



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Técnica de cromatografía de afinidad por columna
para la purificación y análisis de auto-anticuerpos
contra el Factor Estimulante de Colonias de
Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF) humano”.**

TESIS

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

Irving Ivan García Muñoz

Asesora: Dra. Gabriela Barcenás Morales

Coasesora: M. en C. Paulina Cortes Acevedo

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

“Técnica de cromatografía de afinidad por columna para la purificación y análisis de auto-anticuerpos contra el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF) humana”

Que presenta el pasante: Irving Ivan García Muñoz

Con número de cuenta: 311035230 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de abril de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	Dra. Gabriela Bárcenas Morales	
SECRETARIO	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
1er. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	

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

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por haberme permitido desarrollar mis habilidades profesionales.

A todos mis **profesores** que además de transmitirme los conocimientos necesarios para mi desarrollo profesional también compartieron experiencias de vida para formarme como ser humano. A mis **amigos**: Liz, Mariana, Claudia, Monse, Adrián, con los cuales compartí no solo clases sino experiencias de vida.

A la **Dr. Gabriela Barcenas Morales** por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo para llevar a cabo este trabajo de tesis, por brindarme su tiempo, confianza, paciencia y consejos.

Al **Dr. Rainer Doffinger** por apoyar al Laboratorio de Inmunología de la FESC.

Al **jurado asignado**, quienes con sus comentarios, sugerencias y dudas permitieron el enriquecimiento del trabajo.

Quiero agradecer a la **M. en C. Paulina Cortes Acevedo** por brindarme su apoyo desde el comienzo del proyecto. **Pau**, muchísimas gracias por todo tu apoyo y paciencia, por hacernos hecho sentir parte del equipo y porque siempre estuviste dispuesta a regalarnos parte de tu tiempo para apoyarnos a concluir este trabajo. Gracias por tus múltiples consejos y palabras de ánimo.

Al proyecto **PIAPI**, FES-Cuautitlán, UNAM. “Infección e inmunidad” con Clave **PIAPI1642** y **PIAPI1811**.

DEDICATORIAS

Este trabajo lo quiero dedicar a las personas más importantes en mi vida y a quienes les agradezco todo lo que soy:

A ustedes **mamá y papá** que a lo largo de mi vida me han brinda el apoyo necesario para cumplir todas mis metas, este trabajo no solo contiene mi esfuerzo, es el resultado de su esfuerzo diario para guiarme en la vida. Gracias por sus innumerables palabras de aliento y de amor que me dan fuerzas para continuar cumpliendo mis metas. Ustedes son mi ejemplo de esfuerzo y perseverancia, todo lo que soy se los debo a ustedes. Gracias.

A mis **hermanos**. A ti **Miguel** por ser mi ejemplo de superación y por siempre brindarme tu apoyo en todo momento. A ti **Edwin** por soportar mi mal carácter y por todas tus muestras de cariño incondicional.

A mis abuelitos, **Josefina y Miguel** por haber apoyado y contribuido en mi educación. Gracias por siempre darme su apoyo y cariño, a ustedes también les debo mucho de lo que soy hoy en día y nunca tendré forma de agradecerlo.

A **Mariana (mi coma), Liz y Clau** (el orden de los factores no afecta el resultado) porque más que mis amigas, ustedes se han convertido en parte de mi familia. Gracias por haber compartido conmigo una de las etapas más importantes de mi vida, por siempre creer en mí, incluso en los momentos donde ni yo lo hacía, gracias por haberme permitido acompañarlas en los momentos difíciles que han pasado y porque juntos hemos podido salir adelante. Gracias por ser mi equipo y cómplices en los fracasos y las tristezas pero sobre todo en los triunfos y las risas.

Clau, tú mereces un párrafo extra por el simple hecho de haberme soportado tantas horas durante la realización de este trabajo, mil gracias por siempre tenderme tu mano cuando más lo necesito, por ser ese hombro donde descansar, por ser esos oídos siempre dispuestos a escuchar y esas palabras de aliento en los momentos justos. Gracias por siempre alentarme a continuar y superarme a pesar de los malos ratos y por siempre ayudarme a hacerlos más ligeros.

«Una inteligencia sin límites es el mayor tesoro de los hombres.»

CONTENIDO

ÍNDICE DE ESQUEMAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Autoinmunidad e inmunodeficiencias.....	3
1.3. Citocinas	6
1.3.1.Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF)	8
1.4. Auto-anticuerpos y la predisposición a infecciones	10
1.4.1.Auto-anticuerpos contra GM-CSF	12
1.5. Cromatografía por afinidad.....	14
1.6. Afinidad y Aidez	16
1.7. Ensayo luminex o de multi-análisis	18
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos particulares.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Muestras séricas.....	24
5.2. Análisis de la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF en muestras séricas mediante la técnica de ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).....	25
5.3. Técnica de cromatografía por columna de afinidad	26

5.3.1.Preparación del material.....	27
5.3.2.Procedimiento para el acoplamiento de la proteína (citocina GM-CSF)	28
5.3.3.Procedimiento general para la purificación por afinidad	30
5.3.4.Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad.....	32
5.4. Detección de auto-anticuerpos contra el GM-CSF en las diferentes fracciones eluidas de la columna de purificación, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión Luminex	33
5.5. Ensayo de avidéz para el análisis de los auto-anticuerpos anti-GM-CSF mediante la técnica BioPlex en un sistema múltiple de microesferas.....	33
6. RESULTADOS.....	36
6.1. Determinación de auto-anticuerpos contra GM-CSF presentes en muestras séricas humanas.....	36
6.2. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF a partir de muestras séricas humanas mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna	39
6.3. Ensayo de avidéz mediante la técnica Luminex en un sistema múltiple de microesfera.....	50
7. DISCUSIÓN	62
8. CONCLUSIONES	67
9. REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Distribución de inmunodeficiencias primarias por tipo.	4
Esquema 2.	Representación esquemática de las diversas actuaciones de las citocinas: Redundante, Agonista y Pleiotrópica.	7
Esquema 3.	Modelo para la activación, vías de señalización e inactivación del receptor de GM-CSF.	10
Esquema 4.	Alteración de la homeóstasis del surfactante.	13
Esquema 5.	Cromatografía por afinidad.	15
Esquema 6.	Interacción Antígeno-Anticuerpo.	17
Esquema 7.	Inmunoensayo Multiplex.	19
Esquema 8.	Lectura Bio-Plex.	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti-GM-CSF con sus respectivos datos clínicos.	24
Tabla 2.	Detección de la presencia de auto-anticuerpos específicos contra GM-CSF en muestras séricas humanas.	38
Tabla 3.	Valores de Intensidad de fluorescencia e índice de avidéz de las muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos contra el GM-CSF y de los anticuerpos purificados.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de calor.	37
Figura 2.	Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra AA280588.	40
Figura 3.	Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra AK120190.	42
Figura 4.	Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra SK111160.	43
Figura 5.	Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra SB050793.	45
Figura 6.	Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra AF250578.	46
Figura 7.	Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra QA020378.	48
Figura 8.	Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra DG020480.	49
Figura 9.	Ensayo de avidéz de muestras séricas humanas y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de cada uno de ellos.	54
Figura 10.	Ensayo de avidéz de muestras séricas humanas y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de cada una de ellas.	56
Figura 11.	Ensayo de avidéz de muestras séricas originales y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de cada uno de ellos.	57
Figura 12.	Ensayo de avidéz de la muestra sérica DG020480 y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de ésta.	59
Figura 13.	Índice de avidéz de sueros positivos a auto-anticuerpos contra GM-CSF y mezclas de sus purificados.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
Ag	Antígeno
AIRE	Regulador autoinmune
BSA	Albumina sérica bovina
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
C _H	Región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
C _L	Región constante de la cadena ligera de las inmunoglobulinas
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos (por sus siglas en inglés: Granulocyte Colony-Stimulating Factor)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (por sus siglas en inglés: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)
GM-CSFR	Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
HCl	Ácido clorhídrico
IF	Intensidad de fluorescencia
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligramo
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés: major histocompatibility complex)
NaCl	Cloruro de sodio
NaCNBH ₃	Cianoborohidruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NK	Natural Killer cells
PAP	Proteinosis alveolar pulmonar autoinmune
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBS-T	PBS-Tween

pg	Picogramo
rhGM-CSF	GM-CSF humano recombinante
ROS	Especies reactivos de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor estimulante de colonias
V _H	Región variable de la cadena pesada
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
V _L	Región variable de la cadena ligera
α	alfa
β	beta
γ	gama
μL	Microlitro

RESUMEN

La producción de auto-anticuerpos anti-citocinas se han descrito en los últimos años, como una causa importante de susceptibilidad que predispone al individuo a infecciones provocadas por microorganismos patógenos y oportunistas; por ejemplo, la susceptibilidad adquirida a infecciones micobacterianas por la presencia de auto-anticuerpos contra IFN- γ , auto-anticuerpos con capacidad de neutralización contra las citocinas IL-12, IL-17 α , 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*; así mismo, la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF se han involucrado en el desarrollo de proteinosis alveolar pulmonar

Objetivo. Realizar la purificación de auto-anticuerpos contra el GM-CSF presentes en muestras séricas humanas, empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna, para permitir un análisis más confiable de estos auto-anticuerpos, como es la determinación de los valores de índice de avidéz.

Métodos. Se analizaron siete muestras séricas humanas para confirmar la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF, dichos auto-anticuerpos se purificaron mediante la técnica de cromatografía por columna de afinidad, empleando el kit de acoplamiento proteico de micro enlace (*Micro Link protein coupling kit*); se acopló a una columna la citocina humana recombinante GM-CSF (rhGM-CSF), y a otra columna la proteína BSA (como control negativo). La detección de los auto-anticuerpos purificados en las diferentes fracciones eluidas fue confirmada mediante la técnica de Luminex. Posteriormente, con este mismo ensayo se determinaron los valores de índice de avidéz de los auto-anticuerpos presentes en los sueros y en la preparaciones purificadas, utilizando urea 9 M como agente caotrópico.

Resultados. Se confirmó la presencia de auto-anticuerpos anti-GM-CSF en las muestras séricas empleando el ensayo Luminex. La técnica de cromatografía por afinidad permitió la purificación de los auto-anticuerpos de interés, además, el ensayo de Luminex permitió detectar los auto-anticuerpos específicos en los eluidos obtenidos. Cuando se realizó la disminución del pH de 2.8 a 2.0 durante la etapa de elución, algunas de las muestras presentaron un incremento en los valores de IF en los eluidos E8 y E9 lo que indica la liberación de más auto-anticuerpos. Las preparaciones de auto-anticuerpos eluidos a un pH 2.0 presentaron valores de índices de avidéz elevados que aquellos auto-anticuerpos eluidos a un pH menos ácido (pH 2.8); la determinación de los valores de índice de avidéz resultaron ser más precisos empleando los auto-anticuerpos purificados en comparación con los sueros.

Conclusiones. Se logró la purificación de auto-anticuerpos específicos contra GM-CSF presentes en muestras séricas humanas mediante el sistema Luminex, además este ensayo permitió identificar las fracciones positivas a la presencia de dichos auto-anticuerpos. Además, se determinaron los valores de índice de avidéz de los auto-anticuerpos purificados contra GM-CSF, donde fue posible apreciar que los auto-anticuerpos eluidos en condiciones más acidas (pH 2.0) son capaces de generar enlaces más fuertes con la citocina rhGM-CSF, los valores de índice de avidéz calculados a partir de auto-anticuerpos purificados resultaron ser más definidos y consistentes cuando se emplearon las preparaciones purificadas en lugar de las muestras séricas completas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Los microorganismos patógenos han tenido un papel determinante en la historia de la humanidad. Se ha calculado que durante los años de 1348 a 1352, una pandemia de peste bubónica causada por la bacteria *Yersinia pestis* provocó la muerte de más de la mitad de la población en muchos de los países de Europa. Unos doscientos años después, no fueron espadas ni pistolas sino microorganismos importados, llevados por los exploradores a través de los océanos, lo que diezmo a las poblaciones indígenas de América (Carrada, 2001).

En la actualidad, las enfermedades infecciosas son aún la causa directa de muerte más frecuente en el mundo. El ser humano, a lo largo de su modernización ha modificado el ambiente y su forma de vida, de tal forma que cada vez es más sencillo para los microorganismos desplazarse y llegar a poblaciones vulnerables facilitando así la aparición de brotes infecciosos. De igual manera, el abuso y la mala administración de agentes antimicrobianos, así como el uso desmedido de productos químicos en zonas de cultivo, ha producido una influencia selectiva para la supervivencia y persistencia de poblaciones de microorganismos más resistentes así como de vectores más flexibles (Carrada, 2001).

A pesar de los enormes adelantos a lo largo de los años para el control de las enfermedades infecciosas tales como las vacunas y antibióticos de nueva generación, estos padecimientos siguen planteando una gran amenaza para la población de todo el mundo. A nivel mundial el paludismo (causado por el parásito *Plasmodium*) se mantiene como una gran carga, ya que se diagnostican entre 300 y 500 millones de casos por año, por otra parte, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ha continuado su tendencia ascendente con más de 6000 infecciones por día (Contreras-Soto, 2008).

El resurgimiento del cólera provocado por la bacteria *Vibrio cholerae* se ha manifestado en distintas regiones del mundo, la peste ha causado serios estragos en la India, mientras que la fiebre amarilla, transmitida por mosquitos del género *Aedes*, se mantiene como un problema en Kenia, la fiebre del Valle de Rift en Egipto y el

dengue en Centro y Sudamérica, además de las fiebres hemorrágicas como las producidas por los virus Marburg y Ébola han causado verdaderos desastres en muchos países africanos (Contreras-Soto, 2008).

El resultado de la interacción entre un microorganismo y el hospedero se determina tanto por las propiedades del microorganismo infectante como por la respuesta inmunológica del hospedero. El éxito del establecimiento del microorganismo y el posterior desarrollo de una enfermedad depende en gran medida de la capacidad del microorganismo para evadir los diversos mecanismos de defensa, los mecanismos innatos actúan de inmediato (aunque de manera inespecífica) ante la presencia de un microorganismo patógeno aun cuando no hayan estado en contacto previo con él. Mientras que los mecanismos adaptativos requieren de la experiencia de un primer contacto con el patógeno y permiten iniciar una rápida, específica y potente respuesta de defensa cuando el hospedero entra en contacto con el microorganismo por segunda vez (Bellanti, 2016; Rojas, 2015; Male, 2013; Schroeder, 2010).

Un ejemplo de mecanismo de inmunidad adaptativa es la producción de anticuerpos específicos, los cuales juegan un papel sumamente relevante para la defensa del organismo, éstos son glicoproteínas que poseen una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas donde dos son cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Aproximadamente los últimos 110 aminoácidos N-terminales de las cadenas ligeras y pesadas poseen una secuencia muy variable y se les denomina regiones variables, éstas se crean por medio de una compleja serie de eventos de reordenamiento génico. Cada región variable se puede dividir en tres regiones de variabilidad de secuencia, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), y cuatro regiones de secuencia relativamente constante denominadas regiones marco. Las tres CDR de la cadena pesada se combinan con las tres CDR de la cadena ligera para formar el sitio de unión específico al antígeno. Cada CDR consta de aproximadamente 10 aminoácidos. La CDR3 suele ser la más variable de las tres. Por otro lado, las regiones C-terminales de las cadenas ligeras y pesadas forman los dominios constantes (C_L y C_H , respectivamente) y determinan las funciones efectoras del anticuerpo, como por ejemplo, la activación del complemento (Bellanti, 2016; Rojas, 2015; Male, 2013; Schroeder, 2010).

1.2. Autoinmunidad e inmunodeficiencias

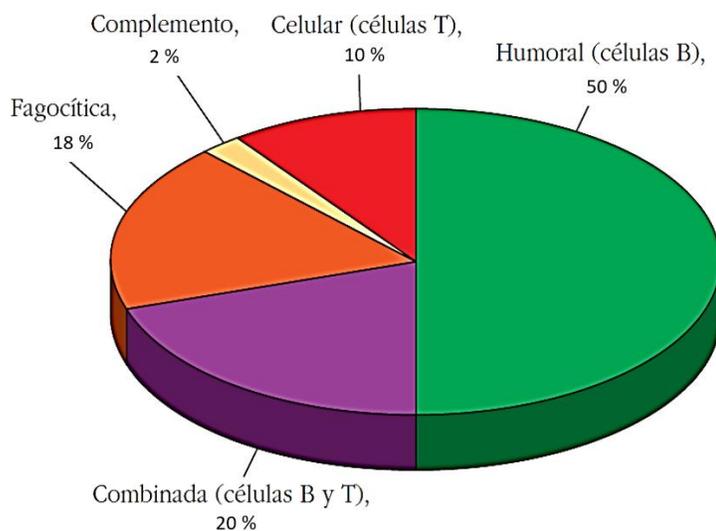
La integridad del sistema inmunitario es fundamental para la protección del individuo contra los microorganismos infecciosos y sus productos tóxicos. Los defectos en uno o más de los componentes del sistema inmunitario pueden conducir a la aparición de trastornos graves que a menudo son mortales, algunos de estos son la autoinmunidad y las inmunodeficiencias, estas últimas pueden ser clasificadas en dos grupos dependiendo la naturaleza de su origen (Abbas, 2015).

Cuando se habla de que un individuo presenta una autoinmunidad, se refiere a la pérdida de la tolerancia inmunológica lo que puede originar una respuesta inmune inadecuada que puede ser de tipo celular y/o humoral contra componentes propios del individuo lo que ocasiona condiciones patológicas. Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una activación de linfocitos T y B autorreactivas que se asocian en algunos casos con la producción de auto-anticuerpos patógenos contra moléculas propias, culminando en inflamación y daño tisular (Torres, 2011; Rojas, 2015; Wang, 2015).

El desarrollo de las enfermedades autoinmunes involucra la pérdida de la tolerancia, y puede deberse a una serie de factores como son la predisposición genética (la principal asociación génica se encuentra con las moléculas del HLA I-II) y factores ambientales tales como la nutrición, el tabaco, la microbiota, fármacos, hormonas (Torres, 2011; Rojas, 2015; Wang, 2015).

No obstante, la predisposición genética por sí misma no es suficiente para desencadenar una respuesta autoinmune, las infecciones virales y bacterianas también pueden intervenir como agentes desencadenantes al crear el microambiente adecuado; las células del tejido infectado liberan citocinas capaces de alertar al sistema inmunitario y estimular la proliferación de clones autorreactivas de linfocitos T. Las enfermedades autoinmunes pueden ser órgano-específicas como la diabetes mellitus tipo 1 o la artritis reumatoide, o también ser órgano-inespecíficas como el lupus eritematoso sistémico (Puel, 2010; Rojas, 2015; Cooper, 2003).

Por otra parte, las inmunodeficiencias se han definido tradicionalmente como defectos en el desarrollo de la respuesta inmune, debido a la inadecuada función de las células involucradas; considerando su etiología, las inmunodeficiencias se dividen en dos grandes grupos: las inmunodeficiencias primarias y las inmunodeficiencias secundarias. Las inmunodeficiencias primarias son enfermedades causadas por defectos genéticos que afectan el desarrollo del sistema inmunitario en sus diferentes niveles y por ende su correcto funcionamiento, mantenimiento y regulación. El resultado, son múltiples fenotipos clínicos que aunque en su mayoría predisponen a la susceptibilidad elevada a las infecciones, también pueden abarcar reacciones alérgicas, inflamatorias y linfoproliferación sin control, entre otros; existiendo diferentes tipos de inmunodeficiencias primarias (**Esquema 1**). Algunos ejemplos de inmunodeficiencias primarias son el síndrome poliendocrino autoinmune tipo I, causado por mutaciones en el gen AIRE que expresa en el timo una proteína que contribuye a la expresión de antígenos periféricos (Puel, 2010; Rojas, 2015; Cooper, 2003).



Esquema 1. Distribución de inmunodeficiencias primarias por tipo. La inmunodeficiencia primaria puede estar presente en procesos innatos (defectos de la fagocitosis, en el sistema del complemento) o presentarse en la respuesta inmune adaptativa (humoral, celular o ambas). De estas categorías, las alteraciones de la inmunidad adaptativa son las más comunes siendo los defectos en anticuerpos la porción más grande (Owen, 2014).

Las inmunodeficiencias primarias se consideran enfermedades raras, no obstante, en la actualidad su frecuencia se estima en 1 de cada 2000 individuos nacidos vivos y su prevalencia en 1 en cada 5000 individuos en la población general. Sólo en los Estados Unidos se calcula que más de medio millón de personas sufren de alguna inmunodeficiencia primaria (Rojas, 2015).

En cuanto a las inmunodeficiencias secundarias, estas son adquiridas e interrumpen el desarrollo o función de un sistema inmunitario que hasta ese momento funcionaba de manera adecuada y pueden ser causadas por diferentes factores:

- Nutrición deficiente
- Enfermedades infecciosas (siendo el VIH el representante de esta causa sin descartar también a bacterias, parásitos y hongos)
- Metástasis de cáncer o leucemia
- Inmunosupresión (posterior a trasplantes de órganos, por ejemplo)
- Quimioterapias o radiación
- Enfermedades crónicas
- Edad avanzada
- Auto-anticuerpos contra citocinas

La insuficiencia en el aporte adecuado de macronutrientes y/o micronutrientes específicos, particularmente zinc, selenio, hierro y las vitaminas antioxidantes, puede acarrear a una deficiencia inmune clínicamente significativa, aumentando la predisposición a infecciones principalmente en los niños. La atrofia linfática es una característica morfológica notoria en la desnutrición. El timo es, en particular, un barómetro sensible en niños pequeños, y la profunda reducción en el peso y el tamaño del órgano da lugar a una timectomía nutricional. Tanto el aumento de la apoptosis de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ inmaduros como la reducción de su proliferación contribuyen a la involución tímica (Male, 2013; Rojas, 2015).

Una amplia variedad de infecciones puede conducir a la inmunosupresión, ya que los microorganismos patógenos a través de numerosos mecanismos son capaces de entorpecer la respuesta inmune del hospedero; por ejemplo, una infección directa de las células que participan en la respuesta inmune (caso típico de la infección por

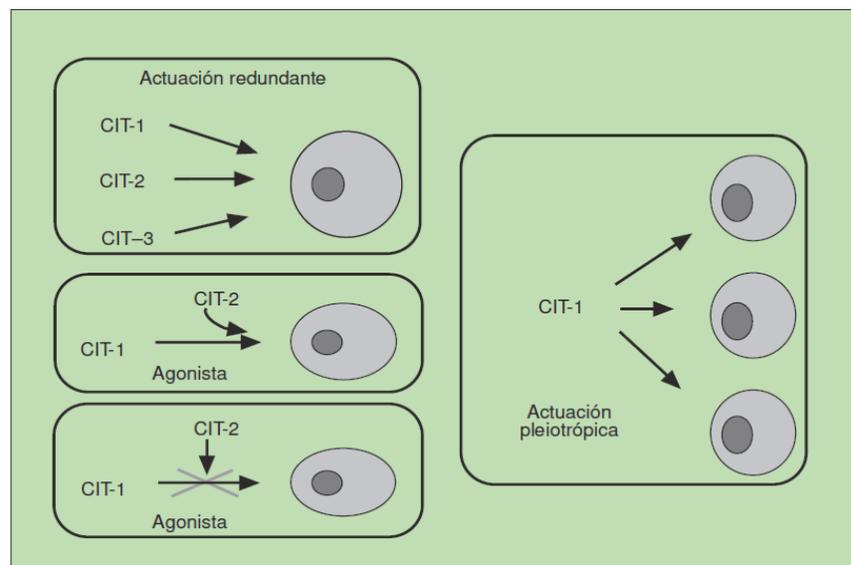
VIH) puede terminar en la destrucción de éstas o en la modificación de su función, las infecciones crónicas por *Mycobacterium tuberculosis* y varios hongos dan lugar, con frecuencia, a una anergia frente a muchos antígenos; así mismo, las infecciones parasitarias crónicas también conducen a la inmunosupresión, por ejemplo, los niños africanos con paludismo crónico tienen una depresión de la función de los linfocitos (Abbas, 2015, Rojas 2015).

En los últimos años los auto-anticuerpos contra citocinas son cada vez más reconocidos como posibles desencadenantes de inmunodeficiencias secundarias y aunque no se ha logrado establecer la causalidad definitiva en todos los casos, éstos auto-anticuerpos, generalmente de tipo IgG, pueden participar en diversas manifestaciones infecciosas y/o inmunológicas dependiendo de la citocina contra la que se dirigen. Si bien, la presencia de éstos anticuerpos no está completamente asociada con la enfermedad, ya que se pueden detectar auto-anticuerpos en la mayoría de las personas sanas y además se ha sugerido que pueden desempeñar un papel en la regulación fisiológica de las actividades biológicas de las citocinas, ya sea por neutralización o quizás prolongando su vida media por la formación de complejos citocina-anticuerpo. Actualmente existen varios estudios que han demostrado que el desarrollo de estos anticuerpos neutralizantes contra algunas citocinas, puede afectar las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, donde finalmente predisponen al hospedador a enfermedades infecciosas (Dinarello, 2003; Winthrop, 2009; Knight, 2016).

1.3. Citocinas

El sistema inmunitario posee una rica organización y se encuentra constituido por un conjunto de diferentes componentes que trabajan de manera coordinada a través de una red sofisticada y compleja de órganos, tejidos, células y moléculas soluble, como las citocinas que son las primeras señales de alarma para atraer al sitio de infección a más leucocitos, y de esta forma controlar y eliminar la invasión de los patógenos (Cedillo, 2015; Pedraza-Alva, 2015).

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas extracelulares, hidrosolubles, con un peso entre 8 y 30 kDa, que se generan por medio de diversos tipos de células en la zona de la lesión y por células del sistema inmunitario. Estos mediadores químicos tienen la capacidad de influir en la actividad, diferenciación, proliferación y supervivencia de las células inmunitarias; además, tienen la capacidad de regular la producción y la actividad de otras citocinas que pueden aumentar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria. Las citocinas componen una compleja red de interacciones que conecta a distintos tipos celulares, en la cual cada una de las citocinas actúa al inducir o suprimir su propia síntesis, la de otras citocinas y/o sus receptores. Se caracterizan por su efecto redundante, ya que acciones similares pueden ser desencadenadas por diferentes citocinas, tienen la capacidad para actuar de manera pleiotrópica sobre diversos tejidos y producir múltiples efectos biológicos además de que pueden actuar como inhibidores de otra citocina (**Esquema 2**) (Barros de Oliveira, 2011; Filella, 2002).



Esquema 2. Representación esquemática de las diversas actuaciones de las citocinas: Redundante, Agonista y Pleiotrópica. Una citocina (CIT) puede ser producida por diferentes tipos de células y ejercer una gran variedad de efectos dificultando su clasificación por medio de su origen o la función biológica que ejercen, por lo que se agrupan en interleucinas (IL, numerada secuencialmente de IL-1 a IL-35), factores de necrosis tumoral (TNFs), quimiocinas (citocinas quimiotácticas o quimioatrayentes), interferones (IFNs) y factores de crecimiento mesenquimal (Barros de Oliveira, 2011; Filella, 2002).

Los receptores de citocinas son clasificados dentro de varios grupos con base a sus similitudes estructurales. Los receptores de citocinas clase I, que incluyen a los receptores para la mayoría de las interleucinas, por ejemplo, la familia de la IL-6 (IL-6, IL-11, la proteína Oncostatina M, el Factor Inhibidor de leucemia, Cardiotrofina 1, G-CSF, IL-12, IL- 23, leptina, Factor Neurotrófico Ciliar) y la familia de la IL-2 (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-17E), son receptores que no poseen actividad enzimática intrínseca, como actividad de cinasa o fosfatasa; mientras que los receptores de la familia del interferón (IFN- α/β , IFN- γ , las interleucinas IL-10, IL-19, IL-20, IL-22) están dentro de la clase II de receptores para citocinas, los cuales poseen un motivo análogo conservado en el dominio extracelular (Valle, 2005; Abbas, 2015).

También se reporta la familia del receptor para el TNF en la cual se encuentran receptores con una estructura de trímeros preformados (algunos de los cuales reconocen ligandos asociados a la membrana y no se consideran receptores para citocinas) con dominios extracelulares conservados ricos en cisteína y mecanismos de transmisión de señales intracelulares, que suelen estimular la expresión génica y en algunos casos inducir la apoptosis. Algunos receptores importantes de esta familia son TNFR TNFR-I y TNFR-II, la proteína CD40, Fas y el receptor para la linfotoxina (Valle, 2005; Abbas, 2015).

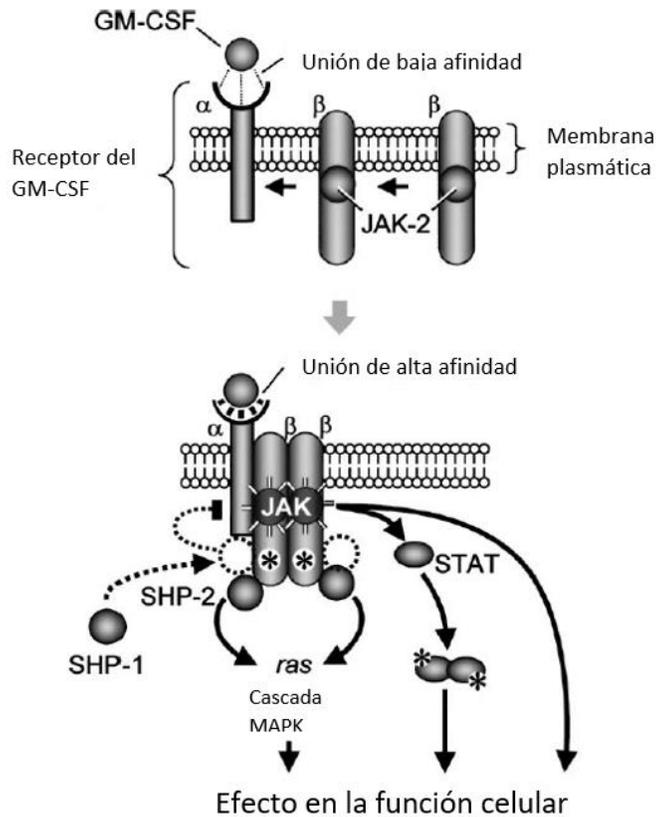
1.3.1. Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF)

El GM-CSF es una citocina pequeña y miembro de la familia de factores estimulantes de colonias (CSF) de los factores de crecimiento hematopoyético que se pliega en una estructura agrupada de cuatro hélices α antiparalelas. Esta citocina puede ser producida por células mieloides, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y células no hematopoyéticas (tales como células endoteliales, condrocitos y células epiteliales alveolares de tipo II).

Entre sus principales funciones se encuentra la diferenciación de células del linaje mieloides, el desarrollo y mantenimiento de macrófagos alveolares pulmonares a través del factor de transcripción PU.1, la maduración convencional de la células

dendríticas y presentación de antígenos, la polarización de los macrófagos M1 (incluyendo la producción de citocinas proinflamatorias, fagocitosis y presentación de antígenos), la activación de neutrófilos (incluyendo fagocitosis, estallido oxidativo y producción de óxido nítrico) y la angiogénesis.

El GM-CSF ejerce sus funciones uniéndose a un receptor heterodimérico (GM-CSFR) que está constituido por una cadena α específica de unión a ligando de baja afinidad (GM-CSFR α) y dos cadenas β transductoras de señales (GM-CSFR β). La unión de la citocina a GM-CSFR α (**Esquema 3**) induce reordenamientos intramoleculares que conducen al ensamblaje progresivo de un complejo de GM-CSFR de señalización de alta afinidad con múltiples sitios de interacción (Wicks, 2015; Knight, 2016). Ninguna de las cadenas del GM-CSFR contiene dominios con actividad catalítica de tirosin-cinasa, sin embargo, la cadena β está asociada constitutivamente a la vía de señalización JAK-2. La unión de GM-CSF a las dos cadenas inicia la autofosforilación de JAK-2 que proporciona sitios de acoplamiento para las proteínas STAT-5 y STAT-3 que inician la señalización JAK-STAT y además la activación de otras vías incluyendo MAPK, PI3K/Akt y NF κ B (Trapnell, 2002; Wicks, 2015).



Esquema 3. Modelo para la activación, vías de señalización, e inactivación del receptor de GM-CSF. Comienza con una unión de baja afinidad a la cadena α del receptor para después unirse en un complejo con las cadenas β , se activan y fosforilan los residuos de tirosina del receptor (asteriscos). Estas regiones fosforiladas se unen a proteínas como las de STAT-5, MAPK y SHP-2, estas últimas tienen efecto antagónico sobre el receptor. Estas vías de señalización tienen como objetivo numerosos genes, resultando en múltiples efectos sobre la función celular (Trapnell, 2002).

1.4. Auto-anticuerpos y la predisposición a infecciones

En los últimos años un número cada vez mayor de estudios han identificado auto-anticuerpos funcionalmente neutralizantes, ya sea hacia citocinas aisladas solas o como parte de patrones anti-citocinas más complejos; comúnmente altos títulos de auto-anticuerpos contra citocinas están asociados con inmunodeficiencia caracterizada por susceptibilidad a diversos patógenos. Así mismo, un papel importante de auto-anticuerpos anti-citocinas en la modulación de las enfermedades autoinflamatorias es cada vez más reconocido. Por lo tanto, la evidencia reciente pone de relieve la importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de auto-anticuerpos contra citocinas, donde altos títulos de estos

auto-anticuerpos neutralizantes causan una amplia variedad de posibles enfermedades infecciosas y/o autoinmunes que amenazan la vida del individuo (Maddur, 2010).

En 2004, Höflich y sus colaboradores reportaron el caso de un paciente en el que aislaron *Burkholderia cocovenenans* de tejido linfoide, *Enterococcus faecalis* de secreciones bronquiales así como algunas especies de *Candida*. Posterior a un tratamiento con antibióticos, el paciente recayó y al realizar estudios se aisló *Mycobacterium chelonae* de aspirado de medula ósea. Uno de los estudios realizados mostró que al estimular la sangre completa del paciente con concanavalina A no había una producción detectable de IFN- γ , sin embargo la teoría de una producción deficiente de IFN- γ fue descartada al observar un estimulación positiva de las células con Acetato de Forbol Miristato y una secreción normal de IFN- γ por parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas del paciente. Los autores reportan la presencia de un auto-anticuerpo, de clase IgG, contra IFN- γ con una gran capacidad neutralizante que resulta en una inmunodeficiencia severa (Höflich, 2004).

El grupo de Baerlecken en 2009 reportó el caso de un paciente que presentaba un título alto de anticuerpos anti-nucleares además de granulomas de células epitelioides en el hígado con niveles elevados de enzimas hepáticas además de una infección por *Mycobacterium avium-intracellulare*. Al analizar el suero del paciente encontraron la presencia de auto-anticuerpos neutralizantes contra el IFN- γ , el cual es producido por los linfocitos Th1 y células NK y es indispensable para el proceso de fagocitosis y muerte intracelular para bacterias intracelulares. Por lo que, una pérdida de IFN- γ y/o un defecto en su receptor puede causar un mayor riesgo de infección con bacterias intracelulares, tales como micobacterias (Baerlecken, 2009).

En 2010, Puel y su grupo de investigación encontraron en pacientes que presentaban el síndrome poliglandular autoinmune tipo I en conjunto con una candidiasis mucocutánea crónica altos títulos de auto-anticuerpos contra interferones tipo-I (como son el IFN- α y el IFN- ω) característicos de dicha autoinmunidad, así como auto-anticuerpos contra IL-17A, IL-17F e IL-22 lo que explicaría la susceptibilidad presentada por los pacientes a la candidiasis pues esta infección es más común en

pacientes inmunodeficientes; además ya se sabe que al menos en el ratón estas citocinas son importantes en la defensa del huésped contra *Candida* (Puel, 2010).

1.4.1. Auto-anticuerpos contra GM-CSF

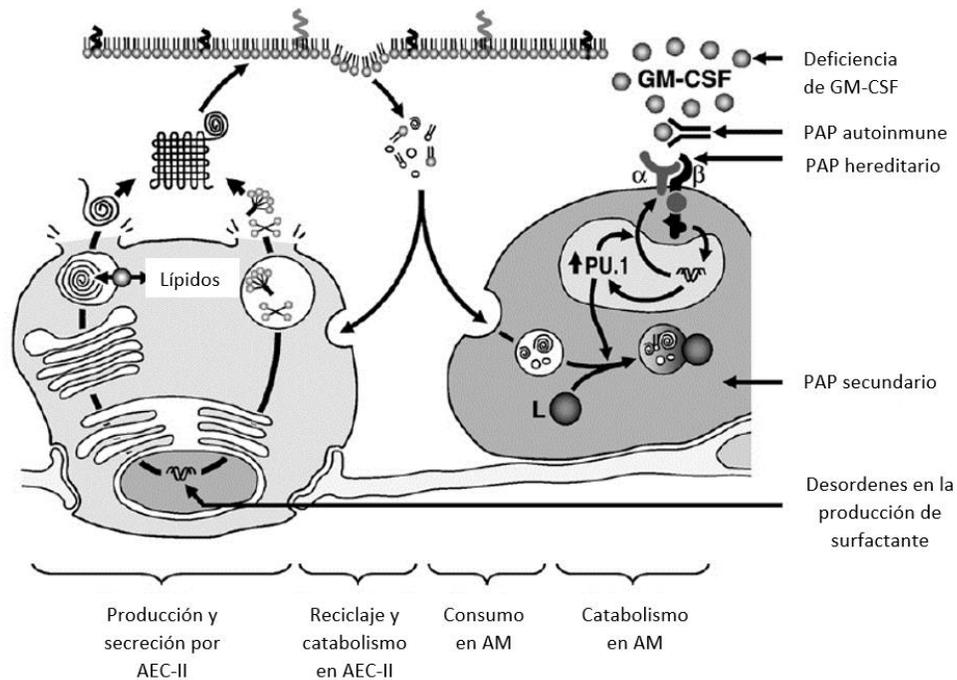
Referente a condiciones clínicas causadas por la presencia de auto-anticuerpos contra el GM-CSF se encuentra la proteinosis alveolar pulmonar autoinmune (PAP), el cual es un síndrome raro que puede ser congénito o adquirido. El PAP se caracteriza por la acumulación de surfactante en los alvéolos pulmonares provocado por la neutralización de auto-anticuerpos contra el GM-CSF resultando en grados variables de insuficiencia respiratoria y disfunción de células mieloides, lo que aumenta el riesgo de infecciones (Carey, 2010; Knight, 2016).

El complejo surfactante está constituido en un 90 % por lípidos, principalmente fosfatidilcolina y en menor cantidad fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, esfingomielina y glucolípidos, mientras que el otro 10 % lo constituyen proteínas hidrofílicas (surfactantes SP-A y SP-D) e hidrofóbicas (SP-C y SP-D). El complejo surfactante es producido y secretado por los neumocitos de tipo II. Una vez secretado, el surfactante crea una película superficial en el epitelio en contacto con el aire. Desde ahí cumple su doble función: estabilizar la superficie pulmonar frente a las fuerzas físicas desarrolladas por la mecánica respiratoria y bloquear el acceso de patógenos a las células epiteliales y, a través de éstas, a los capilares sanguíneos y el resto del organismo (Pérez, 2010; Ernst, 2017).

Desde hace tiempo se reconoce que los pacientes con PAP corren el riesgo de infecciones secundarias con una gran variedad de organismos. Se ha observado que si bien las bacterias comunes responsables de muchas infecciones respiratorias en pacientes comunitarios y hospitalarios, como *Streptococcus spp*, *Klebsiella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* y *Escherichia coli* no predominan en pacientes con PAP autoinmune, si lo hacen los patógenos oportunistas siendo las micobacterias atípicas las más comunes, aunque también se ha descrito infección en el sistema nervioso central por

especies de *Aspergillus* y *Nocardia* en pacientes con esta condición (Seymour, 2002; Juvet, 2008).

Estudios en ratones han demostrado la importancia de niveles adecuados de GM-CSF en el espacio alveolar, los macrófagos alveolares deficientes en GM-CSF tienen una serie de defectos funcionales y mecánicos (**Esquema 4**), incluyendo la alteración de la quimiotaxis, la adhesión, la fagocitosis, la actividad microbicida, la fusión de los fagolisosomas y por ende la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) además de la secreción de citocinas proinflamatorias estimuladas por patógenos; se ha observado también que estos defectos son corregidos por la expresión de GM-CSF en los pulmones de ratones transgénicos. Macrófagos alveolares de ratones con deficiencia de GM-CSF han reducido la expresión de PU.1, un factor "maestro" de transcripción implicado en la diferenciación de macrófagos, lo que demuestra la relación entre el nivel de GM-CSF en los pulmones y el nivel de expresión de PU.1 en los macrófagos alveolares (Carey, 2010).



Esquema 4. Alteración de la homeóstasis del surfactante. El equilibrio se logra mediante la producción moderada de surfactante por parte de las células de epitelio alveolar tipo II (AEC-II) y su catabolismo en AEC-II y macrófagos alveolares (AM). En pacientes con PAP autoinmune la acumulación de surfactante ocurre por la presencia de auto-anticuerpos GM-CSF (Carey, 2010).

En 2013 Rosen y sus colaboradores reportaron la posible relación entre pacientes que presentaban meningitis criptocócica y altos títulos de auto-anticuerpos contra GM-CSF (algunos no presentaban PAP o alguna otra condición de inmunocompromiso). Después de confirmar la presencia de altos títulos de auto-anticuerpos anti-GM-CSF en siete pacientes con meningitis (solo dos de ellos presentaban PAP), evaluaron la fracción IgG de plasma de los siete pacientes y se observó que inhibió la fosforilación de STAT-5 inducida por GM-CSF y bloqueó la expresión de la proteína MIP-1 α inducida también por GM-CSF, demostrando que estos auto-anticuerpos eran biológicamente activos y que eran causantes de una susceptibilidad a una criptococosis. Aunque se sabe que *Cryptococcus* tiene la capacidad de disminuir la producción de GM-CSF en linfocitos T y células NK y por ende disminuir la actividad fagocítica de los macrófagos, el GM-CSF no parece influir directamente en la destrucción de *Cryptococcus* a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC) lo que implica que una actividad defectuosa del macrófago alveolar permite la diseminación y penetración hacia SNC (Rosen, 2013).

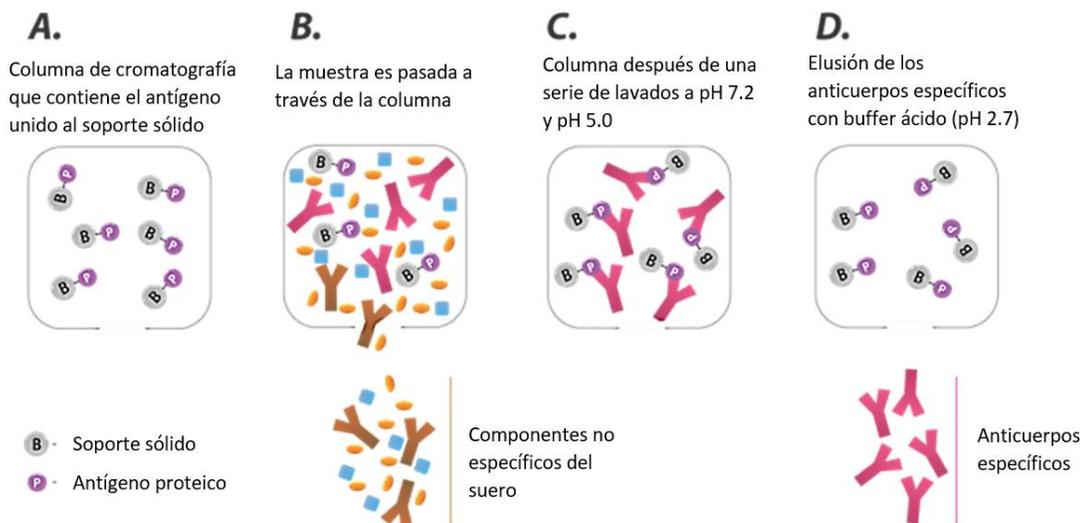
1.5. Cromatografía por afinidad

Seleccionar la metodología apropiada para la purificación de anticuerpos depende siempre del rendimiento y la pureza de los anticuerpos, además de los costos del procedimiento. La eficacia de las purificaciones de afinidad aprovecha los dominios estructurales de los anticuerpos y su capacidad para reconocer específicamente un adsorbente de afinidad, que consiste en un ligando inmovilizado y la matriz a la que está unido el ligando (Huse, 2002).

De acuerdo a la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) la cromatografía de afinidad se define como un tipo de cromatografía líquida que hace uso de una "interacción biológica" para la separación y posterior análisis de analitos específicos dentro de una muestra. Ejemplos de estas interacciones incluyen la unión de una enzima con un inhibidor o de un anticuerpo con un antígeno, siendo el ligando inmovilizado el factor clave que determina el éxito de cualquier método cromatográfico de afinidad. No obstante, también es importante considerar el tipo de soporte al que se inmoviliza el ligando, lo más común es emplear un soporte de carbohidratos como

la agarosa o la celulosa; este tipo de material es fácil de modificar para poder unirse al ligando, se puede usar con diferentes condiciones de elución y posee un porcentaje bajo de unión no específica en muchos compuestos biológico. Sin embargo, como la agarosa y la celulosa tienen una estabilidad mecánica limitada y una eficiencia relativamente baja, se tiende a emplear como alternativa partículas de sílice que son más rígidas, estables y eficientes (Hage, 1999; Hage, 2012).

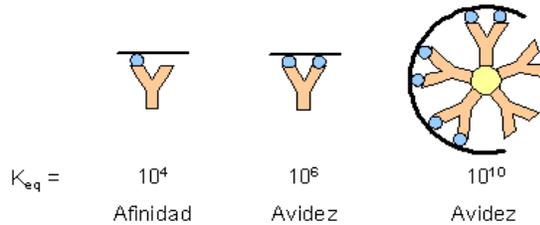
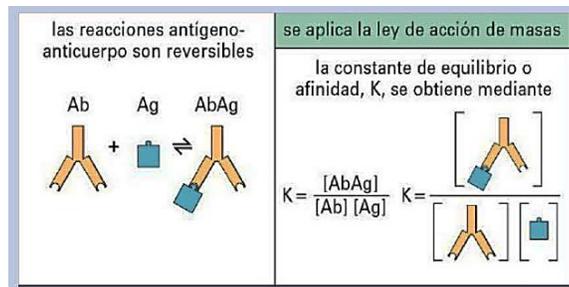
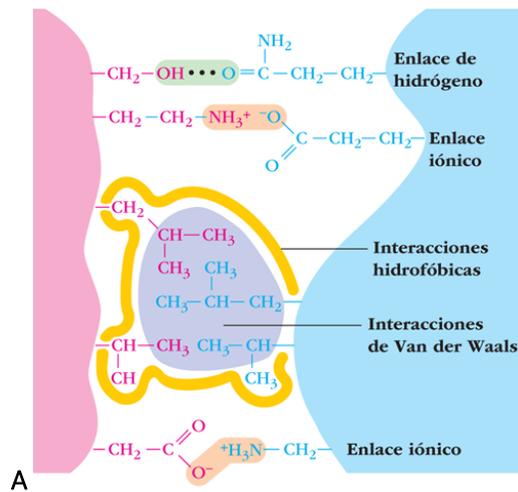
Debido al reconocimiento específico de los anticuerpos, es común emplear la purificación por afinidad con un antígeno inmovilizado como ligando. Este método es ventajoso si se debe obtener un anticuerpo específico a partir de una mezcla de inmunoglobulinas con diferentes especificidades (**Esquema 5**). La purificación de anticuerpos mono-específicos a partir de sueros de animales inmunizados es un ejemplo típico de tal desafío, la elución del anticuerpo retenido se logra a menudo mediante el uso de un cambio en el pH de la fase móvil, aunque también puede emplearse un agente caotrópico o modificador orgánico. La elución por etapas se usa frecuentemente durante el aislamiento de los anticuerpos antes del análisis de estos objetivos por otro método (Huse, 2002; Hage, 2012).



Esquema 5. Cromatografía por afinidad. La purificación de anticuerpos por afinidad implica 4 pasos principales: 1) Acoplar el antígeno a la matriz. 2) La incubación de una muestra cruda con el soporte de afinidad para permitir que la molécula diana en la muestra se una al ligando inmovilizado. 3) Lavar los componentes de muestra no enlazados del soporte. 4) La elución (disociación y recuperación) de la molécula diana del ligando inmovilizado al alterar las condiciones del tampón de modo que ya no se produce la interacción de unión (Magdeldin, 2012; Imagen tomada de <http://www.creative-diagnostics.com/Custom-Antibody-Purification.htm>)

1.6. Afinidad y Avidéz

La afinidad de un anticuerpo es la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas resultantes de la unión entre el paratopo (fragmento de Fab) y su epítipo. La unión antígeno-anticuerpo obedece las reglas de la química, el anticuerpo se une al antígeno usando toda la gama de interacciones no covalentes, los cuales comprenden enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals, con el fin de mantener en estrecha proximidad a las moléculas (**Esquema 6, A**). Este tipo de enlaces permite que la reacción sea reversible, de modo que puede aplicarse al equilibrio la ley de acción de masas y puede determinarse una constante de equilibrio K o constante de asociación (**Esquema 6, B**). Debido a la estructura multivalente de los anticuerpos, se pueden formar múltiples complejos tridimensionales por lo que se generan una gran cantidad de interacciones químicas generando una fuerza de interacción que se denomina avidéz, así por ejemplo, un anticuerpo de tipo IgG podría tener la misma afinidad que un anticuerpo de tipo IgM pero este último tendrá mayor avidéz por su estructura multivalente (Owen, 2014; Male, 2013).



B

Esquema 6. Interacción Antígeno-Anticuerpo. (A) La interacción entre el antígeno y el anticuerpo es el resultado de la formación de múltiples enlaces no covalentes. Estas fuerzas de atracción constan de: enlaces de hidrogeno, enlaces electrostáticos, fuerzas de van der Waals y fuerzas hidrofóbicas. **(B)** Cada enlace es relativamente débil si se compara con los enlaces covalentes, pero juntos pueden generar una interacción de avidéz alta. Por tanto, puede aplicarse la ley de acción de masas y puede calcularse la afinidad del anticuerpo dada por la constante de equilibrio K (Male, 2013; Owen, 2014).

El término avidéz se usa para describir la fuerza general de las interacciones de unión colectivas que ocurren durante unión multivalente. La multivalencia del receptor aumenta mucho la fuerza (avidéz) de la unión del receptor al antígeno. Los anticuerpos han evolucionado para aprovechar esta propiedad al emplear dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede unirse a determinantes individuales sobre antígenos multivalentes, como los que se encuentran sobre superficies bacterianas (Owen, 2014).

1.7. Ensayo luminex o de multi-análisis

El ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex) es un sistema basado en citometría de flujo combinado con un inmunoensayo convencional, emplea como soporte sólido microesferas poliestireno con un diámetro de 5.6 micras; éstas microesferas son clasificadas en regiones las cuales presentan un código de color específico (una proporción diferente de dos fluorocromos) que permite la discriminación e identificación de ensayos individuales, por lo que cada grupo de microesferas se puede conjugar con una molécula de captura diferente y ser mezcladas para ser incubadas con la muestra en un pozo de microplaca de fondo de filtro para reaccionar con analitos específicos. Teóricamente se pueden medir simultáneamente hasta 100 parámetros individuales en una sola etapa del ensayo.

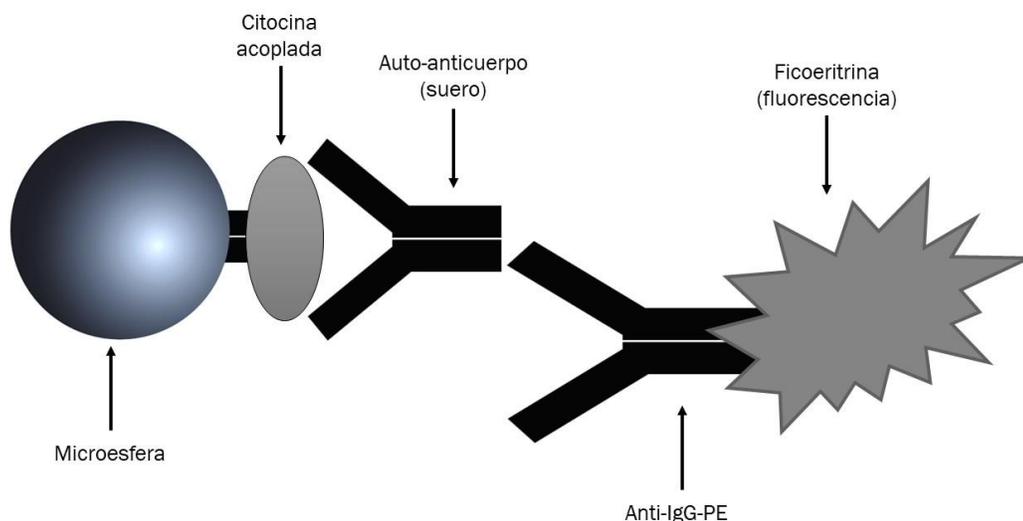
La capacidad que tiene el ensayo de detectar y cuantificar múltiples analitos en la misma muestra le otorga una ventaja comparado con otros inmunoensayos como ELISA o Western Blot, en donde solo se puede analizar un analito a la vez, lo que aumenta la inversión de tiempo y costo en la obtención de resultados. Además, el ensayo de luminex permite el uso de cantidades mínimas de muestra (5-50 μL) con una sensibilidad muy alta (<1 pg/mL).

El sistema de suspensión múltiple se basa en los tres elementos siguientes:

- Microesferas de poliestireno teñidas fluorescentemente, cada una con dirección espectral específica para permitir la discriminación de pruebas individuales dentro de una suspensión múltiple, lo que permite la detección simultánea de una gran variedad de moléculas en un mismo ensayo.

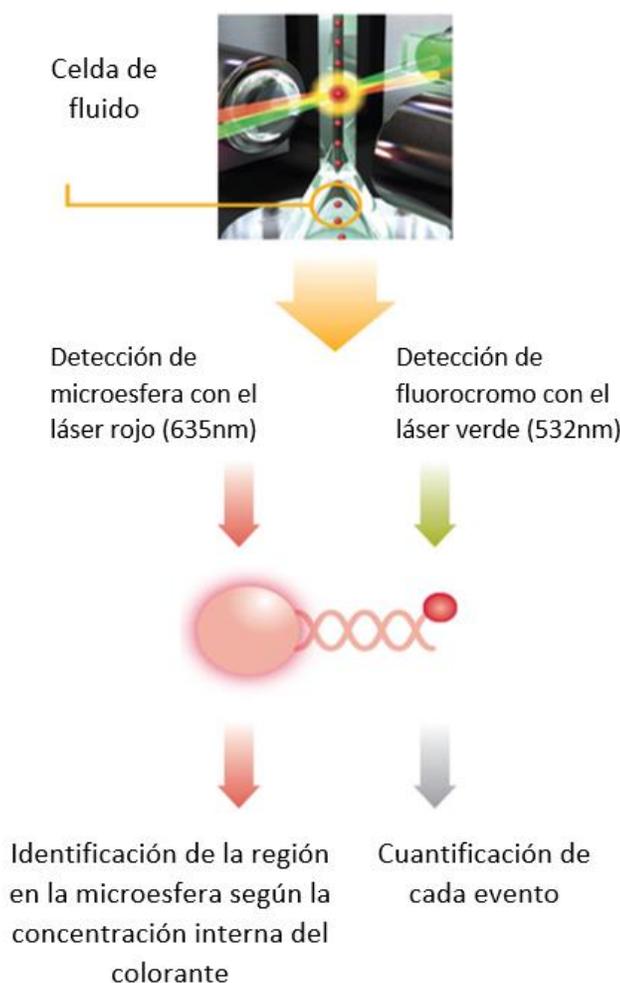
- Un lector de placas basado en citometría de flujo con dos láseres y óptica asociada, un láser excita los colorantes internos que identifican la región de cada microesfera y el segundo láser excita el colorante informador capturado durante el ensayo.
- Un procesador de señales digitales de alta velocidad que gestiona los datos de fluorescencia.

El procedimiento consiste en la activación de las microesferas de poliestireno carboxiladas mediante una reacción carbodiimido, para permitir la unión con los grupos amino del analito, el cual por lo regular es una proteína (antígeno o anticuerpo); por ejemplo, un analito acoplado a las microesferas puede ser una citocina. Las microesferas acopladas reaccionan con la muestra que contiene el biomarcador de interés (anticuerpo contra la citocina). Después de una serie de lavados para eliminar el exceso, un anticuerpo de detección biotinilado se añade para crear un complejo (antígeno-anticuerpo-anticuerpo secundario). El complejo de detección final es evidenciado con la adición del conjugado estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) que sirve como indicador fluorescente (**Esquema 7**).



Esquema 7. Arreglo de inmunoensayo Multiplex. Detección indirecta de auto-anticuerpos en suero contra citocinas específicas (Tomado y modificado de www-bio-rad.com/bio-plex).

La lectura de las reacciones se obtiene utilizando un lector Bio-Plex. Dentro del lector los fluidos alinean las microesferas a través de una celda de flujo en donde dos láseres diferentes las excitan de manera individual. Un láser rojo (635 nm) excita los colorantes de las microesferas, lo que proporciona una identificación específica. Al mismo tiempo, el láser verde (532 nm) excita la ficoeritrina para generar una señal que es detectada por un tubo fotomultiplicador (PMT), el software presenta los datos como Intensidad de fluorescencia (IF) por lo que la concentración relativa del anticuerpo es proporcional a la MFI (**Esquema 8**).



Esquema 8. Lectura Bio-Plex. Determinación de la concentración de analitos basado en citometría de flujo donde un láser (rojo) permite la identificación específica mientras que otro (verde) excita el compuesto fluorescente para establecer una intensidad de fluorescencia media que es proporcional a la concentración del analito (Tomado y modificado de www.merckmillipore.com).

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha logrado evidenciar la importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de altos niveles de auto-anticuerpos contra algunos mediadores químicos, como son las citocinas, afectando el adecuado desarrollo de las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, lo que predispone al hospedador a enfermedades infecciosas causadas por microorganismos oportunistas tales como: hongos, bacterias y virus (Puel, 2008; Maddur, 2010; Browne y Holland, 2010).

Considerando las evidencias que apuntan a la existencia de una correlación entre la presencia de niveles elevados de auto-anticuerpos contra algunas citocinas como la IL-6 y el IFN- γ y la predisposición a infecciones causadas por diversos microorganismos, así como la importancia que tiene el GM-CSF en el espacio alveolar, resulta de interés realizar la purificación de auto-anticuerpos específicos contra esta citocina, utilizando la técnica de cromatografía de afinidad por columna, a partir de muestras séricas positivas a la presencia de dichos auto-anticuerpos, lo cual permitirá realizar en forma más exacta la determinación de los índices de avidéz y evaluar su implicación en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas del tracto respiratorio.

Tomando en cuenta que los auto-anticuerpos anti-citocinas se encuentran presentes en pacientes con infecciones atípicas recurrentes y/o diseminadas, y además, no existen trabajos con respecto a una caracterización más detallada de dichos auto-anticuerpos anti-GM-CSF, el disponer de preparaciones de estos auto-anticuerpos purificados y el análisis de la avidéz, permitirá una mejor caracterización de estos auto-anticuerpos; lo cual puede contribuir a entender mejor la presencia de dichos auto-anticuerpos, y facilitar la atención oportuna de los pacientes que presentan estos problemas para la aplicación de terapias que permitan restablecer el equilibrio de la respuesta inmune y reduzcan la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

3. HIPÓTESIS

La técnica de cromatografía por columna de afinidad permite la purificación de auto-anticuerpos específicos contra GM-CSF presentes en muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes y/o alguna autoinmunidad, lo cual facilita el análisis de la determinación de los índices de avidéz de estos auto-anticuerpos permitiendo una mejor caracterización de éstos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Realizar la purificación de auto-anticuerpos contra el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) presentes en muestras séricas humanas, empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna, para permitir un análisis más confiable del índice de avidéz que presentan dichos auto-anticuerpos.

4.2. Objetivos particulares

- Corroborar la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF en muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas recurrentes y/o algún proceso autoinmune.
- Emplear la técnica de cromatografía de afinidad por columna para la purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF presentes en dichas muestras séricas.
- Identificar las fracciones eluidas positivas a la presencia de auto-anticuerpos específicos contra GM-CSF, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).
- Emplear el agente caotrópico Urea (9 M) en la técnica de sistema múltiple de microesferas Bio-Plex basado en citometría de flujo, para determinar el índice de avidéz de auto-anticuerpos anti-GM-CSF purificados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestras séricas

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

Las muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti-GM-CSF provenían de pacientes con las características clínicas pertenecientes a la susceptibilidad selectiva de inicio tardío a infecciones atípicas o recurrentes causadas por bacterias, virus y hongos; así como de pacientes con enfermedades autoinmunes, dichas muestras séricas fueron enlistadas como se observa en la **Tabla 1**; se usaron además, ocho muestras séricas provenientes de individuos clínicamente sanos como controles negativos.

Tabla 1. Muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos anti-GM-CSF. Las muestras séricas fueron proporcionadas por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.).

Muestra sérica	Observaciones
AA280588	Las muestras séricas son provenientes de pacientes susceptibles a infecciones recurrentes (por virus, bacterias u hongos) y/o procesos autoinmunes tales como proteinosis alveolar pulmonar
AK120190	
SK111160	
SB050793	
AF250578	
QA020378	
DG020480	

5.2. Análisis de la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF en muestras séricas mediante la técnica de ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex)

1. La microplaca de 96 pozos con filtro-BV de 1.2 μm el tamaño del poro, (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) se humedeció agregando 150 μL por pozo de solución de lavado (PBS-T:10 mM PBS pH 7.4, 0.05 % vol/vol Tween 20), después de 2 minutos el líquido se extrajo empleando un sistema de vacío.
2. La suspensión de trabajo de las microesferas acopladas a una citocina en particular se preparó a partir de alícuotas (20 μL), los sistemas de citocinas necesarios para el análisis (incluyendo el control negativo, BSA) se diluyeron en un volumen final de 5 000 μL de solución amortiguadora pre-bloqueadora (10 mM PBS pH 7.4, 1 % BSA, 0.05 % de NaN_3).
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 se removió por medio de filtración a vacío.
4. En los pozos correspondientes se agregaron 50 μL /pozo de cada una de las muestras problema diluidas 1/100 empleando la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1 %, PVA 0.5 %, PVP 0.8 %, NaN_3 0.05 %) como diluyente, así mismo, en los pozos correspondientes se incluyó el control positivo (anticuerpos biotinilados contra GM-CSF) diluido 1/50, y la microplaca se incubó durante 90 min, con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.
5. Se removió el líquido con un sistema de vacío y posteriormente se realizaron tres lavados con 200 μL de PBS-T con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 1-2 minutos entre lavado.
6. A los pozos donde se llevó a cabo la incubación con las muestras séricas se le agregaron 50 μL /pozo del anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina (PE), producido en ratón (Leinco Technologies, Cat. No. I-127) a una dilución de 1/50, y en los pozos donde se utilizaron los anticuerpos anti-GM-CSF biotinilados se agregó la solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (Strep-PE,

R&D Systems, 892525 Lot Num. 308958 y 316378) previamente diluida 1/50, se empleó la solución bloqueadora como diluyente. La microplaca se incubó protegida de la luz durante 60 min a temperatura ambiente con una agitación lenta (500 rpm) empleando un agitador orbital horizontal para microplacas.

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

Nota: Los anticuerpos biotinilados específicos contra el GM-CSF que se utilizaron como controles positivos en este ensayo fueron los siguientes: Human GM-CSF Biotynilated Antibody (1/500), (BioRad, Cat. 47400955).

5.3. Técnica de cromatografía por columna de afinidad

Para la purificación de auto-anticuerpos anti-GM-CSF se empleó la técnica de cromatografía por columna de afinidad utilizando el kit de acoplamiento proteico de microenlace (*Micro Link protein coupling kit*, Thermo Scientific Núm. Cat. 20475). De forma general el procedimiento se describe 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, un paquete contiene fosfato de sodio 0.1 M , Cloruro de sodio 0.15 M, pH 7.2 cuando se reconstituye con 400 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 (NaBH_3CN , mw 62.84): 0.5 mL, disuelto en NaOH 0.01 M.
- e) Solución de lavado (Wash Solution): 25 mL, 1 M NaCl, 0.05 % NaN_3 .
- f) Solución amortiguadora de Elución (Elution Buffer): 50 mL, pH 2.8, contiene aminos primarios.
- g) Tubos de colección para microcentrifuga: Viales con tapa y con una capacidad de 0.5 mL.
- h) Solución amortiguadora de almacenamiento: Se prepararán 100 mL de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS; igual que la solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2) conteniendo 0.05 % de NaN_3 .

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

5.3.1. Preparación del material

Solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2: Se realizó una dilución a partir de una solución stock 10X de la misma a una concentración final de 1X. Para un almacenamiento por largos periodos de la solución amortiguadora filtrar la solución empleando una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μm o añadir azida de sodio a una concentración final de 0.02 % y almacenar a 4 °C.

Proteína de acoplamiento: Se resuspendieron 50 μg de GM-CSF recombinante en 100 μL de solución amortiguadora de acoplamiento, tratando de ajustar a una concentración final de 0.5-1 mg/mL. En el presente estudio se utilizó el producto comercial ImmunoTools, rhGM-CSF (50 μg , Cat. n° 11343125, Lot. 354691), para llevar a cabo la purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF.

5.3.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína (citocina GM-CSF)

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 y suavemente golpear la columna cerca del paquete de la resina varias veces hasta resuspender y luego cuidadosamente se agitó la columna en un vórtex a baja velocidad. Se aseguró que la resina permaneciera húmeda mientras se realizaban los pasos de centrifugación a 1 000 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 siempre a temperatura ambiente antes de comenzar a trabajar (37 °C).
2. Primero se aflojó la tapa superior de la columna y luego se removió el tapón inferior para evitar aspirar aire dentro de ésta. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó a 1 000 g por 60 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, después se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó a 1 000 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 400 µL de la muestra (0.5 µg/mL) directamente en la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló. Para determinar la eficiencia del acoplamiento, se puede reservar una porción de la muestra (3 µL) para ser utilizada como referencia de la cantidad inicial de proteínas.

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

5. En una campana de extracción, se destapó la columna y se añadieron 5 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), agitando el vial cada hora, para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.

Nota: Antes de incubar durante toda la noche se aseguró que la resina se mezclara adecuadamente, por lo que se adicionó una concentración final de 0.05 % de Tween-20 (se agregaron a la columna 0.3 μL de Tween-20 para 400 μL de muestra utilizada), esto ayudó para que la resina fluyera libremente en la columna.

7. Posteriormente, se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó 1 000 rpm por 1 minuto (para colectar el fluido con la proteína no unida). Para determinar la eficacia del acoplamiento, se puede evaluar el fluido pasante con un ensayo de proteínas y comparar con la concentración o la cantidad inicial.
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 una vez más y se puede guardar el fluido pasante para evaluar la eficiencia de acoplamiento.

Nota: Como la reacción fue incubada toda la noche, se invirtió cuidadosamente la columna 10 veces para desalojar cualquier resina restante en la tapa. Se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón.

B) Bloqueo de los sitios activos de unión remanentes.

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

2. Se retiró la tapa de la columna y el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.
3. Se repitieron los pasos 1-2.
4. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 500 μL de solución amortiguadora de enfriamiento directamente a la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló.
5. En una campana de extracción se quitó la tapa de la columna y se adicionaron 10 μL de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se tapó la columna y se mezcló. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos, mezclando cada 15 minutos.
6. Se quitó el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.

Nota: Como la columna se utilizó en forma inmediata fue necesario equilibrarla adicionando 500 μL de solución amortiguadora de acoplamiento y se centrifugó a 1 000 g por 1 minuto, se realizó esto dos veces. Y se continuó con el paso 2 del procedimiento general para la purificación por afinidad.

5.3.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad

C) Formación del complejo unido a la resina.

1. La columna con la resina conteniendo la citocina se equilibró a temperatura ambiente (37 °C).
2. Se removi6 primero la tapa de la columna y después el tap6n. Se coloc6 la columna en un tubo de colecci6n, se centrifug6 y se descart6 el fluido que pas6.
3. Se coloc6 el tap6n a la columna y se adicionaron 500 μL de la muestra s6rica diluida vol/vol en soluci6n amortiguadora de acoplamiento directamente en la resina, se reemplaz6 la tapa y se mezcl6.
4. Se incub6 la reacci6n con un mezclado suave en forma de rotaci6n. Se dej6 incubar la columna durante 2 horas a temperatura ambiente (37 °C), para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.

5. Se 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 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 centrifugó el tubo y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más (Viales: F, G y H).
7. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 500 μ L de solución de amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y gentilmente se invirtió el tubo (columna) 10 veces. Se aflojó la tapa y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido obtenido en el vial, se repitió esta paso una vez más (Viales: I y J).
8. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 μ L de la solución amortiguadora de acoplamiento, en incrementos de 100 μ L, 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 μ L de la solución amortiguadora de Elución a un pH 2.8 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 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 se centrifugó (Vial: E1). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 15 μ L de Tris 1M, pH 9.0.

3. Se repitieron los pasos 1 y 2 seis veces o según sea necesario (mínimo 3 veces) (Viales: E2, E3, E4, E5 E6 y E7).
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 aumento en el volumen empleado, como se indica en los pasos posteriores.
5. Se colocó el tapón a la columna y adicionar 300 μ L de la solución amortiguadora de elución a lo largo de los lados de la columna sobre la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se incubó la columna durante 5 minutos a temperatura ambiente (37 °C).
6. Se destapó la columna y se colocó el tapón. La columna se coloca en un tubo de colección y se centrifugo (Vial: E8). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 18 μ L de Tris 1 M, pH 9.0 (para 500 μ L de volumen de elución).
7. Se repitieron los pasos 5 y 6 según fue necesario (Viales: E9, E10, E11 y E12).
8. Se regeneró la resina tan pronto como fue posible después de la elución mediante el lavado una vez con 300 μ L de Buffer de acoplamiento conteniendo azida de sodio al 0.02 %. Se almaceno la columna a 4 °C.
9. Finalmente, a cada fracción de eluido (12 fracciones) se le agregaron 30 μ L de una solución de BSA al 4.5 %; y se conservaron en refrigeración hasta el análisis.

5.3.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad

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

1. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 500 μ L de la solución de lavado. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.

2. Se tapó la parte inferior de la columna y se 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.
3. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 400 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.

5.4. Detección de auto-anticuerpos contra el GM-CSF en las diferentes fracciones eluidas de la columna de purificación, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión Luminex

Se llevó a cabo la misma metodología descrita anteriormente (**punto 5.2**) del presente trabajo utilizando como muestras el suero original y pre-columna, ambos a una dilución final de 1/100 así como, la muestra sérica post-columna y las diferentes fracciones obtenidas de la purificación, empleado una dilución 1/50; todas las muestras se trabajaron por duplicado.

5.5. Ensayo de avidéz para el análisis de los auto-anticuerpos anti-GM-CSF mediante la técnica BioPlex en un sistema múltiple de microesferas

Las muestras séricas y las fracciones eluidas individuales o mezclas de ellas, que resultaron ser positivas en estudios anteriores a la presencia de altos niveles de auto-anticuerpos contra el GM-CSF se utilizaron para este ensayo de avidéz basado en una técnica descrita por Rachel M. Stenger. Por lo tanto, para las muestras séricas positivas a auto-anticuerpos contra GM-CSF se emplearon las diluciones de 1/50 y 1/100 (Stenger, 2011).

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

1. La microplaca de 96 pozos con filtro-BV de 1.2 μm el tamaño del poro, (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) se humedeció agregando 150 μL por pozo de solución de lavado

(PBS-T: 10 mM PBS pH 7.4, 0.05 % vol/vol Tween 20), después de 2 minutos el líquido se extrajo empleando un sistema de vacío.

2. La suspensión de trabajo de las microesferas acopladas a una citocina en particular se preparó a partir de alícuotas (20 μ L), los sistemas de citocinas necesarios para el análisis (incluyendo el control negativo, microesfera-BSA) se diluyeron en un volumen final de 5 000 μ L de solución amortiguadora pre-bloqueadora (10 mM PBS pH 7.4, 1 % BSA, 0.05 % de NaN_3).
3. Posteriormente 50 μ L de la suspensión de trabajo de las microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex) se agregaron a cada pozo, y el líquido fue removido por medio de filtración a vacío.
4. En los pozos correspondientes se agregaron 50 μ L/pozo de cada una de las muestras problemas (suero o anticuerpos purificados) y el anticuerpo anti-GM-CSF biotinilado como control positivo. Las muestra séricas fueron diluidas 1/50 y 1/100, cada dilución se trabajó por duplicado empleando la solución bloqueadora (10 Mm PBS pH 7.4, BSA 1 %, PVA 0.5 %, PVP 0.8 %, NaN_3 0.05 %) como diluyente y la microplaca se incubó por 90 min con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.
5. Posteriormente se removió el líquido con un sistema de vacío y se adicionaron 200 μ L de urea 9 M preparada en PBS-T (10 mM PBS pH 7.4, 0.05 % vol/vol Tween 20) a los pozos correspondientes, y al resto se les agregó 200 μ L de PBS-T, las microplacas se incubaron por 10 min, con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente.
6. De la microplaca se removió el líquido con un sistema de vacío y posteriormente se realizaron una serie de tres lavados con 200 μ L de PBS-T con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 1 minuto entre cada lavado.
7. En los pozos con las muestras séricas se agregaron 50 μ L/pozo del anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina (PE) (Leinco Technologies, Cat. No. I-127) a una dilución de 1/50, y en los pozos donde se utilizaron los

anticuerpos anti-GM-CSF biotinilados se agregó la solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (Strep-PE, R&D Systems, 892525 Lot Num. 308958 y 316378) previamente diluida 1/50, empleando la solución bloqueadora como diluyente. La microplaca se incubó protegida de la luz durante 60 min a temperatura ambiente con una agitación lenta (500 rpm) empleando un agitador orbital horizontal para microplacas.

8. Se removió el líquido y se repitió la serie de tres lavados con 200 µL de PBS-T.
9. Finalmente se adicionaron 150 µL/pozo de PBS-T, se agitaron las microplacas en un agitador orbital (500 rpm) durante 2-3 minutos para resuspender las microesferas. Se colocó la microplaca en el lector Luminex 100 para realizar el análisis correspondiente (software BP manager V 5.0).

El índice de avidéz (%) de los auto-anticuerpos anti GM-CSF del isotipo IgG se calculó de la siguiente manera:

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

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de auto-anticuerpos contra GM-CSF presentes en muestras séricas humanas

Se trabajaron siete muestras séricas humanas positivas a auto-anticuerpos contra el GM-CSF y ocho controles de pacientes clínicamente sanos, la confirmación de la presencia de dichos auto-anticuerpos se realizó mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple, empleando dos sistemas de microesferas (GM-CSF y BSA), los resultados se presentan en la **Figura 1** que corresponde al mapa de calor de los valores de intensidad de fluorescencia (IF) (**Tabla 2**) obtenidos en estas muestras séricas; en donde el programa *Multiple Experiment Viewer* reporta los valores de IF empleando una escala de colores, el gradiente de negro a azul representa los valores bajos ($< 5\ 000$), de verde a naranja los valores intermedios ($\geq 5\ 000$ y $< 15\ 000$) y rojo los valores altos ($\geq 15\ 000$). El **Panel A** corresponde a las siete muestras de suero positivos, mientras que el **Panel B** representa los resultados obtenidos de los controles sanos. En todas las muestras séricas humanas se confirmó la presencia de auto-anticuerpos anti-GM-CSF ya que resultaron tener valores de IF considerables, las siete muestras presentaron valores altos (mayores a 15 000), así como, el control positivo (anticuerpo anti-GM-CSF) empleado como referencia; mientras que todas las muestras que correspondientes a las muestras negativas (individuos clínicamente sanos) presentaron valores de IF bajos. Ambos tipos de muestras séricas resultaron ser negativas con el sistema microesfera-BSA (control negativo del ensayo).

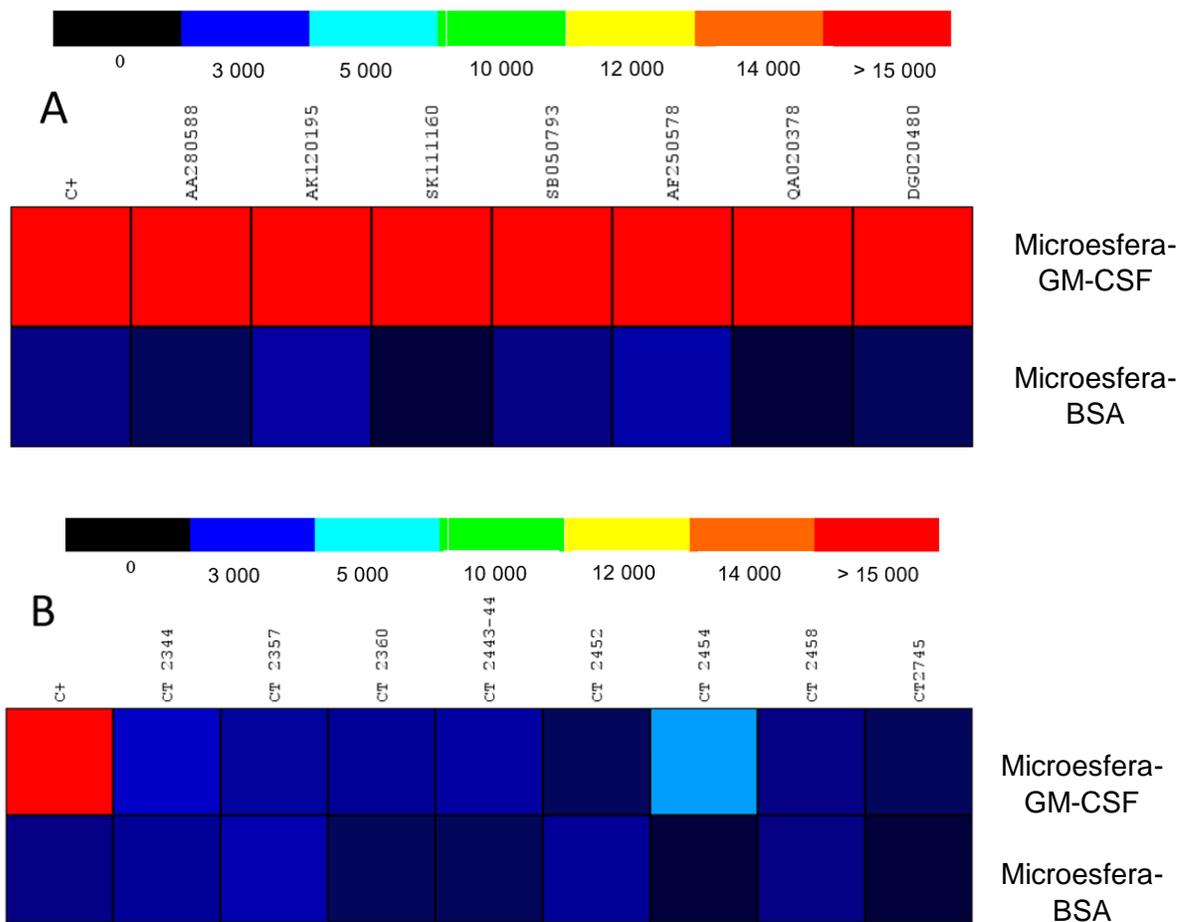


Figura 1. Mapa de calor de los valores de intensidad de fluorescencia de muestras séricas humanas. Se evaluaron siete sueros humanos positivos a auto-anticuerpos contra GM-CSF y ocho sueros como controles negativos (individuos clínicamente sanos); los valores de la intensidad de fluorescencia (IF) se obtuvieron mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple empleando los sistemas de microesferas-GM-CSF y -BSA. Se empleó el programa *Multiple Experiment Viewer* que reporta los valores de IF empleando una escala de colores, el gradiente de negro a azul representa los valores bajos (< 5 000), de verde a naranja los valores intermedios ($\geq 5\ 000$ y < 15 000) y de rojo los valores altos ($\geq 15\ 000$). El **Panel A** representa los valores de IF de las muestras positivas, todas con un valor mayor a 15 000; mientras que el **Panel B** muestra los valores correspondientes a los individuos clínicamente sanos. Se empleó de referencia un anticuerpo anti-GM-CSF humano biotinilado como control positivo (C+).

Tabla 2. Detección de la presencia de auto-anticuerpos específicos contra GM-CSF en muestras séricas humanas. Se reportan los valores de intensidad de fluorescencia (IF) obtenidos de cada una de las muestras séricas humanas trabajadas, se incluye también los valores de IF de los individuos clínicamente sanos utilizados como control negativo (CT) además del valor del control positivo (anticuerpo anti-GM-CSF biotinilado) usado como referencia.

Código de la muestra sérica	Valor de IF
Control positivo +	24 469.3
AA280588	24 844.8
AK120190	15 254.8
SK111160	26 656.5
SB050793	21 263.5
AF250578	24 600.8
QA020378	27 323.3
DG020480	24 767.3
CT 2344	1 092.0
CT 2357	445.5
CT 2360	213.7
CT 2443-44	322.5
CT 2452	83.5
CT 2454	3 991.8
CT 2458	172.5
CT 2745	63.5

6.2. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF a partir de muestras séricas humanas mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna

Se obtuvo la purificación de siete muestras séricas positivas a auto-anticuerpos contra GM-CSF. Una vez realizado el proceso de purificación, se evaluó la eficiencia de la técnica y se identificó la presencia de anticuerpos anti-GM-CSF en las diferentes fracciones, empleando el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex) para el sistema de microesfera-GM-CSF, incluyéndose como control negativo el sistema de microesfera-BSA. Una vez purificados los anticuerpos se realizaron mezclas de las fracciones positivas a la presencia de éstos para su posterior análisis.

En la **Figura 2** se observan los resultados de la técnica de purificación de auto-anticuerpos contra el GM-CSF a partir de la muestra sérica (AA280588) positiva a la presencia de éstos. Las barras de color rosa corresponden a los niveles de IF obtenidos en la muestra de suero original y pre-columna, ambas a una dilución final de 1/100, así como de la muestra post-columna con una dilución 1/50, se pueden observar valores de IF altos en las primeras dos, lo que demuestra niveles considerables de auto-anticuerpos; las muestras que corresponden a los lavados realizados a la columna acoplada con rhGM-CSF, no presentan valores de IF, lo que indica que la mayoría de los auto-anticuerpos presentes en la muestra sérica se unieron a la citocina (GM-CSF) inmovilizada a la columna; las barras de color azul representan los eluidos obtenidos, como se puede observar, el pH ácido del buffer de elución provoca la ruptura del enlace antígeno-anticuerpo y favorece la liberación de los anticuerpos retenidos en la columna.

Por otra parte, las barras de color verde corresponden a la columna que está acoplada con BSA y que se empleó como control negativo, se puede observar que en la fracción del suero post-columna y en las primeras fracciones de lavado presentan valores de IF considerables, lo que indica la presencia de los auto-anticuerpos anti-GM-CSF y que no fueron retenidos en dicha columna debido a que no se unieron de forma inespecífica a una proteína ajena como es la BSA.

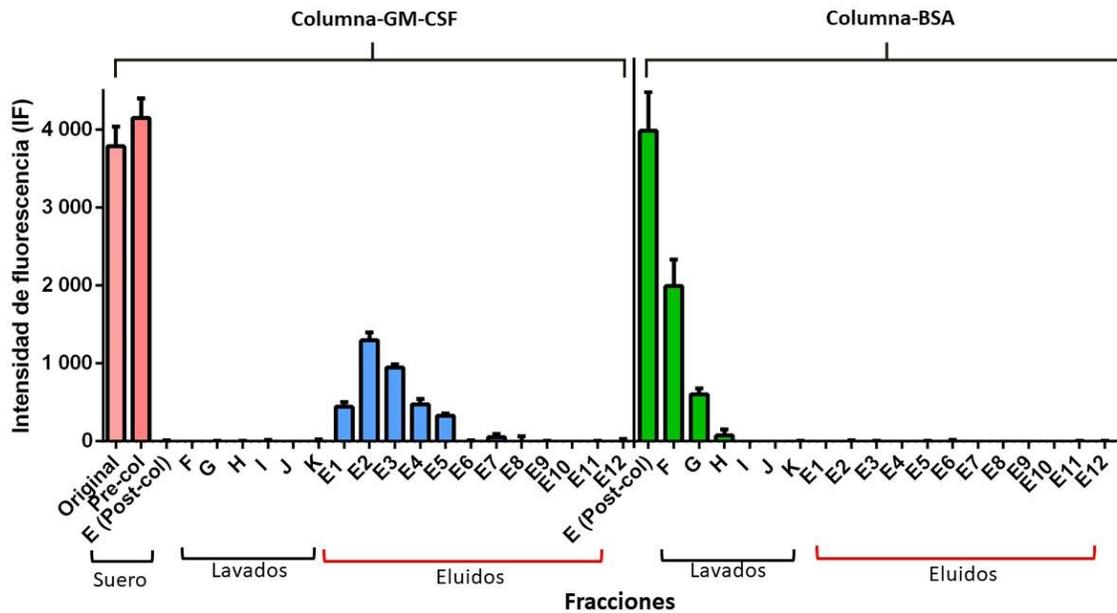


Figura 2. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra sérica AA280588. Valores promedio de intensidad de fluorescencia (IF) de la muestra AA280588, así como de las fracciones de elución y lavado que resultaron del proceso de purificación, dichos valores fueron obtenidos mediante el ensayo Luminex. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la columna acoplada con GM-CSF, donde las barras color rosa corresponden a la muestra sérica original, pre-columna y post-columna; las barras azules representan las fracciones obtenidas de la elución de esta columna. Mientras que en el lado derecho se muestran los resultados de la columna acoplada con BSA, donde las barras verdes corresponden a la muestra sérica post-columna y a las fracciones de los lavados y eluidos. La muestra de suero original y pre-columna se trabajaron a una dilución final de 1/100, mientras que para todas las fracciones obtenidas se empleó una dilución de 1/50.

Con respecto a la parte de elución, en las fracciones E1 a E7 de la columna con GM-CSF, donde se pretende que el enlace antígeno-anticuerpo se rompa debido al uso del buffer de elución con un pH ácido (pH 2.8), se observa que los primeros eluidos (E1 a E5) muestran niveles considerables de IF, teniendo un pico máximo en el eluido E2, y disminuyendo en los eluidos sucesivos. Sin embargo, en el caso de esta muestra, se observó que el cambio a un pH más ácido (pH 2.0) no muestra mayor eficacia al romper la unión del complejo antígeno-anticuerpo (eluidos E8-E12); por otra parte, la unión específica de los auto-anticuerpos contra GM-CSF queda confirmada al apreciar que los eluidos obtenidos de la columna de BSA fueron negativos debido a que nunca se presentó la unión del auto-anticuerpo a la proteína BSA.

La **Figura 3** corresponde al análisis realizado al suero positivo AK120190 y las fracciones obtenidas después de la purificación de auto-anticuerpos anti-GM-CSF a partir de éste. Se puede observar un comportamiento similar al del suero anterior, teniendo un pico máximo de elución en la fracción E2, sin embargo, el cambio a un pH más ácido (pH 2.0) permitió la elución de una porción extra de este auto-anticuerpo pudiéndose notar en un ligero aumento en los niveles de IF en el eluido E8 en comparación con E7.

En la **Figura 4** se observa el resultado después de analizar las fracciones resultantes de la purificación del suero SK111160 mediante la técnica de Luminex; los valores de IF obtenidos son considerablemente más elevados en comparación a las dos muestras séricas anteriores, tanto en los valores de IF del suero original, pre-columna y post-columna, como en los eluidos obtenidos; se aprecian niveles altos de IF en los eluidos E1 hasta E7 presentando un punto máximo de elución en la fracción E4, si bien el cambio de pH no tiene efecto alguno en la ruptura del enlace antígeno-anticuerpo debido a que no ocurrió un incremento en los valores de IF entre los eluidos E7 y E8, se puede apreciar que en el caso de éste suero la eficacia en la purificación de auto-anticuerpos fue mayor ya que se observan niveles de IF muy cercanos a los detectados en la muestra de suero original.

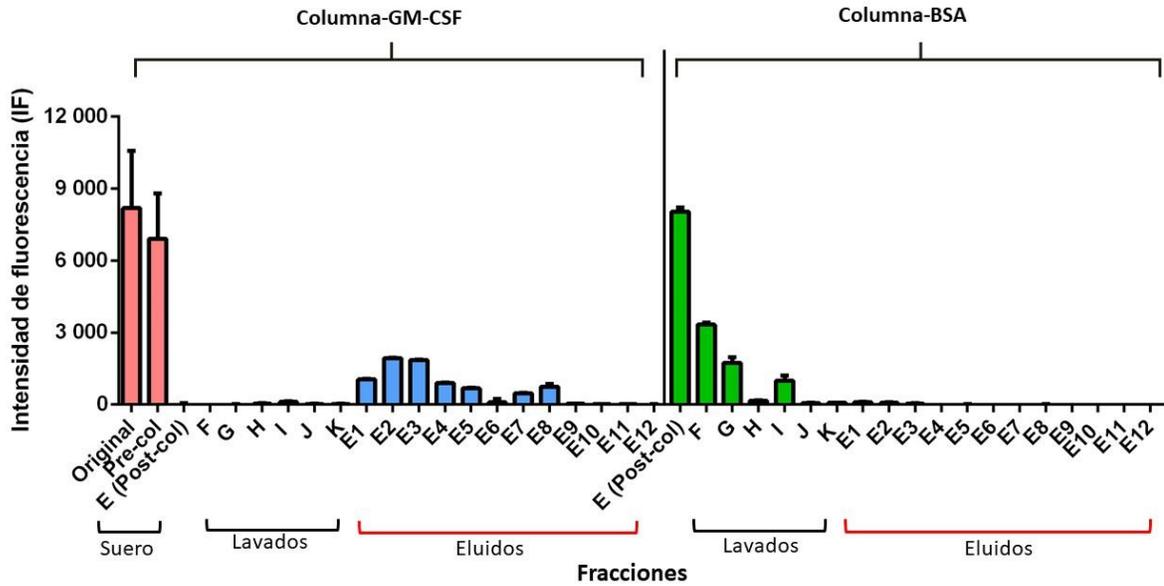


Figura 3. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra AK120190. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de la muestra AK120190, así como de las fracciones de elución y lavado que resultaron del proceso de purificación, éstos valores fueron obtenidos mediante el ensayo Luminex. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la columna acoplada con GM-CSF, donde las barras color rosa corresponden a la muestra sérica original, pre-columna y post-columna; las barras azules representan las fracciones obtenidas de la elución de esta columna. Mientras que en el lado derecho se muestran los resultados de la columna acoplada con BSA, donde las barras verdes corresponden a la muestra sérica post-columna y a las fracciones de los lavados y eluidos. La muestra de suero original y pre-columna se trabajaron a una dilución final de 1/100, mientras que para todas las fracciones obtenidas se empleó una dilución de 1/50.

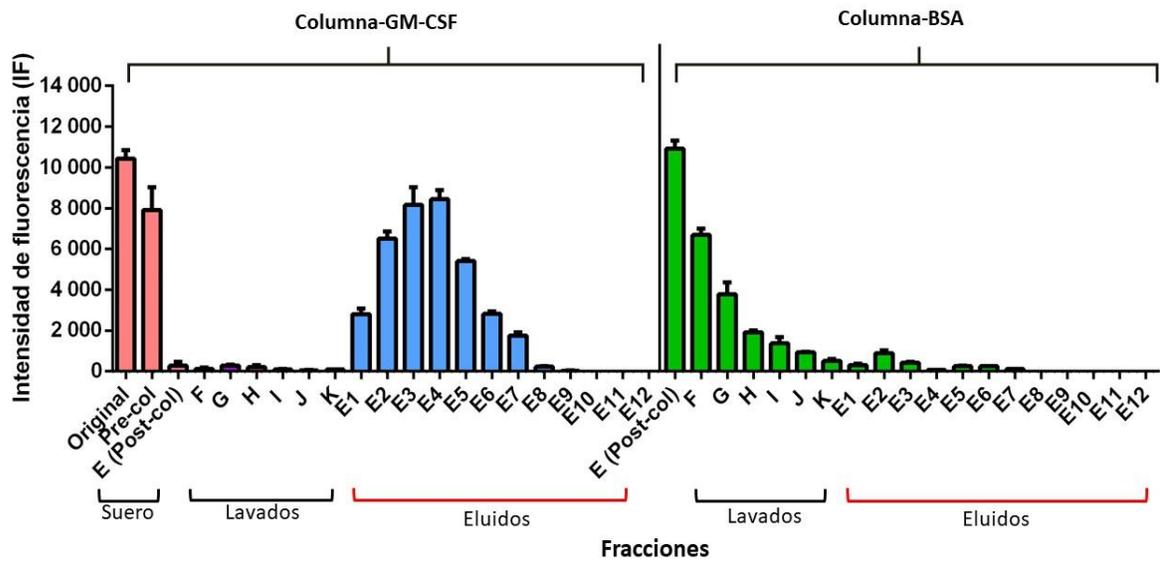


Figura 4. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra SK111160. Valores promedios de intensidad de fluorescencia de la muestra SK111160, así como de las fracciones de elución y lavado que resultaron del proceso de purificación, dichos valores fueron obtenidos mediante el ensayo Luminex. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la columna acoplada con GM-CSF, donde las barras color rosa corresponden a la muestra sérica original, pre-columna y post-columna; las barras de color morado representan los lavados realizados a la columna, las barras azules representan las fracciones obtenidas de la elución de esta columna. Mientras que en el lado derecho se muestran los resultados de la columna acoplada con BSA, donde las barras verdes corresponden a la muestra sérica post-columna y a las fracciones de los lavados y eluidos. La muestra de suero original y pre-columna se trabajaron a una dilución final de 1/100, mientras que para todas las fracciones obtenidas se empleó una dilución de 1/50.

La **Figura 5** representa los valores obtenidos al realizar el análisis de las fracciones obtenidas después de realizar el proceso de purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF en el suero SB050793, que es una muestra que también presentaba niveles altos de dichos auto-anticuerpos. Al igual que las muestras anteriores, los niveles altos de IF en las fracciones de suero original y pre-columna confirman la presencia de los auto-anticuerpos, así como la retención de los mismos en la columna ya que los niveles de IF en la fracción post-columna y las fracciones de lavados (de la F a la K) son prácticamente negativos. Las barras azules, que representan los eluidos, muestran niveles de IF desde el eluido E1 hasta el E9 teniendo un pico máximo en el eluido E2, en ésta muestra se logra apreciar un pequeño efecto en el cambio de pH pues el valor de IF en el eluido E8 se ve ligeramente incrementado a comparación del eluido E7. El comportamiento de las barras verdes (columna-BSA) indica la inexistencia del enlace antígeno-anticuerpo, ya que la gran mayoría de los auto-anticuerpos fueron detectados en la muestra post-columna así como en los primeros lavados (F, G y H).

En la **Figura 6** se observan los resultados obtenidos después de analizar las fracciones obtenidas de la purificación de auto-anticuerpos contra el GM-CSF a partir de la muestra sérica AF250578; se confirma la presencia de dichos auto-anticuerpos así como su retención en la columna-hGM-CSF debido a que la muestra original y pre-columna presentan niveles altos de IF mientras que en la muestra post-columna y las fracciones de lavado los valores de IF descienden notablemente. Las fracciones de elución presentan niveles de IF considerablemente altos desde el eluido E1 hasta el E10, teniendo un valor de IF máximo en el eluido E2 cercano a la de la muestra pre-columna; con esta muestra sérica se logra apreciar un incremento en los valores de IF en las fracciones eluidas E8 y E9 (en comparación con la fracción E7) cuando ocurre el cambio de pH (de 2.8 a 2.0), debido a la liberación de los anticuerpos que se mantenían retenidos en la columna; en cuanto a la columna acoplada con BSA se puede observar también que en la muestra post-columna se obtienen valores de IF altos, indicando que los auto-anticuerpos no se unen a la BSA, disminuyendo dichos valores en las fracciones correspondientes a los lavados hasta el eluido E3.

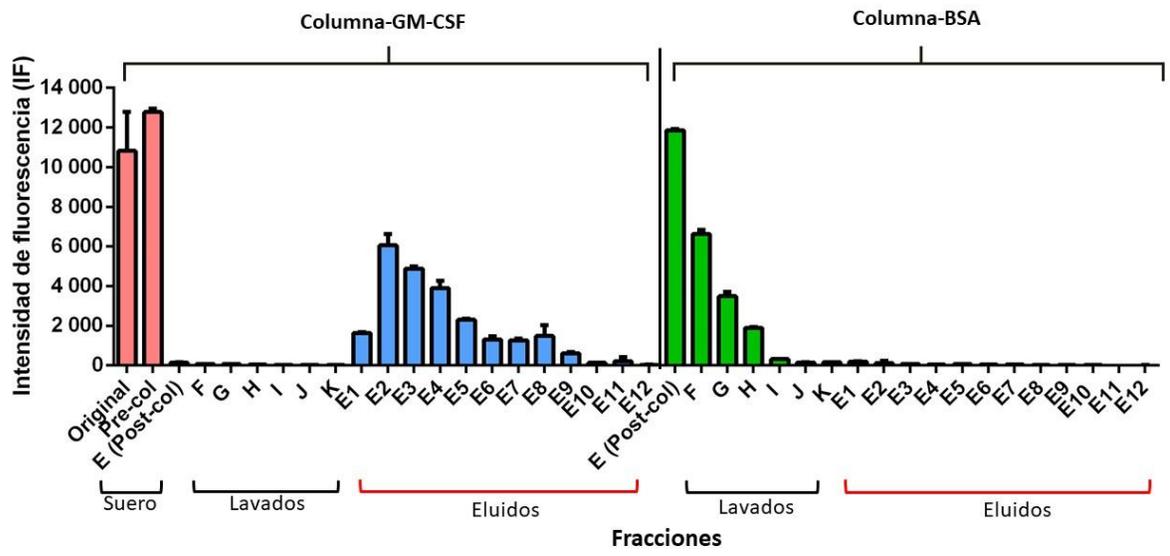


Figura 5. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra SB050793. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de la muestra SB050793, así como de las fracciones de elución y lavado que resultaron del proceso de purificación, estos valores fueron obtenidos mediante el ensayo Luminex. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la columna acoplada con GM-CSF, donde las barras color rosa corresponden a la muestra sérica original, pre-columna y post-columna; las barras azules representan las fracciones obtenidas de la elución de esta columna. Mientras que en el lado derecho se muestran los resultados de la columna acoplada con BSA, donde las barras verdes corresponden a la muestra sérica post-columna y a las fracciones de los lavados y eluidos. La muestra de suero original y pre-columna se trabajaron a una dilución final de 1/100, mientras que para todas las fracciones obtenidas se empleó una dilución de 1/50.

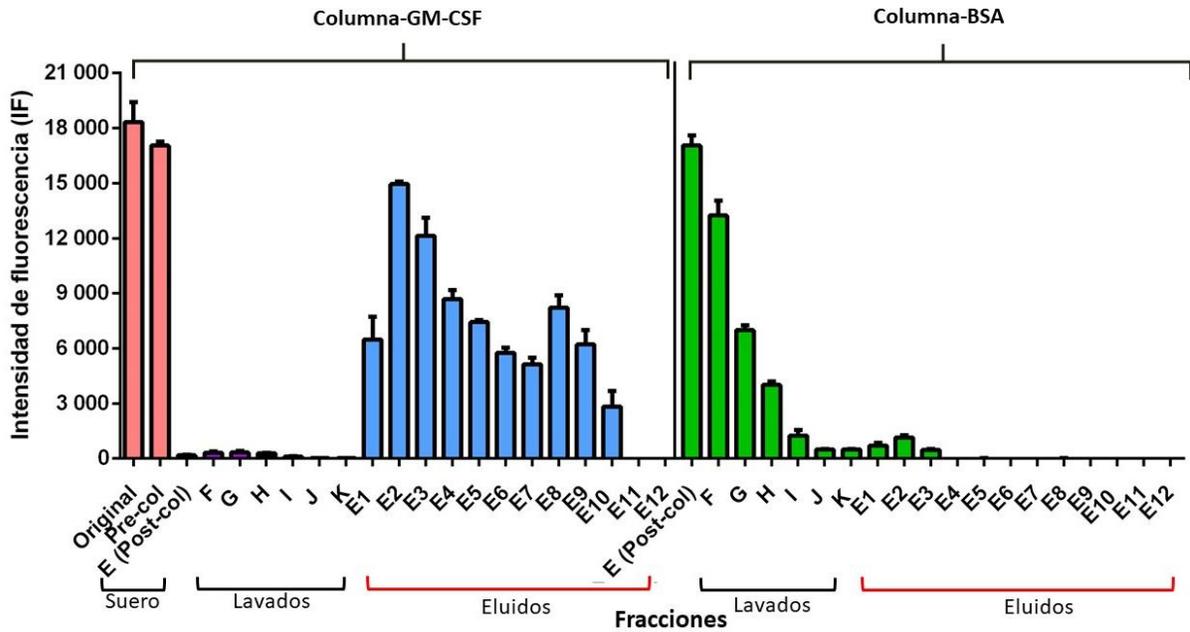


Figura 6. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra AF250578. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de la muestra AF250578, así como de las fracciones de elución y lavado que resultaron del proceso de purificación, dichos valores se obtuvieron mediante el ensayo Luminex. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la columna acoplada con GM-CSF, donde las barras color rosa corresponden a la muestra sérica original, pre-columna y post-columna; las barras azules representan las fracciones obtenidas de la elución de esta columna. Mientras que en el lado derecho se muestran los resultados de la columna acoplada con BSA, donde las barras verdes corresponden a la muestra sérica post-columna y a las fracciones de los lavados y eluidos. La muestra de suero original y pre-columna se trabajaron a una dilución final de 1/100, mientras que para todas las fracciones obtenidas se empleó una dilución de 1/50.

La **Figura 7** corresponde al análisis realizado al suero QA020378 y a las fracciones obtenidas a partir del proceso de purificación de los auto-anticuerpos contra GM-CSF. Tanto la muestra de suero original como la muestra de pre-columna presentan niveles altos de IF lo que confirma la presencia de los auto-anticuerpos, mientras que la formación específica del enlace antígeno-anticuerpo de los mismos se aprecia debido a la disminución en los valores de IF en las fracciones de post-columna y las fracciones de lavado; esta muestra sérica presenta un punto máximo de elución en las fracciones E2 y E3 y va disminuyendo hasta el eluido E10. En este suero también es posible notar el efecto que provoca el cambio de pH a uno más ácido (eluido E8) ya que se logra distinguir un incremento notorio en el valor de IF, lo que indica que hubo una mayor ruptura de enlaces y por ende la liberación de los auto-anticuerpos que seguían retenidos en la columna. Con respecto a la columna-BSA se observa que los auto-anticuerpos anti-GM-CSF no se retuvieron en dicha columna ya que la muestra post-columna presenta valores de IF altos al igual que en las primeras fracciones de lavado, y no presentando valores de IF considerables en los eluidos.

La **Figura 8** muestra la evaluación de las diferentes fracciones obtenidas de la purificación del suero DG020480, el cual presenta los niveles más altos de auto-anticuerpos contra el GM-CSF; la evaluación se realizó por medio de técnica de Luminex con el fin de obtener los niveles de IF en cada una de las fracciones, a pesar de que la gran mayoría de éstos se logró inmovilizar en la columna-rhGM-CSF, se observa un valor de IF considerable en la muestra sérica después de pasarla a través de la columna (E Post-col), tal vez debido a una posible saturación de dicha columna (barras rosa). Así mismo, se puede notar también está saturación en la liberación del exceso de auto-anticuerpos en las tres primeras fracciones de los lavados (F a H, barras moradas). Considerando los niveles altos de auto-anticuerpos de ésta muestra sérica, se obtuvieron valores de IF en casi todas las fracciones eluidas (de E1 a E11), presentando un pico máximo de elución en las fracciones E2 y E3. Así mismo, la columna acoplada con BSA presenta valores de IF desde el primero lavado (F) hasta el eluido E3, debido a los niveles altos de autoanticuerpos presentes en esta muestra sérica; sin embargo, una vez que se eliminaron todos los auto-anticuerpos de la columna, las fracciones siguientes resultaron ser negativas.

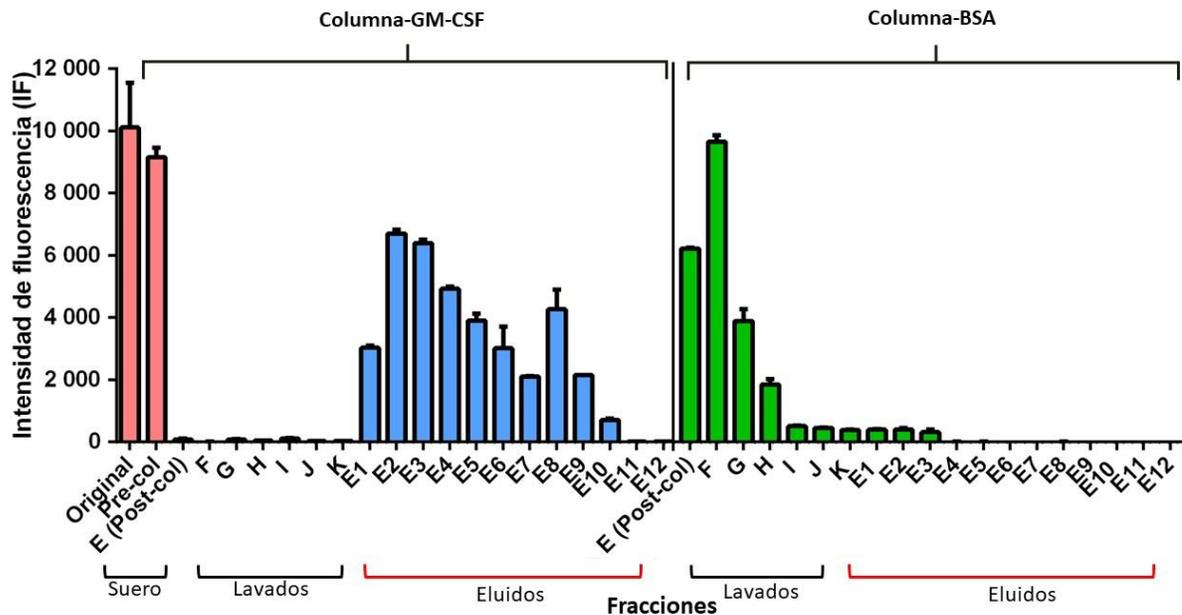
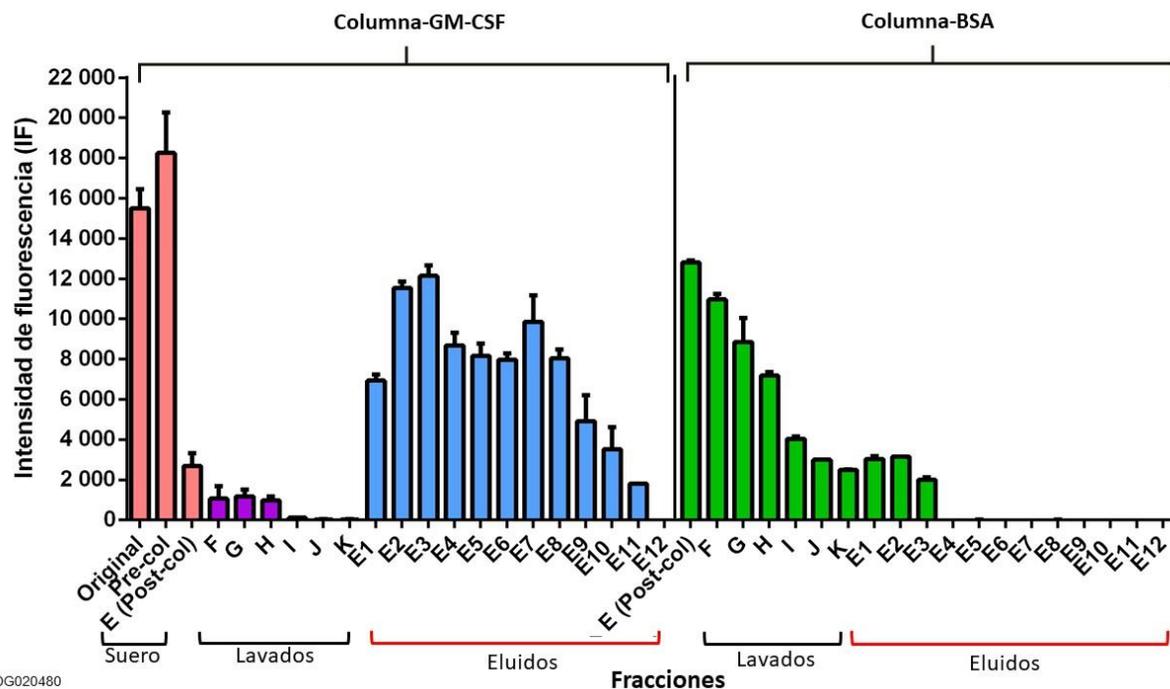


Figura 7. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra QA020378. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de la muestra QA020378, así como de las fracciones de elución y lavado resultadas del proceso de purificación, dichos valores fueron obtenidos mediante el ensayo Luminex. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la columna acoplada con GM-CSF, donde las barras color rosa corresponden a la muestra sérica original, pre-columna y post-columna; las barras azules representan las fracciones obtenidas de la elución de esta columna. Mientras que en el lado derecho se muestran los resultados de la columna acoplada con BSA, donde las barras verdes corresponden a la muestra sérica post-columna y a las fracciones de los lavados y eluidos. La muestra de suero original y pre-columna se trabajaron a una dilución final de 1/100, mientras que para todas las fracciones obtenidas se empleó una dilución de 1/50.



DG020480

Figura 8. Purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF de la muestra DG020480. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de la muestra DG020480, así como de las fracciones de elución y lavado resultadas del proceso de purificación, dichos valores fueron obtenidos mediante el ensayo Luminex. En el lado izquierdo se muestran los resultados de la columna acoplada con GM-CSF, donde las barras color rosa corresponden a la muestra sérica original, pre-columna y post-columna; las barras de color morado representan los lavados realizados a la columna, las barras azules representan las fracciones obtenidas de la elución de esta columna. Mientras que en el lado derecho se muestran los resultados de la columna acoplada con BSA, donde las barras verdes corresponden a la muestra sérica post-columna y a las fracciones de los lavados y eluidos. La muestra de suero original y pre-columna se trabajaron a una dilución final de 1/100, mientras que para todas las fracciones obtenidas se empleó una dilución de 1/50.

6.3. Ensayo de avidéz mediante la técnica Luminex en un sistema múltiple de microesfera.

El ensayo de avidéz se realizó empleando una solución de Urea 9 M como agente caotrópico, esta concentración se eligió considerando reportes de estudios de avidéz realizados anteriormente (Stenger, 2011).

El índice de avidéz (%) de los auto-anticuerpos anti GM-CSF del isotipo IgG se calculó de la siguiente manera:

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

En la **Tabla 3** se reportan los valores de IF obtenidos después del tratamiento con o sin urea de las muestras séricas originales positivas a auto-anticuerpos contra GM-CSF, así como de las preparaciones de anticuerpos purificados correspondientes, es decir, las mezclas de las fracciones positivas, se emplearon dos diluciones diferentes de todas las muestras; así mismo, se reportan los valores correspondientes al índice de avidéz obtenido para cada muestra de suero original y para las diferentes preparaciones de auto-anticuerpos purificados; así mismo se observó que el tratamiento con la urea disminuyó los valores de IF en todas las muestras, obteniéndose valores similares independientemente de la dilución empleada.

En la **Figura 9** se grafican los valores de IF obtenidos después del tratamiento con una solución de urea 9 M de los sueros AA280588 y AK120190, así como, de las diferentes preparaciones de auto-anticuerpos purificados, empleando dos diluciones diferentes (1/50 y 1/100) para todas las muestras analizadas. El **Panel A** corresponde a la muestra de suero (AA280588) original, así como a su correspondiente mezcla de fracciones (de la E-1 a la E-4), donde se puede observar una disminución en los valores de IF cuando se trataron con la solución de urea 9 M, debido a que ésta fue capaz de romper el enlace generado entre los auto-anticuerpos y la citocina acoplada

a la microesfera. En el **Panel B** se grafican los niveles de IF obtenidos después del tratamiento del suero AK120190 y de las mezclas de auto-anticuerpos obtenidas de éste después de su purificación, los valores de IF obtenidos después del tratamiento con urea se observan ligeramente disminuidos en la muestra sérica y en mezcla de los eluidos (del E-1 al E-5) en comparación con la muestra sin urea, por lo que se puede apreciar el efecto causado por la urea al romper los enlaces antígeno-anticuerpo, lo cual no se observa en el eluido E-8.

Tabla 3. Valores de Intensidad de fluorescencia e índice de avidéz de las muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos contra el GM-CSF y de los anticuerpos purificados. Para el ensayo de avidéz se emplearon dos diluciones diferentes trabajadas por duplicado y el índice de avidéz de cada suero y preparación se calculó tomando en cuenta el valor de IF obtenido después de realizar el ensayo mediante la técnica de Luminex.

Muestra	Fracción analizada	Dilución	Valor de Intensidad de Fluorescencia ±DS		Índice de avidéz (%)
			Sin Urea	Tratamiento con Urea 9 M	
AA280588	Suero completo	1/50	3 391.3±300	2 813±155	82.95
		1/100	3 001±300	2 875.5±243	95.82
	Mezcla de las fracciones eluidas de la E1 al E4	1/50	1 255.5±163	472.3±10	37.62
		1/100	1 091±33	411.5±28	37.72
AK120190	Suero completo	1/50	7 013.3±121	6 731±400	95.97
		1/100	6 136.5±529	5 230±400	85.23
	Mezcla de las fracciones eluidas de la E1 al E5	1/50	2 009.5±125	1 138±34	56.63
		1/100	817.3±300	544.3±63	66.60
	Fracción E8	1/50	411.3±29	407.5±91	99.08
		1/100	578.3±205	468.5±100	81.01
SK111160	Suero completo	1/50	8 450.8±700	7 072.5±819	83.16
		1/100	7 595.5±689	5 727.5±165	75.41
	Mezcla de las fracciones eluidas de la E1 al E7	1/50	3 905.8±306	2 875±171	73.61
		1/100	2 649.8±230	1 517.8±51	57.28
SB050793	Suero completo	1/50	8 180.3±506	7 460±600	91.19
		1/100	7 432.8±600	6 629.8±600	89.20
	Mezcla de las fracciones eluidas de la E2 al E5	1/50	4 094±170	1 888.8±300	46.14
		1/100	2 604±288	2 047.3±4419	78.62
	Mezcla de las fracciones eluidas E6 y E7	1/50	1 217.3±176	759.3±31	62.38
		1/100	705.5±187	422±61	59.82
	Mezcla de las fracciones eluidas E8 y E9	1/50	1 126.5±370	963.5±146	85.52
		1/100	572±28	540.5±23	94.49

Tabla 3. Valores de Intensidad de fluorescencia e índice de avidéz de las muestras séricas positivas a la presencia de auto-anticuerpos contra el GM-CSF y de los anticuerpos purificados (continuación)

Muestra	Fracción analizada	Dilución	Sin Urea	Tratamiento con Urea 9 M	Índice de avidéz (%)	
AF250578	Suero completo	1/50	24 729.8±139	24 489.5±713	99.03	
		1/100	24 572±20	22 203±20	90.36	
	Fracción E1	1/50	5 135±300	3 277±332	63.82	
		1/100	4 075±200	2 022±250	49.62	
	Mezcla de las fracciones eluidas E2 y E3	1/50	11 137±216	9 786.8±350	87.88	
		1/100	10 752.5±300	10 317±300	95.95	
	Mezcla de las fracciones eluidas de la E4 al E7	1/50	7 918±60	5 789±4	73.11	
		1/100	5 338±60	4 386±50	82.17	
	Mezcla de las fracciones eluidas E8 y E9	1/50	7 421±60	6 321±60	85.18	
		1/100	4 550.3±58	4 010.5±50	88.14	
	Fracción E10	1/50	1 958±253	1 222.3±239	62.43	
		1/100	1 850±200	817±200	44.16	
	QA020378	Suero completo	1/50	13631.5±1713	9 256±338	69.37
			1/100	11 424.8±13	8 880.8±666	77.73
Fracción E1		1/50	2 789±100	1 221.5±100	43.80	
		1/100	1 991±293	1 021.8±176	51.32	
Mezcla de las fracciones eluidas de la E2 al E4		1/50	6 176.5±400	4 216.3±490	68.26	
		1/100	4 930±150	3 181±150	62.49	
Mezcla de las fracciones eluidas de la E5 al E7		1/50	4 054±706	2 427±300	59.87	
		1/100	1 907.3±158	1 137±100	59.61	
Mezcla de las fracciones eluidas E8 y E9		1/50	3 486±600	3 228±717	92.60	
		1/100	2 378.3±104	2 344±154	98.56	
DG020480	Suero completo	1/50	2 3761±500	18 809.5±500	79.16	
		1/100	22 699.5±700	21 051.5±719	92.74	
	Fracción E1	1/50	5 970.5±600	4 536.5±724	75.98	
		1/100	5 692±300	2 995±100	52.62	
	Mezcla de las fracciones eluidas de la E2 al E6	1/50	10 611.8±1458	9 913.3±2047	93.42	
		1/100	11 877±700	11 419.5±700	96.15	
	Fracción E7	1/50	7 233.8±419	5 637.3±923	77.93	
		1/100	8 303.3±1000	5 043.5±1000	60.73	
	Fracción E8	1/50	6 906±21	6 684±20	96.79	
		1/100	6 769±500	5 209.5±500	76.96	
	Mezcla de las fracciones eluidas E9 y E10	1/50	1 959.8±164	1 849.5±100	94.37	
		1/100	1 120±100	882.5±100	78.79	

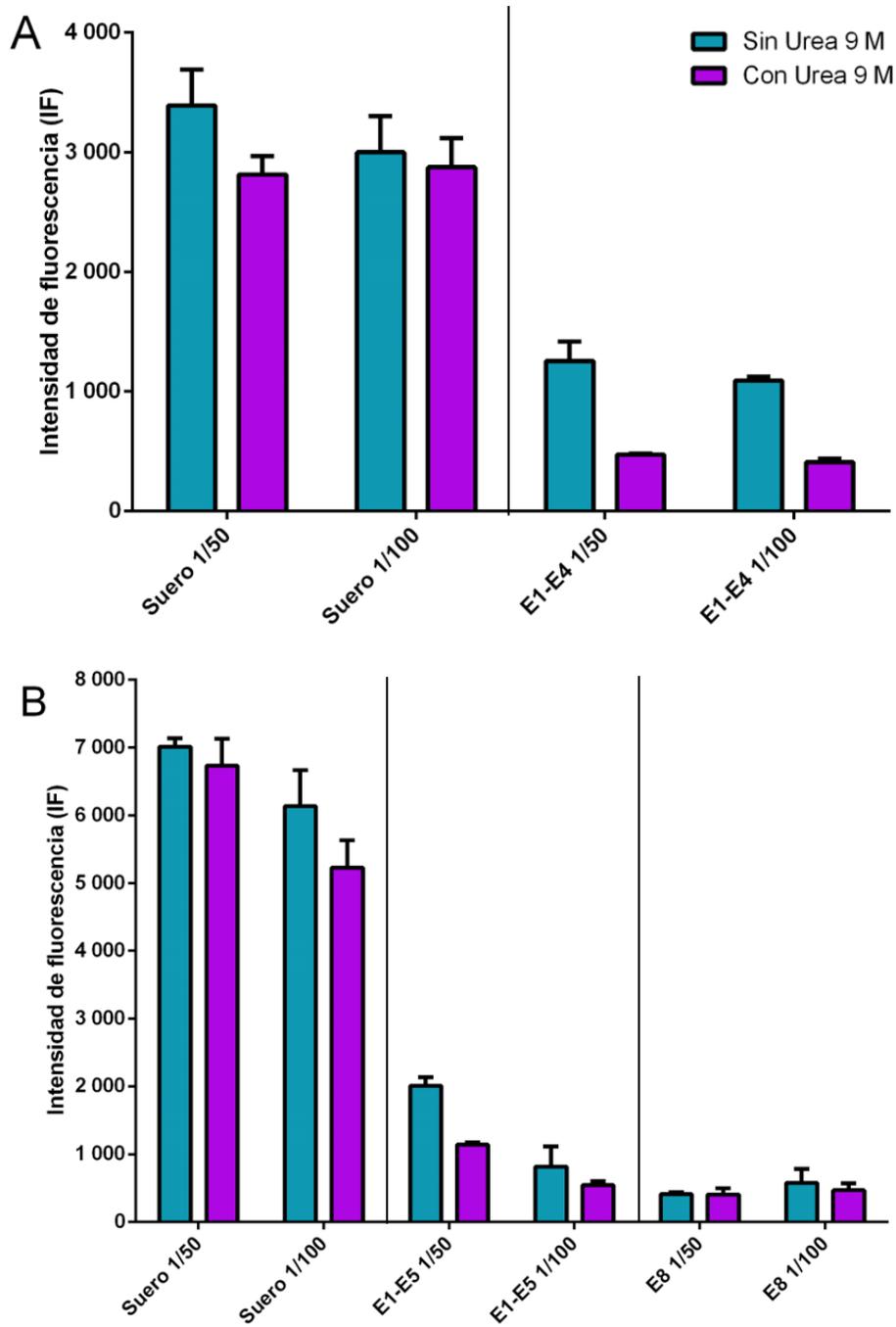


Figura 9. Ensayo de avidéz de muestras séricas humanas y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de cada uno de ellos. Las barras de color morado corresponden a la IF de las muestras séricas y sus diferentes eluidos y/o mezcla de éstos que fueron tratados con una solución de urea 9 M, mientras que las barras de color azul corresponden a las mismas muestras pero sin tratamiento con urea. El **Panel A** pertenece al suero AA280588 y sus eluidos mientras que en el **Panel B** se reportan los resultados del suero AK120190. Todas las muestras se emplearon en dos diluciones diferentes (1/50 y 1/100) y se trabajaron por duplicado.

La **Figura 10** corresponde a los valores de IF de los sueros SK111160 y SB050793 derivados del tratamiento con la solución de urea, así como de las diferentes preparaciones de auto-anticuerpos purificados de cada uno de ellos. Las barras de color azul corresponden al análisis realizado en ausencia de urea mientras que las barras moradas representan las diferentes muestras tratadas con la solución de urea 9 M. Los resultados obtenidos después de analizar el suero original SK111160 y su mezcla de auto-anticuerpos (**Panel A**) evidencian que en todas las muestras los niveles de IF se ven disminuidos cuando se emplea la solución de urea como agente caotrópico; en el **Panel B** (suero SB050793) también se puede observar el efecto causado por la urea ya que el nivel de IF se ve disminuido cuando las muestras se enfrentan a la urea, sin embargo, en el caso de la mezcla de eluidos E8 y E9 los valores de IF son prácticamente iguales evidenciando la fuerza de avidéz en estos auto-anticuerpos.

En la **Figura 11** se encuentran graficados los valores de IF obtenidos de los sueros originales AF250578 y QA020378, así como de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados de cada uno de ellos después de su tratamiento con y sin la solución de urea. Al igual que los sueros anteriores se trabajaron dos diluciones diferentes y a cada muestra se realizó el análisis por duplicado. En el **Panel A** (suero AF250578) no existe una variación notoria entre las dos diluciones de trabajo para todas las muestras analizadas, pero sí se puede observar la disminución en los valores de IF cuando se incubaron con urea, lo que evidencia la ruptura de los enlaces formados entre la citocina y los auto-anticuerpos. En cuanto al suero original QA020378, sus fracciones de eluidos individuales y la mezcla de eluidos (del E2 al E4 y del E5 al E7) (**Panel B**), se puede apreciar el efecto causado por la urea en la muestra sérica original así como en los eluidos donde se empleó un pH de 2.8, el rompimiento del enlace formado entre los auto-anticuerpos y la citocina se ve reflejado en la disminución en los valores de IF; caso contrario ocurre cuando se utilizó un pH más ácido (pH 2.0), correspondiendo a la mezcla de los eluidos E8 y E9 donde se observa que no existe una variación notable entre los valores de IF con y sin tratamiento con la solución de urea 9 M, indicando un enlace más fuerte entre el complejo antígeno-anticuerpo.

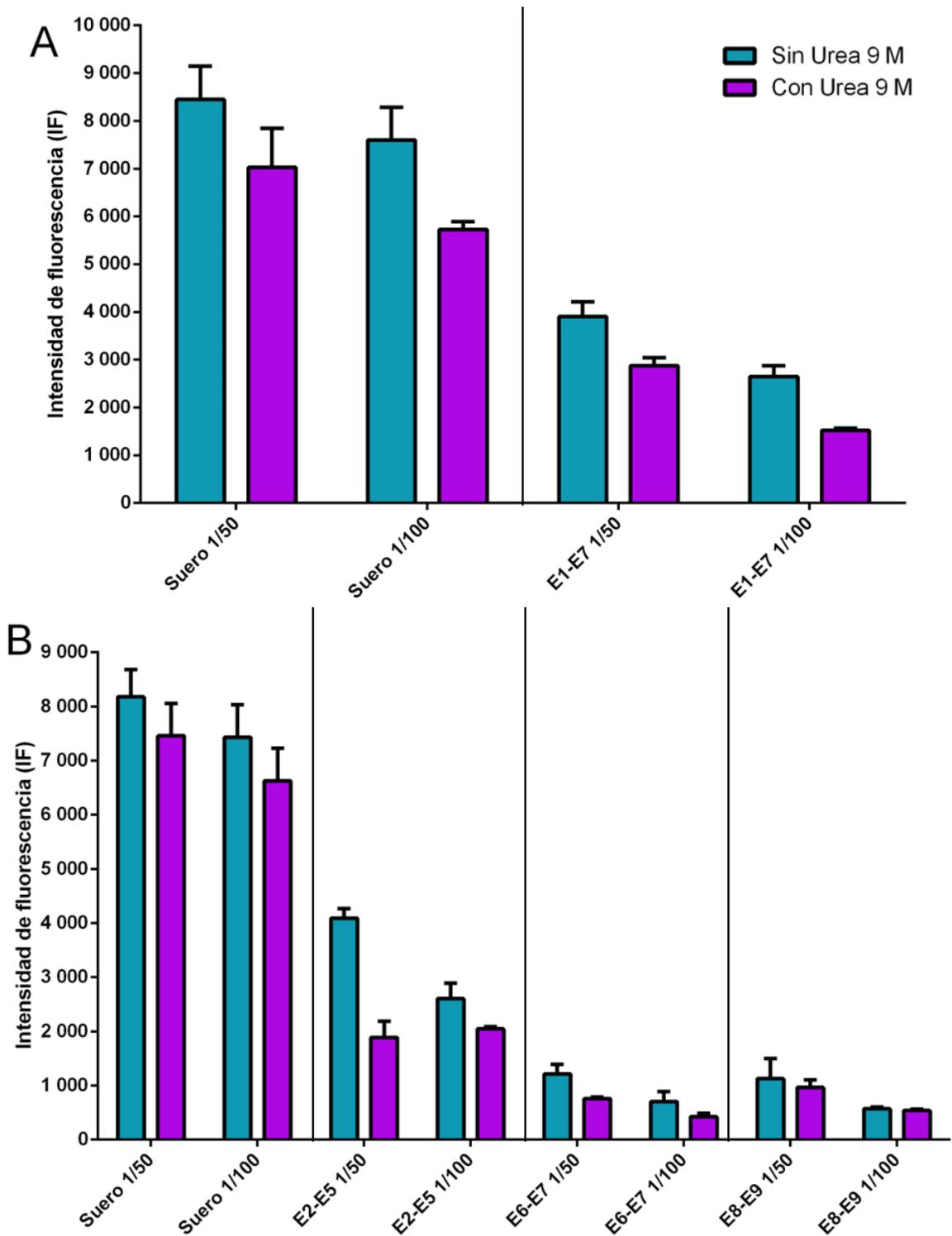


Figura 10. Ensayo de avides de muestras séricas humanas y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de cada una de ellas. Las barras de color morado corresponden a la IF de las muestras séricas y sus diferentes eluidos y/o mezcla de éstos que fueron tratados con una solución de urea 9 M, mientras que las barras de color azul corresponden a las mismas muestras pero sin tratamiento con urea. El **Panel A** pertenece al suero SK111160 y sus eluidos mientras que en el **Panel B** se muestran los resultados del suero SB050793. Todas las muestras se emplearon en dos diluciones diferentes (1/50 y 1/00) y se trabajaron por duplicado.

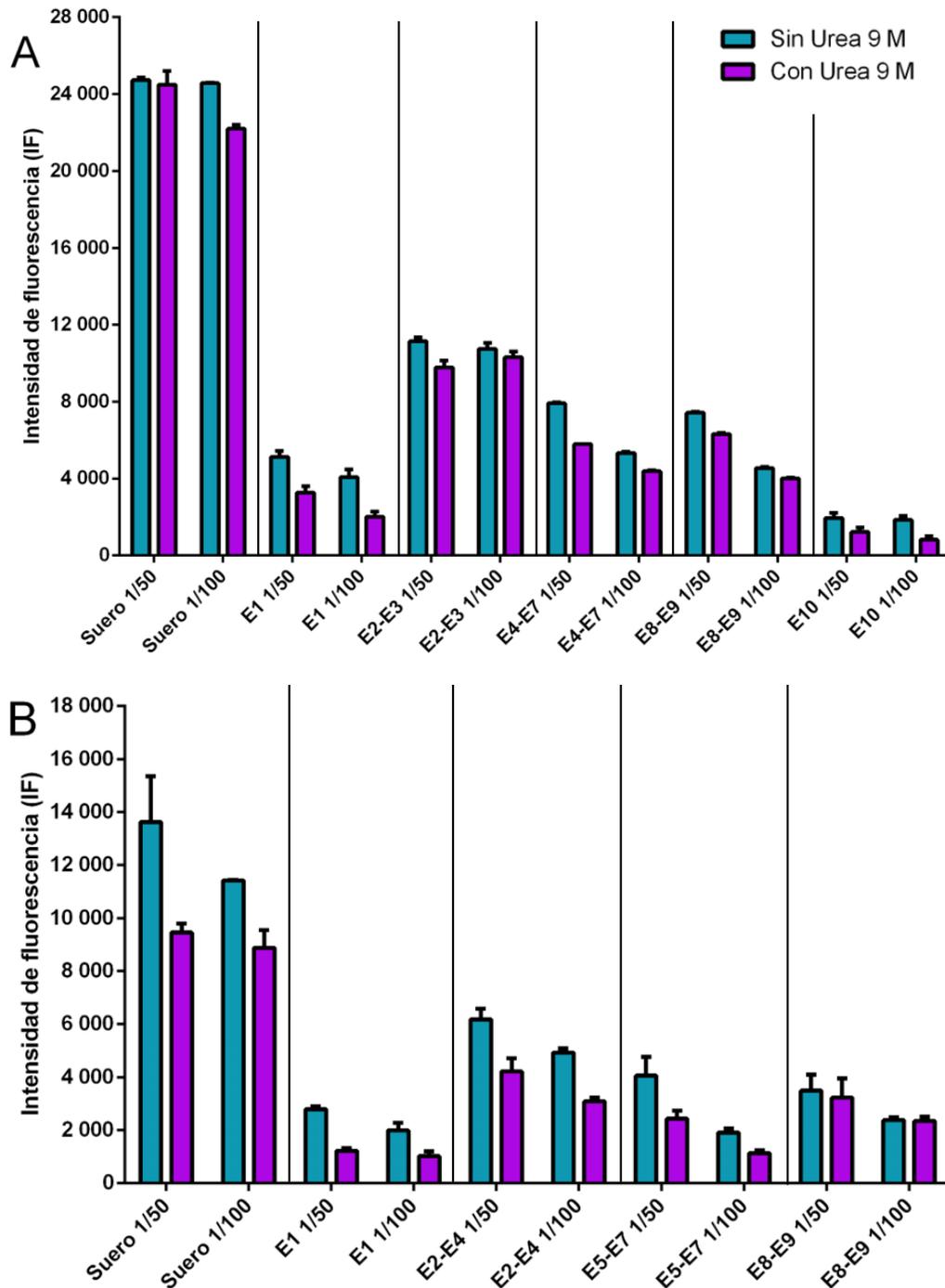


Figura 11. Ensayo de avidéz de muestras séricas originales y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de cada uno de ellos. Las barras de color morado corresponden a la IF de las muestras séricas y sus diferentes eluidos y/o mezcla de éstos que fueron tratados con una solución de urea 9 M, mientras que las barras de color azul corresponden a las mismas muestras pero sin tratamiento con urea. El **Panel A** corresponde al suero AF250578 y sus eluidos mientras que en el **Panel B** se grafican los resultados del suero QA020378. En ambos sueros se emplearon dos diluciones diferentes (1/50 y 1/100) y se trabajaron por duplicado.

La **Figura 12** representa el análisis realizado al suero original DG020480 y las diferentes preparaciones de auto-anticuerpos obtenidos después de la purificación de éste, tanto al suero original como a las diferentes preparaciones se les realizó un tratamiento con urea 9 M con el fin de evaluar la avidéz que presentan los auto-anticuerpos. Se puede observar que la muestra sérica original sí presenta una diferencia notoria en los valores de IF obtenidos entre las diluciones empleadas, la dilución 1/50, en comparación con la dilución 1/100, hace más evidente el efecto caotrópico de la urea. También se puede apreciar que la mezcla de los eluidos E2 al E6 así como la mezcla de los eluidos E9 y E10 presentan niveles de IF muy similares con el tratamiento con y sin urea haciendo evidente que los auto-anticuerpos presentes estas mezclas tienen una fuerza de unión mayor, a la de los demás anticuerpos presentes en el resto de las muestras séricas, pues la concentración de urea no fue capaz de romper los enlaces generados.

Finalmente, en la **Figura 13** se grafican los índices de avidéz de cada uno de los sueros empleados en el presente trabajo, incluyendo las preparaciones de los auto-anticuerpos purificados, en todos los casos, los valores de índice de avidéz que presentan las muestras de los sueros originales se encuentran por arriba del 75 %. Las muestras séricas con mayores valores de índice de avidéz son de las que también se lograron purificar auto-anticuerpos en las fracciones obtenidas con el pH más ácido (pH 2.0), a diferencia de las muestras séricas con valores menores de índice de avidéz donde la purificación de los auto-anticuerpos se logró solo en las primeras eluciones con un pH menos ácido (pH 2.8).

Es importante resaltar que éstos auto-anticuerpos purificados en condiciones más ácidas (pH 2.0), y que resultaron tener valores de índice de avidéz más altos, indican una unión más fuerte entre los auto-anticuerpos con su molécula blanco y por lo tanto, requirieron de condiciones más drásticas para lograr la separación entre los enlaces existentes en la interacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, se presentaron algunas excepciones como fue el caso de los auto-anticuerpos presentes en los primeros eluidos de los sueros AF250578 y DG020480 que resultaron tener valores de índice de avidéz del 95 % y 96.15 %, respectivamente.

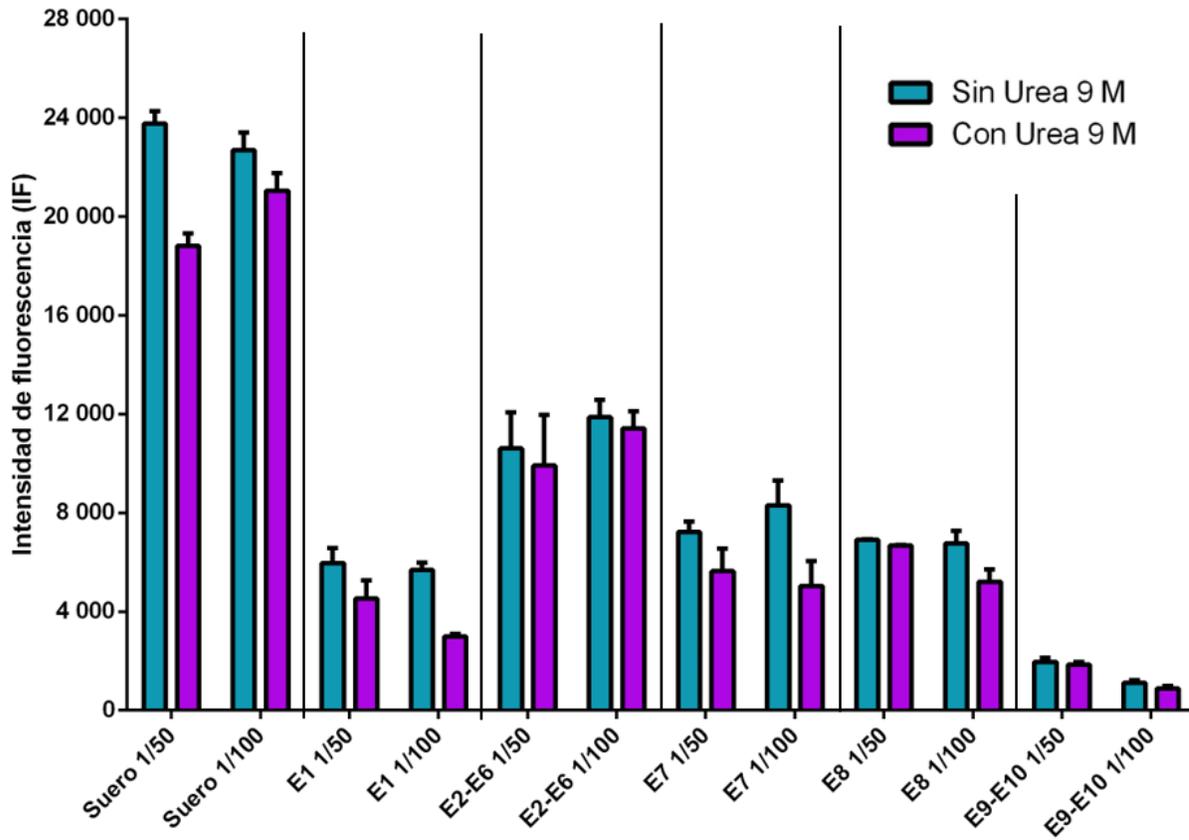


Figura 12. Ensayo de avides de la muestra sérica DG020480 y de las diferentes mezclas de auto-anticuerpos purificados a partir de ésta. Se grafican los niveles de IF del suero DG020480, así como las diferentes mezclas de los auto-anticuerpos purificados con y sin urea 9 M. Las barras de color morado corresponden a los valores de IF de las muestras séricas y sus diferentes eluidos y/o mezcla de éstos que fueron tratados con una solución de urea 9 M, mientras que las barras de color azul corresponden a las mismas muestras sin tratamiento con urea. En ambos casos se emplearon dos diluciones diferentes (1/50 y 1/100) y se trabajaron por duplicado.

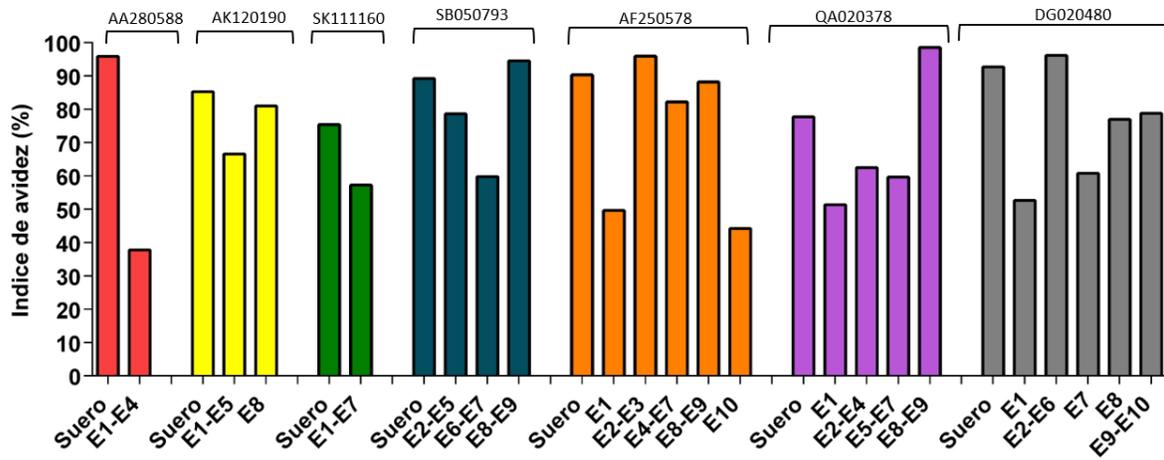


Figura 13. Índice de avididad de sueros positivos a auto-anticuerpos contra GM-CSF y mezclas de sus purificados. Se presentan los índices de avididad de cada uno de los sueros empleado en el trabajo de investigación así como de los eluidos y/o mezclas de ellos obtenidos a partir de su purificación. Las mezclas se realizaron tomando en cuenta los valores obtenidos de cada eluido así como de las condiciones de elución (pH); la dilución considerada fue de 1/100.

De manera general no se presentan diferencias notorias en el índice de avidéz obtenido con las dos diluciones empleadas, a excepción de la mezcla de eluidos del E2 al E5 del suero SB050793 que en la dilución 1/100 presentan un índice de avidéz superior al 70 % mientras que en la dilución 1/50 se encuentra por debajo del 50 %. Se encontró una correlación entre los valores de índice de avidéz altos presentados por las muestras séricas y los auto-anticuerpos purificados empleando el pH más ácido (del E8 al E10).

En forma general, se puede hacer mención de que todos los valores de índice de avidéz de las muestras séricas originales son superiores a los obtenidos de las mezclas de los auto-anticuerpos purificados, sobre todo de los auto-anticuerpos eluidos en las primeras fracciones, donde se utilizó un pH menos ácido (pH 2.8); interpretando estos resultados se podría especular que al determinar los índices de avidéz usando auto-anticuerpos purificados se obtienen valores más confiables, debido a que la acción de la urea interfiere en forma directa sobre los enlaces de los auto-anticuerpos específicos para el GM-CSF, mientras que cuando se usa el suero original la acción de la urea sobre los enlaces del complejo antígeno-anticuerpo podría verse interferida por la presencia de altas concentraciones de otras proteínas séricas, las cuales estarían protegiendo los enlaces de unión entre el auto-anticuerpo y la citocina.

7. DISCUSIÓN

La inmunodeficiencia y los procesos autoinmunes parecen ser dos lados opuestos en el espectro de la respuesta inmune, pero en realidad, estas dos condiciones están frecuentemente relacionadas ya que presentan un carácter bidireccional, pues una enfermedad autoinmune puede ser causa de una inmunodeficiencia y viceversa. En los últimos años se ha logrado establecer una relación más precisa entre las inmunodeficiencias secundarias (adquiridas) causadas por la presencia de altos niveles de auto-anticuerpos con capacidad neutralizante que están dirigidos contra citocinas y que podrían ser la causa de una amplia variedad de enfermedades (Lahera, 2010; Maddur, 2010).

Hoy en día, los anticuerpos anti-citocinas ya se consideran como un importante factor que incrementa la susceptibilidad de los individuos a infecciones causadas una gran variedad de microorganismos (patógenos y no patógenos). En los últimos años se han publicado reportes sobre la actividad neutralizante que presentan estos auto-anticuerpos contra GM-CSF; en 2007 se demostró que las funciones antimicrobianas de los neutrófilos están alteradas en pacientes con PAP debido a la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF, ya que éstos no permiten la estimulación del GM-CSF sobre los neutrófilos para la producción de la molécula CD11b (molécula de adhesión) durante el reclutamiento de estas células. En 2013, Rosen y colaboradores reportaron la posible relación entre pacientes que presentaban meningitis criptocócica y altos títulos de auto-anticuerpos contra GM-CSF, después de evaluar la fracción IgG de plasma de siete pacientes observaron que estos auto-anticuerpos tenían la capacidad de inhibir la fosforilación del factor de transcripción STAT-5 inducida por GM-CSF, además de bloquear la expresión de la proteína MIP-1a; por lo tanto, los autores confirmaron que estos auto-anticuerpos eran biológicamente activos y causantes de una susceptibilidad a una criptococosis (Uchida, 2007; Rosen, 2013).

En el presente trabajo de tesis las muestras séricas humanas corresponden a pacientes que sufrían de severas y recurrentes infecciones causadas por virus, bacterias u hongos, los pacientes presentaban además procesos autoinmunes tales como proteinosis alveolar pulmonar; todos los sueros resultaron ser positivos a la

presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF, lo cual concuerda con los reportes mencionados en el párrafo anterior, donde pacientes con altos niveles de auto-anticuerpos anti-GM-CSF con capacidad neutralizante hacia la actividad biológica de esta citocina presentan un alta susceptibilidad a agentes infecciosos, donde la situación del paciente se puede ver complicada con el desarrollo de PAP.

Para lograr la purificación de auto-anticuerpos específicos contra GM-CSF es importante considerar las propiedades biológicas y químicas que presentan dichas moléculas, y poder emplearlas a nuestro favor con el fin de conseguir una purificación eficiente. Como método de purificación se empleó la cromatografía de afinidad por columna ya que está técnica aprovecha la característica de los anticuerpos para formar enlaces con sus antígenos, los cuales presentan características especiales, siendo enlaces no covalentes, específicos, reversibles y sensibles a condiciones como el pH y la temperatura. Así mismo, la columna fue acoplada mediante enlaces covalentes con la citocina recombinante GM-CSF, una vez que la muestra pasa a través de la matriz, los anticuerpos específicos contra el GM-CSF forman los enlaces que permiten su retención en la columna de agarosa, mientras que todos aquellos componentes del suero o plasma como lo son proteínas abundantes, tales como albúmina y globulinas, productos de desecho, aminoácidos, hormonas, enzimas, entre otros, son eliminados durante el proceso de lavado (Hage, 1999; Hage, 2012).

Una de las características más importantes de los anticuerpos es la formación de enlaces específicos con su molécula blanco, por lo que la técnica de cromatografía nos permitió también asegurar la especificidad de los auto-anticuerpos contra GM-CSF purificados, ya que cada muestra de suero fue evaluada simultáneamente en una columna acoplada con BSA, como se puede observar en cada uno de los resultados obtenidos no se formaron uniones inespecíficas durante el proceso de purificación entre los auto-anticuerpos anti-GM-CSF y la BSA acoplada a la columna.

Una vez que se eliminaron todos los componentes del suero fue necesario romper los enlaces que mantienen retenidos los auto-anticuerpos con la citocina acoplada a la matriz de la columna, esto se logró con el uso de la solución amortiguadora de elución con un pH ácido (primero de 2.8 y luego de 2.0), el cual facilitó que los enlaces no covalentes que se formaron entre los auto-anticuerpos y la

citocina recombinante durante la incubación de las muestras se disociaran, permitiendo la liberación de los auto-anticuerpos. Se ha reportado el efecto que presenta el pH en la interacción antígeno-anticuerpo, el pH ácido debilita las interacciones electroestáticas, o puentes de hidrogeno; por lo que en algunos de los suero como fue el caso de las muestras AK120190, AF250578 y QA020378, se logra apreciar un incremento en los valores de IF cuando las condiciones de elución se vieron modificadas al pH más ácido (pH 2.0), debido a la liberación de los auto-anticuerpos que presentaban una interacción más fuerte con la citocina y que por lo tanto se mantenían retenidos en la columna (Reverberi, 2007).

El kit empleado para la purificación utiliza como matriz agarosa, la cual ya se ha demostrado ser un material adecuado para los procesos de purificación ya que es un compuesto muy estable y por lo tanto, no siendo afectada cuando se ve expuesta a cambios de pH ácidos para la elución, además de que no se altera bajo condiciones de trabajo tales como temperatura, fuerza iónica y la presencia de agentes desnaturizantes y caotrópicos lo que permite su reutilización bajo condiciones de mantenimiento adecuadas (Moser, 2010).

Los efectos de los auto-anticuerpos depende de muchos factores, incluidas las características inmunológica de los auto-anticuerpos, como la avidéz, la especificidad del epítopo, la subclase y el idiotipo. Se ha reportado que los auto-anticuerpos, generalmente del isotipo IgG, tiene una alta afinidad por sus auto-antígenos además de una especificidad restringida, por otro lado, se ha observado que pacientes con enfermedades crónicas autoinmunes pueden producir también auto-anticuerpos de baja afinidad incluso en la etapa tardía de la enfermedad. Los auto-anticuerpos con afinidad muy alta pueden formar complejos antígeno-anticuerpo con potencial óptimo de daño tisular mientras que los auto-anticuerpos de baja afinidad, quizás con poco o ningún efecto perjudicial, permanecen detectables en la circulación (Božič, 2014).

Por lo mencionado en el párrafo anterior resultó de interés en el presente estudio poder determinar la fuerza de unión que son capaces de generar los auto-anticuerpos contra GM-CSF purificados, esto se logró realizando el ensayo para determinar los valores de índice de avidéz que presentan estos auto-anticuerpos con el uso de urea 9 M como agente caotrópico; estudios publicados indican que la urea

en concentraciones altas tiene la capacidad desestabilizar los puentes de hidrógeno, así como las fuerzas de Van der Waals (Bennion, 2003). Independientemente del tipo de muestra analizada (suero original o preparación de auto-anticuerpos purificados) los valores de IF se vieron disminuidos debido al tratamiento con urea, lo cual permite asegurar que las uniones formadas entre los auto-anticuerpos contra GM-CSF y la citocina se vieron disociadas por la presencia de este agente desestabilizante.

Así mismo, los resultados obtenidos permiten afirmar que los auto-anticuerpos que requirieron de condiciones más drásticas (pH 2.0) para su elución durante el proceso de purificación, presentan una fuerza de interacción mayor con la citocina GM-CSF, donde la mayoría arrojó valores de índice de avidéz entre 85 % y 99 %, en comparación con los auto-anticuerpos eluidos a un pH menos ácido (pH 2.8), los cuales presentaron valores entre 37 % y 78 %. Por otro lado, el comportamiento observado dependiendo del tipo de muestra permite sugerir que la determinación de los índices de avidéz, empleando auto-anticuerpos purificados, da una visión más clara de la fuerza de unión que son capaces de generar éstos debido a que la acción de la urea sobre los enlaces del complejo antígeno-anticuerpo no se ve interferida por la presencia del resto de los componentes que constituyen al suero.

Finalmente, es importante mencionar que se decidió emplear la técnica de arreglo de microesferas en suspensión Luminex para realizar la detección de la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF, tanto en las muestras séricas como en las diferentes fracciones del proceso de purificación, así como para la evaluación del ensayo de avidéz debido a las diferentes ventajas que presenta la técnica de Luminex frente a otras técnicas serológicas. En 2011, Stenger y sus colaboradores compararon los requerimientos para la realización del ensayo ELISA y la técnica de Luminex, mencionando que la ELISA requiere de más tiempo para su realización (al menos 2 días), empleando también cantidades sustanciales de antígeno para el recubrimiento, y que la evaluación de cada antígeno es en forma individual (requiriendo mayor número de pozos) y por lo tanto, el uso de volúmenes más grandes de reactivos; mientras que la técnica de Luminex requiere de cantidades muy pequeñas de las proteínas que se deseen analizar y acoplar a las diferentes microesferas, reduciendo así la utilización de grandes volúmenes de reactivos y de cada una de las muestras; además, una vez que se tienen acoplados los sistemas de proteína-microesfera, la

técnica permite hacer una evaluación simultánea de un gran número de analitos en el mismo pozo, lo que facilita obtener una amplia variedad de resultados a partir de una sola muestra (Stenger, 2011).

8. CONCLUSIONES

- ∇ El ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex) permitió determinar la presencia de auto-anticuerpos contra GM-CSF presentes en muestras séricas humanas e identificar las fracciones eluidas que contenían auto-anticuerpos purificados específicos contra GM-CSF.
- ∇ Se logró llevar a cabo la purificación de auto-anticuerpos contra GM-CSF presentes en muestras séricas humanas provenientes de pacientes que presentaban enfermedades infecciosas recurrentes y/o problemas autoinmunes, mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna.
- ∇ El agente caotrópico Urea (9 M) permitió determinar los valores de los índices de avidéz de los auto-anticuerpos anti-GM-CSF mediante la técnica de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).
- ∇ La determinación de los valores de índice de avidéz es más confiable empleando auto-anticuerpos purificados que la muestra sérica, debido a que la acción de la urea no está interferida por la presencia de altas concentraciones de otras proteínas del suero.
- ∇ Los auto-anticuerpos contra GM-CSF eluidos en las condiciones más ácidas (pH 2.0) generan enlaces más fuertes con la citocina rhGM-CSF y por lo tanto, presentan un valor de índice de avidéz más alto.

9. REFERENCIAS

- Ø Abbas, A; Litchman, A; Pillai, S. (2015). Inmunología celular y molecular. Barcelona, España: Elsevier.
- Ø Barros de Oliveira, M; Kimiko, R; Machado, A. (2011). Citocinas y Dolor Rev. brasileña de anestesiología; 61(2): 138-142. Recuperado de <http://bit.ly/2Q2W0yt>
- Ø Bellanti, J; Escobar-Gutiérrez, A; Méndez, J. et al. (2016) Inmunología IV: Aplicaciones Clínicas en Salud y Enfermedad USA: I Care Press.
- Ø Bennion, B; Daggett, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100:5142–5147. Recuperado de <http://bit.ly/2Q080AC>
- Ø Božič, B; Čučnik, S; Kveder, T; et al. (2014). Affinity and Avidity of Autoantibodies Autoantibodies; Elsevier: 43-49. Recuperado de <http://bit.ly/2E2UN5t>
- Ø Browne, S; Holland, S. (2010) Anticytokine autoantibodies in infectious diseases: pathogenesis and mechanisms. Lancet Infect Dis. 10: 875–85. Recuperado de <http://bit.ly/2JBsiPI>
- Ø Carey, B; Trapnell, B. (2010) The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. Clinical Immunology; 135: 223–235. Recuperado de <http://bit.ly/2HjcRu8>
- Ø Carrada, T. (2001). Ecología de las enfermedades infecciosas. Rev. Ciencias; 60: 63-73. Recuperado de <http://bit.ly/2vWpCUX>
- Ø Cedillo, L. (2015) ¿Qué es y cómo funciona el sistema inmune? Rev. Ciencia: 20-25. Recuperado de <http://bit.ly/2LGqwzv>
- Ø Contreras-Soto, J, Cano-Rangel, M. (2008). El Reto de las Enfermedades Emergentes; Bol Clin Hosp. Infant; 25(2): 125-128. Recuperado de <http://bit.ly/2Hjcek3>
- Ø Cooper, M; Lanier, L; Conley, E; et al. (2003) Immunodeficiency Disorders Hematology; 2003(1); 314-330. Recuperado de <http://bit.ly/2Vjxxpv>
- Ø Doffinger, R; Helbert, M; Barcenas, G; et al. (2004). Autoantibodies to IFN- γ in a Patient with Selective Susceptibility to Mycobacterial Infection and Organ-Specific Autoimmunity. Clinical Infectious Diseases. 38:10–4. Recuperado de <http://bit.ly/2EbJEzo>

- Ø Dinarello, C. (2003). Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine* 2(2): S24–34. Recuperado de <http://bit.ly/2HmB8hC>
- Ø Ernst, G; Salvado, A; Grynblat, P; et al. (2017). Proteinosis alveolar pulmonar. Rol de los anticuerpos anti-GM-CSF. *Rev. Facultad de Ciencias Médicas*; 74(1):46-50. Recuperado de <http://bit.ly/2HkUkh8>
- Ø Etzioni, A. (2003) Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2: 364–369. Recuperado de <http://bit.ly/2VHo1BT>
- Ø Filella, X. (2002) Estructura y función de las citocinas. *Med. Integral*;39(2):63-71. Recuperado de <http://bit.ly/2LETuzO>
- Ø Hage, D. (1999). Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clinical Chemistry*; 45(5): 593–615. Recuperado de <http://bit.ly/2JiXYKD>
- Ø Hage, D; Anguizola, J; Bi, C; et al. (2012). Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *J Pharm Biomed Anal*; 69; 93–105. Recuperado de <http://bit.ly/2E4pwij>
- Ø Höflich, C; Sabat, R; Rosseau, S; et al. (2004). Naturally occurring anti-IFN- γ autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia cocovenenans*. *Blood* 103(2): 673–675. Recuperado de <http://bit.ly/2Yqw8PT>
- Ø Huse, K; Böhme, H; Scholz, G. (2002) Purification of antibodies by affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*; 51: 217–231. Recuperado de <http://bit.ly/2LHobUU>
- Ø Juvet, S, Hwang, D; Waddell, T; et al. (2008). Rare lung diseases II: Pulmonary alveolar proteinosis: *Can Respir J.*; 15(4): 203-210. Recuperado de <http://bit.ly/30bNiCy>
- Ø Kisand, K; Wolff, B; Tserel, P; et al. (2010) Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 207:299–308. Recuperado de <http://bit.ly/2W0JIRR>
- Ø Knight, V; Merkel, P; O’Sullivan, M. (2016) Anticytokine Autoantibodies: Association with Infection and Immune Dysregulation; *Antibodies*; 5(3): 1-20. Recuperado de <http://bit.ly/2HAZXXt>
- Ø Lahera, T. (2011) “Conexión entre inmunodeficiencia primaria y autoinmunidad”; *Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*; 26(1): 198-205. Recuperado de <http://bit.ly/2WL7nh8>

- Ø Maddur, M; Vani, J; Lacroix-Desmazes, S; et al. (2010) Autoimmunity as a Predisposition for Infectious Diseases; *Plospathogens*. 6(11): 1-4. Recuperado de <http://bit.ly/2JFd0ti>
- Ø Magdeldin, S; MoserTech A. (2012) Affinity Chromatography: Principles and Applications; *InTechOpen*, Croatia; 356. Recuperado de <http://bit.ly/2E9D5Ny>
- Ø Male, D; Brostoff, J; Roth, D; et al. (2013) *Inmunología*. Barcelona, España: Elsevier.
- Ø Meager, A; Wadhwa, M; Dilger, P; et al. (2003). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against IFN- α , IFN- ω and IL-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 132(1): 128-136. Recuperado de <http://bit.ly/2vZn2O6>
- Ø Moser, A; Hage, D. (2010) Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* 2(4): 769–790. Recuperado de <http://bit.ly/2E7qies>
- Ø Owen, J; Punt, J; Stranford, S; et al. (2014) *Kuby. Inmunología*. Ciudad de México, México: McGraw-Hill.
- Ø Pedraza-Alva, G. (2015) “Las intrincadas redes de la inmunidad” *Rev. Ciencia*: 27-35.
- Ø Pérez, J. (2010) “El Sistema surfactante pulmonar.” *Rev. Investigación y Ciencia*: 38-45.
- Ø Puel, P; Picard, C; Lorrot, M; et al. (2008). Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J Immunol* 180(1):647–654. Recuperado de <http://bit.ly/2LDTIMV>
- Ø Puel, P; Döffinger, R; Natividad, A; 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(2): 291–297. Recuperado de <http://bit.ly/2LGurMQ>
- Ø Reverberi, R; Reverberi, L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus*; 5(4): 227-240. Recuperado de <http://bit.ly/2VBWodo>
- Ø Rojas, W; Anaya, J; Cano, L; et al. (2015) *Inmunología de Rojas Medellín*, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Ø Rosen, L; Freeman, A; Yang, L; et al. (2013) Anti–GM-CSF Autoantibodies in Patients with Cryptococcal Meningitis; *The Journal of Immunology*; 190(8): 3959-3966. Recuperado de <http://bit.ly/2JFrYj5>

- Ø Schroeder, H; Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins; *J Allergy Clin Immunol*; 125(202): 41-52. Recuperado de <http://bit.ly/2Vo6MAN>
- Ø Seymour, J; Presneill, J. (2002) Pulmonary Alveolar Proteinosis. Progress in the First 44 Years; *Am J Respir Crit Care Med*; 166(2): 215–235. Recuperado de <http://bit.ly/2JEXcHe>
- Ø Stenger, R; Smits, M; Kuipers, B; et al. (2011) Fast, Antigen-Saving Multiplex Immunoassay To Determine Levels and Avidity. *Clinical and vaccine immunology*; 18(4) 595–603. Recuperado de <http://bit.ly/2Hn0RXo>
- Ø Torres, S; Martínez, Z. (2011). Factores genéticos, inmunológicos y ambientales asociados a la autoinmunidad; *Rev. Cubana de Investigaciones Biomédicas*; 30(4): 501-510. Recuperado de <http://bit.ly/2w6pd2t>
- Ø Trapnell, B; Whitsett, J. (2002). GM-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense; *Annu. Rev. Physiol*; 64:775–802. Recuperado de <http://bit.ly/2Vzlo3y>
- Ø Uchida, K; Beck, D; Yamamoto, T; et al. (2007) GM-CSF Autoantibodies and Neutrophil Dysfunction in Pulmonary Alveolar Proteinosis; *The New England Journal of Medicine*; 356(6): 567-79. Recuperado de <http://bit.ly/2YurOz0>
- Ø Valle, A. (2005) Vía JAK-STAT: una visión general. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*; 8(1-2):14-25. Recuperado de <http://bit.ly/2Yya3iF>
- Ø Wang, L; Wang, F; Gershwin, M. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update; *Journal of Internal Medicine*; 288(4); 369-395. Recuperado de <http://bit.ly/2YsqFYW>
- Ø Winthrop, K; Chang, E; Yamashita, S; et al. (2009). Nontuberculous Mycobacteria Infections and Anti-Tumor Necrosis Factor- α Therapy. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10), 1556–1561. Recuperado de <http://bit.ly/30g90W4>
- Ø Wicks, I; Roberts, A. (2015). Targeting GM-CSF in inflammatory diseases; *Nature reviews. Rheumatology*; 12(1):37-48. Recuperado de <http://bit.ly/2JkzD7b>
- Ø Zhang, L; Liu, J; Meager, A; et al. (2003). Autoantibodies to IL-12 in myasthenia gravis patients with thymoma; effects on the IFN- γ responses of healthy CD4⁺ T cells; *J Neuroimmunol* 139(1-2): 102–108. Recuperado de <http://bit.ly/2Q27jHf>