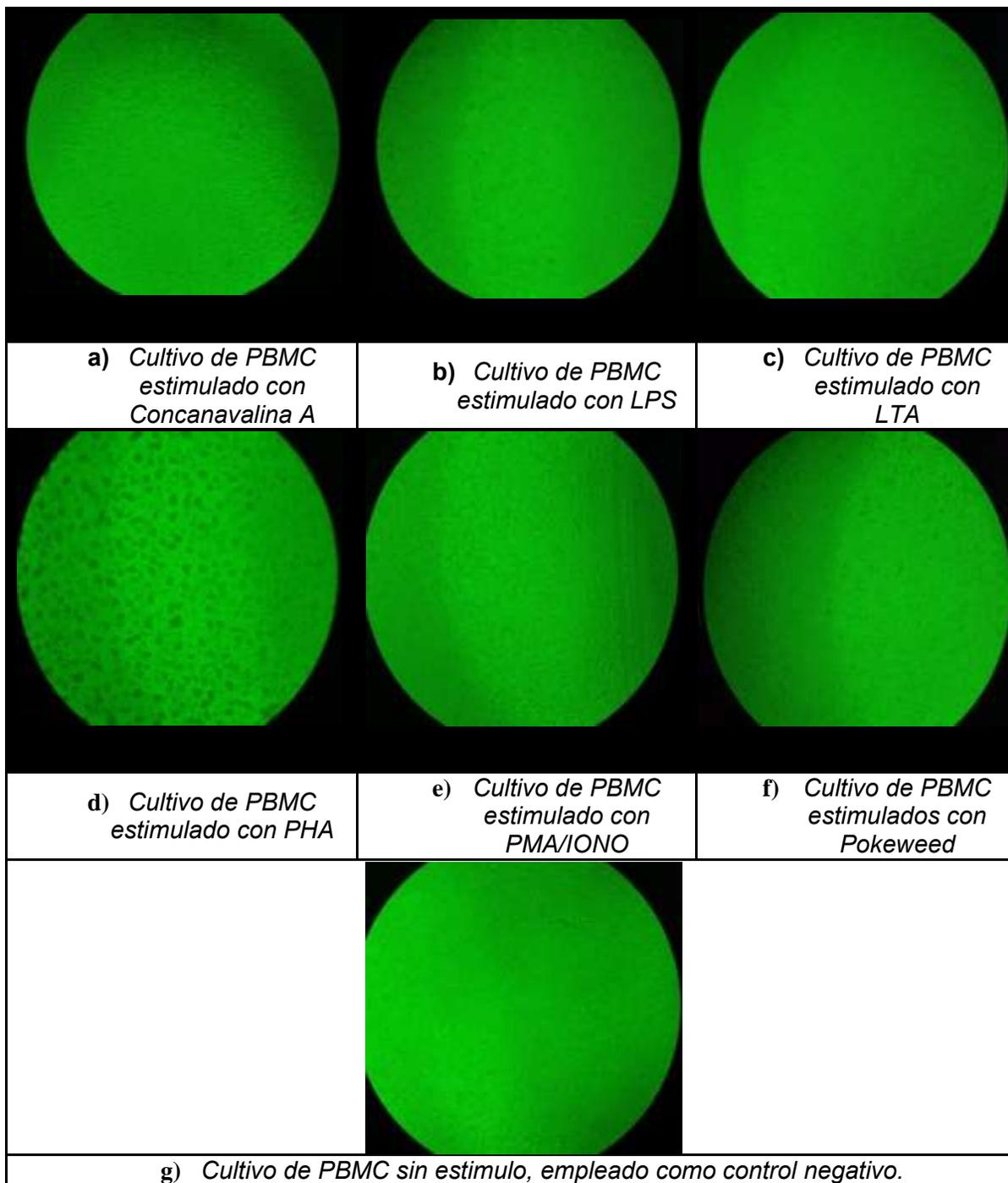
### 6.1. Muestras séricas.

Para el reconocimiento del IFN- $\gamma$ , así como para el ensayo de neutralización se emplearon cuatro muestras séricas, las cuales se sabía eran positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  con base a estudios previos realizados en el laboratorio de trabajo, las características de dichas muestras se detallan previamente en la **Tabla. 1**. Con respecto a las muestras séricas con código S.M. y H.V.P, éstas fueron trabajadas para el reconocimiento de IFN- $\gamma$  mediante la técnica de ELISA, mientras que las muestras identificadas con código A.A. y SR se trabajaron en el ensayo de neutralización empleando la técnica de Luminex.

### 6.2 Purificación y estimulación *in vitro* de PBMC y sangre completa.

La purificación PBMC se llevó a cabo mediante el empleo de un gradiente de densidad con Ficoll-Paque, obteniendo concentraciones celulares de  $8.6 \times 10^5$  a  $5.1 \times 10^6$  células/mL, dichas suspensiones de PBMC, además de sangre completa se utilizaron para las estimulaciones *in vitro* empleando diferentes mitógenos como LTA a 50  $\mu\text{g/mL}$ , Con A a 10  $\mu\text{g/mL}$ , PHA a 10  $\mu\text{g/mL}$ , PMA/IONO a 10 ng/mL/1  $\mu\text{g/mL}$ , y Pokeweed a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Cabe mencionar que estas condiciones de estimulación fueron trabajadas en un número variable de pozos dependiendo del volumen requerido para cada análisis. Posterior a un lapso de 48 horas los cultivos de PBMC estimulados con los mitógenos ya mencionados se observaron bajo un microscopio invertido, y fueron comparados con respecto a los pozos que contenían PBMC no estimuladas empleadas control negativo, consiguiendo observar una diferencia en la proliferación y crecimiento entre ambas condiciones, siendo más notable la proliferación y

confluencia celular en los pozos con células estimuladas con el mitógeno PHA, como se observa en la **Figura 6**.



**Figura 6. Estimulación *in vitro* de PBMC empleando diversos mitógenos para la producción de IFN- $\gamma$  natural.** Las concentraciones de los mitógenos empleadas para esta estimulación se detallan a continuación: a) Con A a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , b) LPS a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , c) LTA a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , d) PHA a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e) PMA/IONO 10 ng/mL/1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , f) Poweeked a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y g) Cultivo sin estímulo (control negativo). La concentración de PBMC trabajada fue de  $8.6 \times 10^5$  cel/mL, la confluencia celular se observa a las 48 horas posteriores a la estimulación, empleando el objetivo 40x.

### **6.3. Determinación de la presencia de IFN- $\gamma$ natural en sobrenadantes de PBMC mediante la técnica de electroforesis.**

Después de la estimulación *in vitro* se realizó la colecta de los sobrenadantes de PBMC, y se llevó a cabo la técnica de SDS-PAGE para determinar la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  en su forma natural como respuesta a la estimulación a los diferentes mitógenos trabajados.

Para el corrimiento electroforético de los geles de poliacrilamida-SDS, todas las muestras (sobrenadantes) se sometieron a las mismas condiciones de concentración y desnaturalización. Así mismo se utilizó como control positivo a la citocina rh IFN- $\gamma$  (4  $\mu$ g/carril) y como control negativo se emplearon los sobrenadantes de PBMC no estimuladas.

Los geles fueron analizados en el programa de imágenes *KODAK Gel Logic 100 System*, el cual reconoce automáticamente las bandas correspondientes a las proteínas presentes en el corrimiento electroforético, además de calcular el coeficiente de movilidad relativa (Rf), la intensidad neta de la banda (IN) y el peso molecular de las mismas. Sin embargo, para el análisis de estos geles mostrados en la **Figuras 7 y 8** no se realizó la determinación del tamaño molecular debido a que durante el corrimiento no se empleó un marcador de peso molecular.

En las **Figuras 7 y 8** se muestra la distribución de las muestras, así como las bandas correspondientes a las proteínas presentes en los sobrenadantes de PBMC, ambas figuras muestran el análisis de las bandas realizado por el analizador de imágenes ya mencionado.

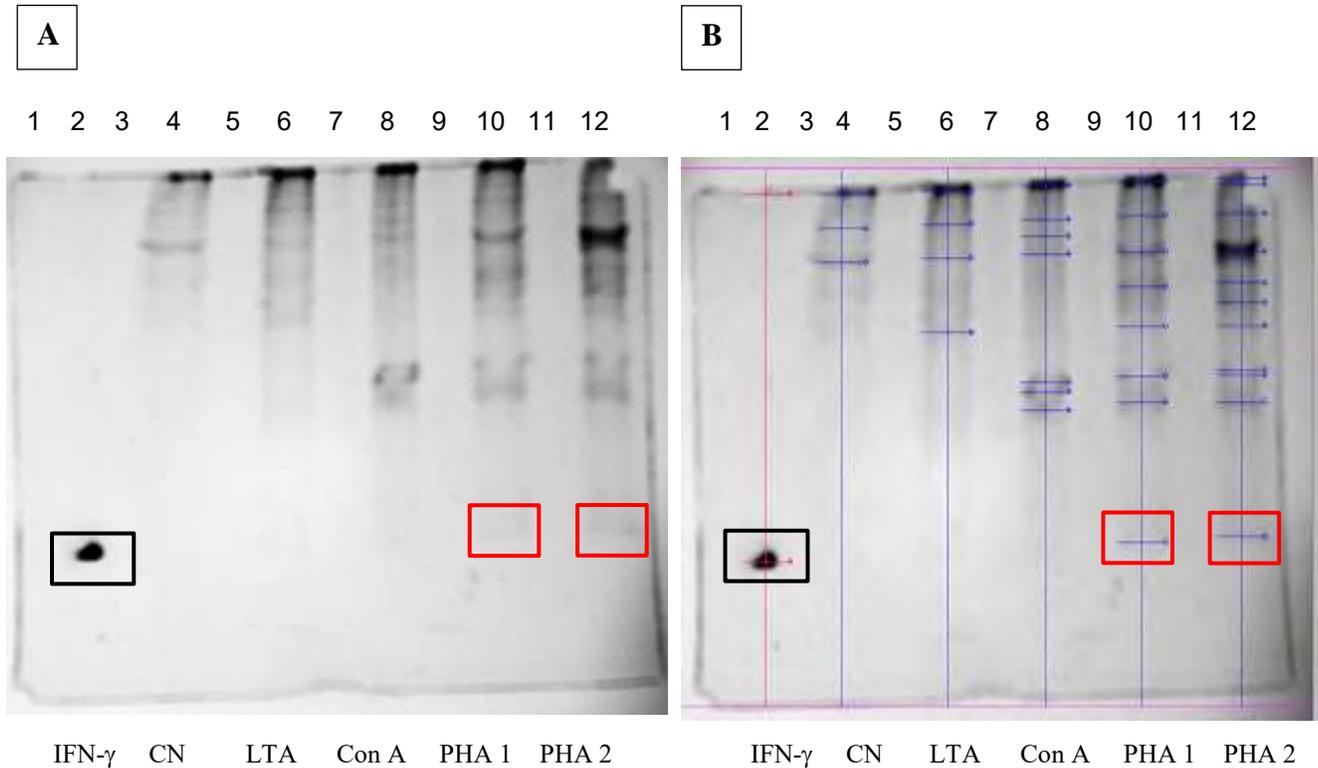
En la **Figura 7** (Panel A) se observó claramente la presencia de la banda correspondiente a la citocina rh IFN- $\gamma$  (carril 2, recuadro negro), así como la ausencia de alguna banda que sugiera la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural en el sobrenadante correspondientes a las PBMC no estimuladas (carril 4). En el caso de los sobrenadantes de PBMC estimuladas con los diferentes mitógenos

se obtuvieron resultados variables, se observó de manera tenue la presencia de una banda en los carriles 10 y 12 que corresponde a los sobrenadantes estimulados con PHA (recuadros rojos), dicha banda se observa ubicada a la altura de la banda correspondiente a la citocina rh IFN- $\gamma$ , cabe mencionar que para este mitógeno se emplearon diferentes fechas de preparación para probar la estabilidad de los mismos. Mientras que para los sobrenadantes estimulados con LTA (carril 6) y Concanavalina A (carril 7), no se observó ninguna banda que indicara la presencia de la citocina de interés. En el Panel B se muestran los carriles y las bandas identificadas por el analizador de imágenes correspondientes a las muestras analizadas.

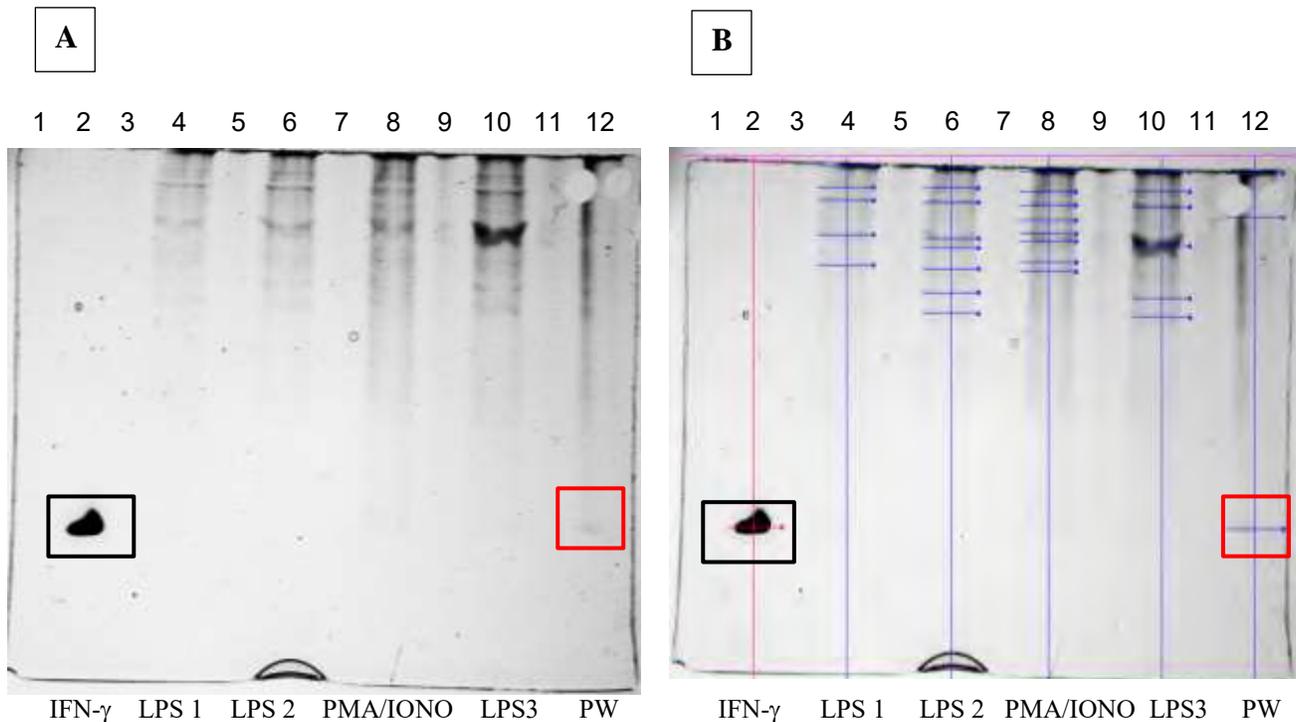
En la **Figura 8** (Panel A) fue nuevamente evidente la presencia de la banda correspondiente a la citocina rh IFN- $\gamma$  (carril 2, recuadro negro), mientras que para los sobrenadantes de PBMC estimulados con LPS (carril 4, 6 y 10) y PMA/IONO (carril 8) no se observó ninguna banda que demostrara la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural; sin embargo, en el caso del sobrenadante de la estimulación con Pokeweed (carril 12, recuadro rojo) se observó una banda con un desplazamiento similar a la citocina rh IFN- $\gamma$ , pero con menor intensidad. En el Panel B se muestran los carriles y bandas identificadas por el analizador de imágenes.

En la **Tabla 3** se reportan los valores de Rf e IN de las bandas correspondientes de la citocina rh IFN- $\gamma$  y de los sobrenadantes de PBMC estimulados con PHA y Pokeweed.

Por otra parte, se pudo observar en ambas Figuras (7 y 8) la presencia de otras bandas en los sobrenadantes de los cultivos celulares como producto del medio RPMI-S



**Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de sobrenadantes de PBMC estimuladas *in vitro* con diferentes mitógenos.** En el Panel A se observa el patrón electroforético de proteínas correspondientes a la citocina rh IFN- $\gamma$  y a los sobrenadantes de PBMC teñidas con azul de Commasie. Las muestras depositadas en los carriles fueron: carril 2 rh IFN- $\gamma$  rh (4  $\mu$ g/carril), carril 4 sobrenadante de PBMC's no estimuladas, carril 6 sobrenadante estimulado con LTA (50  $\mu$ g/mL), carril 8 sobrenadante estimulado con Concanavalina A (10  $\mu$ g/mL), y los carriles 10 y 12 contienen sobrenadante estimulados con PHA (10  $\mu$ g/mL). Los recuadros negros indican la banda correspondiente a la citocina IFN- $\gamma$  rh (control positivo), mientras que los recuadros rojos muestran la banda que sugieren la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural empleando diferentes estímulos. Panel B se muestran los carriles y bandas identificadas por el programa *KODAK Gel Logic 100*, correspondientes a las muestras analizadas.



**Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de sobrenadantes de PBMC estimuladas *in vitro* con diferentes mitógenos.** En el Panel A se observa el patrón electroforético de proteínas correspondientes a la citocina rh IFN- $\gamma$  y a los sobrenadantes de PBMC teñidas con azul de Commasie. Las muestras depositadas en los carriles fueron: carril 2 IFN- $\gamma$  rh (4  $\mu$ g/carril), carriles 4, 6 y 10 contienen sobrenadantes estimulados con LPS (1 $\mu$ g/mL), carril 8 sobrenadante estimulado con PMA/IONO (10 ng/mL/1  $\mu$ g/mL), y carril 12 sobrenadante estimulado con Powekeed (10  $\mu$ g/mL). Los recuadros negros indican la banda correspondiente a la citocina IFN- $\gamma$  rh (control positivo), mientras que los recuadros rojos muestran la banda que sugieren la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural empleando diferentes estímulos. Panel B se muestran los carriles y bandas identificadas por el programa *KODAK Gel Logic 100 System*, correspondientes a las muestras analizadas.

Como se mencionó anteriormente, debido a que no se empleó un marcador de peso molecular en los geles correspondientes a las **Figuras 7 y 8**, no fue posible calcular el tamaño de las bandas presentes en las muestras analizadas; sin embargo, únicamente se calcularon los valores de Rf para las proteínas que aludieron la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural, dichos valores se reportan en la **Tabla 3**.

Los valores de Rf para el rh IFN- $\gamma$  empleado como control positivo en los geles correspondientes a las **Figuras 7 y 8** fueron de 0.63 y 0.65, respectivamente; este desplazamiento fue tomado como referencia para la identificación de la banda correspondiente al IFN- $\gamma$  natural presente en los sobrenadantes de PBMC estimuladas con algunos mitógenos *in vitro*. Para el caso de los sobrenadantes estimulados con PHA, éstos presentaron valores de Rf de 0.61 y 0.62 (**Figura 7**), y para Pokeweed un valor de 0.65 (**Figura 8**). Por otra parte la cantidad de las muestras depositadas en los pozos se relacionó con el valor de IN de las bandas identificadas por el analizador de imágenes, lo cual permite hacer una comparación cualitativa de la cantidad de proteína presente en cada banda. Los valores de IN obtenidos para el rh IFN- $\gamma$  fueron de 66,316 en la **Figura 7** y de 71,723 en la **Figura 8**, mientras que los valores de IN correspondientes a las bandas del IFN- $\gamma$  natural fueron de 4,275 y 4,728 cuando se empleó el estímulo PHA, y de 2,798 con el estímulo Pokeweed. Estos resultados reflejaron la diferencia en la visualización de las bandas observadas para el rh IFN- $\gamma$  con respecto a las bandas identificadas para el IFN- $\gamma$  natural, las cuales fueron más tenues. Por lo tanto, considerando la presencia de la banda correspondiente al IFN- $\gamma$  natural en los geles de electroforesis, así como la identificación y los valores de IN obtenidos del análisis de la banda en los diferentes geles, se seleccionó a la PHA a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL como mitógeno para las estimulaciones posteriores.

Con respecto al corrimiento electroforético de las muestras de sangre completa que fueron estimuladas en las mismas condiciones que los sobrenadantes de PBMC, no fue posible observar la migración de las bandas debido a la gran cantidad de componentes presentes en la sangre (resultados no mostrados).

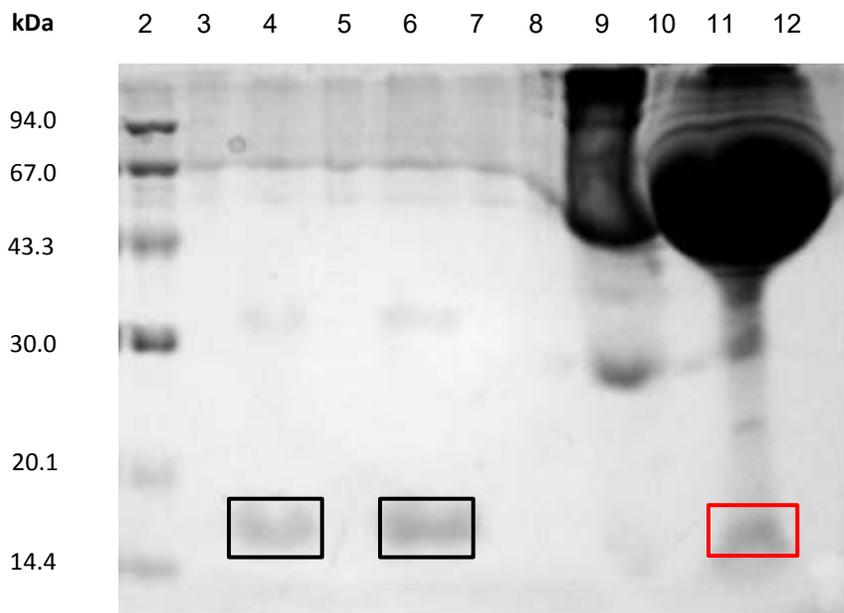
<b>Muestras de sobrenadantes estimulados con:</b>	<b>Movilidad relativa</b>		<b>Intensidad neta de la banda (UA)</b>	
	Fig. 7	Fig. 8	Fig. 7	Fig. 8
IFN- $\gamma$ rh 4 $\mu$ g/mL *	0.63	0.65	66,316	74,723
PBMC + PHA	0.61	-	4,275	-
PBMC + PHA	0.62	-	4,728	-
PBMC + Pokeweed	0.65	-	2,798	-

**Tabla 3. Análisis de las bandas identificadas en el corrimiento electroforético correspondientes a rh IFN- $\gamma$  y sobrenadantes de PBMC's estimuladas de manera *in vitro* con PHA (10  $\mu$ g/mL) y Pokeweed (10  $\mu$ g/mL).** Los valores mostrados para la movilidad relativa e intensidad neta de las bandas fueron calculados por analizador de imágenes *KODAK Gel Logic 100 System*. La citocina rh IFN- $\gamma$  fue empleada control positivo (IMMUKIN).

En la **Figura 9** se muestra el corrimiento electroforético de las bandas correspondientes al marcador de peso molecular (mpm, carril 2), así como de la citocina rh IFN- $\gamma$  la cual fue empleada como control positivo a dos concentraciones diferentes de 3  $\mu$ g/carril (carril 4) y 6  $\mu$ g/carril (carril 6) indicados en los recuadros negros. A su vez se observó la presencia de la banda correspondiente a la citocina IFN- $\gamma$  natural en el sobrenadante de PBMC estimuladas con PHA (carril 11, recuadro rojo), es importante mencionar que en este sobrenadante los niveles de IFN- $\gamma$  natural fueron previamente cuantificados

mediante la técnica de ELISA (dicha cuantificación se muestra más adelante en la **Tabla 6**).

La presencia de la banda correspondiente a la citocina IFN- $\gamma$  natural en el gel de poliacrilamida, se confirmó mediante la determinación de su peso molecular y su comparación con la citocina rh IFN- $\gamma$ . Los valores de Rf y tamaño molecular obtenidos para la citocina IFN- $\gamma$  natural fueron de 0.66 y 16.9 kDa, respectivamente. Mientras que para la citocina rh IFN- $\gamma$  se obtuvieron valores de 0.66 y 16.8 kDa al emplear una cantidad de 3  $\mu$ g/carril, en tanto que al trabajar con una cantidad de 6  $\mu$ g/carril los resultados fueron de 0.66 y 16.8 kDa. Estos valores fueron calculados por el analizador de imágenes *KODAK Gel Logic 100 System*, y son reportados en la **Tabla 4**.



**Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la identificación de la citocina IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC estimuladas *in vitro*.** Carril: 2) marcador de peso molecular (mpm), 4) rh IFN- $\gamma$  (3  $\mu\text{g}$ /carril), 6) rh IFN- $\gamma$  (6  $\mu\text{g}$ /carril), 11) sobrenadante de PBMC's estimuladas con PHA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los recuadros negros indican la presencia de la banda correspondiente al control positivo (rh IFN- $\gamma$ ), y el recuadro rojo muestra la banda identificada para la citocina IFN- $\gamma$  natural presente en de la muestra analizada.

<b>Citocina</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Movilidad relativa</b>
rh IFN- $\gamma$ (3 $\mu\text{g}$ /carril)	16.8	0.66
rh IFN- $\gamma$ (6 $\mu\text{g}$ /carril)	16.8	0.66
IFN- $\gamma$ natural (PBMC + PHA)	16.9	0.66

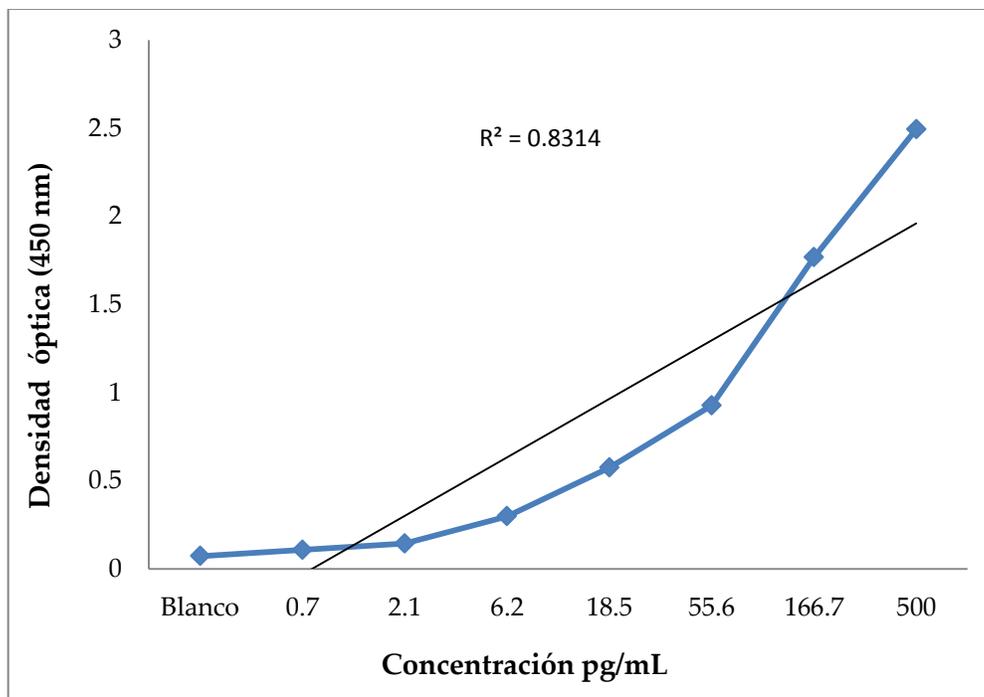
**Tabla 4. Análisis de las bandas correspondientes a la citocina IFN- $\gamma$  en su forma recombinante y natural presente en los sobrenadante de PBMC's estimuladas con PHA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).** Los valores de movilidad relativa (Rf) y peso molecular fueron calculados mediante el analizador de imágenes *KODAK Gel Logic 100 System*.

#### **6.4. Determinación de la producción *in vitro* de IFN- $\gamma$ natural presente en sobrenadantes de PBMC y sangre completa mediante la técnica de ELISA.**

La presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC y células de sangre completa estimuladas con PHA, se confirmó realizando la cuantificación de ésta mediante la técnica de ELISA. Para dicha cuantificación se realizó una curva patrón, los valores de concentraciones y de densidad óptica (D.O.) de esta curva se detallan en la **Tabla 5**, y se muestran gráficamente en la **Figura 10**. Por lo tanto, las concentraciones de IFN- $\gamma$  natural en las muestras analizadas se determinaron mediante la interpolación de los valores D.O. en la curva patrón, considerando el factor de dilución de las muestras diluidas 1:5. Los valores de D.O. y de concentración final de las muestras analizadas se reportan en la **Tabla 6**, donde se puede observar una mayor cantidad de la citocina IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC estimuladas con PHA al obtener una concentración de 539 pg/mL, mientras que para los sobrenadantes de células de sangre completa se obtuvo una concentración de 305 pg/mL; asimismo se observó una menor producción de IFN- $\gamma$  natural en los sobrenadantes no estimulados empleados como control negativo, con respecto a las células estimuladas.

<b>Concentración (pg/mL)</b>	<b>Densidad óptica</b>
Blanco	0.072
0.7	0.107
2.1	0.143
6.2	0.298
18.5	0.574
55.6	0.927
166.7	1.767
500	2.494

**Tabla 5. Valores de concentración y densidad óptica empleadas en la elaboración de la curva patrón para la cuantificación de la citocina IFN- $\gamma$  natural.** El estándar de rh IFN- $\gamma$  corresponde al Kit Pelikine compac<sup>TM</sup>. La lectura se realizó en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm.



**Figura 10. Curva de patrón para la determinación de la concentración de la citocina IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC y células de sangre completa estimuladas con PHA.** Se muestra valor del coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) entre las variables medidas.

<b><i>Muestras</i></b>	<b><i>Densidad óptica</i></b>	<b><i>Concentración (pg/mL)</i></b>
PBMC+PHA	1.14	539
PBMC + RPMI-S	0.10	11
Sangre + PHA	1.02	305
Sangre + RPMI-S	0.19	59

**Tabla 6. Valores de densidad óptica (450 nm) obtenidos mediante la técnica de ELISA empleados en la interpolación en la curva patrón, para la determinación de la concentración de IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC y células de sangre completa.** Las concentraciones finales mostradas fueron calculadas considerando un factor de dilución de 5.

### **6.5. Determinación de la dilución óptima de trabajo del anticuerpo anti-IFN- $\gamma$ biotinilado y de la estreptavidina-HRP mediante la técnica de Dot-ELISA.**

Previamente a la estandarización de la técnica de ELISA para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ , fue necesario determinar las diluciones óptimas de trabajo para el Ab anti-IFN- $\gamma$  biotinilado (R&D) y la Strep-HRP (ICN biomedical) a través de la técnica de Dot-ELISA. Para esta titulación se usó como antígeno a la citocina rh IFN- $\gamma$  (1 $\mu$ g/mL), así como las diluciones 1:100 y 1:500, tanto para el Ab biotinilado, como para la Strep-HRP.

En la **Figura 11** se muestran los resultados obtenidos de esta titulación que se visualizan en forma de puntos sobre membranas de nitrocelulosa (NC). Se pudo observar una reacción positiva evidenciada por una coloración marrón para ambos conjugados trabajados, no obstante la coloración se apreció con mayor intensidad al emplear las diluciones 1:100, tanto para el Ab biotinilado, como para la Strep-HRP; sin embargo, estas diluciones también mostraron un mayor fondo en los pozos empleados como blancos (sin antígeno y con PBS) como resultado de uniones inespecíficas en la membrana de NC. Para el caso de las diluciones 1:500 empleadas en ambos reactantes, dieron una reacción positiva tenue y con un menor fondo en las membranas de NC utilizadas como blancos. Por lo tanto, para la técnica de ELISA se decidió el uso de las diluciones 1:200 para el Ab biotinilado y 1:300 para la Strep-HRP.

<i>Dilución anti-IFN-<math>\gamma</math> biotinilado</i>	<i>rh IFN-<math>\gamma</math> (1 <math>\mu</math>g/mL)</i>	<i>Blanco (PBS)</i>	<i>Dilución Strep-HRP</i>
<i>1:100</i>			<i>1:100</i>
<i>1:500</i>			
<i>1:100</i>			<i>1:500</i>
<i>1:500</i>			

**Figura 11. Titulación del anticuerpo anti IFN- $\gamma$  biotinilado (R&D) y de la estreptavidina-HRP (ICN biomedical) mediante la técnica Dot-ELISA.**

## 6.6. Estandarización de la técnica de ELISA para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ natural presente en sobrenadantes de PBMC.

El estudio de la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC estimuladas de manera *in vitro*, se realizó empleando la técnica de ELISA, mediante el reconocimiento por anticuerpos anti IFN- $\gamma$  biotinilados, así como por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas.

Para la estandarización de esta técnica se evaluaron los sobrenadantes obtenidos de la estimulación de PBMC con PHA (10  $\mu$ g/mL), Pokeweed (10  $\mu$ g/mL), y PMA/IONO (10 ng/mL/1  $\mu$ g/mL); como control positivo se utilizó el rh IFN- $\gamma$ . Así mismo, se empleó la dilución óptima de trabajo (1:200) para el Ab Hu-IFN- $\gamma$  biotinilado R&D determinada mediante la técnica de Dot-ELISA, y el uso de los anticuerpos biotinilados MAb Hu IFN- $\gamma$  Mabtech (1:50) y MAb Hu IFN- $\gamma$  Thermo (1:200), además de las muestras séricas positivas a auto-anticuerpos purificados contra IFN- $\gamma$  identificados como S.M. y H.V.P a una dilución 1:200. Los valores promedio de D.O. y desviación estándar (SD) de las muestras analizadas por duplicado se reportan en la **Tabla 7** y se representan gráficamente en la **Figura 12**.

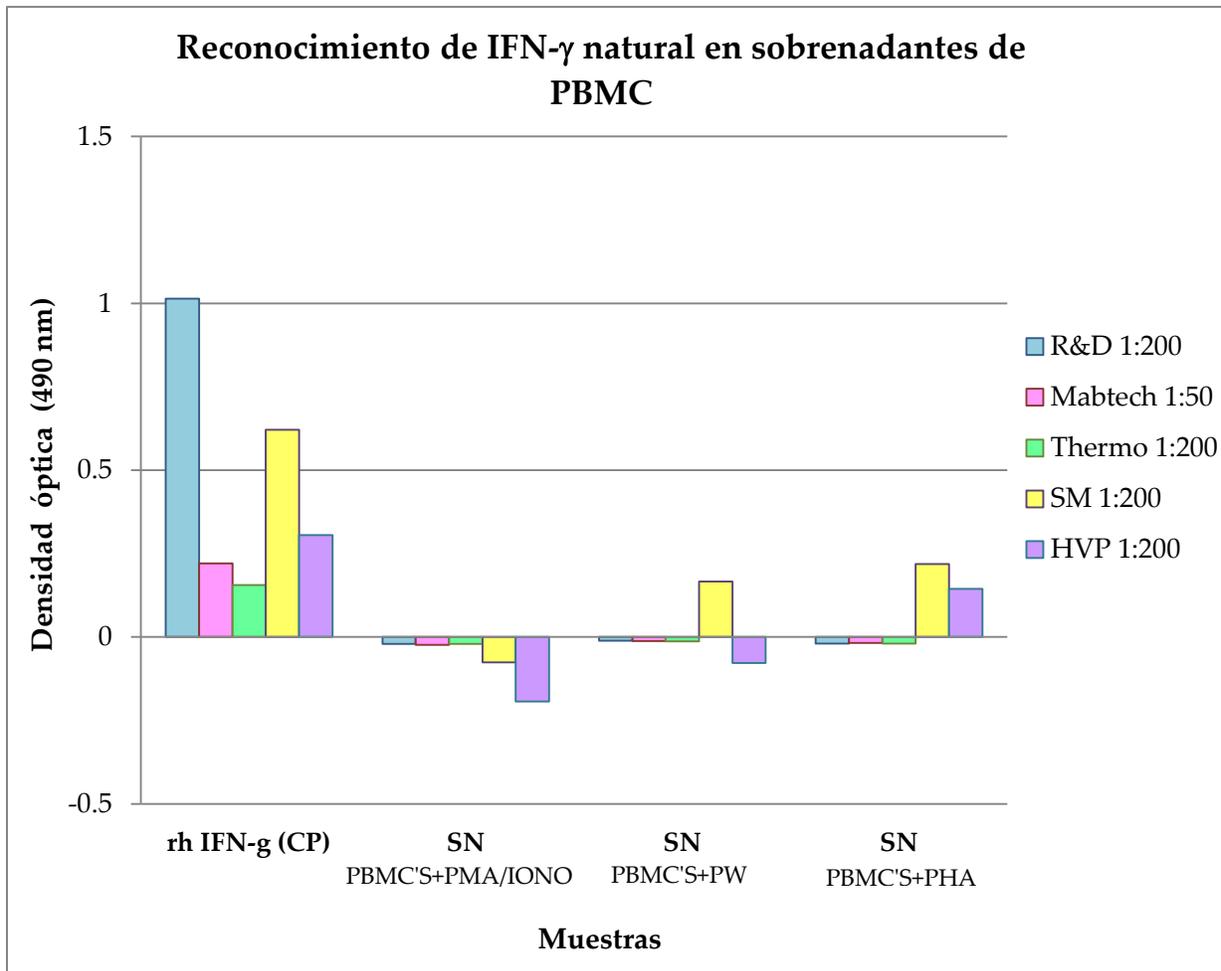
De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que los sobrenadantes de PBMC estimuladas con los diferentes mitógenos son débilmente reconocidos por todos los anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  evaluados, debido a las bajas cantidades de la citocina IFN- $\gamma$  en su forma natural. Considerando que para la citocina rh IFN- $\gamma$  (control positivo) se empleó 50  $\mu$ L/pozo de una solución de antígeno a una concentración de 2  $\mu$ g/mL, se pudo observar un mejor reconocimiento por los anticuerpos biotinilados y muestras séricas trabajadas, obteniendo un valor más alto de D.O. (1.01) por el anticuerpo anti Hu-IFN- $\gamma$  bitonilado R&D. Mientras que la concentración de la citocina IFN- $\gamma$  natural presente en sobrenadantes de PBMC estimuladas con PHA fue de 0.539  $\mu$ g/mL, de la cual se preparó una solución de antígeno a 0.042  $\mu$ g/pozo, y por consiguiente al emplear una

concentración mucho menor del IFN- $\gamma$  natural que del rh IFN- $\gamma$ , los valores de D.O. resultaron ser inferiores para todos los anticuerpos trabajados.

Para los sobrenadantes de PBMC estimulados con PW y PMA/IONO se observaron valores de D.O. menores con relación a los sobrenadantes estimulados con PHA, por lo que se corroboró que existe una baja o nula presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural.

<b>Anticuerpos anti-IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Dilución</b>	<b>Muestras</b>			
		<b>rh IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Sobrenadantes de PBMC con PMA/IONO</b>	<b>Sobrenadantes de PBMC con Pokeweed</b>	<b>Sobrenadantes de PBMC con PHA</b>
Hu-IFN- $\gamma$ Biotin R&D	1:200	1.01 $\pm$ 0.01	-0.02 $\pm$ 0.02	-0.01 $\pm$ 0.0	-0.01 $\pm$ 0.01
Hu-IFN- $\gamma$ Biotin Mabtech	1:50	0.22 $\pm$ 0.0	-0.02 $\pm$ 0.02	-0.02 $\pm$ 0.02	-0.01 $\pm$ 0.01
Hu-IFN- $\gamma$ Biotin Thermo	1:200	0.15 $\pm$ 0.01	-0.02 $\pm$ 0.02	-0.01 $\pm$ 0.0	-0.02 $\pm$ 0.01
Auto anti-IFN- $\gamma$ (SM)	1:200	0.62 $\pm$ 0.01	-0.07 $\pm$ 0.29	0.16 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.04
Auto anti-IFN- $\gamma$ (HVP)	1:200	0.30 $\pm$ 0.01	-0.19 $\pm$ 0.10	-0.07 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.10

**Tabla 7. Valores promedio de densidad óptica (490 nm) de anticuerpos anti IFN- $\gamma$  empleados para el reconocimiento de la citocina en su forma natural presente en sobrenadantes de PBMC, estimuladas *in vitro*.** Las concentraciones de los mitógenos utilizados para la estimulación *in vitro* se detallan a continuación: PHA (10  $\mu$ g/mL), Pokeweed (10  $\mu$ g/mL), y PMA/IONO (10 ng/mL/1  $\mu$ g/mL). Los valores promedio D.O.  $\pm$ SD se obtuvieron de cada una de las muestras trabajadas por duplicado, así mismo a cada valor de DO se les sustrajo el valor promedio de los pozos correspondientes al blanco.



**Figura 12. Representación gráfica de los valores promedio de densidad óptica (490 nm) de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , empleados para el reconocimiento de la citocina en su forma natural en sobrenadantes de PBMC's, mediante la técnica de ELISA.** Las concentraciones utilizadas para la estimulación *in vitro* de sobrenadantes de PBMC's fueron: PHA (10  $\mu$ g/mL), Pokeweed (10  $\mu$ g/mL), y PMA/IONO (10 ng/mL/1  $\mu$ g/mL). Los valores promedio DO se obtuvieron de cada una de las muestras trabajadas por duplicado, así mismo a cada valor de DO se les sustrajo el valor promedio de los pozos correspondientes al blanco. \*CP (control positivo).

## **6.7. Reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ natural por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión (Luminex).**

La medición de citocinas solubles y otros analitos en muestras biológicas ha sido de gran interés para el desarrollo de múltiples técnicas basadas en el reconocimiento a través de la unión específica Ag-Ac. En el presente trabajo se incluyó la técnica de Luminex para la estandarización de un ensayo de neutralización para demostrar el reconocimiento del IFN- $\gamma$  natural por anticuerpos específicos, empleando el rh IFN- $\gamma$  como control positivo. Así mismo, se emplearon diferentes condiciones de trabajo, incluyéndose el uso de anticuerpos biotinilados que fueron previamente titulados.

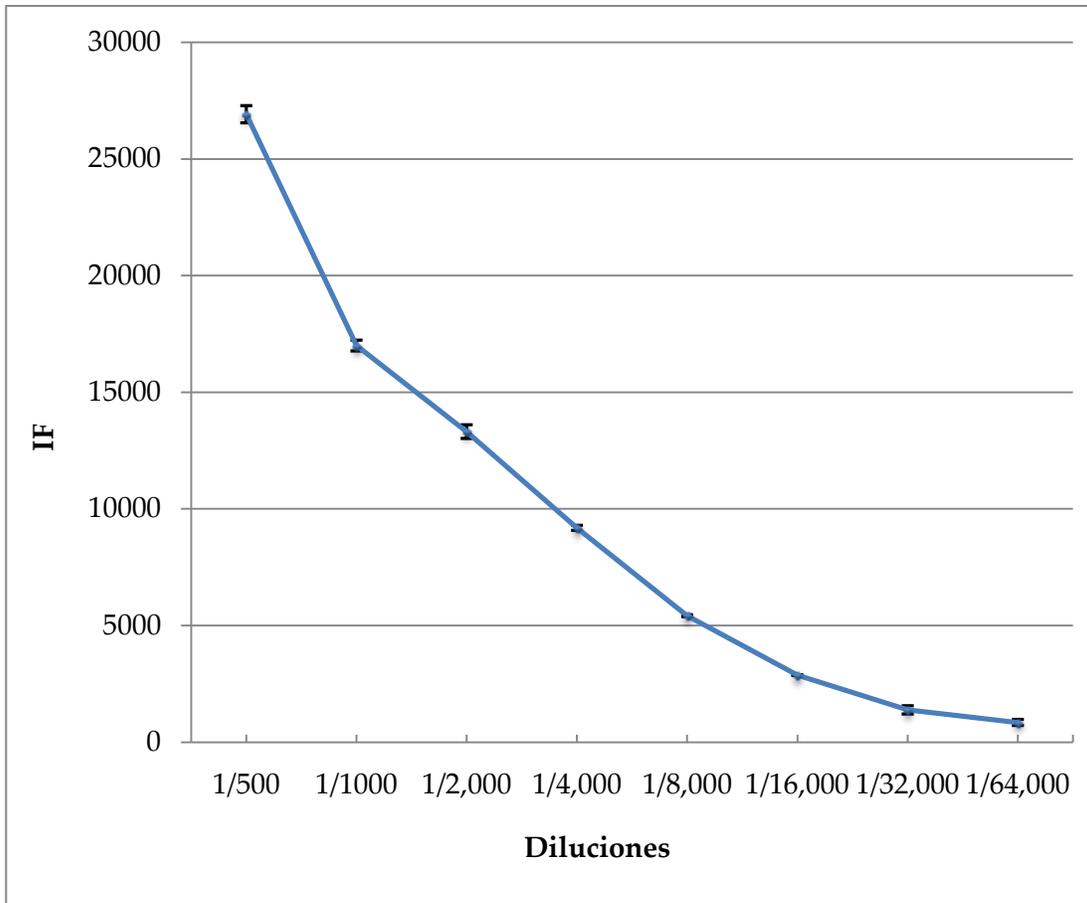
### **6.7.1. Titulación de anticuerpos biotinilados contra IFN- $\gamma$ mediante la técnica de Luminex.**

La determinación de la dilución óptima de trabajo de los anticuerpos biotinilados utilizados para la neutralización del reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  mediante el ensayo de Luminex, se realizó empleando una suspensión de microesferas con la citocina rh IFN- $\gamma$  acoplada, así como el uso del sistema de BSA como control negativo. Los anticuerpos utilizados para su titulación fueron: Hu IFN- $\gamma$  biotinilado (R&D, No. Cat. BAF285), MAb Hu IFN- $\gamma$  biotinilado (Mabtech No. Cat. 3420250), y MAb Hu IFN- $\gamma$  biotinilado (Thermo No. Cat. M701B). Las diluciones empleadas para cada Ab se describen en la **Tabla 8**, así como los valores promedio de intensidad de fluorescencia (IF) y desviación estándar (DS), los cuales fueron obtenidos de los duplicados de cada muestra, en las **Figuras 13, 14 y 15**, se representan gráficamente los valores promedio de IF resultantes de la titulación de los anticuerpos Hu IFN- $\gamma$  biotinilado R&D, MAb Hu IFN- $\gamma$  biotinilado Mabtech y MAb Hu IFN- $\gamma$  biotinilado Thermo, respectivamente.

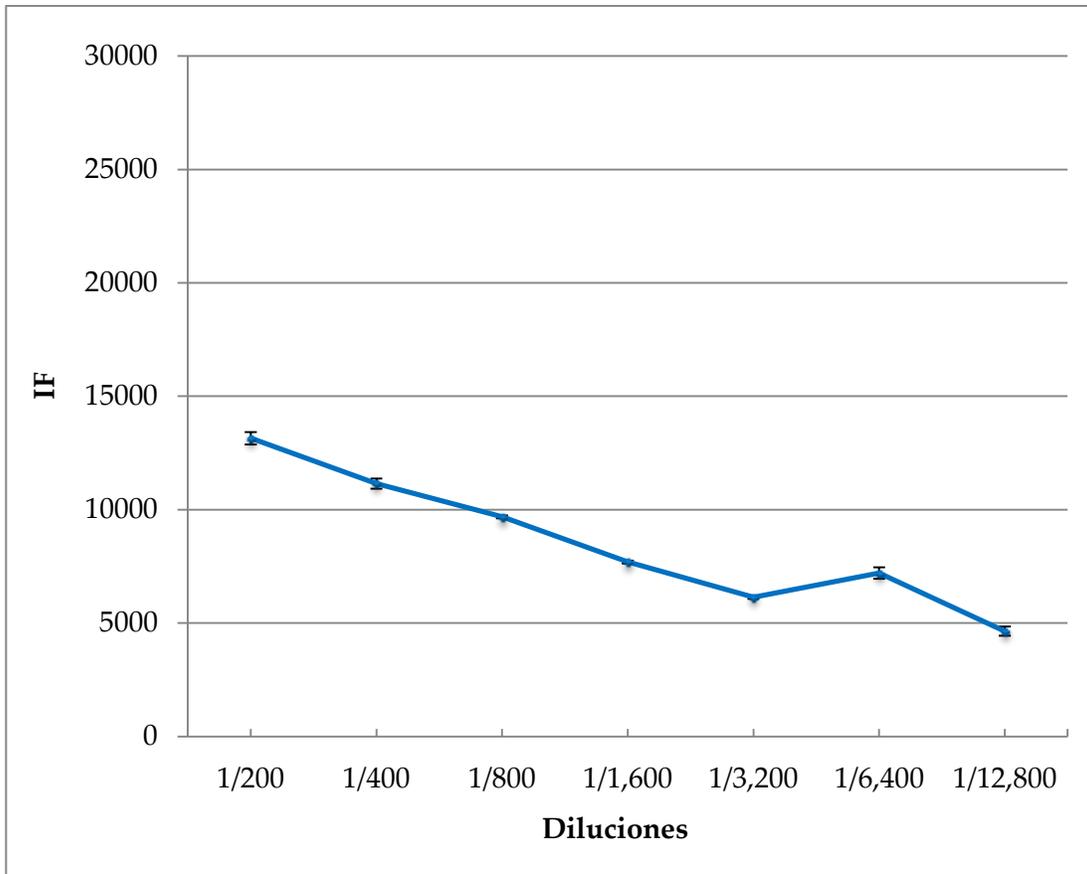
De acuerdo a los valores de IF obtenidos para cada Ab se observó un mejor reconocimiento de la citocina rh IFN- $\gamma$  por el Ab biotinilado Hu IFN- $\gamma$  R&D al obtener valores de IF de 26, 921 al emplear la dilución 1:1000 y de 846 para la dilución 1:64,000. Por otra parte para las siete diferentes diluciones dobles iniciando con la de 1:200 de los anticuerpos Mab Hu IFN- $\gamma$  Mabtech y Mab Hu IFN- $\gamma$  Thermo se observaron valores de IF dentro de un rango de 13,151 a 4,442 y de 13,697 a 3,909, respectivamente. De esta forma se determinó la dilución óptima de trabajo como aquella donde el valor promedio de IF fuera considerable y en la cual el valor del control negativo fuera relativamente bajo. Por lo tanto, con base a estos criterios se estableció la dilución óptima de trabajo 1:3,000 para el Ab Hu IFN- $\gamma$  R&D, 1:400 para Mab Hu IFN- $\gamma$  Mabtech y 1:800 para Mab Hu IFN- $\gamma$  Thermo.

<b>Anticuerpo biotinilado</b>	<b>Dilución</b>	<b>Promedio de intensidad de fluorescencia (IF) <math>\pm</math> DS</b>	
<b>Hu IFN-<math>\gamma</math> Biotin R&amp;D</b>	1:500	26,921	$\pm$ 370
	1:1,000	17,000	$\pm$ 234
	1:2,000	13,308	$\pm$ 293
	1:4,000	9,191	$\pm$ 107
	1:8,000	5,423	$\pm$ 47
	1:16,000	2,871	$\pm$ 15
	1:32,000	1,388	$\pm$ 175
	1:64,000	846	$\pm$ 126
<b>MAB Hu IFN-<math>\gamma</math> Biotin Mabtech</b>	1:200	13,151	$\pm$ 275
	1:400	11,152	$\pm$ 226
	1:800	9,684	$\pm$ 68
	1:1,600	7,692	$\pm$ 62
	1:3,200	6,145	$\pm$ 73
	1:6,400	7,206	$\pm$ 351
	1:12,800	4,642	$\pm$ 203
<b>MAB Hu IFN-<math>\gamma</math> Biotin Thermo</b>	1:200	13,527	$\pm$ 220
	1:400	13,697	$\pm$ 148
	1:800	11,856	$\pm$ 97
	1:1,600	9,702	$\pm$ 271
	1:3,200	7,409	$\pm$ 220
	1:6,400	5,400	$\pm$ 231
	1:12,800	3,909	$\pm$ 153

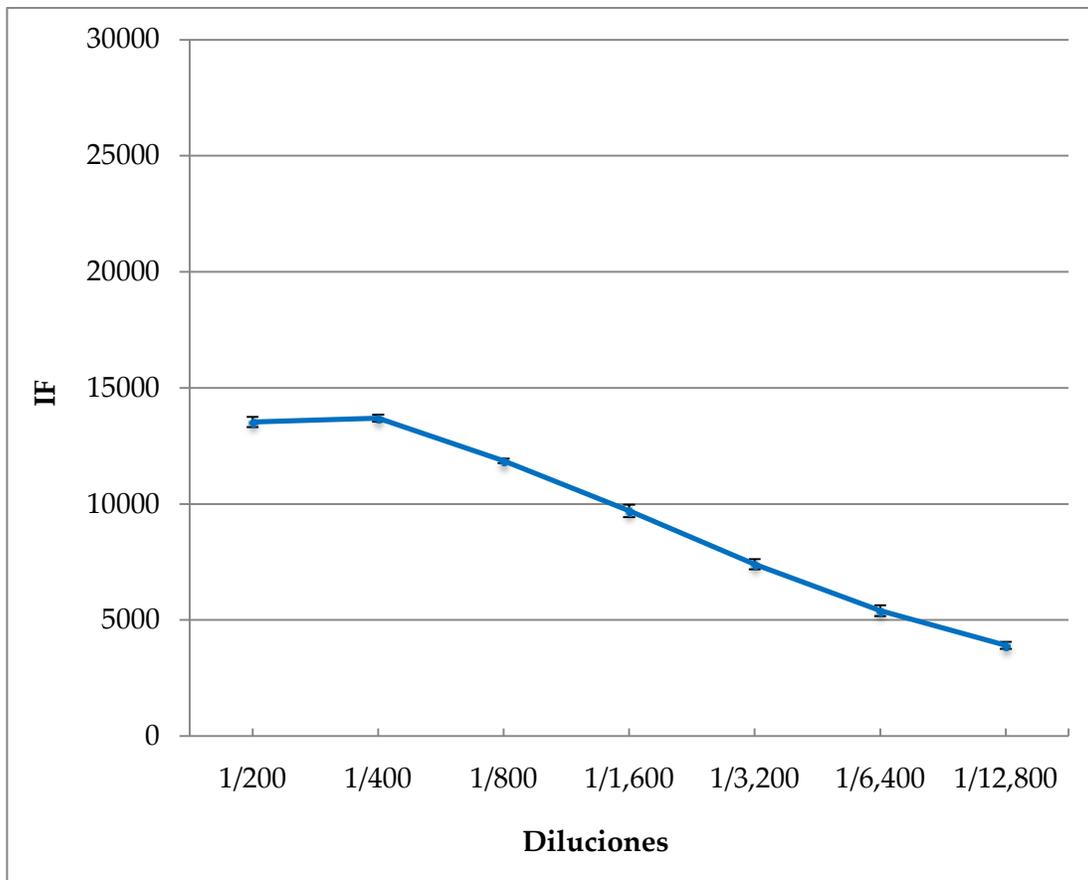
**Tabla 8. Valores promedio de intensidad de fluorescencia  $\pm$ DS obtenidos de la titulación de anticuerpos biotinilados anti-IFN- $\gamma$  empleando la técnica de Luminex. Todas las diluciones analizadas fueron trabajadas por duplicado.**



**Figura 13. Determinación de la dilución óptima del anticuerpo Hu IFN- $\gamma$  biotinilado R&D empleando la técnica de Luminex. Se muestran los valores promedio de intensidad de fluorescencia  $\pm$ SD de cada uno de las ocho diluciones dobles trabajadas por duplicado.**



**Figura 14. Determinación de la dilución óptima del anticuerpo MAb Hu IFN- $\gamma$  Mabtech biotinilado empleando la técnica de Luminex.** Se muestran los valores promedio de intensidad de fluorescencia  $\pm$ SD de cada una de las siete diluciones dobles trabajadas por duplicado.



**Figura 15. Determinación de la dilución óptima del anticuerpo MAb Hu IFN- $\gamma$  Thermo biotinilado empleando la técnica de Luminex . Se muestran los valores promedio de intensidad de fluorescencia  $\pm$ SD de cada una de las siete diluciones dobles trabajadas por duplicado.**

### **6.7.2. Ensayo de neutralización para evaluar el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$ natural por auto-Anticuerpos presentes en muestras séricas empleando la técnica de Luminex.**

La estandarización del ensayo de neutralización para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas identificadas como R.S. y A.A. (Ver detalles en Tabla 1), se llevó a cabo empleando diferentes condiciones de trabajo. Dichas condiciones incluyeron el uso de las diluciones óptimas de trabajo para cada uno de los anticuerpos biotinilados MAb Hu IFN- $\gamma$  Mabtech (1:400), MAb Hu IFN- $\gamma$  Thermo (1:800) y Hu IFN- $\gamma$  R&D (1:3,000), así como el empleo de dos concentraciones (20  $\mu$ g/mL y 2  $\mu$ g/mL) de rh IFN- $\gamma$  (controles positivos), además de los sobrenadantes de PBMC no estimulados (control negativo) y estimulados con PHA (como fuente del IFN- $\gamma$  natural).

En la **Tabla 9** se detallan las diferentes condiciones de trabajo analizadas en este ensayo, así como los valores promedio de IF  $\pm$ SD y los porcentajes de inhibición para cada uno de ellas, los cuales fueron calculados empleando los valores de IF correspondiente a cada una de las condiciones trabajadas sin el auto-Ac de inhibición. Todas las condiciones se analizaron por duplicado utilizando una suspensión de microesferas conteniendo el sistema de acoplamiento de la estreptavidina o de la BSA, este último empleado como control negativo.

En la **Figura 16** se representan los valores promedio de IF ( $\pm$ SD) para cada una de las condiciones trabajadas, empleando como anticuerpos de captura al Hu IFN- $\gamma$  Thermo y al Ab biotinilado Hu IFN- $\gamma$  R&D, todas las condiciones de trabajo se realizaron por duplicado.

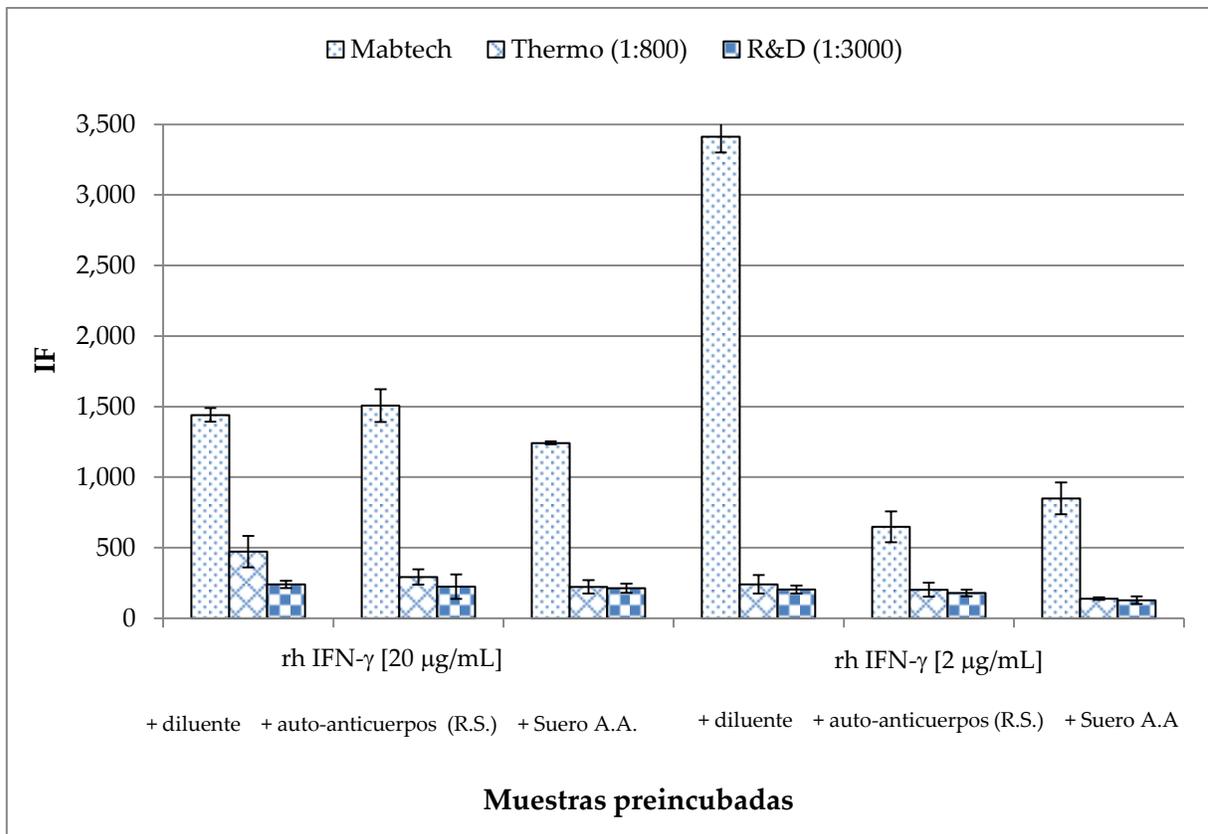
Para la pre-incubación de la citocina con los auto-anticuerpos se empleó el rh IFN- $\gamma$  a las concentraciones de 2 y 20  $\mu$ g/mL, así como los sobrenadantes

de PBMC estimulados y no estimulados. Es importante mencionar, que debido a las bajas cantidades de IFN- $\gamma$  natural presentes en PBMC estimuladas con PHA de 539 pg/mL, y a partir de este sobrenante que fué concentrado, se preparó una solución de trabajo del antígeno a  $5.39 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ , adicionando  $1.63 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/pozo}$  para cada condición, no fue posible observar valores de IF considerables para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  natural por ninguno de los anticuerpos biotinilados de captura, por consiguiente no se calculó el porcentaje de inhibición para las diferentes muestras de auto-anticuerpos analizadas.

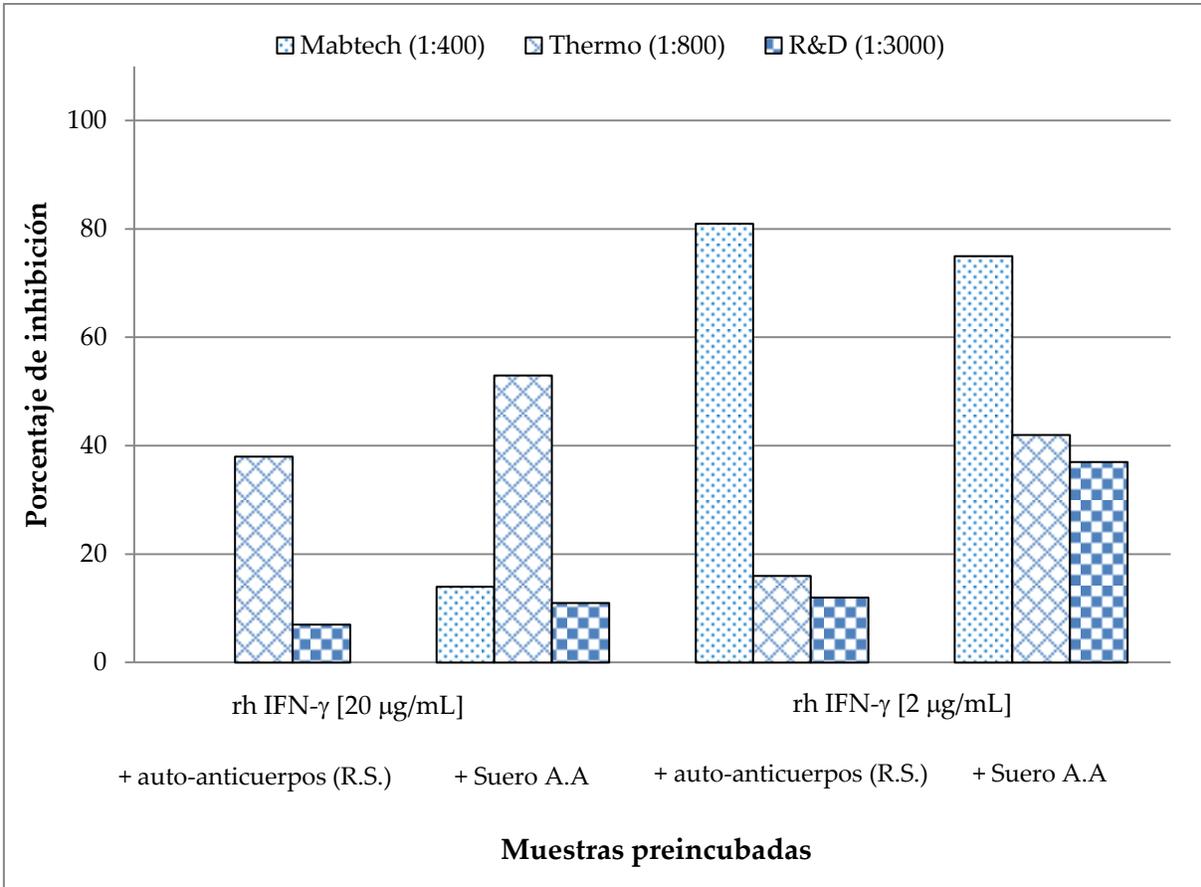
En la **Figura 17**, se muestran gráficamente los porcentajes de inhibición obtenidos del reconocimiento de la citocina rh IFN- $\gamma$  (20  $\mu\text{g/mL}$  y 2  $\mu\text{g/mL}$ ) por los auto-anticuerpos anti-citocina presentes en la muestra sérica (A.A.) y en la preparación purificada, empleando tres en cada una de las diferentes condiciones de trabajo analizadas.

<b>Condiciones de trabajo</b>						
Sistema de microesferas: Estreptavidina y BSA	<b>Anticuerpos biotinilados (Captura)</b>	<b>Muestras pre incubadas</b>	<b>Promedio de intensidades de fluorescencia <math>\pm</math> SD</b>		<b>Porcentaje de inhibición</b>	
	MAb Hu IFN- $\gamma$ (1:400)		rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + Diluyente	1,441*	$\pm$ 49	0 %
			rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + auto-anticuerpos R.S.	1,507	$\pm$ 116	0%
			rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + Suero A.A.	1,243	$\pm$ 10	14%
	Mabtech		rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + Diluyente	3,414*	$\pm$ 112	0%
			rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + auto-anticuerpos R.S.	648	$\pm$ 110	81%
			rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + Suero A.A.	850	$\pm$ 113	75%
	MAb Hu IFN- $\gamma$ (1:800)		rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + Diluyente	472*	$\pm$ 112	0%
			rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + auto-anticuerpos R.S.	293	$\pm$ 54	38%
			rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + Suero A.A.	222	$\pm$ 47	53%
			rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + Diluyente	241*	$\pm$ 65	0%
			rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + auto-anticuerpos R.S.	203	$\pm$ 50	16%
	Ab Hu IFN- $\gamma$ (1:3,000) R&D		rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + Diluyente	240*	$\pm$ 26	0%
			rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + auto-anticuerpos R.S.	224	$\pm$ 87	7%
			rh IFN- $\gamma$ [20 $\mu$ g/mL] + Suero A.A.	213	$\pm$ 33	11%
			rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + Diluyente	204*	$\pm$ 28	0%
			rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + auto-anticuerpos R.S.	179	$\pm$ 23	12%
			rh IFN- $\gamma$ [2 $\mu$ g/mL] + Suero A.A.	128	$\pm$ 27	37%

**Tabla 9. Valores de IF  $\pm$ SD y porcentaje de inhibición obtenidos mediante el ensayo de neutralización para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas.** Todas las condiciones evaluadas fueron trabajadas por duplicado, empleando como anticuerpo de detección a MAb anti-Hu IFN- $\gamma$ -PE. \*Estos valores son considerados como el 100% de reacción para cada una de las condiciones trabajadas de acuerdo a anticuerpo de captura utilizado y la concentración de rh IFN- $\gamma$ , a partir de los cuales fue calculado el porcentaje de inhibición.



**Figura 16. Valores promedio de IF  $\pm$  SD obtenidos mediante el ensayo de neutralización para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  (20  $\mu\text{g/mL}$  y 2  $\mu\text{g/mL}$ ) por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas, empleando la técnica de Luminex. Los anticuerpos biotinilados Mab Hu IFN- $\gamma$  Mabtech (1:400), Mab Hu IFN- $\gamma$  Thermo (1:800) y Hu IFN- $\gamma$  R&D (1:3,000), fueron utilizados como anticuerpos de captura para las diferentes condiciones de trabajo. Todas las muestras trabajadas por duplicado.**



**Figura 17. Valores de porcentaje de inhibición para el reconocimiento de la citocina rh IFN- $\gamma$  (20  $\mu\text{g/mL}$  y 2  $\mu\text{g/mL}$ ) por auto-anticuerpos presentes en muestras séricas.** Se muestran los anticuerpos de captura empleados en las diferentes condiciones de trabajo, donde  representa al anticuerpo Mab Hu IFN- $\gamma$  biotinilado Mabtech (1:400),  al anticuerpo Mab Hu IFN- $\gamma$  biotinilado Thermo y  el anticuerpo anti Hu IFN- $\gamma$  biotinilado R&D (1:3,000).

De acuerdo a los resultados obtenidos para cada una de las condiciones trabajadas, se observaron mayores valores de IF para el reconocimiento de la citocina rh IFN- $\gamma$  al emplear como Ab de captura al Mab Hu IFN- $\gamma$  Mabtech (1:400) con IF de 1,441 y 3,414 para cada una de las concentraciones evaluadas de rh IFN- $\gamma$  a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Mientras que el Ab MAb Hu IFN- $\gamma$  Thermo, presentó valores de IF de 472 para la concentración 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 241 para 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en tanto que al utilizar al Ab Hu IFN- $\gamma$  R&D se observaron los valores más bajos de IF de 240 para la concentración 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 204 para 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos valores de IF fueron considerados como el 100% de la interacción (reacción) entre el Ab de captura, la citocina rh IFN- $\gamma$  y el Ab de detección, a partir de los cuales se calculó el porcentaje de inhibición para cada uno de los auto-anticuerpos anti-citocina, en las diferentes condiciones de trabajo.

Por lo tanto, considerando los valores de porcentaje obtenidos se pudo observar un mejor reconocimiento del rh IFN- $\gamma$  por el Ab Mab Hu IFN- $\gamma$  Mabtech como Ab de captura, en comparación de los otros dos anticuerpos (MAb Hu IFN- $\gamma$  Thermo y Hu IFN- $\gamma$  R&D), en todas las condiciones trabajadas. Así mismo, al emplear una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de rh INF- $\gamma$  con los auto-anticuerpos presentes en el purificado R.S. y el suero A.A, se observó un mayor porcentaje de inhibición para todas las condiciones analizadas, sin embargo se observó mayor inhibición en la mayoría de los casos al emplear a la muestra sérica A.A., excepto en la condición donde se trabajó con el Ac Mabtech, más rh IFN- $\gamma$  (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y los auto-anticuerpos R.S., que presentó el mayor porcentaje de inhibición de todas las condiciones evaluadas.

## 7. DISCUSIÓN

Las enfermedades autoinmunes son caracterizadas por una activación de células T y células B auto-reactivas, y están asociadas en algunos casos con la producción de auto-anticuerpos contra moléculas propias, generando inflamación y daño del tejido. Durante el desarrollo de la autoinmunidad, pueden ser producidos auto-anticuerpos que pueden neutralizar componentes importantes del sistema inmune y que son esenciales para montar respuestas contra microorganismos. Estos auto-anticuerpos pueden favorecer enfermedades infecciosas presentes o predisponer a los individuos a un riesgo incrementado de infecciones bacterianas, virales y fúngicas (Bettelli, *et al.* 2008)

El IFN- $\gamma$  es una citocina pleiotrópica que tiene la capacidad de ejercer sus efectos en diversas células, posee actividad inmunomoduladora e incrementa la expresión de antígenos de HLA de clase I y II, así como la activación de diversas células, especialmente a macrófagos. Su producción deficiente reduce la capacidad microbicida y aumenta la susceptibilidad a infecciones intracelulares persistentes o recurrentes causadas por microorganismos como *Micobacterium*, *Salmonella* y *Leishmania*, es así que resulta de gran interés la determinación de la presencia de esta citocina, así como la identificación de auto-anticuerpos que afecten su función (Zhiguang, 2014).

La introducción de técnicas basadas en las reacciones inmunológicas ha sido de gran importancia para el análisis, reconocimiento y cuantificación de una gran cantidad de moléculas. Los procedimientos inmunológicos más utilizados son los que se basan en la unión antígeno-anticuerpo, considerando la propiedad de las inmunoglobulinas de unirse a un antígeno de manera específica mediante interacciones mutuas, además del hecho de que pueden visualizarse por los fenómenos de precipitación, aglutinación y mecanismo indirectos (marcaje con fluorocromos, radioisótopos o enzimas), hacen que estos métodos sean empleados ampliamente para la cuantificación de antígenos o anticuerpos. En caso de enfermedades autoinmunes, las técnicas inmunológicas permiten la detección de varios auto-anticuerpos simultáneamente a partir de volúmenes

muy pequeños, aunado al desarrollo de nuevas técnicas, la sensibilidad y especificidad de algunas pruebas serológicas ha ido en aumento, de tal manera que permiten realizar diagnósticos y análisis con mayor certeza (Stock y Calderon, 2010; Hernández, 2009).

En el presente trabajo se llevó a cabo la producción de la citocina IFN- $\gamma$  natural a través de la estimulación de PBMC y células de sangre completa empleando diferentes mitógenos, con la finalidad de identificar a esta citocina empleando la técnica de electroforesis; así mismo, para realizar el reconocimiento de dicha citocina por auto-anticuerpos específicos, mediante la estandarización de las técnicas de ELISA y el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión (Luminex).

La diferenciación de células T en subpoblaciones Th1 o Th2 según su patrón de citocinas ha sido de gran importancia en el análisis de la regulación de las respuestas inmunes; en presencia de la estimulación antigénica los linfocitos Th1 producen IL-2 e IFN- $\gamma$ , y estimulan la inmunidad mediada por células, mientras que los linfocitos Th2 segregan IL-4, IL-5 e IL-10, y participan en el desarrollo de la inmunidad humoral. Existen diferentes mitógenos de linfocitos que dan lugar a una respuesta policlonal, sin la participación directa del receptor antigénico (TCR o BCR), que conlleva a la liberación de diversas citocinas, que a su vez contribuyen a la autoproliferación del linfocito (Botella, 2012). Sin embargo, no todos los linfocitos responden de igual forma a los diferentes mitógenos, así la lectina PHA estimula preferentemente a células T, aunque tienen un pequeño efecto sobre linfocitos B, la Con A es también un mitógeno de linfocitos T, mientras que el Pokeweed actúan tanto en LT como LB, por su parte los LPS son activadores de LB y los inóforos aumentan la concentración de calcio intracitoplasmático, que en conjunto con los esterés de forbol que activan a la proteína cinasa C están involucrados en la activación de LT (Botella, 2012; Tizard, 2009). En el presente estudio la producción de la citocina IFN- $\gamma$  natural se llevó a cabo mediante la estimulación *in vitro* de células de sangre completa y PBMC, como respuesta al proceso de activación de linfocitos por estímulos

inespecíficos con LTA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Con A (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PHA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PMA/IONO (10  $\text{ng}/\text{mL}/1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) y Pokeweed (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

La estimulación *in vitro* de PBMC mostró un mayor efecto sobre la proliferación celular y producción de la citocina IFN- $\gamma$  natural al emplear a la lectina PHA, seguida de la estimulación con Pokeweed y PMA/IONO; sin embargo, de acuerdo a la presencia de la banda correspondiente al IFN- $\gamma$  natural observada en los geles de electroforesis y al análisis de los mismos, se obtuvo una mejor producción de esta citocina al emplear como mitógeno a la PHA.

Se sabe que la PHA, que es una lectina de origen proteínico derivada de la semilla del frijol (*Phaseolus vulgaris*) formada estructuralmente por dos subunidades E y L. Su actividad mitogénica se basa en la capacidad de unirse a residuos de azúcar en las cadenas laterales de glicoproteínas presentes en las membranas de linfocitos, además es reconocida por su capacidad de aglutinar eritrocitos y leucocitos (Canda, 2011).

La producción de IFN- $\gamma$  natural por la estimulación con PHA, se reafirmó al realizar la identificación de la banda correspondiente a esta citocina, mediante la determinación de su peso molecular y su comparación con la citocina rh IFN- $\gamma$  (control positivo), obteniendo valores 16.8 kD y 16.9 kD, respectivamente. Estos valores pueden compararse con el trabajo realizado por Zhiguang y colaboradores, que han realizado estudios comparativos de la estructura cristalina de las cadenas del receptor de IFN- $\gamma$  humano y de pollo a través de diversas técnicas, incluyendo la técnica de electroforesis donde reportan un peso molecular de 17 kD correspondiente a la banda de IFN- $\gamma$  humano purificado y de 24 kD para IFN- $\gamma$  de pollo (Zhiguang, 2014).

Con respecto a las muestras de células de sangre completa estimuladas con PHA, no fue posible realizar la identificación de la citocina IFN- $\gamma$  natural mediante la técnica de electroforesis, debido a la presencia de una gran cantidad de proteínas séricas en la sangre, que impidieron la visualización de las moléculas a través de gel de electroforesis, logrando observar sólo la presencia de manchas difusas.

La capacidad de las PBMC en la producción de la citocina IFN- $\gamma$  natural como respuesta a la estimulación *in vitro* con PHA, se evaluó mediante la cuantificación de esta citocina, empleando la técnica de ELISA (Kit Pelikine compac<sup>TM</sup>), los resultados obtenidos mostraron mayores cantidades de IFN- $\gamma$  natural al trabajar con PBMC (539 pg/mL), comparadas con la producción en células de sangre completa (305 pg/mL), mientras que las muestras no estimuladas presentaron valores de 11 pg/mL para PBMC, y de 59 pg/mL para células de sangre completa. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Anibarro y colaboradores, que reportan los niveles de IFN- $\gamma$  producidos por PBMC de pacientes clínicamente sanos al ser estimuladas con PHA (10  $\mu$ g/mL), obteniendo concentraciones de 8 pg/mL y de 440 pg/mL para las PBMC sin estímulo y con estímulo, respectivamente, empleando la técnica de ELISA sandwich (Anibarro, 2011).

Con respecto a la estandarización de la técnica de ELISA para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  natural, se puede mencionar que para las muestras correspondientes a los sobrenadantes de PBMC estimulados con PMA/IONO, Pokeweed y PHA, estos presentaron un débil reconocimiento por los anticuerpos anti IFN- $\gamma$  trabajados en este ensayo (Hu IFN- $\gamma$  biotin R&D, MAb Hu IFN- $\gamma$  biotin, Mabtech y MAb Hu IFN- $\gamma$  biotin Thermo, así como por los auto-anticuerpos presentes en las dos muestras séricas (SM y HVP), dichos resultados pueden explicarse debido a las bajas cantidades de IFN- $\gamma$  natural utilizadas en el ensayo, las cuales fueron insuficientes para obtener una reacción considerable para el reconocimiento por los anticuerpos específicos para la citocina de interés. Así mismo, se pudo observar que a concentraciones de 2  $\mu$ g/mL de la citocina rh IFN- $\gamma$  es identificada eficientemente por el antisuero policlonal Hu IFN- $\gamma$  biotin R&D, así como por el auto-anticuerpos purificado (SM.).

Considerando las concentraciones empleadas para la estandarización del ELISA, la literatura reporta que una concentración de antígeno entre 1-10  $\mu$ g/mL es suficiente para la adsorción y la inmovilización de éste a la fase sólida y

alcanzar una señal máxima por los anticuerpos específicos, de la misma forma es importante garantizar la purificación del material biológico. Así mismo, refiere que el uso de antisueros policlonales como el Hu IFN- $\gamma$  biotin R&D trabajado en este ensayo, permiten reconocer una variedad de epítomos sobre Ag (IFN- $\gamma$ ), permitiendo detectar menores cantidades del Ag, polimorfismos, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización, en comparación con los anticuerpos monoclonales (Ochoa, 2012). Por lo tanto, podemos mencionar que para la estandarización de esta técnica, es importante considerar una concentración mínima de 1 a 2  $\mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  natural presente en sobrenadantes de PBMC estimuladas, para poder obtener niveles de detección favorables para la identificación de esta citocina.

Aunque en el presente estudio se ha demostrado la detección de la citocina IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC, como producto de la estimulación celular con diferentes mitógenos, específicamente con PHA, a través del empleo de diferentes técnicas como electroforesis y ELISA, sin embargo debido a la baja cantidad de IFN- $\gamma$  natural obtenida, se recurrió al empleo de una técnica más reciente y con mayor sensibilidad como es el ensayo Luminex para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  por auto-anticuerpos, mediante la estandarización de un ensayo de neutralización.

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  $\mu\text{g}$ ) que deseen acoplarse a las diferentes microesferas, así como de muestras séricas (1-3  $\mu\text{l}$ ); otra ventaja aunada a esta técnica es que existe el análisis de antígenos múltiples realizado en un solo pozo

en forma simultánea, 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, resultando ser una técnica económica considerando la reducción en el número de micropozos utilizados y en el volumen de todos los reactivos necesarios (Stenger, 2011).

El ensayo de neutralización es un procedimiento de serología con un alto grado de especificidad ya que los anticuerpos neutralizantes son dirigidos contra determinantes antigénicos específicos, lo convierte en un estándar de otros métodos serológicos, su determinación es de gran utilidad para evidenciar la respuesta inmune de un individuo (Stock y Calderon, 2010).

Considerando que el objetivo del presente estudio es el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  natural por diferentes técnicas, así como la estandarización de las mismas, se llevó a cabo el ensayo de neutralización mediante la técnica de Luminex, para lo cual fue necesario evaluar diferentes condiciones de trabajo, que incluyeron la elección del Ab de captura más apropiado, la concentración del antígeno (IFN- $\gamma$ ) y la evaluación de la capacidad neutralizante de los auto-anticuerpos anti-citocina (IFN- $\gamma$ ) presentes en una muestra sérica A.A. y en una preparación de anti-Ac anti-IFN- $\gamma$  purificados (R.S).

En la determinación de la dilución óptima de trabajo para los tres anticuerpos de captura identificados como Hu IFN- $\gamma$  biotin R&D, MAb Hu IFN- $\gamma$  biotin Mabtech y MAb Hu IFN- $\gamma$  biotin Thermo, se observaron valores de IF mayores para el antisuero policlonal IFN- $\gamma$  R&D, ésto se fundamenta debido a que dicho Ab tiene una mayor capacidad de unión a distintos determinantes antigénicos, en comparación con los anticuerpos monoclonales Hu IFN- $\gamma$  biotin Mabtech y Hu IFN- $\gamma$  biotin Thermo producidos por un solo grupo de linfocitos B, que reconocen de manera específica a un solo epítipo antigénico. Así mismo, las altas IF observadas se vieron favorecidas al emplear un sistema de

microesferas con la citocina IFN- $\gamma$  acoplada, aunado a la amplificación dada por el fluorocromo PE.

Con respecto al ensayo de neutralización y la evaluación de las diferentes condiciones de trabajo, se demostró que el Ab de captura MAb Hu IFN- $\gamma$  biotin Mabtech presenta una mejor capacidad de reacción por el rh IFN- $\gamma$ , comparado con los anticuerpos Hu IFN- $\gamma$  biotin R&D y MAb Hu IFN- $\gamma$  biotin Thermo, obteniendo valores IF mayores; es importante resaltar que debido a que se incluyó el Ab monoclonal anti IFN- $\gamma$  PE como Ab de detección, se observó una señal débil de reacción entre el anticuerpo Hu IFN- $\gamma$  biotin R&D y el rh IFN- $\gamma$ , contrario a lo que se había observado en la titulación del mismo, sin embargo esto puede explicarse ya que al utilizar un antisuero policlonal como Hu IFN- $\gamma$  biotin R&D, éste puede reconocer y ocupar los epítomos específicos a los que va dirigido el Ab monoclonal de detección y por consiguiente se observa una disminución en la señal producida en el reconocimiento de la citocina de interés por los auto-anticuerpos analizados.

Así mismo, en todas las condiciones empleadas para la inhibición de la citocina IFN- $\gamma$  la concentración de rh IFN- $\gamma$  a 2  $\mu$ g/mL fue la más óptima y consistente en comparación con el uso de la concentración a 20  $\mu$ g/mL, éste fenómeno puede explicarse debido a que el reconocimiento de un epítomo por un Ac específico, puede depender la conformación tridimensional para establecer su unión con las regiones variables de los anticuerpos; considerando esto es posible que la presencia de altas cantidades de la citocina rh IFN- $\gamma$  (20  $\mu$ g/mL) pudo generar un impedimento estérico para permitir su reconocimiento por los anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ . Por otra parte se observaron valores de porcentaje de inhibición muy considerables en la mayoría de las condiciones trabajadas al emplear los auto-anticuerpos presentes en la muestra sérica A.A en comparación con el purificado (R.S.), a excepción de cuando se utilizó el anticuerpo Mab Hu IFN- $\gamma$  biotin (1:400), el rh IFN- $\gamma$  a 2  $\mu$ g/mL y los -anticuerpos

presentes en el purificado (R.S.), donde se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición.

Finalmente, con respecto a los sobrenadantes de PBMC estimulados con PHA, no fue posible observar un efecto de inhibición por los auto-anticuerpos evaluados (muestra sérica y auto-anticuerpos purificados), posiblemente debido a las bajas cantidades de IFN- $\gamma$  natural presente en los sobrenadantes, por lo tanto para demostrar la inhibición de ésta citocina natural por el reconocimiento de los auto-anticuerpos es necesario considerar una mayor cantidad de la citocina natural, teniendo como referencia al menos una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$ , como se demostró al emplear el rh IFN- $\gamma$ .

## 8. CONCLUSIONES

1. Se logró la producción de la citocina IFN- $\gamma$  natural por las PBMC estimuladas *in vitro* con el mitógeno PHA.
2. Se estandarizó la técnica de electroforesis para la determinación de la presencia de la citocina IFN- $\gamma$  natural en sobrenadantes de PBMC estimuladas con PHA.
3. La cuantificación mediante la técnica de ELISA de los niveles de IFN- $\gamma$  natural presentes en el sobrenadante de PBMC estimulado con PHA, confirmó la presencia de esta citocina observada en los geles de poliacrilamida.
4. Se determinó que para el reconocimiento efectivo de la citocina IFN- $\gamma$  por anticuerpos específicos mediante la técnica de ELISA, es necesario el empleo de una concentración de 2 $\mu$ g/mL de esta citocina.
5. Se estandarizó el ensayo de neutralización mediante la técnica de Luminex para el reconocimiento de la citocina IFN- $\gamma$  por auto-anticuerpos, donde la concentración de 2  $\mu$ g/mL, así como el empleo del Ab Hu IFN- $\gamma$  biotin (1:400) como Ab de captura resultaron ser las condiciones de trabajo óptimas.
6. Los auto-anticuerpos presentes en la muestra sérica (A.A.). presentaron en la mayoría de las condiciones trabajadas en el ensayo de neutralización valores mayores de porcentaje de inhibición, en comparación con los auto-Abs purificados (R.S.).

## 9. REFERENCIAS

- Altare, *et al.* (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human IL-12 receptor deficiency. *Science* 280, 1432-1435.
- Anibarro, L. *et al.* (2011). Eje IL-12/IFN- $\gamma$  en pacientes de tuberculosis en una región europea con alta incidencia de enfermedad. *ELSEVIER DOYMA, Inmunología.*, 36-44.
- Araujo, A. C. (2011). Antibody Avidity and Antigen-Specific. *CDC*, 26.
- Argyrios, N. T. *et al.* (2001). The role of IFN-g in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity . *Biomed Central*, 136-141.
- Arpa, T. L. (2008). Tesis doctoral Mecanismos moleculares que regulan la activación clásica y alternativa en los macrófagos. Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Avedaño, S. C. (2009). Interferones: tipos y acciones. *Gastroenterol Hepatol.*, 125-128.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M. *et al.* VK. (2008). Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453: 1051–1057.
- Borden, E. C. (2014). *Molecular Basis of Cancer Therapy*.
- Botella, R. *et al.* (2012). Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. *Actas Dermosifiliográficas*, 87-101.
- Browne y Holland. (2010). Anticytokine autoantibodies in infectious diseases: pathogenesis and mechanisms. *Lancet Infect Dis* 2010;10: 875–85.
- Brunelle, J.L. y Verde, R. (2014). Electroforesis unidimensional de SDS-PAGE. *Methods Enzymol.*, 151-159.
- Canda, S. A. (2011). *Tesis doctoral Rafts lipídicos e IL-12R: Nuevos avances en el control de la actividad proliferativa de IL-12*. Universidad de Santiago de Compostela, España.

- Carretero, M. (2009). Interferon beta . Barcelona: Actualidad Científica.
- Delves Peter, *et al.* (2014). *Roitt Inmunología*. México: Médica Panamericana.
- Dubin PJ, Kolls JK. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 226: 160–171.
- Döffinger, R., Patel, S. and Kumararatne, D. (2005). Human immunodeficiencies which pre-dispose to intracellular bacterial infection. *Current Opinion in Rheumatology*, 17, 440-6.
- 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.
- Duarte, R.F. y Frank, D.A. (2010). The JAK-STAT signaling pathway and its role in oncogenesis, immunomodulation and development. *Medicina Clínica*, 227-234.
- Fainboim, L y Geffner, J. (2008). *Introducción a la Inmunología Humana*. Buenos Aires: Médica Panamericana .
- Gutierrez . P. J. (2010). *Inmunología Veterinaria*. México: El Manual Moderno.
- Hernández, F. y Cabiedes, J. (2009). Técnicas Inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatología clínica*, 173-177.
- Hoflich C, Sabat R, Rosseau S. *et al.* (2004). Naturally occurring anti-IFN- $\gamma$  autoantibody and severe infections with Mycobacterium chelonae and Burkholderia cocovenenans. *Blood* 103: 673–675.
- 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.
- Kenneth, M., Travers, P, Walport M. (2009). *Inmunobiología.de Janeway* México : McGraw-Hill.

- Krebs, D. y. (2007). Proteínas SOCS: reguladores negativos de la señalización de citocinas. *Stem Cells*, 378-387.
- Luna. Q.G. y Juarez, G.I.(2011). El interferon en el mecanismo tumoral. *RIC*, 11-18.
- 
- Meager M, Wadhwa P, *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.
- 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)
- Manrique, C. y Silva, G.D. (2010). *Apoptosis de las células beta del páncreas durante la diabetes de tipo 1*. *Fac Med Univ Nac Colomb*, 181-189.
- Mata-Espinosa, y Hernández-Pando (2008). Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Revista de Investigación Clínica.*, 421-431.
- Morales, S. y Gallo, R.L. (2006). *Métodos físicos.químicos en Biotecnología*. Cuernavaca Morelos: UNAM.
- Lomonte, B. (2009). *Técnicas de laboratorio en Inmunología Clínica* . Costa Rica: Universidad de costa Rica.
- Ochoa, A. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos*. La Habana: FINLAY.
- Owen, J.A. y *et al.* (2014). *Kuby Inmunología*. México: Mc Graw Hill.
- Parham, P. (2006). *Inmunología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

- Palomar, M. L. *et al.* (2013). Manual básico de laboratorio de Inmunología. México: UNAM.
- Patel, Ding, Brown, *et al.* (2005). Anti-IFN- $\gamma$  autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *J Immunol* 175: 4769–4776.
- 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, Barcenas-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.
- 
- Quintana J. F., Yeste, A., Mascanfroni, I.D. *et al* (2015). *Inmunopatología de la esclerosis múltiple*. Barcelona, España: AMBOS.
- Ramos, B.D. y Ramos, N.F. (2008). Interferon: 50 años después. *Gaceta Médica*, 55-66.
- Reverberi, R. (2007). 227. *Blood Transfus*, 227-240.
- Rojas, E.O. (2006). Inmunología (de memoria). México: Medica Panamericana.
- Rodríguez, M. R. *et al.*(2015). El rol de IFN-g, IL-13, IL-18 y sus receptores en la periondontitis. *Revista Mexicana de Periodontología*, 33-39.
- Romero, A. (2009). Citocinas y lupus eritematoso sistémico. *Gaceta médica*, 190-211.
- Stenger, R. M. (2011). Fast, Antigen-Saving Multiplex Immunoassay to Determine Levels and Avidity. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, 595–603.
- Stock. S.R. y Calderón, P. (2007). Inmunología. México: UNAM.
- Tizard, R.I. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria . Texas: ELSEVIER.

- William Rojas M, *et al.* (2012). *Inmunología de Rojas*. Medellin, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas.
- Zhang Y.S, Boisson, D.S. *et al* (2008). Inborn errors of interferon (IFN) mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-a/b, IFN-g is host defense. *Inmunological Reviews*, 29-40.
- Zhiguang, P. *et al.* (2014). Crystal structure of the gamma receptor alpha chain from chicken reveals an undetected extra helix compared with the human counterparts. *Journal of Interferons & Cytokine research*, 41-51.

## APÉNDICE

<i>Solución</i>	<i>Especificaciones</i>	<i>Preparación</i>
Solución amortiguadora de revestimiento	Solución de amortiguadora de carbonatos/bicarbonatos 0.5 M a pH 9.6	1.24 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O en 100 mL de agua destilada
		1.68 g NaHCO <sub>3</sub> en 200 mL de agua destilada
Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)	0.2 M a pH 6.8-6.9	32 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
		6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
		164 g NaCl
		900 mL agua destilada
Solución amortiguadora de lavado	PBS con 0.005 % de Tween20	1 L de PBS
		50 mL Tween20
Solución amortiguadora de sustrato	Solución amortiguadora de acetatos 0.11 M a pH 5.5	15 g CH <sub>3</sub> COONa.3H <sub>2</sub> O
		Ajustar PH con CH <sub>3</sub> COOH
Solución madre de TMB	3,5,3'5' tetrametilbencidina (TMB)	30 mg TMB
		5 mL DMSO
Solución stock de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3% de H <sub>2</sub> O	Diluir en agua destilada
Solución sustrato	Solución amortiguadora de sustrato	30 mL
	Solución stock de TMB	500 mL
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 mL
Solución de paro	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 1.8 M	Diluir en agua destilada

<i>Solución</i>	<i>Reactivo</i>	<i>Cantidades</i>
Solución amortiguadora de corrida para electroforesis, pH 8.3	Trizma base (0.025M)	3.023 g
	Glicina (0.192M)	14.4 g
	SDS (0.1%)	1.0 g
	Agua destilada	1000 mL
	Si es necesario ajustar el pH, debe hacerse con Trizma base.	
Solución digestora	Tris base (0.5M) pH 6.8	4.375 mL, (0.125M)
	SDS	0.1 g, (2%)
	Glicerol	0.5 mL, (10%)
	2-Mercaptoetanol	0.125 mL, (2.5%)
	Azul de Bromofenol	1%
Solución stock de tinción (Azul de Coomassie)	Azul de Coomassie R-250	2.0 g
	Agua destilada	200 mL
Solución de trabajo para tinción de proteínas (Azul de Coomassie R-250 al 0.125%)	Solución concentrada azul de Coomassie	63.5 mL
	Metanol absoluto	250 mL
	Ácido acético glacial	50 mL
	Agua destilada	1375 mL
	Esta solución se filtra en papel Whatman antes de usarse	
Solución desteñidora I	Metanol	250 mL
	Ácido acético	50 mL
	Agua destilada	200 mL
Solución desteñidora II	Metanol	25 mL
	Ácido acético	23 mL
	Agua destilada	440 mL

<b>Solución</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Cantidades</b>
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10x, pH = 7.2-7.4	Cloruro de sodio (NaCl)	80.0 g
	Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10.0 g
	Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.91 g
	Cloruro de potasio (KCl)	1.60 g
	Agua destilada	1 000 mL
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH= 7.2	Cloruro de Sodio (NaCl)	8.00 g
	Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.21 g
	Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.34 g
	Agua destilada	1000 mL
Solución de amortiguadora de carbonatos (0.05 M), pH=9.6	Bicarbonato de sodio ácido (NaHCO <sub>3</sub> )	0.293 g
	Carbonato de sodio anhidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.159 g
	Agua destilada	100 mL
Solución amortiguadora de Fosfato-Citrato (0.05 M), pH= 5	Fosfato de sodio dibásico	0.7296 gr en 25.7 mL agua destilada
	Ácido cítrico 0.1 M	0.510 gr en 24.3 mL de agua destilada.
	Ajustar con agua destilada	1000 mL
Solución bloqueadora BSA-PVP-PVA	BSA (1%)	0.5 gr
	PVA (0.5%)	0.25 gr
	PVP (0.8%)	0.4 gr
	Ajustar con agua destilada a	100 mL
Solución pre-bloqueadora	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)	50 mL
	BSA (0.5%)	0.25 gr