



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**Técnica de cromatografía de afinidad por columna para la
purificación de auto-anticuerpos contra interleucina 6 humana.**

Que para obtener el grado de:
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.

P r e s e n t a:

Karla Dominik Cabral Sánchez

Tutor: Dra. Gabriela Barcenas Morales.

Co-asesor: Dr. Rainer Döffinger.

Cuautitlán Izcalli, Estado De México, 2018



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.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
INDICE DE GRÁFICAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Antecedentes</i>	1
1.2. <i>Interleucina 6 (IL-6)</i>	2
1.3. <i>Auto-anticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones</i>	4
1.4. <i>Anticuerpos</i>	8
1.4.1. <i>Estructura de anticuerpos</i>	14
1.5. <i>Interacciones de antígenos-anticuerpos</i>	18
1.6. <i>Cromatografía de afinidad por columna</i>	19
1.7. <i>Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión multi-Plex (Luminex)</i>	22
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. <i>Objetivo general</i>	28
4.2. <i>Objetivos específicos</i>	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1. <i>Muestras séricas</i>	29
5.2. <i>Análisis de la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 en muestras séricas mediante la técnica de ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex)</i>	30
5.3. <i>Estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna para la purificación de auto-anticuerpos anti-IL-6</i>	31
5.3.2. <i>Procedimiento general para la purificación de auto-anticuerpos</i>	35
5.3.3. <i>Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad</i>	37
5.4. <i>Detección de auto-anticuerpos anti-citocinas en las diferentes fracciones eluidas de la columna de purificación, mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión monoplex, Luminex</i>	38
6. RESULTADOS	40
6.1. <i>Detección de auto-anticuerpos contra IL-6 en muestras séricas</i>	40

6.2. Estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna para la purificación de auto-anticuerpos contra IL-6 presentes muestras séricas.....	42
6.2.1. Detección de auto-anticuerpos anti-IL-6 en las diferentes fracciones obtenidas por la técnica de cromatografía de afinidad por columna	42
6.3. Purificación de auto-anticuerpos contra IL-6 presentes en muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos.	45
6.4. Análisis de la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 purificados en las diferentes fracciones obtenidas por la técnica de cromatografía de afinidad por columna	45
7. Discusión.....	59
8. Conclusiones	65
9. Bibliografía.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proceso que conduce la producción de anticuerpos.	11
Figura 2. Los anticuerpos pueden participar de tres modos en la defensa del hospedador.	13
Figura 3. Estructura general de un anticuerpo.	17
Figura 4. Acoplamiento de proteína a un soporte inerte (perlas de agarosa).	21
Figura 5. Estructura y esquema general de reacción para la resina AminoLinK e inmovilización química de la resina.	22
Figura 6. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).	24

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos contra IL-6.	29
Tabla 2. Detección de la presencia de auto-anticuerpos anti-IL- en muestras séricas humanas.	40

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Detección de la presencia de auto-anticuerpos anti-IL- en muestras séricas humanas	41
Gráfica 2	Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código BC602735 .	44
Gráfica 3	Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código BC761842 .	47
Gráfica 4	Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código HP180660 .	50
Gráfica 5	Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código AJ060393 .	53
Gráfica 6	Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código NJ13087 .	55
Gráfica 7	Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código SW140456 .	58

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac/Ab	Anticuerpos.
BCR	Receptor de células B.
BSA	Albúmina sérica bovina.
°C	Grados centígrados.
CRP	Proteína C Reactiva.
Ca ⁺²	Calcio.
CDR	Regiones de complementariedad.
C _H	Cadena pesada.
C _L	Cadena ligera.
Fab	Fragmento de unión al antígeno.
Fc	Fragmento cristalizable.
FcR	Receptores para la fracción cristalizable.
g	Gravedades.
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos.
H	Cadena pesada.
HCl	Ácido clorhídrico.
IFN- γ	Interferón gama.
IL	Interleucina.
K ⁺	Potasio.
L	Cadena ligera.
M	Molar.
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
mL	Mililitro.
Na ⁺	Sodio.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaCNBH ₃	Cianoborohidruro de sodio.
NaN ₃	Azida de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NH ₃	Aminas primarias.
NK	Natural killer.
NO	Óxido nítrico.
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PAP	Fosfatasa ácida prostática.
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PBS-T	PBS-Tween.
PE	Ficoeritrina.
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted.
rh-IL-6	Interleucina 6 recombinante humana.
rpm	Revoluciones por minuto.

STAT-1	Transductor de señales y activador transcripcional-1.
STAT-3	Transductor de señales y activador transcripcional-3.
Strep	Estreptavidina.
sICAM-1	Molécula de adhesión intercelular soluble 1
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
VCAM-1	Molécula 1 de adhesión de células vasculares.
V _H	Dominio variable de la cadena pesada.
V _L	Dominio variable de la cadena ligera.
μg	Microgramo.
μL	Microlitro.

RESUMEN

Un número cada vez mayor de estudios han identificado que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra algunas citocinas, como una consecuencia de autoinmunidad, afecta las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, donde finalmente predispone al hospedador a enfermedades infecciosas producidas por una serie de microorganismos. Sus manifestaciones son diversas e incluyen susceptibilidad adquirida a infecciones micobacterianas por la presencia de auto-anticuerpos contra IFN- γ , auto-anticuerpos anti-IL-6 en pacientes con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente, proteínosis alveolar pulmonar debido a auto-anticuerpos anti-GM-CSF, así mismo; auto-anticuerpos neutralizantes contra citocinas IL-12, IL-17A, IL-17F e IL-22 han sido reportados en pacientes con candidiasis mucocutánea crónica y/o con síndrome poli-endócrino autoinmune-1, timoma y miastenia gravis (Meager, *et al.* 2003; Zhang, *et al.* 2003; Doffinger, *et al.* 2004, Hoflich, *et al.* 2004; Puel, *et al.* 2008; Kisand, *et al.* 2010; Puel, *et al.* 2010).

Para dar continuidad a los estudios desarrollados por nuestro grupo de trabajo enfocado a la detección y análisis de la presencia de auto-anticuerpos contra ciertas citocinas y quimiocinas, el objetivo del presente trabajo fue estandarizar y disponer de técnicas, como es la de cromatografía de afinidad en columna, para lograr la purificación de auto-anticuerpos anti-IL-6 presentes en muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes; lo cual , permitirá a futuro realizar un estudio más claro y preciso para poder determinar la función de dichos auto-anticuerpos; por ejemplo, empleando ensayos in vitro de inhibición de la actividad biológica de citocinas. (Döffinger *et al.*, 2004; Puel *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2011, tesis de licenciatura; Ruiz *et al.*, tesis de maestría en proceso).

Objetivo: Realizar la estandarización y aplicación de la técnica de cromatografía de afinidad por columna para obtener la purificación de auto-anticuerpos contra IL-6 presentes en muestras séricas, que permita a futuro un

análisis más claro y preciso de la función neutralizante de los auto-anticuerpos anti-IL-6 sobre la actividad biológica de esta citocina.

Métodos. Se analizaron seis muestras séricas positivas a auto-anticuerpos anti-IL-6, dichos auto-anticuerpos se purificaron mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna, empleando el kit de acoplamiento proteico de micro enlace; se acopló la citocina IL-6 humana recombinante (rh-IL-6) a una columna y a otra se acopló la proteína BSA (como control negativo). La detección de los auto-anticuerpos purificados en las diferentes fracciones eluidas fue confirmada por el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple multi-plex (Luminex).

Resultados. La técnica de cromatografía de afinidad por columna resultó ser útil para la purificación de auto-anticuerpos anti-IL-6 en muestras séricas, lograndose confirmar la presencia de dichos auto-anticuerpos en las muestras séricas y purificados mediante el ensayo Luminex. Se detectó la presencia de auto-anticuerpos contra IL-6 en algunas fracciones eluidas de la Columna rh-IL-6, indicando que el pH ácido del buffer de elución (pH 2.8) produjo la ruptura del enlace entre los auto-anticuerpos anti-IL-6 y la citocina acoplada a la columna; así mismo, el cambio a un pH más ácido del buffer de elución (pH 2.0) logró una purificación de los auto-anticuerpos más eficiente.

Conclusiones. Se realizó exitosamente la purificación de auto-anticuerpos anti-IL-6 de seis muestras séricas empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna; en donde se observó que el empleo de un pH más ácido facilita la ruptura de la unión entre los auto-anticuerpos anti-IL-6 y la rh-IL-6 inmovilizada, favoreciendo la purificación de los auto-anticuerpos contra IL-6 presentes en muestras séricas de pacientes con diversas enfermedades infecciosas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

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

Actualmente existen varios estudios que han demostrado que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra algunas citocinas, como una consecuencia de autoinmunidad, afecta las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, donde finalmente predispone al hospedador a enfermedades infecciosas (Dinarelo, 2003; Winthrop, 2009; Marodi, 2009).

Una correlación entre la presencia de auto-anticuerpos neutralizantes hacia IFN- γ e infecciones micobacterianas ha sido reportada, en estos estudios han demostrado pacientes con una deficiencia adquirida en la inmunidad mediada por el IFN- γ , caracterizada por la presencia de auto-anticuerpos con una alta afinidad y actividad neutralizantes contra esta citocina (Madariaga *et al.*, 1998; Doffinger *et al.*, 2004; Hoflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2007; Koya *et al.*, 2009; Baerlecken *et al.*, 2009).

Así mismo, existe una serie de publicaciones demostrando la presencia de auto-anticuerpos contra otras citocinas, por ejemplo, los auto-anticuerpos contra los IFNs tipo I (tales como IFN- α 2, el IFN ω), IL-12 y TNF- α , también fueron

identificados en pacientes con enfermedades autoinmunes y reumáticas, y en aquellos con infecciones crónicas (Masi *et al.*, 2009). Las infecciones intratables (incluso fatales), en pacientes con miastenia gravis con timoma podrían estar relacionadas con altos títulos de anti-IL-12 y anti-IFN- α auto-anticuerpos que pueden reducir la respuesta de IFN- γ con un sesgo hacia una respuesta de IL-4 (Zhang *et al.* 2003).

La celulitis estafilocócica recurrente y abscesos subcutáneos se reportaron en un niño con auto-anticuerpos contra la IL-6 y el curso de los acontecimientos clínicos en el paciente fue sugestivo de una aparición de auto-anticuerpos anti-IL-6 que precedió a la infección por estafilococos y han sido reportados niveles altos de la misma en pacientes con esclerosis sistémica. En varios estudios se ha demostrado que anticuerpos neutralizantes hacia citocinas Th17 predisponen a infecciones fúngicas (Dubin 2008; Conti *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Kisand *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2010, Vincent *et al.* 2015).

1.2. Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina con un peso molecular de 21-28 kDa en función de que se encuentre en un estado de glicosilación o fosforilación. Es una proteína de 185 aminoácidos que se une entre sí, formando un paquete de 4 α -hélices. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al factor de necrosis tumoral-alfa (Por sus siglas en ingles *Tumor Necrosis Factor-alpha* TNF- α).

Esta citocina es producida por múltiples células como son los macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, osteoblastos, miocitos, adipocitos, células β pancreáticas y diversas células tumorales. La secreción de IL-6 está inducida por la insulina, catecolaminas, TNF- α y por la propia IL-6 (las dos últimas demostradas *in vitro*). Su concentración plasmática es de 10 pg/mL,

incrementándose en situaciones de inflamación aguda como la sepsis. Por el contrario, en estados inflamatorios crónicos de bajo grado, su incremento es moderado. Dentro de las múltiples propiedades pleiotrópicas de esta citocina se pueden mencionar su actividad proinflamatoria, favorece la lipólisis y la respuesta inmune, en función del tejido diana (Hoene y Weigert, 2008).

Se le considera una citocina proinflamatoria por ejercer una regulación positiva sobre otros reactantes de fase aguda hepáticos como la proteína C reactiva (o por sus siglas en inglés *C Reactive Protein*, CRP), inducir el crecimiento y diferenciación de las células B, la activación de las células T; así como la estimulación de la hematopoyesis, diferenciación de los macrófagos y células dendríticas, el reclutamiento leucocitario y favorece la síntesis de citocinas pro inflamatorias como la proteína quimio atrayente de monocitos 1 (MCP-1) Así mismo, induce la agregación plaquetaria, producción de sICAM-1, PAI-1 y MCP-1, y proliferación de las células del músculo liso (Chudek y Wiecek, 2008; Hoene y Weigert, 2008).

La CRP es un reactante de fase aguda, de estructura pentamérica y un peso molecular de 120 kDa. Es secretado por los hepatocitos en respuesta a la IL-6, el TNF- α y leptina, siendo inhibida por la adiponectina. Posee una gran sensibilidad como marcador de inflamación y predictor de diferentes enfermedades que cursan con asociación a un proceso infeccioso. Los valores por encima de 10 mg/L deben ser considerados secundarios a procesos agudos infecciosos o autoinmunes y, por lo tanto, deben ser excluidos. Asimismo, produce la activación endotelial del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), la inducción del PAI-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1 y endotelina-1, así como la inhibición del óxido nítrico sintasa (NOs). (Meurman O.*et al.*, 1992; Wärnberg *et al.*, 2006).

La participación de la inflamación en procesos de autoinmunidad ha llevado a la utilización de biomarcadores inflamatorios en la predicción de

marcadores pronósticos en la terapia con anticuerpos. La CRP es uno de los biomarcadores más aceptado porque refleja apropiadamente el proceso inflamatorio subyacente y se correlaciona con otras moléculas como VCAM-1 e IL-6, en donde esta última, estimula la producción de citocinas por parte de diferentes células e induce en el hígado la producción de proteínas de la fase aguda de la inflamación (Wärnberg y Marcos, 2008).

Los mecanismos inflamatorios que se pueden presentar en las fases tempranas de un proceso infeccioso o autoinmune determinan un incremento en los niveles séricos de distintas citocinas como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que por la vía porta se trasladan al hígado promoviendo la síntesis de proteínas de fase aguda, tales como CRP. La CRP estimula la expresión endotelial de moléculas de adhesión como E-selectina (E-S), VCAM-1 y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), favoreciendo así el desarrollo acelerado de otras alteraciones.

Se han detectado aumentos de IL-6 tras una infección bacteriana como respuesta a los niveles altos de IL-1 y TNF producidos. La presencia de auto-anticuerpos contra IL-6 se ha reportado en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente, considerando el historial clínico del paciente los autores mencionan que la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 preceden a una infección estafilococal (Puel, *et al.*, 2008).

1.3 Auto-anticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones

El término de autoinmunidad se refiere a una inapropiada respuesta inmune contra componentes propios del hospedero que resulta en condiciones patológicas. En forma muy general las enfermedades autoinmunes son caracterizadas por la activación de células T y B auto-reactivas, y están

asociadas en algunos casos con la producción de auto-anticuerpos contra moléculas propias, terminando en inflamación y daño del tejido. Son de etiología desconocida, de carácter progresivo o recurrente y pueden afectar una gran diversidad de órganos o sistemas. (Shoenfeld, 1994; Kivity *et al.*, 2009; Agmon-Levin, 2009; Invernizzi y Gershwin, 2009; Hewagama y Richardson, 2009).

De acuerdo a la distribución de el o los antígenos que provocan estas patologías, se distinguen las enfermedades autoinmunes órgano-específicas, en las que el sistema inmunitario ataca a órganos concretos y las enfermedades autoinmunes sistémicas, las cuales, pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y a varios sistemas a la vez, incluidos múltiples órganos.

En enfermedades autoinmunes no específicas de órganos, suele existir una superposición de perfiles de auto-anticuerpos y características clínicas en la misma persona. También es posible que la misma persona tenga dos enfermedades autoinmunes diferentes a la vez. Esto ocurre con mucha más frecuencia de lo que se puede esperar.

Asimismo, puede haber agrupamientos de enfermedades autoinmunes en la misma familia. Este fenómeno se puede explicar en parte por la base genética subyacente de estas enfermedades, pero explica por qué una de dos hermanas desarrolla anemia perniciosa y la otra desarrolla tiroiditis de Hashimoto (Rose, 2001).

Durante el curso de la autoinmunidad, los auto-anticuerpos que pueden neutralizar los componentes principales del sistema inmune que son esenciales en el montaje de las respuestas anti-microbianas pueden ser producidos. Estos auto-anticuerpos pueden exacerbar las enfermedades infecciosas en curso o predisponer al individuo a un mayor riesgo de infecciones por hongos, bacterias, virus, y cualquier microorganismo oportunista (Puel *et al.*, 2014).

Las citocinas son mediadores químicos que juegan un papel muy importante en el proceso de montaje de respuestas anti-microbianas, debido a sus

habilidades para regular la respuesta inmune, tanto la innata como la adquirida del sistema inmunitario, en la polarización de la respuesta de células T, y por actuar como moléculas efectoras. Las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-12 y TNF- α) y quimiocinas (IL-8, MCP-1 α y RANTES) son producidas para atraer otras células inmunocompetentes al sitio de la infección (Kasama *et al.*, 1993; Bliss *et al.*, 1999; Denkers 2003).

Por otra parte, IL-12 regula la diferenciación de células Th1, e IL-4 influye en la diferenciación de células Th2. Las citocinas IL-6, IL-21, TGF- β , IL-1 β e IL-23 son críticas para la expansión y diferenciación de células Th17. Las células Th1 producen IFN- γ e IL-2, y confieren protección contra patógenos intracelulares.

Las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, y son importantes para eliminar patógenos extracelulares y parásitos. Las células Th17 secretan IL-17, IL-21 e IL-22, y proveen protección contra varios patógenos extracelulares, incluyendo a los hongos, como *Candida spp.* Adicionalmente, los IFN's tipo I tienen un papel muy importante en la inmunidad anti-viral y en la modulación de la respuesta de células T y B (Zhu y Paul 2008; Bettelli *et al.*, 2008; Dubin y Kolls 2008; Amanianda *et al.*, 2009).

Actualmente existen varios estudios que han demostrado que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra algunas citocinas, afecta las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, donde finalmente predispone al hospero a enfermedades infecciosas (Dinarello, 2003; Winthrop, 2009; Marodi, 2009, Maddur, 2010).

Una correlación entre la presencia de auto-anticuerpos neutralizantes hacia IFN- γ e infecciones micobacterianas ha sido reportada, en estos estudios han demostrado pacientes con una deficiencia adquirida en la inmunidad mediada por el IFN- γ , caracterizada por la presencia de auto-anticuerpos con una alta afinidad

y actividad neutralizantes contra esta citocina, ya que IFN- γ es producido tanto por células T (CD4⁺ y CD8⁺) como por las células NK (natural killer) en una respuesta a una serie de estímulos inflamatorios y/o autoregulación inmune, esta citocina es clave en el control de la infección contra *Mycobacterium* porque estimula el desarrollo y función de células efectoras, y es requerida para la producción de óxido nítrico (NO) por el macrófago, además de favorecer la producción de citocinas pro-inflamatorias (Madariaga *et al.*, 1998; Doffinger *et al.*, 2004; Hoflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2007; Koya *et al.*, 2009; Baerlecken *et al.*, 2009).

Así mismo, existen publicaciones demostrando la presencia de auto-anticuerpos contra algunas citocinas, por ejemplo, la presencia de auto-anticuerpos contra IL-6 se ha reportado en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente, también en pacientes con cirrosis alcohólica y con severas infecciones bacterianas (Puel *et al.*, 2008, Browne *et al.*, 2014); y en varios estudios se ha demostrado que anticuerpos neutralizantes hacia citocinas Th17 predisponen a infecciones fúngicas (Dubin 2008; Conti *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Kisand *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2010).

Es importante la realización de este tipo de proyectos, ya que permiten reforzar y dar continuidad a los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, los cuales se han enfocado en el análisis de la detección y caracterización de auto-anticuerpos contra ciertos componentes del sistema inmune, como son las citocinas y quimiocinas, donde dichos auto-anticuerpos podrían estar asociados a enfermedades, tanto infecciosas como autoinmunes (Döffinger *et al.*, 2004; Puel *et al.*, 2010, Rosenberg *et al.*, 2016; Barcenas *et al.*, 2006; Autran *et al.*, 2016 Tesis de doctorado; Cortes *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, tesis de maestría en proceso).

Por lo tanto, resaltando la función esencial de las citocinas en el desarrollo y regulación de la respuesta inmune involucrada en el control de las infecciones, resulta de sumo interés realizar la estandarización y desarrollo de técnicas, como

es la de cromatografía por columna de afinidad, para obtener la purificación de auto-anticuerpos anti-citocinas (anti-IL-6) presentes en muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes. La disponibilidad de este tipo de técnicas permitirá a futuro realizar un estudio más claro y preciso para poder determinar la función de dichos auto-anticuerpos presentes en muestras séricas procedentes de pacientes con enfermedades infecciosas y/o autoinmunes.

1.4. Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas glucoproteínas especializadas, llamadas también inmunoglobulinas (Ig), producidas por células B terminales diferenciadas, denominadas células plasmáticas, estos anticuerpos presentan la característica de reaccionar específicamente con un antígeno, lo que hace que la reacción antígeno-anticuerpo, sea específica (Fainboim, 2008).

La composición de los anticuerpos es de un 82 % a 96 % proteica y un 4 % a 18 % de carbohidratos. La parte proteica está constituida por dos regiones funcionales diferentes, una encargada del reconocimiento del antígeno, que posee gran variabilidad por cuanto tiene la capacidad de reconocer un número casi ilimitado de moléculas diferentes; mientras que la región efectora tiene una composición constante y presenta la capacidad de fijar el complemento, de actuar como opsonina y de facilitar el paso de los anticuerpos a través de ciertas barreras como la placenta (Rojas, 2012).

Los anticuerpos se presentan entre un 10 % y un 20 % de las proteínas totales del plasma. Son de varias clases, que se reconocen con los nombres de IgA, IgG, IgM, IgE e IgD. Su estructura básica es similar en todas las clases, con variaciones propias de cada una con diferencias moleculares en ciertos sitios que les confieren la especificidad de reaccionar con determinado antígeno y no con otros (Perham, 2006).

En condiciones normales, un organismo adulto sintetiza de dos a cuatro gramos diarios de anticuerpos y cataboliza una cantidad igual. La vida media de cada clase de Ig es distinta. De quince a veinte días para la IgG, de cuatro a cinco para IgA e IgM. Parte del catabolismo de los anticuerpos lo hace el sistema reticuloendotelial del hígado. Otra parte se pierde en la saliva, la secreción de los tractos respiratorio, digestivo y gastrointestinal, calostro y la leche (Geffner, 2008).

La concentración de anticuerpos dentro del organismo tiene variaciones considerables. La IgG, dado su peso molecular de 150 kDa, pasa fácilmente el torrente circulatorio hacia los tejidos y se encuentra en buenas cantidades en el humor acuoso en el líquido cefalorraquídeo, sinovial, amniótico, peritoneal, así como en los líquidos intersticiales. Por otra parte, la IgM, que tiene peso molecular de 900 kDa no sale del torrente circulatorio a los tejidos sino en condiciones excepcionales y su mayor concentración es, por lo tanto, intravascular. En las secreciones como la saliva, las lágrimas, el moco nasal y traqueobronquial, los líquidos intestinales, la bilis, la orina, el calostro y la leche, la Ig más abundante es la IgA, pero pueden presentarse pequeñas cantidades de IgG (Berg, 2008).

La producción de anticuerpos está a cargo de un grupo especial de linfocitos denominados linfocitos B. La inmunoglobulina unida a la membrana sobre la superficie de células B sirve como el receptor de antígeno de estas y se conoce como receptor de células B (BCR, del inglés *B cell receptor*). El proceso que conduce la producción de anticuerpos comienza cuando se expone a los linfocitos B a antígenos libres o extracelulares. Antes de encontrar al antígeno la célula B madura expresa la inmunoglobulina en una forma unida a la membrana que funciona como receptor de la célula B para el antígeno. El desarrollo de las células B comprende etapas en las que se ensamblan diferentes componentes del receptor de esas células. En éste proceso cada célula B queda restringida a expresar una sola forma de receptor, pero ésta forma varía de una célula a otra. Cuando el antígeno se une a éste receptor las células B son estimuladas para

que proliferen y se diferencien en células plasmáticas, que entonces secretan anticuerpos con la misma especificidad que presenta la Ig unida a la membrana. La señal que inicia la proliferación de las células B y la secreción de los anticuerpos es la unión del antígeno a la célula B específica (**Figura 1**) (Roitt, 2008).

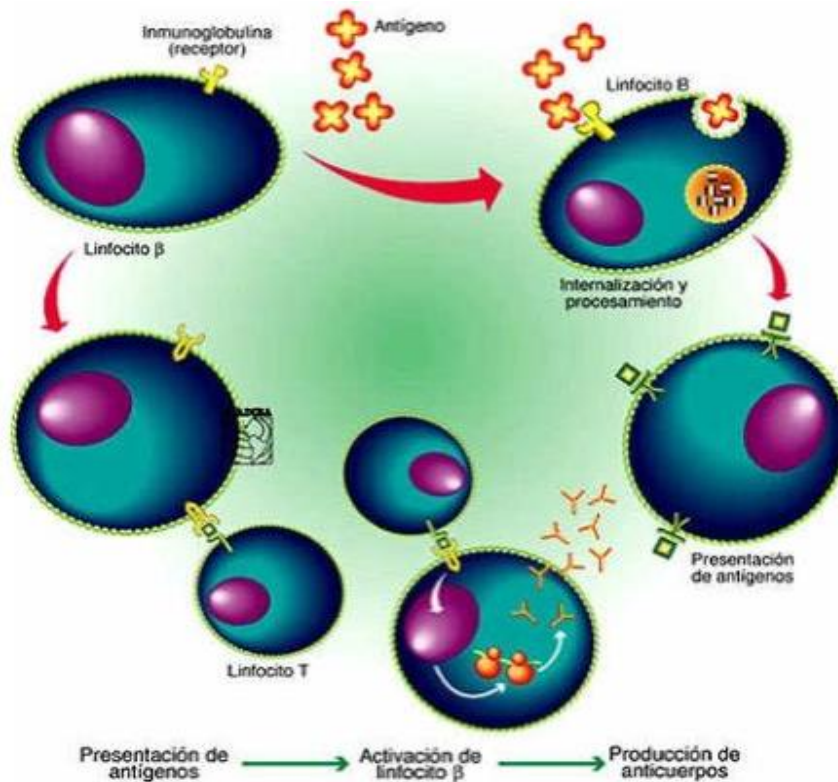


Figura 1. Proceso que conduce la producción de anticuerpos. La inmunoglobulina unida a la membrana sobre la superficie de células B sirve como el receptor de antígeno de ésta, y se conoce como receptor de células B (BCR). La inmunoglobulina de la misma especificidad para este antígeno se secreta como Anticuerpos por células B terminales diferenciadas, denominadas como células plasmáticas. El repertorio total de células B producen Anticuerpos en una vasta gama de especificidades de antígeno, cada célula B produce inmunoglobulina de especificidad única (McIntosh, A., 2012, Escuela de Biociencias, Universidad de Birmingham).

Los Anticuerpos llevan a cabo tres funciones principales, siendo las siguientes:

- I. **Neutralización.** Los anticuerpos pueden proteger contra agentes patógenos o sus productos al unirse a ellos, y así bloquear su acceso a células que podrían infectar o destruir, esta función de neutralización tiene mayor importancia para la protección contra virus (se evita que entren a células y se repliquen) y contra toxinas bacterianas.
- II. **Opsonización.** La unión de anticuerpos no siempre basta para evitar la multiplicación de una bacteria, por lo cual otra función de los anticuerpos es permitir con mayor facilidad que una célula fagocítica como un neutrófilo o un macrófago ingiera la bacteria y la destruya. Muchas bacterias evaden el sistema inmunitario innato porque tienen una cubierta externa; sin embargo, los antígenos en la cubierta pueden reconocerse mediante anticuerpos, y los fagocitos tienen receptores para la fracción cristalizable (FcR del inglés, *crystallizable fraction Receptor*) que se unen a las porciones Fc de los anticuerpos que cubren a la bacteria, lo que conduce a la fagocitosis. El recubrimiento de agentes patógenos y partículas extrañas por moléculas de anticuerpos de esta manera se conoce como opsonización.
- III. **Activación del complemento.** Las regiones constantes de los anticuerpos unidas a superficies bacterianas forman receptores para la primera proteína del sistema del complemento, de modo que una vez que se producen anticuerpos, la activación del complemento aumenta. La vía clásica a menudo empieza con la unión de C1q a anticuerpos que han reconocido específicamente estructuras sobre la superficie bacteriana, siendo esta una forma de activación de la cascada de complemento.

En el **Figura 2** se ilustran las funciones principales de la molécula de anticuerpo.

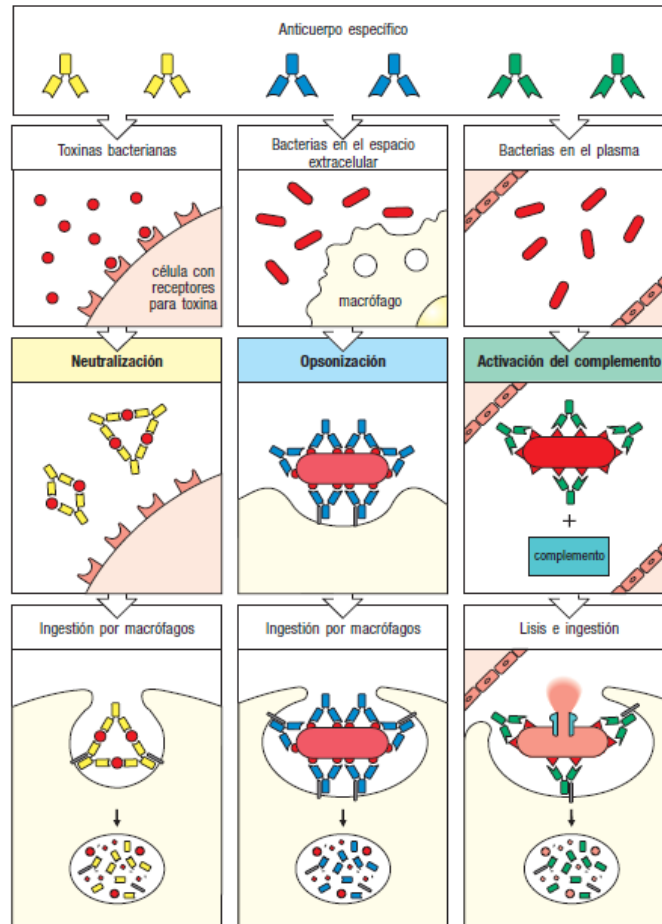


Figura 2. Los anticuerpos pueden participar de tres modos en la defensa del hospedador. Los paneles izquierdos muestran Anticuerpos que se unen y neutralizan a una toxina bacteriana, así evitan la interacción con las células del hospedero y que causen enfermedad. Una toxina no unida puede reaccionar con los receptores de las células del hospedero, mientras que el complejo toxina-Anticuerpos no puede. Los Anticuerpos también neutralizan las partículas de virus y células bacterianas por interaccionar con ellos e inactivarlos. El complejo antígeno-Anticuerpos es eventualmente degradado por macrófagos, el antígeno que está recubierto con Anticuerpos es reconocido como extraño por fagocitos (macrófagos y neutrófilos) que luego ingieren y destruyen, eso es llamado opsonización. Los paneles de en medio muestran la opsonización y fagocitosis de una célula bacteriana. Los paneles de la derecha muestran la activación del complemento, los Anticuerpos unidos a la superficie de la bacteria forman un receptor para la activación del complemento, que en algunos casos puede matar directamente a la bacteria. Generalmente el complemento favorece el recubrimiento y destrucción de la bacteria por fagocitosis, así que los Anticuerpos tiene por objetivo la destrucción de patógenos y sus productos tóxicos para su eliminación por fagocitosis (Janeway, 2008).

Las funciones de reconocimiento y efectoras están separadas de forma estructural en la molécula de anticuerpo, una parte del cual se une de modo específico al antígeno mientras que la otra emprende los diversos mecanismos de eliminación (Male, 2007; Rojas, 2012).

1.4.1. Estructura de anticuerpos

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

Hay características comunes en todas las Ig y otras específicas o propias de cada clase. Se utiliza la molécula de anticuerpo IgG como ejemplo para describir las características estructurales generales de las inmunoglobulinas (Roitt, 2008).

Los anticuerpos IgG son moléculas grandes con un peso molecular de 150 kDa y están compuestos de dos clases de cadenas de polipéptidos. Una cadena, de casi 50 kDa, se denomina cadena pesada (H, del inglés *heavy chain*), y la otra, de 25 kDa se llama cadena ligera (L, del inglés *light chain*). Cada molécula de IgG consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras; las dos primeras se unen entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada se enlaza a una ligera por medio de un enlace disulfuro, por lo tanto, una molécula de inmunoglobulina, consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas

ligeras idénticas, lo que le da a una molécula de anticuerpo, dos sitios de unión a antígenos idénticos y así, la capacidad para unirse al mismo tiempo a dos estructuras iguales con ubicaciones diferentes.

En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadenas ligeras, llamadas kappa (κ) y lambda (λ), las inmunoglobulinas tienen sus dos cadenas κ o λ , nunca una de cada tipo. La clase de un anticuerpo y por tanto la función efectora de éste, se define por la estructura de su cadena pesada. Hay cinco clases principales de cadenas pesadas o isotipos, algunas de las cuales tienen varios subtipos, y éstos determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo. Las cinco clases principales de inmunoglobulina son inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE), sus cadenas pesadas se denotan por la letra griega minúscula correspondiente μ , δ , γ , α y ϵ , respectivamente. Sus propiedades funcionales distintivas son conferidas por la parte carboxilo terminal de la cadena pesada, donde no se relaciona con la cadena ligera.

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

Las regiones constantes de las cadenas pesadas muestran una estructura organizada en dominios, esto es, bloques de secuencias repetidas (casi idénticas) de aproximadamente de 110 aminoácidos de largo. Los dominios variables del grupo amino terminal (dominios V) de las cadenas pesadas y ligeras (V_H y V_L , respectivamente) juntos conforman la región V del anticuerpo y le confieren la capacidad para unirse a antígenos específicos, mientras que los dominios constantes (dominios C) de las cadenas pesadas y ligeras (C_H y C_L , respectivamente) constituyen la región C. Los múltiples dominios C de cadenas

pesadas se enumeran desde el extremo amino terminal hasta el grupo carboxilo terminal, por ejemplo, C_{H1}, C_{H2}, y así sucesivamente.

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

En las regiones variables de las cadenas L y H hay subregiones que consisten en secuencias de aminoácidos con extrema variabilidad (hipervariables) que forman el sitio de unión con antígenos. Las regiones hipervariables forman el área de la molécula del anticuerpo que es complementaria en estructura con el determinante antigénico o con el epítopo, y por tanto también se conoce como regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*). Aproximadamente cinco aminoácidos en cada región hipervariable constituyen el sitio de unión a antígenos.

En las cadenas H también existe una región adicional, que no forma parte de los dominios, denominada región bisagra. La región bisagra está localizada entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, y ésta permite la movilidad a las inmunoglobulinas. La región bisagra es en particular susceptible a la digestión proteolítica por la enzima papaína, el tratamiento de la molécula de inmunoglobulina con esta enzima provoca la división de esta molécula, obteniéndose tres fragmentos, de los cuales dos fragmentos son idénticos y contienen la actividad de reconocimiento y unión al antígeno; estos se denominan fragmentos de unión al antígeno (Fab, *fragment antigen binding*), dichos fragmentos corresponden a los

dos brazos idénticos de la molécula de anticuerpo. El otro fragmento no contiene actividad de unión al antígeno, pero en estudios iniciales se observó que se cristaliza con facilidad, y por esta razón se le nombró fragmento cristalizable (Fc, *crystallizable fraction*), es la parte efectora de la molécula de anticuerpo que interactúa con moléculas y células. La estructura de la molécula del anticuerpo se ilustra en el **Figura 3** (Janeway, 2008).

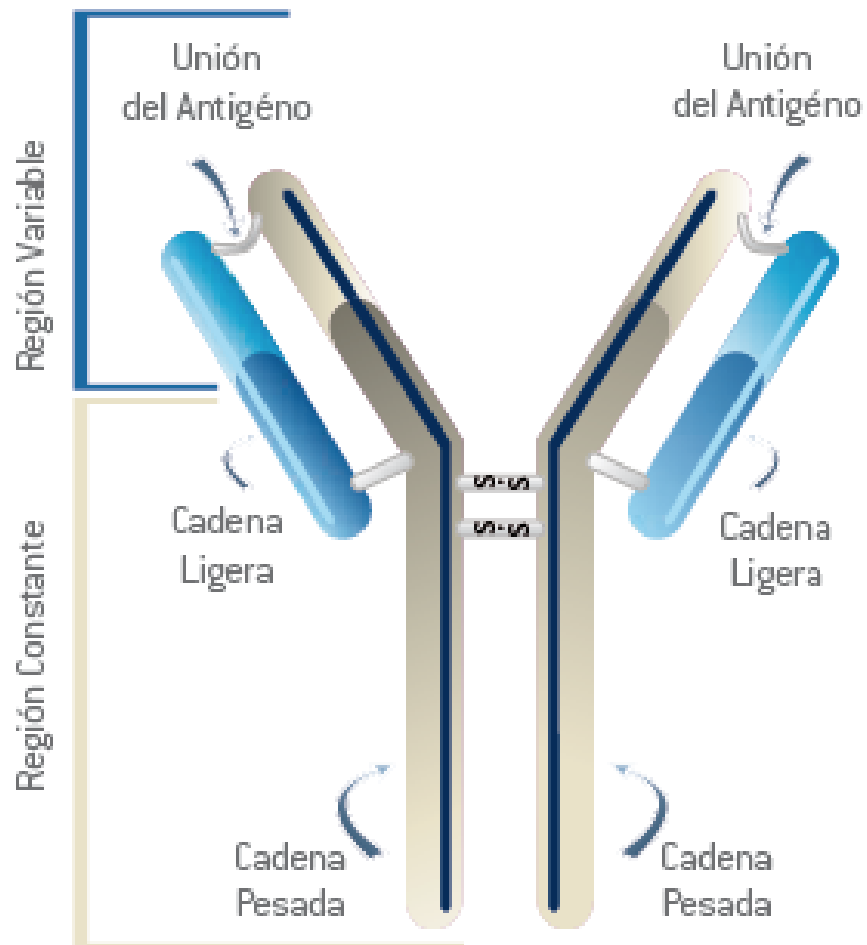


Figura 3. Estructura general de un anticuerpo. La molécula conforma de Y está compuesta por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro (S-S). La mayor parte de la molécula está formada por regiones constantes (C), que son iguales en todos los anticuerpos de la misma clase. Las secuencias de los aminoácidos de las regiones variables (V), que forman los dos sitios de unión al antígeno, difieren entre las moléculas. (Rojas, 2006).

1.5. Interacciones de antígenos-anticuerpos

Una de las propiedades más características de los anticuerpos, es su capacidad de reaccionar específicamente con los antígenos inductores de su producción (antígenos homólogos). La reacción antígeno-anticuerpo ocurre en dos etapas. En la primera sucede la interacción físico-química entre las moléculas del antígeno y el anticuerpo, y en la segunda esta interacción se manifiesta por la formación de un precipitado, cuando el antígeno es soluble, o de un “aglutinado”, cuando el antígeno es particulado.

La interacción antígeno-anticuerpo es un fenómeno que depende de la complementariedad química de los reactantes, la cual está dada a su vez por la conformación de las moléculas y por la carga de sus elementos constituyentes. Cuando tal interacción ha ocurrido, se producen los complejos antígeno-anticuerpo, donde los reactantes se mantienen unidos a través de enlaces electroestáticos y, en algunos casos, a través de enlaces covalentes. (Janeway y Travers, 2001).

Dentro de los enlaces electroestáticos contamos con los enlaces iónicos o salinos, interacciones hidrofóbicas, interacciones entre dipolos, las fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. Las concentraciones altas de sal y los valores extremos de pH alteran la unión antígeno-anticuerpo al debilitar interacciones electrostáticas, o enlaces de hidrógeno, o ambos. Este último principio se emplea en la purificación de antígenos al utilizar columnas de afinidad, de anticuerpos inmovilizados y viceversa para la purificación de anticuerpos.

Así mismo, se pueden llevar a cabo interacciones hidrofóbicas cuando dos superficies hidrófobas se unen para excluir moléculas de agua. La fuerza de dicha interacción es proporcional al área de superficie que está oculta del agua. Para algunos antígenos, estas interacciones probablemente expliquen la mayor parte de la energía de unión. En algunos casos, las moléculas de agua quedan

atrapadas en hendiduras en la interfaz entre el antígeno y el anticuerpo; estas moléculas de agua atrapadas en especial las que están entre residuos aminoácidos polares, también pueden contribuir a la unión y, por ende, a la especificidad del anticuerpo.

La contribución de cada una de estas fuerzas a la interacción general depende de los anticuerpos y antígenos particulares comprendidos. Una diferencia notoria entre interacciones de anticuerpos con antígenos proteicos, y casi todas las otras interacciones naturales entre una proteína y otra, es que los anticuerpos a menudo tienen muchos aminoácidos aromáticos en sus sitios de unión a los antígenos. Estos aminoácidos participan de manera importante en interacciones de van der Waals, enlaces hidrofóbicos y a veces en enlaces de hidrógeno. (Voet,2009, Syed-Hussain, 2014).

1.6. Cromatografía de afinidad por columna

La cromatografía de afinidad por columna, es una técnica con una aplicación muy amplia, y es usada en el aislamiento y purificación de anticuerpos o antígenos. El principio es simple, el antígeno o el anticuerpo son unidos a través de sus grupos aminados libres a las partículas de agarosa activadas con bromuro de cianógeno que escinde enlaces peptídicos en el lado carboxílico de residuos de metionina.

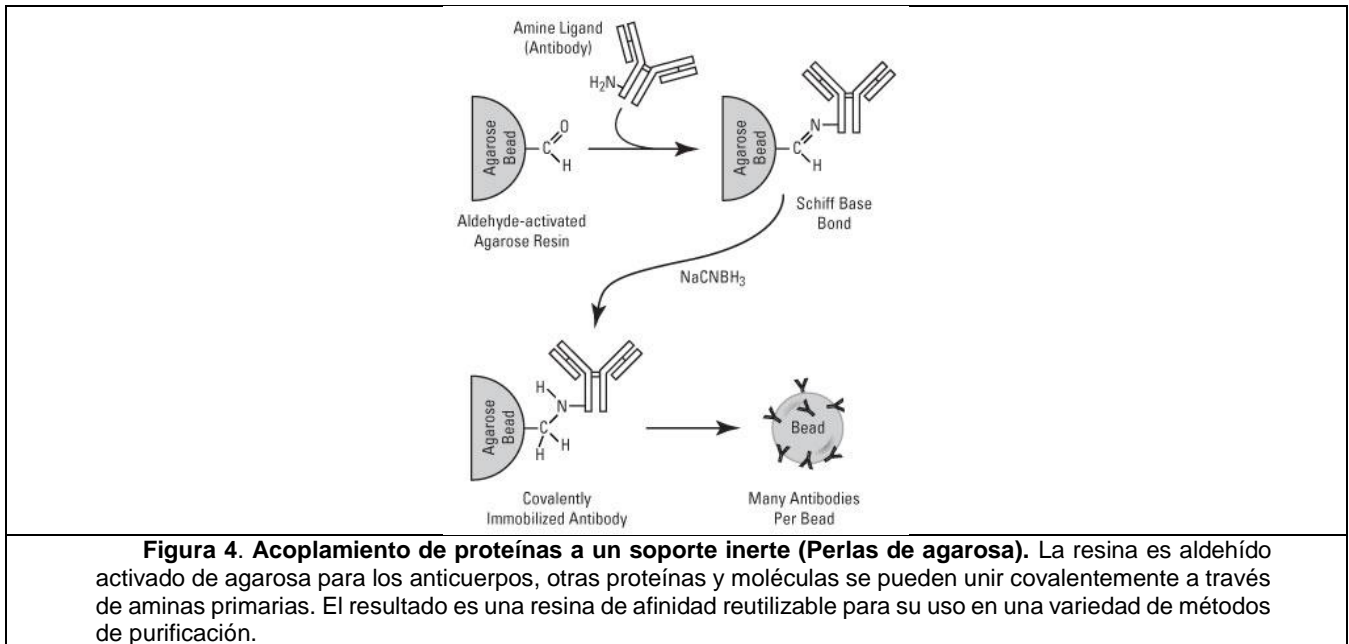
En esta técnica una molécula denominada ligando se une de manera específica a la proteína que se quiere purificar, se une covalentemente a una matriz inerte y porosa. Cuando se pasa a través de este material cromatográfico, una solución proteica impura, la proteína de interés se une al ligando inmovilizado y las otras sustancias se eliminan de la columna por arrastre del líquido de lavado. La proteína se obtiene purificada en gran medida mediante un cambio en las condiciones de elución que hacen que se libere de la matriz cromatográfica.

La gran ventaja de la cromatografía de afinidad es su capacidad de explotar las propiedades bioquímicas únicas de las proteínas más que las propiedades fisicoquímicas, como ocurre en otros métodos cromatográficos.

Como se mencionó anteriormente la matriz utilizada en la cromatografía de afinidad debe ser químicamente inerte, tener alta porosidad y poseer un número elevado de grupos funcionales capaces de formar uniones covalentes con los ligandos. Entre los pocos materiales que cumplen con estos requisitos, la agarosa, que posee grupos hidroxilo libres, es la más utilizada. Si el ligando tiene un grupo amino primario que no es esencial para su unión a la proteína de interés, puede unirse de forma covalente a la agarosa.

El ligando utilizado en el aislamiento de una proteína por cromatografía de afinidad debe tener una afinidad suficiente por la proteína como para inmovilizarla sobre el gel de agarosa pero no tan alta como para impedir su liberación posterior. Si el ligando es sustrato de una enzima que se está purificando, las condiciones cromatográficas deben ser tales que no permitan el funcionamiento catalítico de la enzima para evitar la destrucción del ligando.

Una vez que una proteína se unió a una columna de cromatografía de afinidad y se eliminaron las impurezas por lavado, ésta debe liberarse de la columna. Una de las formas de hacerlo es eluir la columna con una solución de un compuesto que tiene mas afinidad por el sitio de union de la proteína que el ligando unido. Otra manera es alterar las condiciones de la solución para que el complejo ligando-proteína deje de ser estable, por ejemplo, mediante el cambio de pH, fuerza iónica o temperatura (**Figura 4**). Sin embargo, se debe tener cuidado de que las condiciones de la solución no produzcan un daño irreversible a la proteína (Voet,2006).



El Thermo *Scientific Micro Link Protein Kit* contiene todos los componentes necesarios para pegar covalentemente las proteínas conteniendo aminas primarias y otros ligandos a un soporte de perlas de agarosa. El resultado de la inmovilización de una proteína es una columna de afinidad estable y reusable para la purificación de anticuerpos, antígenos y otras biomoléculas.

La resina Amino Link Plus contiene grupos aldehídos, que reaccionan específicamente con las aminas primarias (-NH₂), lo cual ocurre sobre la superficie de las proteínas en las cadenas laterales que contienen residuos de lisina (K) y el amino terminal de cada polipéptido.

Después la formación espontánea de enlaces de base de Schiff semi-estables, la reducción con Cianoborohidruro de sodio resulta en enlaces aminos secundarios estables; los anticuerpos, antígenos y otras proteínas teniendo diferentes pesos moleculares y puntos isoeléctricos se acoplan a la resina Amino Link con una eficiencia de acoplamiento promedio mayor al 80 % (**Figura 5**) (Hermanson, *et al.*, 1992).

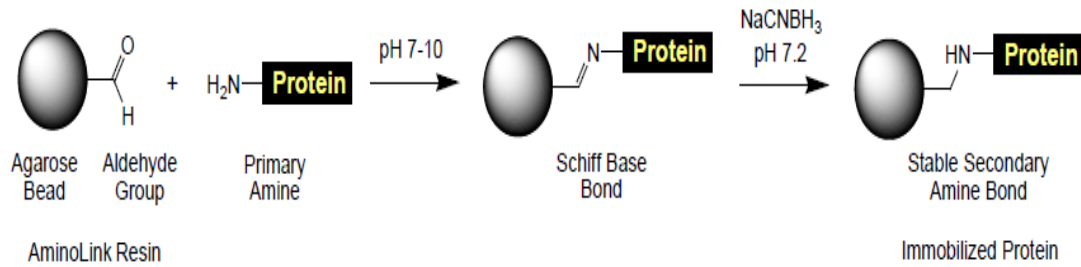


Figura 5. Estructura y esquema general de reacción para la resina AminoLink e inmovilización química de acoplamiento de la resina. Formación de enlaces aminos estables entre la proteína y la resina.

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

El ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bioplex (Luminex) es un sistema basado en citometría de flujo, que utiliza microesferas poliestireno con un diámetro de 5.6 micras como el soporte sólido para un inmunoensayo convencional; las microesferas son clasificadas en regiones las cuales presentan un código de color específico que permite la discriminación e identificación de ensayos individuales, éste código es establecido mediante 2 colorantes fluorescentes diferentes que se presentan en proporciones que varían de acuerdo a cada región de microesfera. Actualmente, hasta 100 parámetros individuales pueden ser medidos simultáneamente en una sola etapa del ensayo.

Las microesferas de cada región se pueden conjugar con una molécula (analito) diferente; las microesferas conjugadas por lo tanto pueden ser mezcladas y depositadas en un pozo de microplaca de fondo con filtro, para ser incubadas con la muestra y permitir las reacciones antígeno-anticuerpo específicas. 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.

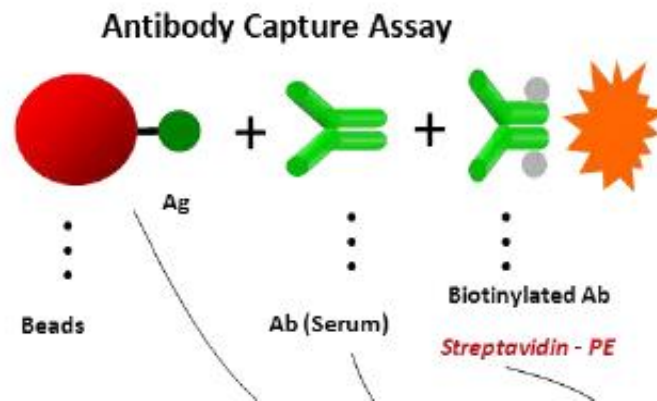
El ensayo permite la detección y cuantificación de múltiples analitos (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, entre otros) en una sola muestra, empleando un

principio similar al ensayo por inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). La sensibilidad de este método es comparable a un ELISA convencional, pero permite investigaciones complejas usando pequeñas alícuotas de reactivos para realizar el ensayo; de igual forma existe una gran flexibilidad para realizar una serie de variaciones en el análisis serológico.

En el caso del ensayo de captura indirecto, cada analito (citocina) es acoplado covalentemente a microesferas con una región en particular. Posteriormente, se añade la muestra problema para la unión de los anticuerpos específicos al analito y finalmente se agrega un anticuerpo anti-inmunoglobulina especie específico, el cual puede estar conjugado con un fluorocromo (PE, ficoeritrina) o con biotina, para este último caso es necesario utilizar la estreptavidina-ficoeritrina como molécula indicadora (**Figura 6, Panel A**).

Después de la incubación se realiza la lectura del sistema empleando el lector de Bio-Plex, donde los fluidos de precisión alinean las microesferas a través de una celda de flujo donde dos láseres las excitan individualmente, el láser de clasificación rojo excita los colorantes en cada microesfera, para su identificación específica, mientras que el láser verde excita la molécula indicadora asociada con la microesfera, lo que permite la cuantificación del analito capturado. El sistema 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) (**Figura 6, Panel B**).

Panel A.



Panel B.

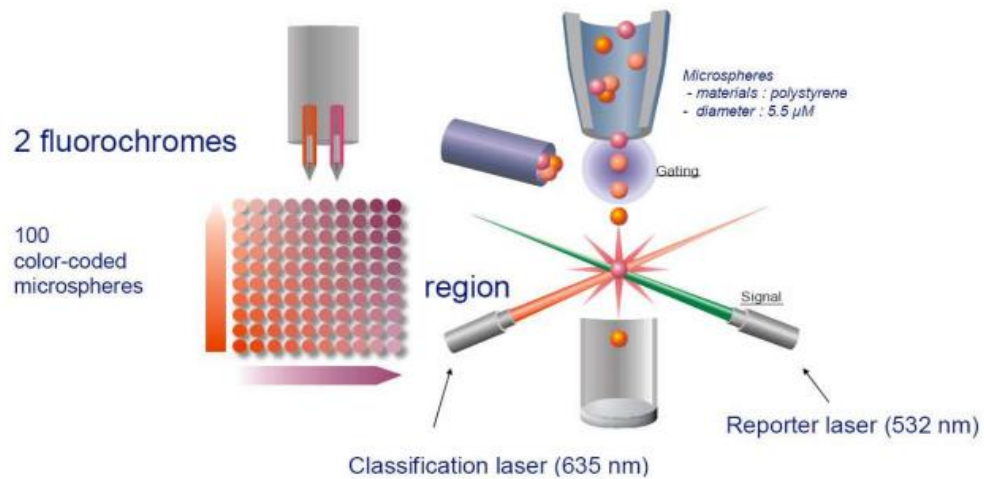


Figura 6. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex) 7: Panel A Inmunoensayo indirecto para la detección de auto-anticuerpos contra los diferentes mediadores químicos (Araujo, 2011). **Panel B** Microesferas codificadas ópticamente utilizando una mezcla de diferentes colorantes que son decodificados por un citómetro de flujo (Ruiz-Méndez J. (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; Dubin 2008; Maddur, 2010, Browne y Holland, 2010).

Se ha demostrado que la presencia de auto-anticuerpos neutralizantes contra citocinas en pacientes con infecciones, proveen una visión interesante hacia un enlace desconocido entre la respuesta autoinmune y la predisposición a enfermedades infecciosas; sin embargo, hasta donde sabemos, no existen reportes con respecto a la función y caracterización detallada de estos auto-anticuerpos presentes en las muestras séricas (Ercolini and S. D. Miller. (2008).

Por lo mencionado anteriormente y considerando la importancia que tienen los mediadores químicos, como las citocinas, en el desarrollo y regulación de la respuesta inmune necesaria para el control de las infecciones, resultó de interés realizar la purificación de auto-anticuerpos específicos contra citocinas utilizando la técnica de cromatografía de afinidad por columna, a partir de muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti-citocinas (IL-6); para la identificación de las muestras y las eluciones de cromatografía que fueron positivas se empleó la técnica de un sistema múltiple de microesferas BioPlex, basado en citometría de flujo.

Considerando que los auto-anticuerpos anti-citocinas se encuentran presentes en pacientes con infecciones atípicas recurrentes y/o diseminadas, se sugiere que se podría presentar una función neutralizante de los auto-anticuerpos

contra estos mediadores químicos; sin embargo, no existen trabajos con respecto a una caracterización más detallada de dichos auto-anticuerpos anti-citocina, indicando que el análisis de estos auto-anticuerpos es de suma importancia; y por lo tanto, las preparaciones de auto-anticuerpos purificados serían más recomendables y de mayor utilidad para llevar a cabo estudios futuros, donde se podría evaluar su capacidad neutralizante, empleando emplear en ensayos de inhibición neutralización *in vitro* de la fosforilación de STAT-1 y STAT-3, pruebas de alteración en la producción de citocinas, determinación de los índices de avidéz, en el análisis de reconocimiento de citocinas nativas, identificación de los epítomos reconocidos por los auto-anticuerpos mediante microarreglos, entre otros; lo cual permitiría una caracterización más completa de la función neutralizante de los auto-anticuerpos anti-citocinas hacia la actividad biológica de estos mediadores químicos.

3. HIPÓTESIS

La técnica de cromatografía por columna de afinidad permitirá la purificación de auto-anticuerpos anti-citocina (anti-IL-6) presentes en muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes y/o autoinmunes. Dichas purificaciones facilitaran en trabajos futuros la realización de un análisis más preciso y claro para elucidar la capacidad de neutralización de estos auto-anticuerpos sobre la actividad biológica funcional de la IL-6.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estandarizar y aplicar la técnica de cromatografía de afinidad por columna para obtener la purificación de auto-anticuerpos anti-citocinas (anti-IL-6) presentes en muestras séricas humanas, para que permita un análisis más claro y preciso de la función biológica neutralizante de los auto-anticuerpos anti-IL-6 sobre la actividad de la citocina.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Corroborar la presencia de auto-anticuerpos contra IL-6 en muestras séricas, empleando los sistemas de citocinas humanas recombinantes acopladas a micropartículas, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).

4.2.2. Realizar la purificación de auto-anticuerpos de muestras séricas de pacientes, con enfermedades infecciosas recurrentes, empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna.

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

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestras séricas

Las muestras séricas utilizadas en el presente trabajo fueron proporcionadas por el Dr. Rainer Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.). Las muestras séricas se muestran enlistadas en la **Tabla 1**.

Muestra sérica	Positiva a auto-anticuerpos	Datos clínicos
BC602735	Anti-IL-6	Varón de 34 años fiebre recurrente. Celulitis <u>estafilococal</u> . Infección diseminada severa, ausencia de inflamación.
BC761842		Varón de 56 años con autoinmunidad <u>multiorgánica</u> , infección diseminada por estafilococos, linfoma de <u>Hodgkin</u> , fiebre recurrente.
HP180660		Varón de 67 años, presenta hemoptisis, enfermedad pulmonar y neumonía intersticial.
AJ060393		Varón de 60 años con herpes recurrente e historial de encefalitis por <i>Virus Varicela Zoster</i> .
NJ130871		Varón de 66 años, presenta <u>aspergilosis</u> pulmonar crónica.
SW140456		Varón de 44 años, presenta inflamación con ausencia de infección.
<p>Tabla 1. Muestras séricas a la presencia de auto-anticuerpos contra IL-6. Se mencionan los datos clínicos respectivos para cada muestra; todas las muestras fueron proporcionadas por el Dr. R. <u>Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.)</u>.</p>		

5.2 Análisis de la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 en muestras séricas mediante la técnica de ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex)

1. Las microplacas de 96 pozos con filtro-BV de 1.2 μm el tamaño del poro, (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) se humedecieron agregando 150 μL por pozo de PBS-T, después de 1 a 2 minutos el líquido fue removido empleando un sistema de vacío.

2. La suspensión de trabajo de las microesferas con la citocina de interés (IL-6) acoplada se preparó a partir de las alícuotas almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, (incluyendo como control negativo a las microesferas con la BSA; los 20 μl de cada alícuota fueron diluidos en el volumen necesario de solución amortiguadora pre-bloqueadora para disponer de 5 mL volumen final.

3. Posteriormente 50 μL de la suspensión de trabajo de las microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex) se agregaron a cada pozo, y el líquido fue removido por medio de filtración a vacío.

4. A continuación, en los pozos correspondientes se depositaron 50 μL /pozo de cada una de las muestras problemas diluidas 1/100, del anticuerpo anti-IL-6 específico biotinilado diluido 1/100 (control positivo, cat. BAF 206 polyclonal goat IgG) o del diluyente (control negativo), empleando la solución bloqueadora como diluyente; posteriormente las microplacas fueron incubadas por 90 min, con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.

5. El líquido de cada pozo fue removido empleando el sistema de vacío y se llevó a cabo una serie de tres lavados con 200 μL de PBS-T.

6. Posteriormente a los pozos donde se llevó a cabo la incubación con las muestras séricas problemas se les agregó 50 μL /pozo del anticuerpo secundario anti-IgG humano acoplado a ficoeritrina (PE) (Leinco Technologies, I-127)

previamente diluido 1/50; mientras que a los pozos incubados con los controles positivos se les agregó el mismo volumen de una solución de estreptavidina acoplada a PE (R&D systems, 892525) diluida 1/100, se empleó la solución bloqueadora como diluyente. Las microplacas se incubaron protegidas de la luz durante 60 min a temperatura ambiente con una agitación lenta (500 rpm) empleando un agitador orbital horizontal para microplacas.

7. El líquido se removió y se repitió la serie de tres lavados con 200 μ L de PBS-T.

8. Finalmente se adicionaron 100 μ L/pozo de PBS-T, se agitaron las microplacas en un agitador orbital (500 rpm) durante 2-3 minutos para resuspender las micropartículas y se colocó la microplaca en el lector Luminex 100 para realizar el análisis correspondiente.

5.3. Estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna para la purificación de auto-anticuerpos anti-IL-6

La purificación de los auto-anticuerpos presentes en las muestras séricas se llevó a cabo empleando el *AminoLink Plus immobilization Kit* (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, Num. Cat. 20462). En forma general algunos de los reactivos y materiales más importantes que se usaron en la realización de esta técnica se describen a continuación:

- a) **Columnas de centrifugación con resina de acoplamiento amino enlace:** cada columna contiene 400 μ L de una suspensión al 4 % de perlas de agarosa con 25 % de un compuesto acuoso.
- b) **Solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2 (*Coupling Buffer*):** Solución salina amortiguadora de fosfatos, 1 paquete rinde en fosfato de sodio [0.1 M], Cloruro de sodio [0.15 M], pH 7.2 cuando se reconstituye con 500 mL de agua.
- c) **Solución amortiguadora de enfriamiento (*Quenching Buffer*):** 50 mL, 1 M Tris-HCl, 0.05 % de azida de sodio (NaN_3), pH 7.4.

- d) **Solución de Cianoborohidruro de sodio al 5 M (NaCNBH₃):** 0.5 mL, disuelto en NaOH 0.01 M.
- e) **Solución de lavado (*Wash Solution*):** 25 mL, 1 M NaCl, 0.05 % NaN₃.
- f) **Solución amortiguadora de Elución (*Elution Buffer*):** 50 mL, pH 2.8, contiene aminas primarias.
- g) **Tubos de colección para micro centrifuga:** Viales con tapa y con una capacidad de 0.5 mL.
- h) **Solución amortiguadora de almacenamiento:** Se preparó la solución amortiguadora de fosfatos (PBS; igual que la solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2) conteniendo 0.05 % de NaN₃.

5.3.1. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína (citocina recombinante)

A) Preparación de la columna e inmovilización de la proteína

Para todos los pasos se requirió mezclar la resina de acoplamiento con la solución amortiguadora golpeando suavemente la columna cerca del paquete de la resina varias veces hasta resuspender y luego cuidadosamente se agitó la columna en un vortex a baja velocidad. Se aseguró que la resina permaneciera húmeda todo el tiempo. Se realizaron los pasos de centrifugación a 1000 x g (~3,300 rpm en la centrifuga IEC MicroMAX RF-Thermo, o ~3,500 en BioFugePico-Heraeus) por 1 minuto.

1. La columna de centrifugación conteniendo la resina de acoplamiento amino enlace, y todos los reactivos a utilizar se equilibraron a temperatura ambiente (37 °C).

2. Primero se aflojó la tapa superior de la columna y luego se removió el tapón inferior para evitar aspirar aire dentro de ésta. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugo a 1000 x g por 30 segundos, para remover la solución amortiguadora de almacenamiento.

3. Se removió la tapa superior y se insertó el tapón. La resina fue suspendida, adicionando 400 μL de la solución amortiguadora de acoplamiento utilizado para disolver la muestra. Después se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó a 1000 x g por 1 minuto y se descartó el fluido pasante. Este paso se repitió dos veces más.

4. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 500 μL de la muestra (0.5 mg/mL) directamente en la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se reservó 3 μL de la muestra (Vial A)

5. En una campana de extracción, se destapó la columna y se añadieron 5 μL de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se volvió a colocar la tapa y se mezcló.

6. Se dejó incubar la columna durante 2 horas a temperatura ambiente (37 °C), para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.

7. Posteriormente, se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó 1000 x g por 1 minuto (para coleccionar el fluido con la proteína no unida). Para determinar la eficacia del acoplamiento, se evaluó el fluido pasante con un ensayo de proteínas y compararlo con la concentración o la cantidad inicial. (Vial: B, de 5 μL).

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

B) Bloqueo de los sitios activos de unión remanentes

- 1.** Se destapó la columna y se insertó el tapón. Posteriormente se adicionaron 500 μ l de solución amortiguadora de enfriamiento a la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló.
- 2.** Se retiró la tapa de la columna y el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.
- 3.** Se repitieron los pasos 1-2.
- 4.** Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 500 μ L de solución amortiguadora de enfriamiento directamente a la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló.
- 5.** En una campana de extracción se quitó la tapa de la columna y se adicionaron 10 μ L de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se tapó la columna y se mezcló. Se incubo la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos, mezclando cada 15 minutos.
- 6.** Se quitó la tapa y el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso. Nota: Como la columna se utilizó en forma inmediata fue necesario equilibrarla adicionando 500 μ L de solución amortiguadora de acoplamiento y se centrifugo a 1000 x g por 1 minuto, se realizó esto dos veces. Y se continuó con el paso 2 del Procedimiento general para la purificación por afinidad.

5.3.2. Procedimiento general para la purificación de auto-anticuerpos

C) Formación del complejo unido a la resina

1. La columna con la resina conteniendo la proteína (rh-IL-6) inmovilizada, se equilibró a temperatura ambiente (37 °C).
2. Se removió primero la tapa de la columna y después el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.
3. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 400 μ L de la muestra sérica diluida vol:vol en solución amortiguadora de acoplamiento directamente en la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló.
4. Se incubó la reacción con un mezclado suave en forma de rotación. Se dejó incubar la columna durante 2 horas a temperatura ambiente (37 °C), para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.
5. Se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó. Se guardó el fluido pasante para análisis (Vial: E). Para la evaluación se utilizó el sistema citocina-microesfera Bio-Plex.
6. Para reducir las posibles interacciones no específicas (opcional) se preparó 1 mL de una solución de NaCl a 0.5 M, con la cual se diluyó la solución de lavado vol: vol, y se le adicionó Tween-20 para una concentración final de 0.05 %. Se quitó la tapa de la columna, se insertó el tapón y se adicionaron 300 μ L de la solución. Se reemplazó la tapa y cuidadosamente se invirtió la columna 10 veces. Se aflojó la tapa, se removió el tapón y se colocó la columna en un tubo de colección. Se centrifugo el tubo y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más (Viales: F, G y H).

7. Se destapo la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 μL de solución de amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y gentilmente se invirtió el tubo (columna) 10 veces. Se aflojo la tapa y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugo y se descartó el fluido pasante, se repitió este paso una vez más. (Viales: I y J).

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

D) Elución

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3.3. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad

1. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 400 μL de Buffer de acoplamiento, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón inferior, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.

2. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 300 μL de solución amortiguadora de acoplamiento a lo largo de los lados de la columna para lavar la resina. Se reemplazó la tapa y se almacenó a 4 °C.

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

5.4. Detección de auto-anticuerpos anti-citocinas en las diferentes fracciones eluidas de la columna de purificación, mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión monoplex, Luminex

1. Las microplacas de 96 pozos con filtro-BV de 1.2 μm el tamaño del poro, (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) se humedecieron agregando 150 μL por pozo de PBS-T, después de 1 a 2 minutos el líquido será removido empleando un sistema de vacío.

2. La suspensión de trabajo de las microesferas con la citocina de interés (rh-IL-6) acoplada se preparó a partir de las alícuotas almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, incluyendo como control negativo al sistema BSA-microesferas; los 20 μL de cada alícuota de los diferentes sistemas-microesferas fueron diluidos en el volumen necesario de solución amortiguadora pre-bloqueadora para disponer de 5 mL volumen final.

3. Posteriormente 50 μL de la suspensión de trabajo de las microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex) se agregaron a cada pozo, y el líquido fue removido por medio de filtración a vacío.

4. A continuación, en los pozos correspondientes se depositaron 50 μL /pozo de cada una de las muestras por analizar diluidas 1/50 ó 1/100, de los anticuerpos anti-citocinas específicos biotinilados (1/100, control positivo) o del diluyente (control negativo), empleando la solución bloqueadora como diluyente y las microplacas fueron incubadas por 90 min, con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.

5. El líquido de cada pozo fue removido empleando el sistema de vacío y se llevó a cabo una serie de tres lavados con 200 μ L de PBS-T.

6. Posteriormente a los pozos donde se llevó a cabo la incubación con las muestras problema se les agregó 50 μ L/pozo del anticuerpo secundario anti-IgG humano acoplado a ficoeritrina (PE) (Leinco Technologies, I-127) previamente diluido 1/50; y a los pozos incubados con los controles positivos se les agregó el mismo volumen de una solución de estreptavidina acoplada a PE (R&D systems, 892525) diluida 1/100, se empleó la solución bloqueadora como diluyente. Las microplacas se incubaron protegidas de la luz durante 60 min a temperatura ambiente con una agitación lenta (500 rpm) empleando un agitador orbital horizontal para microplacas.

7. El líquido se removió y se repitió la serie de tres lavados con 200 μ L de PBS-T.

8. Finalmente se adicionaron 100 μ L/pozo de PBS-T, se agitaron las microplacas en un agitador orbital (500 rpm) durante 2-3 minutos para resuspender las micropartículas y se colocó la microplaca en el lector Luminex 100 para realizar el análisis correspondiente.

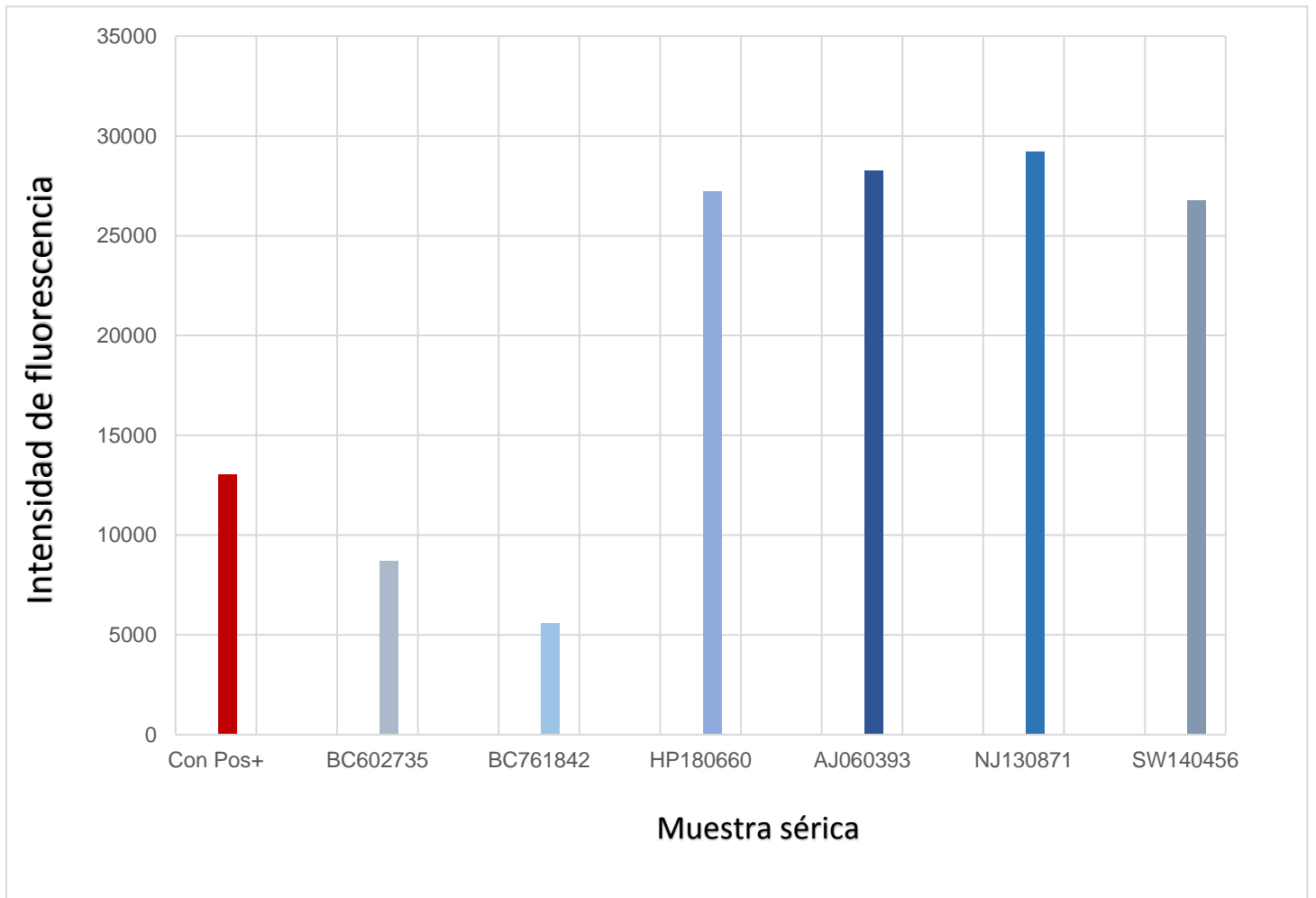
6. RESULTADOS

6.1. Detección de auto-anticuerpos contra IL-6 en muestras séricas

Se analizaron un total de 6 muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes, para la confirmación de la presencia de auto-anticuerpos específicos contra IL-6, empleando la técnica de suspensión múltiple de micropartículas (Luminex). En la **Tabla 2** se presentan los valores de intensidad de fluorescencia (IF) obtenidos de cada una de las muestras séricas humanas que se analizaron en el presente estudio.

Código de la muestra sérica	Valor de IF
Cont pos +	13 000
HP180660	27 224
AJ060393	28 265
NJ130871	29 216
SW140456	26 745
BC602735	8 702
BC761842	5 574

Tabla 2. Detección de la presencia de auto-anticuerpos específicos contra IL-6 en muestras séricas humanas. Se presentan los valores de intensidad de fluorescencia (IF) obtenidos de cada una de las muestras séricas humanas trabajadas, incluyendo los valores del control positivo (anti-IL-6 biotinilado unido a estreptavidina).



Gráfica 1. Detección de la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 en muestras séricas positivas. Se analizaron un total de 6 muestras séricas positivas anti-IL-6 con diferentes diluciones 1/100 cada una; empleando la técnica de suspensión múltiple de micropartículas (Luminex).

6.2. Estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna para la purificación de auto-anticuerpos contra IL-6 presentes muestras séricas

Se realizó la estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad empleando la muestra sérica BC602735, la cual se determinó previamente que era positiva a la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6. Para la purificación de dichos auto-anticuerpos se emplearon dos columnas, la primera columna a la cual se le acopló la rhIL-6, para que los auto-anticuerpos contra IL-6 se unieran a la citocina recombinante y de esta forma logrando separar los demás componentes de la muestra trabajada; mientras que la segunda columna que tenía acoplada a la proteína BSA se utilizó como control negativo para descartar cualquier unión inespecífica.

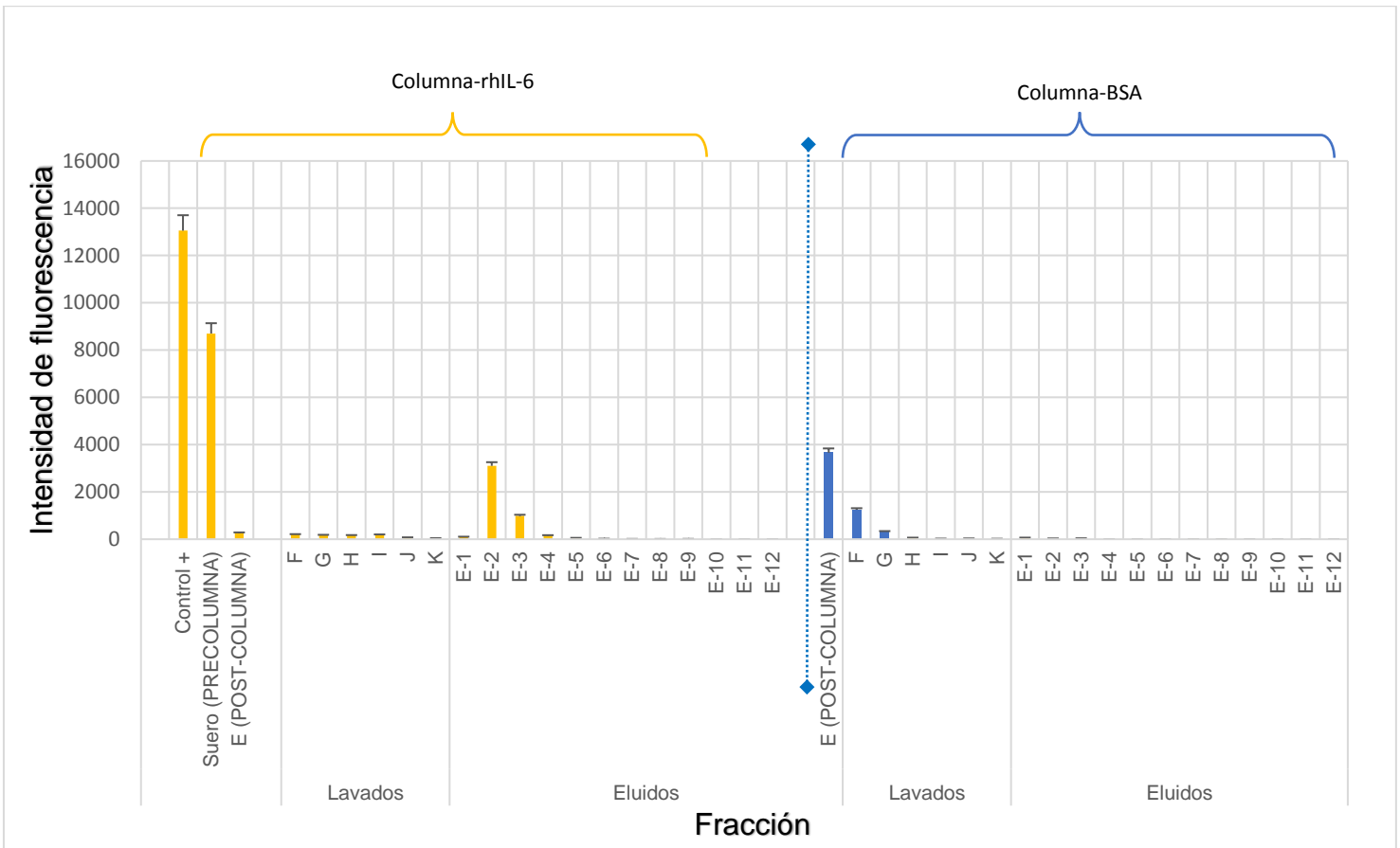
6.2.1. Detección de auto-anticuerpos anti-IL-6 en las diferentes fracciones obtenidas por la técnica de cromatografía de afinidad por columna

En la **Gráfica 2** se esquematizan los valores de IF de las diferentes fracciones obtenidas, así como la muestra sérica **BC602735** antes de pasar a través de las columnas (precolumna) y la muestra postcolumna que corresponde a la fracción conteniendo los componentes de la muestra sérica no unidos a las columnas al pasar a través de ellas; se presenta de igual forma la intensidad de fluorescencia de las fracciones obtenidas de los lavados y de las fracciones eluidas, correspondientes a cada una de las columnas trabajadas.

La porción E (post-columna) representa a la fracción que contiene los componentes de la muestra sérica no unidos a la columna, por lo tanto, una vez que atravesó la columna de afinidad acoplada a IL-6, la detección de los auto-anticuerpos anti-IL-6 en esta fracción resultó ser baja, debido a que estos auto-anticuerpos quedaron unidos a la IL-6 acoplada a la columna; mientras que la fracción E obtenida de la columna-BSA presenta altos niveles de intensidad de fluorescencia, ya que no existió una unión específica de los auto-anticuerpos contra esta citocina.

A partir de las fracciones F a la K corresponden a las fracciones de lavados, por lo tanto la intensidad de fluorescencia va disminuyendo. A partir de E1 se realiza la elución del auto-anticuerpo anti-IL-6, debido al cambio de pH, siendo un valor de pH 2.8, generándose la ruptura del enlace antígeno-anticuerpo, favoreciendo la liberación del mismo, por lo que la presencia del auto-anticuerpo anti-IL-6 se empezó a detectar de la elución E2 hasta la E3, obteniéndose valores de intensidad de fluorescencia positivos, detectándose así las diferentes fracciones con presencia del auto-anticuerpo anti-IL-6 purificado.

Así mismo, se incluyó el control positivo siendo este un anticuerpo específico contra IL-6, presentando altos niveles de intensidad de fluorescencia debido a la unión específica del anticuerpo al antígeno que se encuentra acoplado a la microesfera del sistema utilizado, mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión, multi-Plex (Luminex).



Grafica 2. Purificación del auto-anticuerpo anti-IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código **BC602735**; proveniente de un varón de 34 años que presentaba fiebre recurrente, celulitis estafilococal, infección diseminada severa con ausencia de inflamación. De lado derecho se esquematiza el control negativo (Columna de BSA), presentando niveles de IF bajos debido a la unión inespecífica del auto-anticuerpo anti-IL-6 que existe en dicha columna.

6.3. Purificación de auto-anticuerpos contra IL-6 presentes en muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos.

En cuanto se estandarizaron las condiciones de la técnica de cromatografía de afinidad por columna, se procedió a realizar la purificación de los auto-anticuerpos contra IL-6 de las otras cinco muestras séricas positivas a estos auto-anticuerpos. De la misma manera se emplearon 2 columnas, una acoplada a BSA siendo ésta el control negativo, y otra columna acoplada a IL-6, obteniendo así cada una de las fracciones purificadas de cada muestra.

6.4. Análisis de la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 purificados en las diferentes fracciones obtenidas por la técnica de cromatografía de afinidad por columna

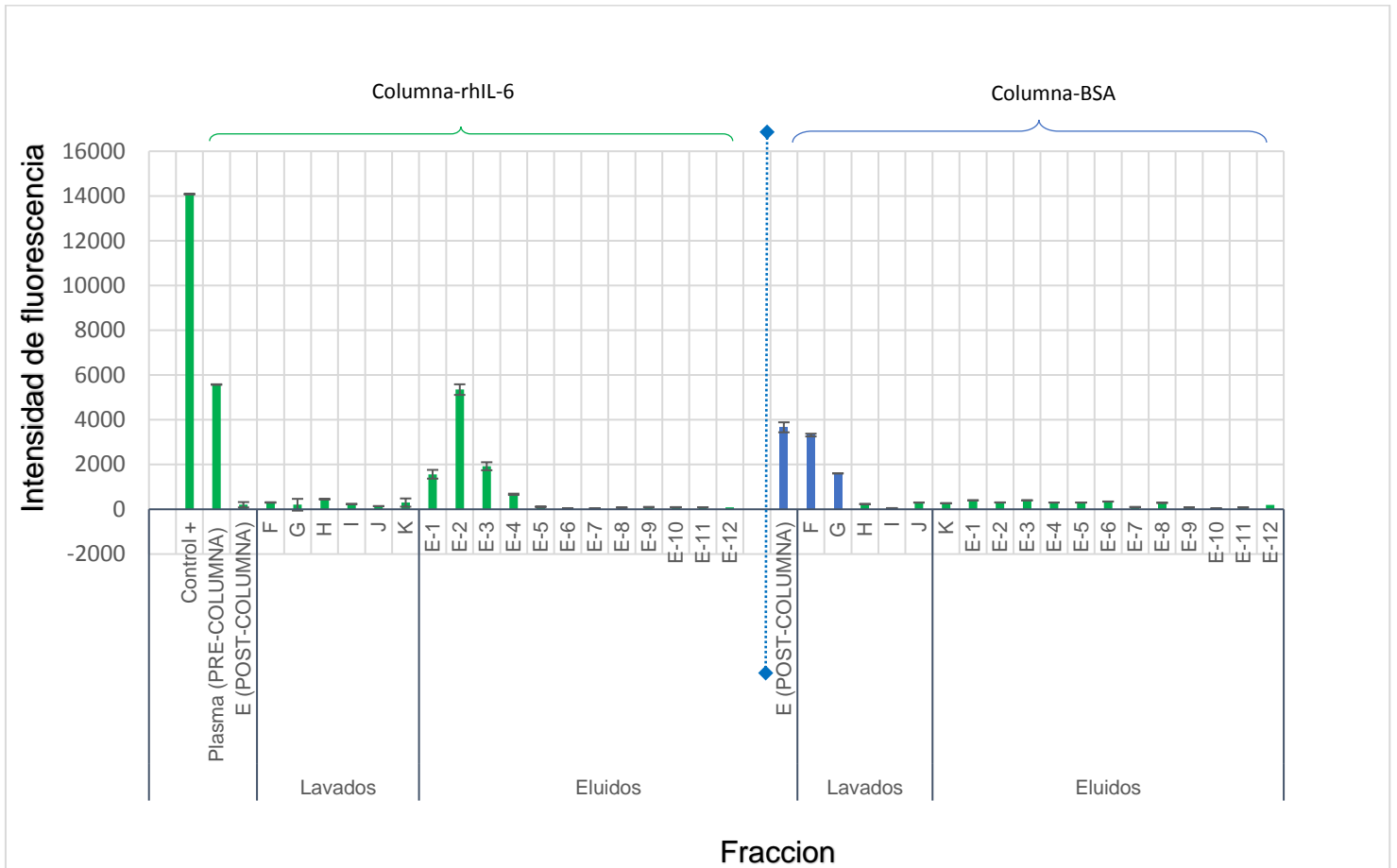
Una vez que se logró la estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna, las otras cinco muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos contra IL-6 se trabajaron para la purificación de éstos empleando dicha técnica. Donde los valores de IF de cada una de las diferentes fracciones obtenidas de las columnas trabajadas se esquematizan en las gráficas que se muestran a continuación; así mismo, se incluyó el control positivo que corresponde a un anticuerpo comercial específico para la IL-6, este control se utilizó para confirmar el reconocimiento adecuado de la rhIL-6 del sistema de microesferas que se empleó, para llevar a cabo la evaluación de la presencia de los auto-anticuerpos anti-IL-6 en las diferentes fracciones obtenidas por la técnica de cromatografía.

A continuación, se presentan en la **Gráfica 3** los valores de IF correspondiente a la muestra plasmática **BC761842** y cada una de las fracciones obtenidas mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Se puede observar que el control positivo (anticuerpo específico contra IL-6) y el suero PRE-COLUMNA (muestra sérica positiva a auto-anticuerpos anti-IL-6 antes de depositarla a la columna), presentaron valores considerables de IF, lo

que indica la presencia y unión específica de auto-anticuerpos contra la rhIL-6, la cual estaba acoplada a las microesferas que se emplearon en la técnica de Luminex.

Así mismo, en esta **Gráfica 3** se indican los valores de IF obtenidos de las diferentes fracciones colectadas de ambas columnas trabajadas (Columna-rhIL-6 y Columna-BSA). Con respecto a la Columna-rhIL-6, la fracción E (muestra sérica POST-COLUMNA) que representa los componentes de la muestra sérica no unidos a esta columna de afinidad, por lo tanto, una vez que atravesó la columna que contenía acoplada a la rhIL-6, los niveles de IF fueron bajos; mientras que en la fracción E obtenida de la Columna-BSA siguió presentando niveles considerables de auto-anticuerpos (IF=3,664), indicando que no existió una unión inespecífica de los auto-anticuerpos anti-IL-6 hacia una proteína ajena como es la BSA.

A partir de las fracciones F a la K, correspondientes a los lavados, no se detectaron valores de IF en la Columna-rhIL-6, valores de IF obtenidos; en contraste, en las primeras eluciones de la Columna-rhIL-6 se ve claramente que existió la ruptura del enlace entre los auto-anticuerpos anti-IL-6 y la citocina acoplada a la columna (debido al pH ácido del buffer de elución, pH 2.8), correspondiendo a las fracciones eluidas de E1 a E4, las cuales presentaron valores de IF mayores a las fracciones correspondientes a los lavados de esta misma columna (fracciones de F a K). Aunque en las fracciones de E8 a E12 existió una disminución a un pH aún más ácido (pH 2) del buffer de elución no se logró detectar la presencia de los auto-anticuerpos anti-IL-6 en dichas fracciones. La purificación específica de los auto-anticuerpos contra la IL-6 se confirmó al obtener valores mínimos de IF en todas las fracciones eluidas (de E1 a E12) de la Columna-BSA.



Gráfica.3 Purificación del auto-anticuerpo anti-IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código **BC761842**; proveniente de un varón de 56 años que presentaba, autoinmunidad multiorgánica, infección diseminada por estafilococos, linfoma de Hodgkin, y fiebre recurrente. De lado derecho se muestra como control negativo la columna de BSA. De lado derecho se esquematiza el control negativo (Columna de BSA), presentando niveles de IF bajos debido a la unión inespecífica del auto-anticuerpo anti-IL-6 que existe en dicha columna.

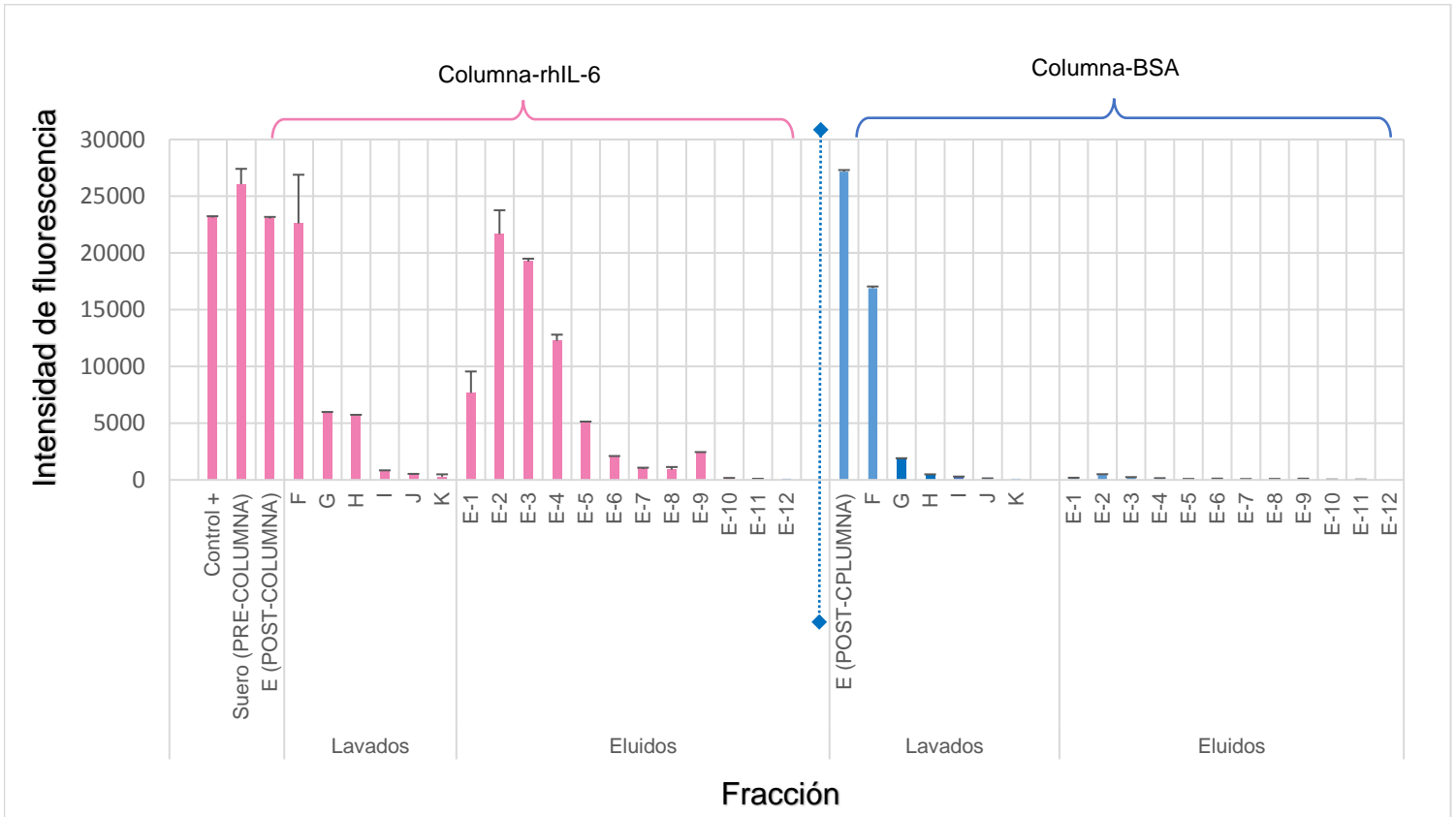
Del mismo modo, en la **Gráfica 4** se esquematizan los valores de IF obtenidos en las diferentes fracciones colectadas de ambas columnas trabajadas (Columna-rhIL-6 y Columna-BSA), mientras que para la Columna-BSA se ve una disminución paulatinamente de los correspondientes a la muestra sérica **HP180660**. Así mismo, se representa el control positivo (anticuerpo específico contra IL-6) y el suero PRE-COLUMNA (muestra sérica positiva a los auto-anticuerpos anti-IL-6 antes de depositarla a la columna), los cuales presentaron valores considerables de IF, lo que indica que existió una unión específica de los anticuerpos contra la rhIL-6 acoplada a las microesferas.

Con respecto a la Columna-rhIL-6, la fracción E (muestra sérica POST-COLUMNA) que representa la fracción que contiene los componentes no unidos a la Columna-rhIL-6 una vez que la atravesó, la detección de los auto-anticuerpos anti-IL-6 en esta fracción presentó valores considerables de IF (23,037), debido a que la muestra sérica presentaba niveles altos de estos auto-anticuerpos obteniendo valores de IF de 27,057 (suero PRE-COLUMNA), y por lo tanto la detección de la presencia de auto-anticuerpos contra IL-6 en la fracción E se explica debido a una saturación de la Columna-rhIL-6 por los altos niveles de auto-anticuerpos presentes en la muestra **HP180660**, lo cual no se observó en la **Gráfica 3** correspondiente a la muestra **BC761842** que tenía niveles de auto-anticuerpos más bajos (IF=5,574). Por la misma razón en las primeras fracciones (de la F a la H) correspondientes a los lavados se obtuvieron valores de IF que indicaron la presencia de los auto-anticuerpos anti-IL-6.

Además, en esta misma **Gráfica 4**, se puede observar el incremento de los valores de IF obtenidos en las fracciones eluidas (de E1 a E7) correspondientes a la Columna-rhIL-6; indicando la ruptura del enlace auto-anti-IL-6 a causa del cambio de pH del buffer de elución (pH 2.8), y así mismo se observa en el cambio a un pH aún más ácido (pH 2) del buffer, detectándose valores de IF también en las fracciones eluidas E8 y E9, aunque los niveles de auto-anticuerpos anti-IL-6 resultaron ser más bajos en estos eluidos. Sin embargo, el uso de un pH más ácido favorece la purificación de auto-anti-IL-6

presentes en las muestras séricas trabajadas e incrementa el rendimiento de purificación de la técnica de cromatografía de afinidad por columna.

Mientras que en el caso de la Columna-BSA en la fracción E (POST-COLUMNA) se obtuvieron valores de IF de 27,068 y a medida que se realizaron los lavados, los valores de IF fueron disminuyendo a partir de las fracciones F a la H, indicando que no existió una unión inespecífica de los auto-anticuerpos anti-IL-6 hacia una proteína ajena como es la BSA, lo que se confirmó también por los valores mínimos de IF que se obtuvieron en todas las fracciones eluidas (de E1 a E12) de esta columna.



Grafica 4. Purificación del auto-anticuerpo anti-IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código **HP180660**; proveniente de un varón de 67 años que presentaba hemoptisis, enfermedad pulmonar y neumonía intersticial. De lado derecho se esquematiza el control negativo (Columna de BSA), presentando niveles de IF bajos debido a la unión inespecífica del auto-anticuerpo anti-IL-6 que existe en dicha columna.

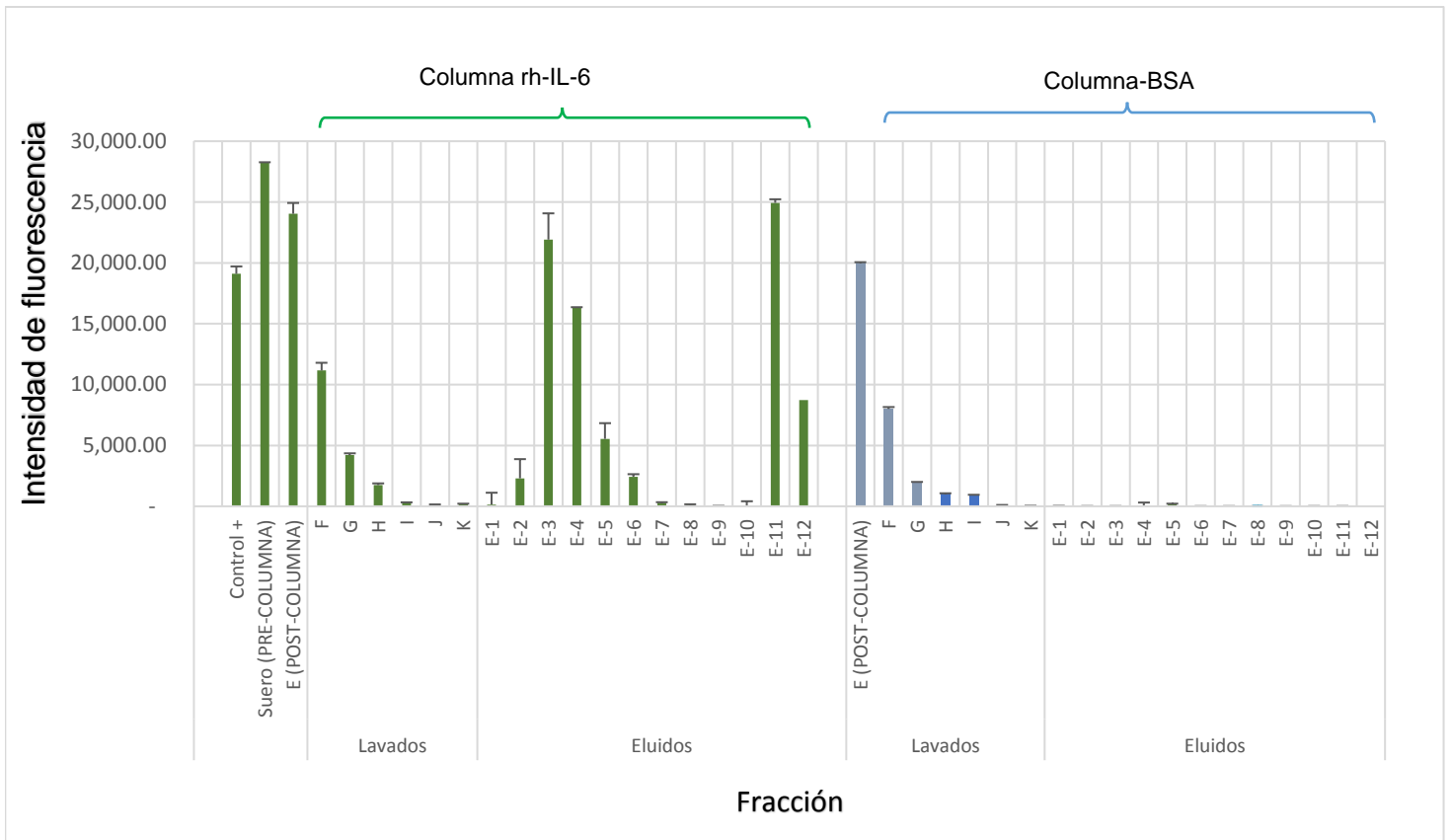
En la **Gráfica 5** se esquematiza la muestra sérica **AJ060393**, se presenta el control positivo y el suero PRE-COLUMNA en ambas fracciones se presentan considerables valores de IF, indicando la unión específica de los anticuerpos contra la rhIL-6. Se observan los valores de IF correspondientes a cada una de las fracciones eluidas y colectadas de ambas columnas trabajadas (Columna-rhIL-6 y Columna-BSA).

Con respecto a la Columna-rhIL-6, en la fracción E (muestra sérica POST-COLUMNA) la detección de los auto-anticuerpos anti-IL-6 resultó ser considerable presentando valores de IF de 24,036; un comportamiento similar se observó para la muestra sérica (**HP180660**) descrita anteriormente, ambas muestras séricas **AJ060393** y **HP180660** tenían niveles altos de estos auto-anticuerpos ya que presentaron valores de IF de 28,177 y de 27,057 respectivamente. Por lo tanto, los valores de IF considerables que se obtuvieron en la fracción POST-COLUMNA indican aún la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 en esta fracción, y así mismo los valores de IF obtenidos para las primeras fracciones del lavado (de F a H), ambos casos se explican debido a una saturación de la Columna-rhIL-6 por los altos niveles de auto-anticuerpos presentes en la muestra.

Por otro lado, se observa la ruptura del enlace entre los auto-anti-IL-6 y la rhIL-6 inmovilizada en las fracciones eluidas de E2 a E6, considerando el incremento de los valores de IF obtenidos debido al cambio de pH 2.8; así mismo, se detectaron también valores considerables de IF en las fracciones eluidas E11 y E12, a causa de la disminución a un pH aún más ácido (pH 2) del buffer de elución, obteniendo un mejor rendimiento del auto-anti-IL-6 purificado.

Como en las Gráficas descritas anteriormente, la Columna-BSA se utilizó como control negativo, y por lo tanto en la **Gráfica 5** se puede observar que se obtuvieron valores de IF considerables en la fracción E POST-COLUMNA indicando que no existió una unión específica de los auto-anticuerpos anti-IL-6 hacia una proteína ajena como es la BSA; así mismo, se pueden observar valores

mínimos de IF en los lavados y en todas las fracciones eluidas (de E1 a E12) de la Columna-BSA . esta columna.



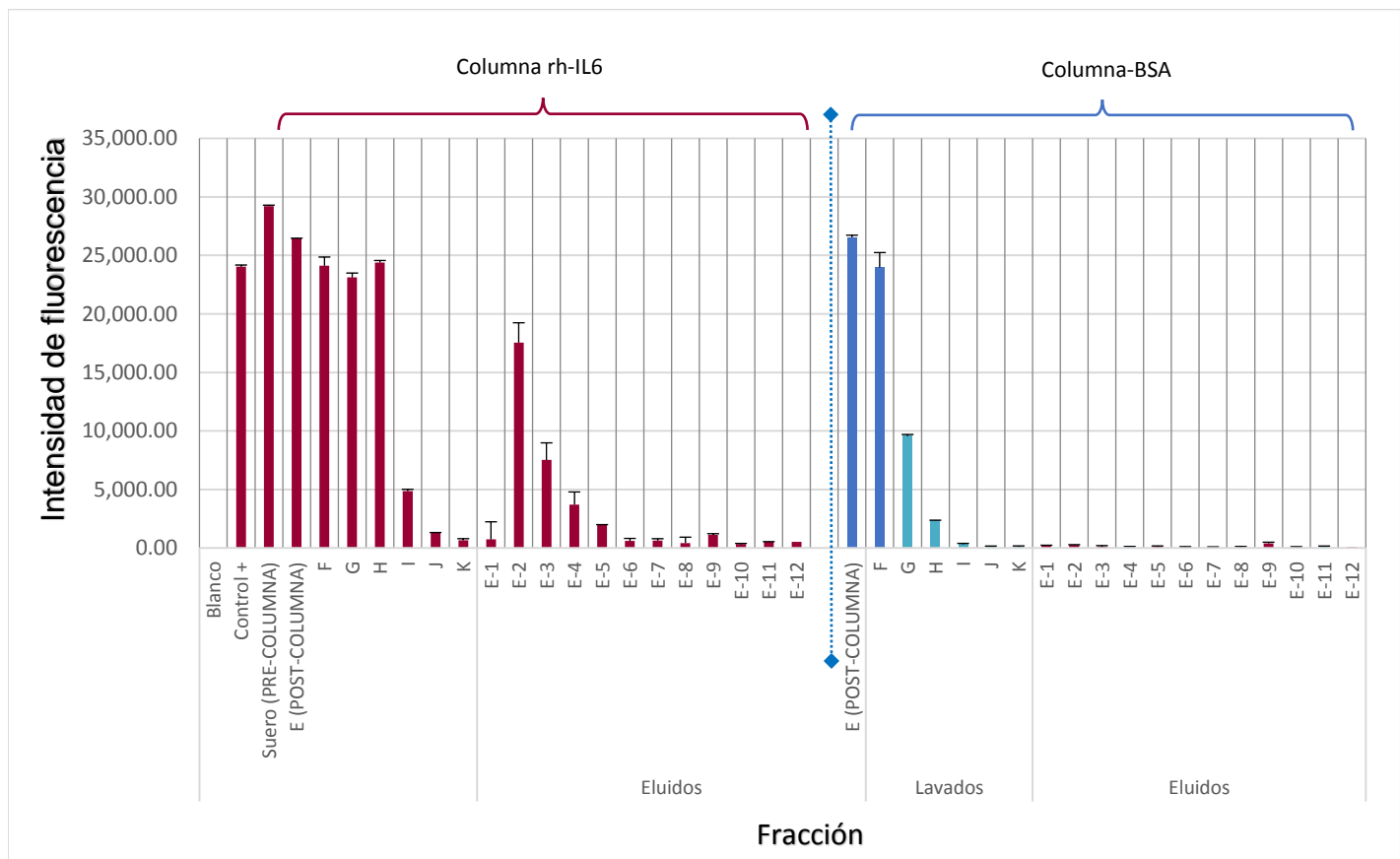
Grafica 5. Purificación del auto-anticuerpo anti-IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código **AJ060393**; proveniente de un varón de 67 años que presentaba hemoptisis, enfermedad pulmonar y neumonía intersticial. De lado derecho se esquematiza el control negativo (Columna de BSA), presentando niveles de IF bajos debido a la unión inespecífica del auto-anticuerpo anti-IL-6 que existe en dicha columna.

En la **Gráfica 6** se esquematiza la muestra **NJ13087**, se observa el control positivo y el suero PRE-COLUMNA, ambas fracciones presentaron considerables valores de IF, comprobando la unión específica de los anticuerpos contra la rhIL-6.

Se observan cada una de las fracciones eluidas colectadas de ambas columnas trabajadas (Columna-rhIL-6 y Columna-BSA). Con respecto a la Columna-rhIL-6, la fracción E (muestra sérica POST-COLUMNA) una vez que atravesó la columna que contenía acoplada a la rh-IL-6, los niveles de IF fueron valores considerables ya que la muestra presentó niveles altos de estos auto-anticuerpos obteniendo valores de IF iniciales de 26,452. Por lo que también en esta misma Gráfica se puede observar una saturación de la Columna-rh-IL-6 ya que se detectó la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6 hasta en las fracciones de lavados (F a la H).

Así mismo, como ya se ha explicado anteriormente, debido al cambio de pH ácido del buffer de elución (pH 2.8), se puede observar el incremento de los valores de IF obtenidos en las fracciones eluidas E2 a E5 confirmando la ruptura del enlace de los auto-anticuerpos anti-IL-6 detectados solo en estas fracciones, ya que aunque se realizó la disminución del pH a uno más ácido (pH 2) del buffer de elución, no se obtuvo el auto-anti-IL-6 purificado en las eluciones correspondientes (E8 a E12).

Respecto al control negativo (Columna-BSA) se observan valores considerables de IF en la fracción E POST-COLUMNA, dichos valores van disminuyendo gradualmente en las fracciones de los lavados (F a la H), evidenciando que no hay unión específica de los auto-anticuerpos anti-IL-6 a la proteína BSA, comprobando esto también por los valores mínimos de IF que se obtuvieron en todas las fracciones eluidas (de E1 a e12).



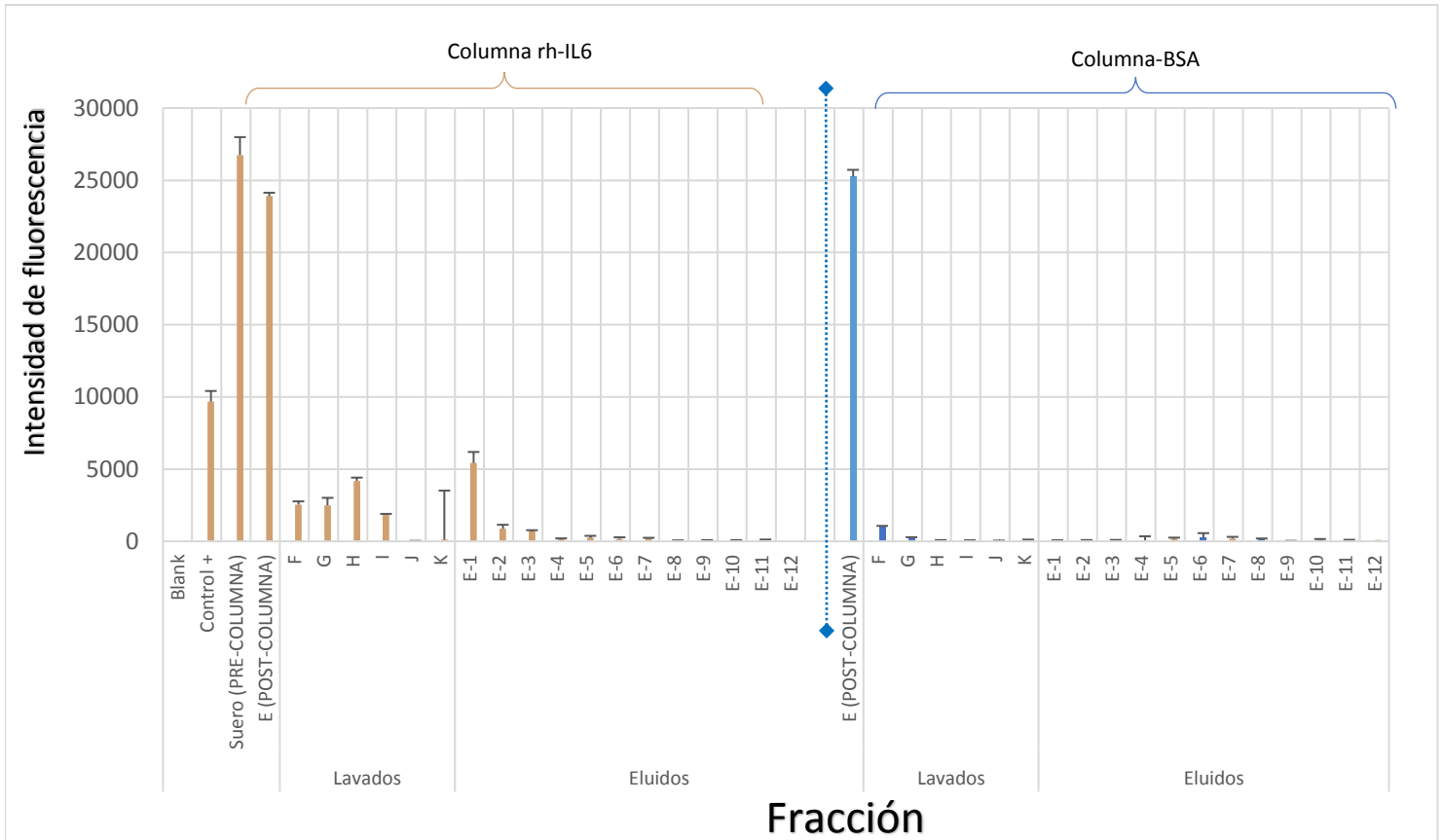
Grafica 6. Purificación del auto-anticuerpo anti-IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código **NJ13087**; proveniente de un sujeto de 66 años que presentaba aspergilosis y enfermedad pulmonar crónica. De lado derecho se esquematiza el control negativo (Columna de BSA), presentando niveles de IF bajos debido a la unión inespecífica del auto-anticuerpo anti-IL-6 que existe en dicha columna.

Igualmente, en la **Gráfica 7** se esquematiza el comportamiento de la muestra **SW140456** cuando se realizó la purificación de los auto-anticuerpos, se puede observar que el control positivo y el suero PRE-COLUMNA presentaron considerables valores de IF.

En esta misma **Gráfica 7** se indican los valores de IF obtenidos en las diferentes fracciones colectadas de ambas columnas trabajadas. Con respecto a la Columna-rh-IL-6, la fracción E (muestra sérica POST-COLUMNA) que representa los componentes de la muestra sérica no unidos a esta columna de afinidad; sin embargo, considerando que esta muestra sérica presentó niveles de auto-anticuerpos elevados (IF= 26,745), se puede observar que en la fracción E, que corresponde a la muestra una vez que atravesó la Columna-rh-IL-6, se determinaron valores de IF considerables (23,904), debido a la saturación de la columna por los niveles altos de auto-anticuerpos anti-IL-6 presentes en esta muestra sérica, comportamiento similar a las otras muestras séricas que presentaron niveles considerables de auto-anticuerpos contra IL-6.

A partir de las fracciones de los lavados F a la K, se detectaron valores mínimos de IF, sin embargo, en las eluciones de dicha columna, se ve claramente la ruptura del enlace auto-anti-IL-6 en las fracciones eluidas de E1 a E3 considerando el incremento de los valores de IF obtenidos en la primera fracción. A pesar de que en las fracciones de E8 a E12 existió una disminución a un pH aún más ácido (pH 2) del buffer de elución, no se detectó la presencia de los auto-anticuerpos anti-IL-6 en dichas fracciones. Sin embargo, la detección de valores mínimos de IF en las fracciones de F a K y las fracciones eluidas E1 a E3, comparados con las muestras de las **Gráficas 4, 5 y 6**, se podría explicar debido a que la misma Columna-rh-IL-6 fue reutilizada en cada una de las purificaciones realizadas. A pesar de que en el Thermo *Scientific Micro Link Protein Kit* sugiere emplear la columna un número de 20 veces, es aquí donde se estandariza el número real para poder reutilizar dichas columnas para la purificación de los auto-anticuerpos.

Del mismo modo, la purificación específica de los auto-anticuerpos anti-IL-6 de dicha muestra (**SW140456**) se confirmó al obtener valores considerables de IF en la fracción E POST-COLUMNA de la Columna-BSA; así mismo, se pueden observar valores mínimos de IF en los lavados y en todas las fracciones eluidas (de E1 a E12) de esta columna.



Grafica 7. Purificación del auto-anticuerpo anti-IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Muestra sérica positiva al auto-anticuerpo anti-IL-6 con el código **SW140456**; proveniente de un varón de 44 años, presentaba inflamación con ausencia de infección. De lado derecho se esquematiza el control negativo (columna-BSA), presentando niveles de IF bajos debido a la unión inespecífica del auto-anticuerpo anti-IL-6 que existe en dicha columna.

7. Discusión

Actualmente no existen muchos estudios con respecto a una caracterización detallada a auto-anticuerpos anti-citocinas, por lo que lograr la purificación de los mismos es de suma importancia, para la realización de análisis más específicos y claros sobre la función que se le podría atribuir a la presencia de auto-anticuerpos contra citocinas, podrían estar involucrados en la susceptibilidad a infecciones por diversos microorganismos.

Así mismo, los auto-anticuerpos anticitocinas purificados se podrían caracterizar empleando ensayos *in vitro* de inhibición de la fosforilación de algunos factores de transcripción, como son STAT-1 y STAT-3; estos ensayos de inhibición resultan de gran utilidad para evaluar y demostrar la capacidad neutralizante de dichos auto-anticuerpos anti-citocinas sobre la actividad funcional de estos mediadores químicos. También se pueden realizar otras pruebas como es la inhibición de la producción de citocinas, la determinación de los índices de avidéz, el análisis de reconocimiento de citocinas nativas, y por otra parte resulta de suma importancia emplear los auto-anticuerpos contra citocinas purificados para lograr la identificación de los epítomos reconocidos por los auto-anticuerpos mediante microarreglos de péptidos solapados, entre otros ensayos.

Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna empleando el Thermo *Scientific Micro Link Protein Kit*, para lograr la purificación de los auto-anticuerpos anti-citocina (IL-6). Se analizaron seis muestras séricas positivas a auto-anticuerpos contra IL-6, las cuales se mencionan en forma general en la Tabla 1 (punto 5.1); los pacientes sufrían de severas y/o recurrentes infecciones causadas por estafilococos, herpes, aspergilosis e inflamación con ausencia de infección.

Las condiciones de trabajo empleadas para la realización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna son importantes, puesto que la solución

amortiguadora que es utilizada para la unión óptima de los auto-anticuerpos debe presentar un valor de pH similar al que se tiene en condiciones fisiológicas, es por eso que se utilizó una solución amortiguadora de un pH neutro (es decir pH 7.2), dado que este método de purificación aprovecha la característica de que al formarse el complejo antígeno-anticuerpo intervienen enlaces no covalentes. Considerando que las muestras séricas además de presentar auto-anticuerpos anti-IL-6, se encuentran mezclados otros componentes biológicos propios de la misma; como proteínas, (albúmina, globulinas), electrolitos (Na⁺, K⁺, Ca⁺ etc.), urea, ácido úrico, creatinina, glucosa, lípidos, aminoácidos, oxígeno, dióxido de carbono, hormonas, enzimas, etc. Por lo tanto, cuando el suero o plasma pasa a través de la columna (matriz), los anticuerpos específicos contra la citocina (rh-IL-6) permanecen unidos a este antígeno inmovilizado en la columna, mientras que los otros componentes de la muestra sérica (entre ellos anticuerpos inespecíficos para el antígeno inmovilizado) fueron eliminados mediante los lavados.

Así mismo, la unión específica de los auto-anticuerpos a la citocina IL-6 se corroboró al utilizar otra columna de afinidad que tenía acoplada una proteína ajena (BSA) a la proteína de interés (citocina), el empleo de dicha columna demostró que nada se unió inespecíficamente, considerando la similitud de los valores de IF que presentaron cada una de las muestras séricas antes y después del paso a través de la Columna-BSA.

Para la etapa de elución de las columnas se realizó la disociación del complejo antígeno-anticuerpo mediante la variación del pH, cambiando a valores de pH ácidos primero de 2.8 y después a 2.0, para así provocar la ruptura del complejo entre la citocina y los auto-anticuerpos, para finalmente obtener en forma purificada los auto-anticuerpos que se unieron específicamente a la IL-6 inmovilizada al inmunoabsorbente de la columna de afinidad.

El soporte utilizado en el presente estudio fue la agarosa, este material es un polímero lineal de 1,3-D galactopiranososa β 1-4,3,6 anhidro L-galactosa, que

permite se utilice en concentraciones muy bajas (<0.5%) y facilita la formación de poros muy grandes, además de ser muy estable. La estructura de los soportes de agarosa no se mantiene por enlaces covalentes, si no que se debe a puentes de hidrógeno entre cadenas vecinas; sin embargo, cuando se adicionan agentes que destruyen estos puentes como algunas aminas primarias, cloruro de guanidino, urea y algunos detergentes utilizados, para recuperar la muestra no se aprecia una disminución en la estabilidad del soporte (Firer, 2001).

Además, cuando se utiliza un soporte de agarosa en la técnica de cromatografía de afinidad por columna, se ha demostrado que el método más popular y mejor para lograr una separación adecuada de la reacción antígeno-anticuerpo, es la aplicación a la columna de una solución amortiguadora ácida, entre un pH de 1 a 3, debido a que la agarosa presenta la característica de ser muy estable en un rango de pH de 2 a 3 y muestra una tolerancia adecuada a la exposición de HCl [1 M]; sin embargo, a estas condiciones ácidas se logra la ruptura de los enlaces involucrados en la interacción antígeno-anticuerpo. Así mismo, Moser y autores refieren que se ha demostrado que estas columnas son muy estables cuando se utilizan los cambios de pH moderados en un intervalo de 2.5 a 3.0 para la elución. Es importante que el soporte no se altere bajo las condiciones de trabajo, así como a diferentes valores de pH, temperatura, fuerza iónica y bajo la presencia de agentes desnaturalizantes y caotrópicos; por lo tanto, el hecho de poder reutilizar una columna depende de estas condiciones de trabajo (Moser *et al*, 2000; Ross, 2008).

Se evaluó la eficiencia de la técnica de cromatografía de afinidad por columna para realizar la purificación de los auto-anticuerpos anti-IL-6, empleando el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex). Donde los valores de IF indicaron la presencia o la ausencia de los auto-anticuerpos purificados en las diferentes fracciones eluidas obtenidas durante el proceso de purificación de las seis muestras séricas trabajadas; así mismo, se vió reflejado el efecto de disociación del pH sobre la unión de los auto-anticuerpos contra IL-

6 que formaron los complejos antígeno-anticuerpo en la columna de cromatografía de afinidad.

La purificación de los auto-anticuerpos específicos contra la IL-6 se confirmó al obtener valores mínimos de IF en todas las fracciones eluidas (de E1 a E12) de la Columna-BSA. Mientras que cuando se utilizó la Columna-rh-IL-6 se obtuvieron valores de IF considerables en algunas de las fracciones eluidas, ya que el uso de un pH ácido del buffer de elución, favorece la ruptura de las interacciones entre los auto-anticuerpos y la citocina, y así lograr la purificación de los auto-anti-IL-6 presentes en las muestras séricas trabajadas; así mismo, se observa que el cambio a un pH aún más ácido del buffer de elución incrementa el rendimiento de purificación de la técnica de cromatografía de afinidad por columna.

Es importante mencionar que los niveles de auto-anticuerpos contra la citocina (IL-6) que presenta cada una de las muestras séricas positivas, influyó en el comportamiento de las fracciones eluidas de la columna de cromatografía de afinidad, en las cuales se detectó la presencia de los auto-anticuerpos anti-IL-6 purificados. Por ejemplo, las primeras dos muestras analizadas (**Panel C y D**) presentan niveles de auto-anticuerpos anti-IL-6 más bajos que las muestras de los paneles **E, F, G y H** (considerando los valores de IF que presentaron cada una de ellas); es decir, para las muestras séricas del panel **C y D** se obtuvieron auto-anticuerpos contra IL-6 purificados en las fracciones eluidas E1 a E4, aunque en las fracciones de E8 a E12 existió una disminución a un pH más ácido (pH 2) del buffer de elución, no se logró detectar la presencia de los auto-anticuerpos anti-IL-6 en dichas fracciones de estas muestras.

En cuanto a las muestras séricas con niveles de auto-anticuerpos anti-IL-6 más altos (representadas en los paneles **E, F y G**) se observaron considerables valores de IF en los eluidos E1 a E6. Sin embargo, cuando se realizó la disminución del pH de 2.8 a 2.0 (fracciones eluidas de E8 a E12), en ninguna de estas fracciones eluidas se detectaron niveles de auto-anticuerpos anti-IL-6 para

el caso del suero representado en el panel **G**. Mientras que, con el suero **HP180660**, (Gráfica 4, panel **E**) se observan considerables niveles de auto-anticuerpos anti-IL-6 purificados en las fracciones eluidas E8 y E9; del mismo modo, en el suero **AJ060393** (Gráfica 5, panel **F**) se obtuvieron considerables valores de IF en los eluidos E11 y E12. Esto permite mencionar que en las muestras séricas **HP180660** y **AJ060393** el descenso del pH de 2.8 a 2.0 del buffer de elución, favoreció la disociación de la interacción de los auto-anticuerpos anti-IL-6, por consiguiente, la obtención de una mejor purificación de los auto-anticuerpos empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna.

Con respecto a los valores bajos de IF los cuales indican una detección escasa de auto-anticuerpos anti-IL-6 purificados en las eluciones de E1 a la E3 de la muestra SW140456, en contraste con los valores más altos obtenidos en estas mismas eluciones correspondientes a las muestras HP180660, AJ060393 y NJ130871; tomando en cuenta que estas cuatro muestras presentaron considerables niveles de auto-anticuerpos, donde una de ellas (SW140456) presentó un comportamiento distinto, esta diferencia se puede explicar debido a que la misma Columna-rh-IL-6 fue reutilizada en las purificaciones de los auto-anticuerpos anti-IL-6 presentes en todas las muestras trabajadas; y la muestra SW140456 fue la última trabajada para la purificación de estos auto-anticuerpos, correspondiéndole el reuso de 15 veces; a pesar de que en el Thermo *Scientific Micro Link Protein Kit* sugiere emplear la columna un número de 20 veces.

Por otro lado, en las muestras de los paneles HP180660, AJ060393, NJ130871 y SW140456, se observa que en la Columna-rh-IL-6, la fracción E (muestra sérica POST-COLUMNA) que representa los componentes no unidos a la Columna-rh-IL-6 de afinidad, presentó valores de IF considerables debido a la saturación de esta Columna-rh-IL-6, debido a los altos niveles de auto-anticuerpos contra IL-6 presentes en dichas muestras séricas; por lo que se recomienda utilizar columnas de mayor capacidad para la realización de la técnica de cromatografía de afinidad cuando se trabajan muestras que presentan

elevados niveles de auto-anticuerpos contra citocinas, y de esta forma evitar rebasar la capacidad de unión de la citocina acoplada a la columna hacia los auto-anticuerpos a purificar que se encuentran presentes en las muestras séricas.

El presente trabajo de tesis consistió en lograr la purificación de auto-anticuerpos contra IL-6 utilizando la técnica de cromatografía de afinidad por columna, a partir de muestras séricas de pacientes con diversas enfermedades infecciosas recurrentes y/o autoinmunes; la disponibilidad de preparaciones purificadas de estos auto-anticuerpos anti-IL-6 serían más recomendables y de mayor utilidad para llevar a cabo estudios futuros. Donde los auto-anticuerpos purificados se podrían emplear en ensayos para evaluar la capacidad neutralizante de éstos sobre la actividad biológica de la citocina blanco. Dentro de los que se podrían mencionar, ensayos *in vitro* de neutralización de la fosforilación de los factores de transcripción STAT-1 y STAT-3, pruebas de inhibición de la producción de citocinas; entre otros ensayos como, los análisis de determinación de los índices de avidéz, de reconocimiento de citocinas nativas, identificación de los epítomos reconocidos por los auto-anticuerpos mediante microarreglos de péptidos solapados, entre otros. Finalmente, la estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad por columna permitirá realizar a futuro la purificación de otros auto-anticuerpos contra diversas citocinas, para que de igual forma sea posible lograr un análisis más a fondo en cuanto a poder definir la función de los auto-anticuerpos anticitocinas empleando los ensayos de neutralización *in vitro*, la identificación de determinantes antigénicos, así como otros tipos de estudios.

8. Conclusiones

8.1 Todas las muestras sericas trabajadas fueron positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti-IL-6, empleando el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).

8.2 Se determinaron los niveles de auto-anticuerpos anti-citocinas IL-6 presentes en cada una de las fracciones obtenidas en la técnica de cromatografía de afinidad por columna mediante el ensayo de Luminex.

8.3 Se realizó exitosamente la estandarización de la técnica de cromatografía de afinidad en columna para la purificación de los auto-anticuerpos anti-IL-6, a partir de muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes.

8.4 Se comprobó la eficiencia del Thermo *Scientific Micro Link Protein* para la purificación de auto-anticuerpos anti-IL-6 a partir de muestras séricas positivas, con la detección de valores considerables de IF en algunas de las fracciones de elución obtenidas a partir de la Columna-rh-IL-6.

8.5 El uso de un pH más ácido facilita la ruptura del enlace entre los auto-anticuerpos anti-IL-6 y la rh-IL-6 inmovilizada; así mismo, favorece la purificación de los auto-anticuerpos contra IL-6 presentes en muestras séricas de pacientes con diversas enfermedades infecciosas.

9. Bibliografía

1. Aimanianda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S. et al. 2009. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci* 30: 287–295.
1. Altare, et al. (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human IL-12 receptor deficiency. *Science* 280, 1432-1435.
2. Baerlecken N, Jacobs R, Stoll M. et al. 2009. Recurrent, multifocal *Mycobacterium avium-intercellulare* infection in a patient with IFN-g autoantibody. *Clin Infect Dis* 49: e76–78.
3. Bennion, B. J., and V. Daggett. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5142– 5147.
4. Berg K. Autoantibodies to crude human leucocyte interferon (IFN), native human IFN, recombinant human IFN-alpha 2b and human IFN-gamma in healthy blood donors. (2008)., *Clin Exp Immunol* 1990;82:57–62.
5. Bettelli E, Korn T, Oukka M. et al. VK. (2008). Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453: 1051–1057.
6. Bliss, S.K., Marshall, A.J., Zhang, Y. et al. 1999. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-a, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J. Immunol.* 162, 7369–7375.
7. Browne y Holland. (2010). Anticytokine autoantibodies in infectious diseases: pathogenesis and mechanisms. *Lancet Infect Dis* 2010;10: 875–85
8. Browne, S.K. (2012). Anticytokine autoantibody-associated immunodeficiency. *Annu Rev Immunol.* 32:635-57
9. Caragol, I., Raspall, M., Fieschi, C., et al. (2003). Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta 1 deficiency. *Clin Infect Dis* 37(2):302-6.

10. McIntosh, A. (2012) Escuela de Biociencias, Universidad de Birmingham <http://inmunologia.eu/celulas-inmunologia-en-un-mordisco/celulas-b-reguladoras-bregs>
11. Conti, H.R., Shen, F., Nayyar, N., *et al.* (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signalling are essential for mucosal host defence against oral candidiasis. *J Exp Med* 206:299–311
12. Denkers, E.Y. (2003). From cells to signalling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Immunol. Med. Microbiol.* 39;193–203.
13. Dinarello CA. 2003. Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine* 21 Suppl 2: S24–34.
14. Doffinger *et al.* (2004). Autoantibodies to Interferon- γ in a Patient with Selective Susceptibility to Mycobacterial Infection and Organ- Specific Autoimmunity. *Clinical Infectious Diseases*; 38:e10–4
15. Döffinger, Patel, and Kumararatne. (2006). Host genetic factors and mycobacterial infections: Lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*, 8, 1141-1150
16. Döffinger, R., Patel, S. and Kumararatne, D. (2005). Human immunodeficiencies which pre-dispose to intracellular bacterial infection. *Current Opinion in Rheumatology*, 17, 440-6.
17. Dubin PJ, Kolls JK. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 226: 160–171.
18. Ercolini and S. D. Miller. (2008). The role of infections in autoimmune disease. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 155: 1–15
19. Fainboim, L., (2008)., *Introducción a la Inmunología Humana*, 5° ed, Buenos Aires: Médica Panamericana.
20. Fieschi Claire, Dupuis Stéphanie, Catherinot Emilie, *et al.* 2003. Low Penetrance, Broad Resistance, and Favorable Outcome of IL-12 Receptor β 1 Deficiency: Medical and Immunological Implications. *The Journal of Experimental Medicine*. 197 (4): 527–535.
21. Firer M. A. 2001. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 49: 433-442.

22. Geffner, J. (2008). *Introducción a la inmunología humana*, Buenos Aires: Médica Panamericana.
23. Hermanson, G.T., et al. (1992). *Immobilized affinity ligand techniques*. Academic Press, Inc.: San Diego, CA.
24. Hewagama A, Richardson B (2009). The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 33: 3–11.
25. Hoene M., Weigert C., (2008). The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance, *Obes Rev* 9(1):20-9
26. Hoflich C, Sabat R, Rosseau S. et al. (2004). Naturally occurring anti-IFN- γ autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia coccovenans*. *Blood* 103: 673–675.
27. Invernizzi P, Gershwin ME (2009). The genetics of human autoimmune disease. *J Autoimmun* 33:290–299.
28. Janeway Charles A, Travers Paul, Walport Mark, Sholmchik Mark. (2008). *Inmunobiology: The immune system in health and disease*. Editores: Austin Penelope, Lawrence Eleanor. 5ta ed. Garland Publishing, New York.
29. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Sholmchik, M. (2001). *Inmunobiology: The immune system in health and disease*. Garland Publishing, New York. pp 71
30. Kampmann B, Hemingway C, Stephens A. et al. (2005). Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN- γ . *J Clin Invest* 115:2480–2488.
31. Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J. *et al.* (1993). Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1-a. *J. Exp. Med.* 178, 63–72.
32. Kenneth A. Rubinson, Judith F. Rubinson, *Análisis Instrumental*, Ed. Prentice Hall, España 2004, pp 730-739.
33. Kisand, K., Boe-Wolff, A.S., Podkrajsek, K.T. *et al.* (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 207:299–308.

34. Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., *et al.* (1999). Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 190: 875–880
35. Kivity, S., Agmon-Levin, N., Blank, M. y Shoenfeld, Y. (2009). Infections and autoimmunity – friends or foes? *Trends in Immunology* 30: 409-4014
36. Koya T, Tsubata C, Kagamu H, *et al.* 2009. Anti-IFN-g autoantibody in a patient with disseminated Mycobacterium avium complex. *J Infect Chemother* 15: 118–122.
37. Lin, L., Ibrahim, A.S., Xu, X., *et al.* (2009). Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against Staphylococcus aureus and Candida albicans infection in mice. *PLoS Pathog*
38. Madariaga L, Amurrio C, Martin G, *et al.* (1998). Detection of anti-IFN- γ autoantibodies in subjects infected by Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2: 62–68.
39. Maddur, M.S., Vani, J., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S., Bayry, J. (2010) Autoimmunity as a Predisposition for Infectious Diseases. *PLoS Pathog* 6(11)
40. Maddur. (2010). Autoimmunity as a predisposition of infectious diseases. *PLOS Pathogens*. 6(11)
41. Male, D., Brostoff, J., Roitt, I., (2007), *Inmunología*, Madrid, España: Elsevier.
42. Maródi, L. y Casanova, J.L. (2009), Novel primary immunodeficiencies relevant to internal medicine: novel phenotypes. *Journal of Internal Medicine*, 266: 502–506.
2. Masi L, Ricci L, Zulian F, Del Monte F, Simonini G, Capannini S, *et al.* Serum osteopontin as a predictive marker of responsiveness to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2009;36:2308–13.
43. Moser, B.; Clark-Lewis, I.; Zwahlen, R.; Baggiolini, M. Neutrophil-activating properties of melanoma growth-stimulatory activity. *J. Exp. Med.* 2000 171,1797–1802.

[PubMed](<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185333>)

44. Patel, Ding, Brown, et al. (2005). Anti-IFN- γ autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *J Immunol* 175: 4769–4776.
45. Patel, Döffinger, Barcenas-Morales and Kumararatne, (2008). Genetically determined susceptibility to mycobacterial infection. *Journal of Clinical Pathology*, 61, 1006-12.
46. Perham, P., (2006), *Inmunología*, 2° ed., Buenos Aires: Médica Panaméricana.
47. Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., et al. (2002). Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 70(2):336-48.
48. Puel et al. (2014). Autoantibodies against cytokines: back to human genetics. *Inmunobiology*.
49. 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.
50. Puel, Picard et al. (2008). Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J Immunol* 180:647–654.
51. Reverberi, R. (2007). 227. *Blood Transfus*, 227-240.
52. Roitt, I. (2008). *Inmunología. Fundamentos*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
53. Rojas-Espinosa, Ó. (2012). *Inmunología (de memoria)* (3ra ed.). México: Medica Panamericana.
54. Rose NR., (2001) *The autoimmune diseases*, 3rd edition. Academic Press, San Diego, CA, USA
55. Ross, M. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos aires: Medica Panamericana.
56. Rossenberg, J., Powles, R., Balar, Necchi, et al. (2016) Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy:

- a single-arm, multicentre, phase 2 trial., *The Lancet*, Volume 387, No. 10031, p 1909-1920.
57. Ruíz MJ. IBT.(2011). Detección y estandarización de ensayos para la evaluación de la actividad biológica de autoanticuerpos anti-quimiocinas y anti-citocinas involucrados en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas en humanos. Tesis de Licenciatura. COBACH. México.
 58. Shoenfeld. (1994). Idiotypic induction of autoimmunity: a new aspect of the idiotypic network. *FASEB J* 8: 1296–1301.
 59. Stenger, R. M. (2011). Fast, Antigen-Saving Multiplex Immunoassay To Determine Levels and Avidity. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, 595–603.
 60. Syed-Hussain. (2014). Adaptation of a commercial ELISA to determine the IgG avidity in sheep experimentally and naturally infected with *Neospora caninum*. *Elsevier*, 21-28.
 61. Tanaka Y, Hori T, Ito K, Fujita T, Ishikawa T, Uchiyama T. Disseminated Mycobacterium avium complex infection in a patient with autoantibody to interferon-gamma. *Intern Med* 2007;46:1005–9.
 62. Vincent, T., Plawewski, M., Goulabchand, R., Guilpain, P., Eliaou, J., (2015). Emerging clinical phenotypes associated with anti-cytokine autoantibodies., *Autoimmunity Reviews* 14 (2015) 528–535, journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev.
 63. Voet, D. (2009). *Fundamentos de Bioquímica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
 64. Winthrop, K.L., Chang, E., Yamashita, S., Iademarco, M.F., y LoBue, P.A. (2009). Nontuberculous Mycobacteria Infections and Anti-Tumor Necrosis Factor- α Therapy. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10), 1556–1561.
 65. Zhang, W.; Sims, G.; Meager, A.; Beeson, D.; Vincent, A.; Willcox, N. Spontaneous production of antiIFN α and antiIL12 autoantibodies by thymoma cells from myasthenia gravis patients suggests autoimmunization in the tumor. *Int. Immunol.* 2003, 15, 903–913. [Google Scholar (http://scholar.google.com/scholar_lookup?

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