



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TÉCNICAS DE TINCIÓN INTRACELULAR EN
CÉLULAS MONOCITICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE IL-6, IL-12 Y TNF- α POR
CITOMETRÍA DE FLUJO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN

Jose Eduardo Dominguez Silva

Lilia Lozano Miranda



MÉXICO, D.F. Mayo

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Berron Ruiz Patricia Elvira**

VOCAL: **Profesor: Heras Chavarría Mónica Berenice**

SECRETARIO: **Profesor: Guzmán Vázquez Elizabeth**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Mendieta Rergis Araceli**

2° SUPLENTE: **Profesor: Martínez Álvarez Julio Cesar**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Inmunología y Alergia. Instituto Nacional de Pediatría

ASESOR DEL TEMA: QFB. Elizabeth Guzmán Vázquez

SUPERVISOR TÉCNICO: QFB. Jazmín Elizabeth Hernández García

SUSTENTANTES: JOSÉ EDUARDO DOMÍNGUEZ SILVA

LILIA LOZANO MIRANDA

Agradecimientos

Introducción

La producción de citocinas por linfocitos y monocitos se puede medir a nivel de células individuales en respuesta a estímulos antigénicos debido a diversos estados fisiopatológicos que comprometen al sistema inmune. La citometría de flujo es una técnica multiparamétrica cuantitativa que permite una evaluación objetiva en la expresión de proteínas intracelulares y así poder determinar la funcionalidad y viabilidad celular.

Los monocitos son la principal fuente celular de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-12 y TNF- α) por lo cual su determinación in vitro es importante y se requiere establecer una técnica en el laboratorio para su cuantificación, considerando todas las variables que influyen en la citometría de flujo desde la obtención de células, el uso de diferentes activadores, y los tiempos de incubación principalmente, estos factores son lo que actualmente se reportan en la literatura. Tomando lo anterior como base para la implementación de una técnica y así dar apoyo en el diagnóstico de diversos padecimientos hematológicos e inmunológicos como son Síndrome Hemofagocítico y Artritis Reumatoide.

Objetivos:

Comparar dos técnicas de tinción intracelular de citocinas (IL-6, TNF- α e IL-12) en células monocíticas por citometría de flujo, seleccionando la mejor mediante los siguientes criterios 1) Producción de citocinas respecto al tiempo y concentración de LPS 2) Viabilidad Celular y 3) Intensidad de Fluorescencia Media.

Índice

I. Introducción.....	4
II. Índice.....	5
III. Marco Teórico.....	6
1) Sistema Inmune	
1. Historia.....	5
2. Monocitos.....	7
2) Citocinas	
1. TNF- α	18
2. IL-12.....	20
3. IL-6.....	24
4. Técnicas de Medición.....	25
3) Citometría de Flujo	
1. Historia.....	25
2. Instrumentación.....	27
3. Análisis de Datos.....	32
4) Tinciones de citocinas Intracelulares	
1. Separación por Gradiente.....	34
2. Cultivo Celular.....	35
3. Brefeldrina (BFA).....	37
4. Activadores (LPS).....	37
5. Viabilidad Celular.....	38
IV. Material, Equipos y Reactivos.....	40
V. Método.....	41
VI. Resultados.....	47
VII. Análisis de Resultados.....	60
VIII. Conclusiones.....	66
IX. Bibliografía.....	67
X. Apéndices.....	74

Marco Teórico

3.1 Sistema Inmune

3.1.1 Historia

Las células de sistema inmune son principalmente los glóbulos blancos o leucocitos y las células tisulares relacionadas con ellos. Estas células tienen origen en una célula progenitora común llamada célula troncal (célula madre) hematopoyética pluripotente, de la que también derivan los eritrocitos y las células llamadas Megacariocitos. Todos estos tipos celulares se denominan en conjunto células hematopoyéticas. El proceso por el que las células hematopoyéticas producen esta variedad de células se llama hematopoyesis.¹⁻³

La célula progenitora mieloide origina el linaje mieloide, integrado por un grupo de células llamados granulocitos debido a que poseen gránulos citoplasmáticos prominentes que contienen sustancias reactivas que destruyen microorganismos y aumentan la inflamación. Como los granulocitos tienen núcleos de forma irregular con dos a cinco lóbulos también se llaman polimorfonucleares. El más abundante de los granulocitos y de todos los leucocitos es el neutrófilo, que se especializa en la captura, fagocitosis y lisis de microorganismos. Las células con estas funciones se denominan fagocitos y los neutrófilos, son los fagocitos más numerosos y letales.¹⁻³

El granulocito que ocupa el segundo lugar en orden de abundancia es el eosinófilo, que actúa como defensa contra helmintos y otros parásitos intestinales, siendo el basófilo el menos abundante es tan escaso que se sabe poco acerca de su contribución a la respuesta inmune.¹⁻³

El segundo grupo de células mieloides está compuesto por monocitos. Los cuales son leucocitos que circulan en la sangre. Se diferencian de los granulocitos porque son más grandes, núcleo dentado característico. Los monocitos son progenitores móviles del macrófago tisular: viajan por la sangre a los tejidos donde maduran hasta convertirse en macrófagos y allí permanecen. Son las células depuradoras generales del cuerpo que fagocitan y eliminan células muertas y los detritos celulares, así como microorganismos invasores.¹⁻³

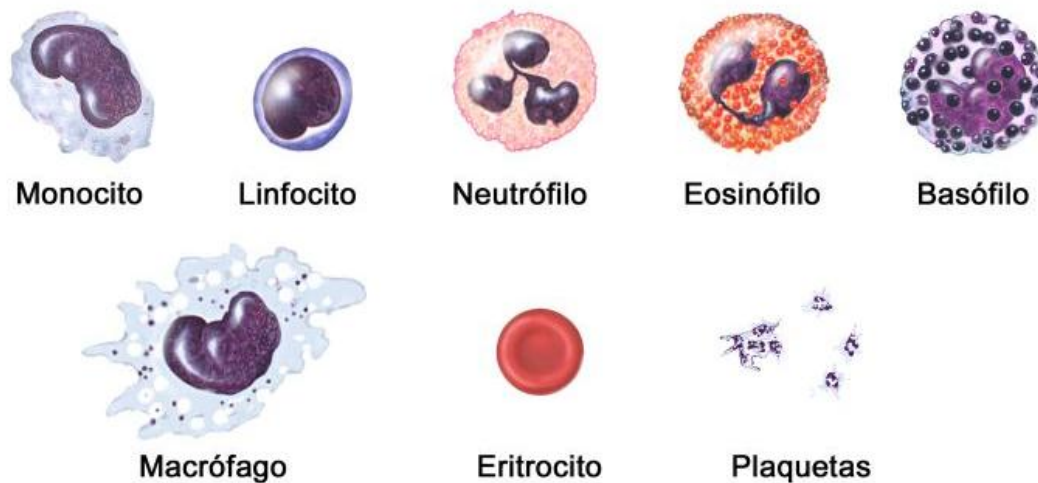


Figura 1. Representación de las diferentes células en sangre periférica humana
 Recuento de Leucocitos y diferenciales (2014). Obtenida de:
<http://leucocitosaltos.blogspot.mx/2013/02/recuento-de-leucocitos-y-diferenciales.html>

Los macrófagos presentes en los tejidos infectados generalmente son las primeras células fagocíticas que detectan un microorganismo invasor. Como parte de su respuesta al patógeno los macrófagos secretan citocinas que atraen leucocitos a la zona infectada.¹⁻³

3.1.2 Monocitos

El *sistema fagocítico mononuclear* se define como una red de células mieloides, no granulocítica, cuya función es importante en la remodelación de tejidos, homeostasis, así como los aspectos estimulantes y reguladores del sistema inmune innato y adaptativo. El sistema fagocítico mononuclear se divide

actualmente en tres tipos de células, monocitos, macrófagos terminalmente diferenciadas y células dendríticas.¹⁻³

Los monocitos tienen una vida media en circulación de aproximadamente tres días, comparado con los neutrófilos no se cuenta con una reserva de monocitos en la zona marginal. Una vez en los tejidos, los monocitos no vuelven a entrar a circulación, sino que se transforman en macrófagos tisulares generalmente sin la capacidad de dividirse. Los monocitos representan entre un 3 a 8% de los leucocitos de sangre periférica, miden de 12 a 15 μm de diámetro y poseen un núcleo en forma de riñón característico. El citoplasma contiene un aparato de

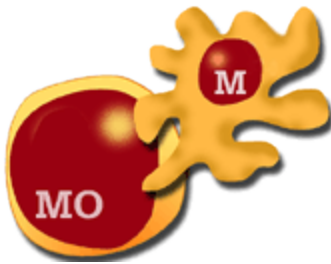


Figura 2. Esquema de un Monocito y Macrófago
Travers (2009)

Golgi bien desarrollado, así como numerosos gránulos lisosomales y microtúbulos de filamentos de actina que están reticulados por la proteína de unión a actina y miosina. Los monocitos son lentamente móviles, exhiben actividad fagocítica y tienen una fuerte tendencia a adherirse y propagarse en superficies de vidrio.⁴

Los macrófagos miden entre 20 a 80 μm de diámetro y contienen a menudo un gran núcleo vacuolado con nucléolos prominentes. Su citoplasma contiene un gran aparato de Golgi bien desarrollado, abundante retículo endoplásmico rugoso y ribosomas, mitocondrias, grandes microtúbulos, microfilamentos, numerosos lisosomas ricos en enzimas hidrolíticas y un sistema de actina-miosina.⁴

Los macrófagos también son anaerobios facultativos, con la notable excepción del macrófago alveolar pulmonar. Los macrófagos son muy móviles y presentan una marcada actividad fagocítica. En contraste con los monocitos, los macrófagos se ha demostrado que proliferan en respuesta a ciertos estímulos *in vivo*.⁵

Los macrófagos expresan receptores para el componente Fc de la IgG, tanto los monocitos y los macrófagos expresan receptores para IgE que es relevante para la inmunidad del huésped a varios parásitos. Los macrófagos residen en diferentes tejidos, con propiedades morfológicas y funcionales diferentes. Se ha postulado

que el perfil de los estímulos locales, a los que están expuestos los macrófagos en un tejido particular, influye en su composición y su metabolismo. (Ver Tabla 1) .⁵⁻⁷

Tejido	Importancia de su función
Bazo	La eliminación de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La presentación de antígenos a los linfocitos
Nodos Linfáticos	Presentación de Antígeno a Linfocitos
Medula Ósea (Células Enfermeras)	Células fagocíticas La síntesis de proteínas de unión a hierro Importante fuente de hierro para el desarrollo normoblastos
Hígado (Células Kupffer)	Eliminación de microorganismos, endotoxinas, antígenos, complejos inmunes, suspensiones coloidales, quilomicrones y eritrocitos envejecidos de la circulación
Hueso (Osteoclasto)	La resorción ósea durante el remodelado óseo
Cerebro (células microgliales)	Función Desconocida
Pulmón alvéolos (alveolar pulmonar macrófagos)	Presentación de antígenos a los linfocitos Eliminación de microbios inhalados y partículas inertes Liquidadación de surfactante en los alvéolos
Pleura y el peritoneo	Poco conocido Puede funcionar como "rodamientos" para facilitar los movimientos de parietal y membranas viscerales
Epidermis (Células Langerhans)	La presentación de antígenos a los linfocitos Papeles importantes en las respuestas inmunes mediadas por células (por ejemplo, hipersensibilidad tardía) y la sensibilidad de contacto

Tabla 1. Clasificación de los diferentes Macrófagos Tisulares
Tortora (2007) Introducción a la Microbiología

Los primeros estudios sobre la función de los monocitos se centraron principalmente en la actividad fagocítica, la investigación en las dos últimas décadas ha puesto de relieve la importancia de su función secretora. Los monocitos y los macrófagos liberan una enorme cantidad de sustancias biológicamente activas en su entorno local, incluyendo proteínas, lípidos, nucleótidos y metabolitos de oxígeno. Estos productos son importantes tanto en el

medio ambiente local como en la mediación de la inflamación, la reparación de tejidos y en funciones de regulación: antimicrobiana, tumoricida e inmune, también en respuestas sistémicas tales como la respuesta de fase aguda. (Ver Tabla 2).⁵⁻⁷

La activación de los fagocitos mononucleares se define como los cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales donde las células se someten en una mejora de sus funciones. Más de 50 alteraciones estructurales y funcionales se producen en los macrófagos activados. (Ver Tabla 3).⁵⁻⁷

La activación de los fagocitos mononucleares puede ser inducida por muchos factores que incluyen citocinas, productos bacterianos, alérgenos, partículas fagocitadas, complejos inmunes, componentes del complemento, virus, e IgE. Los fagocitos mononucleares juegan un papel destacado en la defensa del huésped contra muchos microorganismos mediante el uso de la función fagocítica bien desarrollada para ayudar a los neutrófilos en la ingestión y la muerte de varias especies de bacterias y hongos. Por otra parte, los fagocitos mononucleares son la primera línea de defensa contra microorganismos intracelulares obligados, como *Mycobacterium*, *Legionella*, *Listeria*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Toxoplasma* y *Leishmania spp*. Los fagocitos mononucleares también eliminan los virus y las células infectadas por estos.⁵⁻⁷

El proceso de fagocitosis consiste en tres fases fijación, ingestión, y lisis. Durante la fase inicial de fijación, el fagocito mononuclear se une al microorganismo por receptores de superficie no específicos.⁵⁻⁷

Enzima	Inhibidores de enzimas y citocinas	Metabolitos de Oxigeno
Lisosima Proteínas Neutras	Anti-proteinasas α -Antitripsina α -Antimacroglobulina α -Antriquimotripsia	Anión SuperOxido Peróxido de Hidrogeno Radical Hidroxilo
Activador Plasminogeno Elastasa Colagenasa Convertasa Angiotensina	Inhibidor activador plasminogeno Inhibidor Colagenasa Inhibidor de Tejido o Metaloproteinasas Inhibidor Plasmina Inhibidor Fosfolipidos	Proteínas Unión Fibronectina Tromboespodina Transferrina Transcobalamina II
Hidrolasas Acidas Proteinasas	Lipomodulina Inhibidor de IL-1 Componentes de Complemento	Lípidos Bioactivos Leucotrienos B4, C, D y E Prostaglandinas E2 y F2a y Tromboxano
Esterasas Lipasas Ribonucleasas Fosfatasas Glicosidasas	Vía Clásica: C1, C4, C2, C3, C5 Vía Alterna: Factor B, Factor D y Properidin Inhibidores Inhibidores C3	Factores de Coagulación Vía Intrínseca: Protombina, IX, X, V Vía Extrínseca: VII, Activador Plasminogeno e Inhibidor del Activador Plasminogeno
Hormonas Polipeptidicas		
Interleucina IL-a &IL-B Interleucina 6 Interleucina 8 Factor de Necrosis Tumoral Interferón Alfa Factor Crecimiento derivado de Plaquetas Factor-6 crecimiento Transformación		Factor de activación de Fibroblasto Factor de crecimiento Fibroblasto Actividad Tipo Insulina Eritropoyetina Factor Estimulante de la Colonia Macrófago- Granulocito Factor Estimulante de la Colonia Granulocito

Tabla 2. Productos Químicos producidos durante la activación del Macrófago
Yona S (2010) Monocyte subsets origin fates and funtion

Morfológicas		Funcional	
Incremento:		Incremento:	
Tamaño		Pinocitosis	
Adhesividad y Difusión		Fagocitosis	
Gránulos Citoplasmáticos		Actividad microbicida	
Formación Pseudópodo		Quimiotaxis	
		Presentación de Antígeno	
		Actividad Tumoricida	
Bioquímicas		Receptor de Expresión	
Incremento:		Incremento:	
Estallido Respiratorio		Receptor Fc , CR1 y CR3	
Metabolismo Glucosa		Antígenos CD11/CD18	
Actividad de Adenilato Ciclasa		Receptores IL-2	
“Afluencia” ion calcio		Antígenos MHC Clase II	
Decremento :		Decremento:	
5´nucleotidasa Adenosin Monofosfatasa en MP		Antígenos MHC Clase I	
Secretoria			
Incremento :		Fibronectina	
Activador de <i>Plasminógeno</i>		Interleucina 1	
Elastasa		Interleucina 6	
Colagenasa		Factor de Necrosis Tumoral	
Componentes del Complemento		Sin cambios: Lisozima	

Tabla 3. Principales Cambios que sufre el Macrófago durante su activación
Yona S (2010) Monocyte subsets origin fates and function

Sin embargo, la unión se mejora en gran medida si los microorganismos han sido opsonizados por inmunoglobulina o por C3b debido a que poseen receptores específicos para dichas moléculas. Cuando se desencadenan la respuesta por un estímulo fagocítico o farmacológico, estos rápidamente consumen una gran cantidad de oxígeno y metabolizan grandes cantidades de glucosa a través de la vía de la hexosa mono fosfato. El propósito de este estallido respiratorio es generar un número de metabolitos reactivos de oxígeno con el potencial para inhibir el crecimiento o para matar los microorganismos y las células neoplásicas.⁵⁻⁷

Una función bien definida de los fagocitos mononucleares es su interacción con los linfocitos en la respuesta inmune. Esta interacción es esencial para el desarrollo de la inmunocompetencia celular y humoral y tiene dos componentes

principales. El primer componente consiste en la inducción de una respuesta a un antígeno, y se llama respuesta inmune inductiva. La respuesta inmune efectora incluye la expresión de la inmunidad mediada por células, y la secreción de mediadores con funciones de regulación inmune tales como la IL-6, TNF- α e IFN- γ . Para lograr optimizar la inactivación y/o lisis de microorganismos patógenos, los macrófagos deben ser activados. Esta activación es inducida por citocinas que son liberadas por los linfocitos T activados.⁴⁻⁷

Durante esta etapa efectora, los macrófagos presentan un aumento de la fagocitosis y destrucción microbiana, secretan una amplia variedad de moléculas biológicamente activas que influyen en las dos respuestas del sistema inmune. Se cree que la participación de los fagocitos mononucleares en eventos citotóxicos es importante en la muerte de las células tumorales y en la inmunidad a los protozoos. Los fagocitos mononucleares se unen a las células tumorales recubiertas de anticuerpos y parásitos como *Esquistosomas*, *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium spp* por parte de sus receptores Fc para IgG.⁴⁻⁷

La respuesta de fase aguda es una reacción inflamatoria sistémica a la infección o lesión. Se caracteriza por fiebre, taquicardia, shock y cambios en la concentración de algunas proteínas circulantes, como la proteína C reactiva y el fibrinógeno.⁴⁻⁷

Al menos tres productos secretados por los monocitos son importantes en esta respuesta: IL-1, TNF- α e IL-6. De manera general se resume a continuación:

IL-1 se cree que regula la fiebre mediante la estimulación de la liberación de prostaglandina E en el hipotálamo que restablece el centro termorregulador de este, también media el catabolismo acelerado de la proteína muscular y el balance negativo de nitrógeno que están asociados con la infección aguda y la inflamación.⁸⁻⁹

El TNF- α regula la síntesis de proteínas de fase aguda y es también un pirógeno endógeno. Además, se cree que es el responsable, en parte de la coagulación

intravascular diseminada e insuficiencia multisistémica visto en estado de shock endotóxico.⁸⁻⁹

IL-6 se ha implicado recientemente en la mediación de la respuesta de fase aguda ya que las concentraciones séricas de IL-6 se correlacionan con los niveles de proteína C reactiva y la fiebre en los pacientes con quemaduras graves. Los monocitos de sangre periférica son la principal fuente de IL-6, que es el principal inductor de la producción de proteínas de fase aguda en hepatocitos cultivados. Además de sus efectos sistémicos en la inflamación, la IL-1 y TNF- α también inducen efectos locales en los focos inflamatorios incluyendo:

1. El reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación.
2. La modulación de múltiples funciones de neutrófilos, tales como la degranulación y la generación de metabolitos reactivos de oxígeno.
3. La proliferación de los fibroblastos y aumento de la síntesis de colágeno por estas células.⁸⁻⁹

Los fagocitos mononucleares se infiltran en los tumores y son probablemente una de las principales defensas del huésped contra los tumores que surgen espontáneamente. Los fagocitos mononucleares utilizan ambos mecanismos de dependiente/independiente de anticuerpos para destruir las células tumorales.

Un gran número de estudios han documentado la naturaleza y el alcance de la heterogeneidad de monocitos, y han sugerido mecanismos por los que puede haber surgido esta heterogeneidad. Los monocitos han demostrado ser heterogéneos con respecto a las propiedades físicas tales como el tamaño y la densidad, la expresión de receptores de superficie y diversas propiedades funcionales. Tales diferencias han sido marcadas para subpoblaciones separadas de los monocitos de acuerdo a su 1) tamaño y volumen; 2) la densidad; 3) expresión de la proteína de superficie; 4) función, y 5) el contenido de enzima.⁵⁻⁷

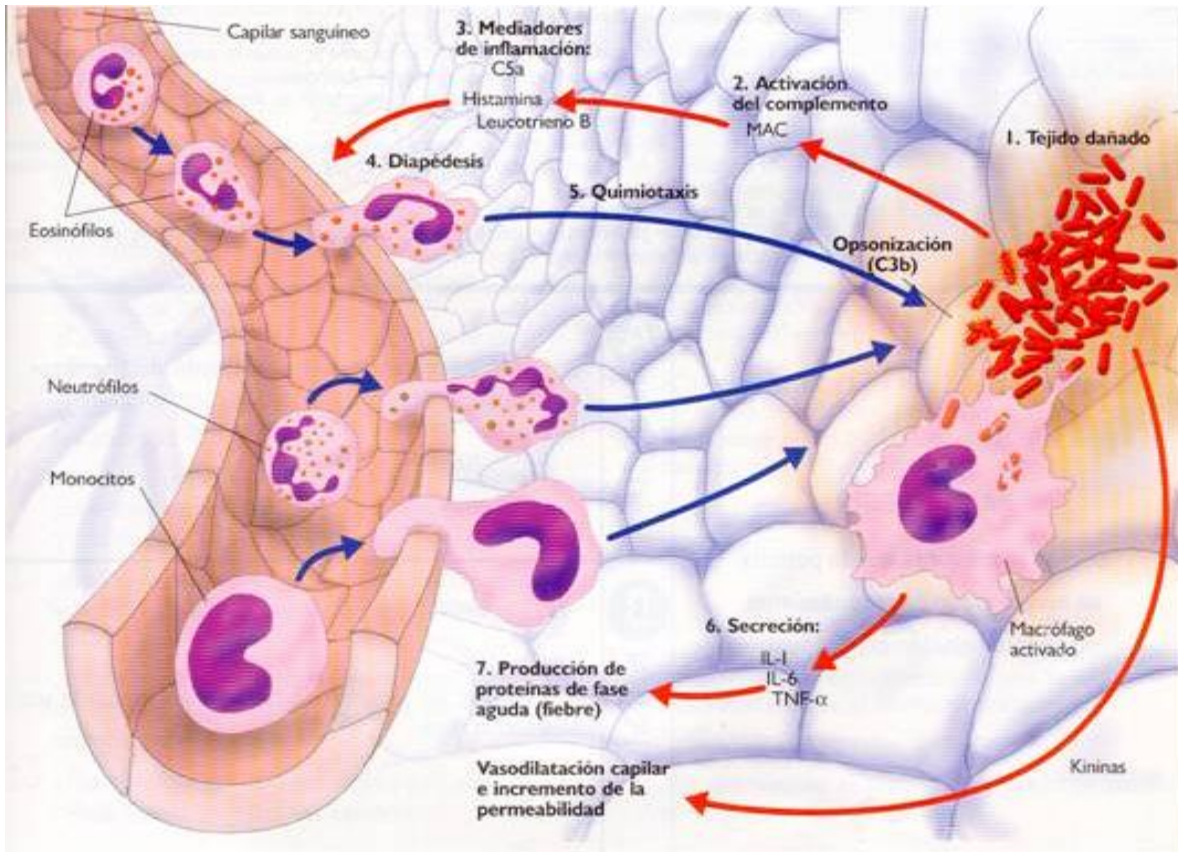


Figura 3. Esquema General de la reacción inflamatoria
 Mecanismos Inespecíficos (2014) Recuperado de:
<http://www.biologiasur.org/apuntes/inmunologia/mecanismos/inespecificos.html>

Se pueden distinguir dos subpoblaciones de monocitos humanos pueden ser identificados por los marcadores antigénicos CD14 y CD16. CD14 es el receptor más importante de endotoxina en monocitos humanos. Se sabe que participa en la activación de estas células, en especial en estados patofisiológicos a concentraciones relevantes de lipopolisacárido, este se une a la endotoxina por sí solo, pero la presencia del suero de la proteína de unión a lipopolisacárido mejora esta interacción 100 a 1000 veces.¹⁰

El número absoluto de moléculas de CD14 es de aproximadamente 3000-5000 sobre los neutrófilos, mientras que 110 000 moléculas de CD14 se expresan en monocitos en reposo. Existen también diferentes formas solubles de CD14 también existen, las cuales se puede encontrar en suero humano o en el sobrenadante del cultivo de monocitos y macrófagos.¹⁰

La síntesis, expresión y liberación de CD14 en monocitos puede ser alterado y regulada por citocinas, lipopolisacárido y otros mediadores biológicamente activos..¹⁰

3.2 Citocinas

Las fuentes celulares de las citocinas incluyen principalmente a monocitos/macrófagos, células dendríticas, además de células T, B fibroblastos, neutrófilos, células endoteliales, células cebadas etc. Los blancos celulares de diversas citocinas incluyen monocitos y macrófagos, células T, células B, neutrófilos, células hematopoyéticas de la series linfoide y mieloide, fibroblastos, células cebadas y eosinófilos.^{1,2, 11}

Los efectos de las citocinas incluyen la diferenciación, proliferación y activación de diversas células, la expresión de receptores celulares para un sin número de ligandos y la secreción de una gran diversidad de otros mediadores que incluyen prostaglandinas, factores de crecimiento y de diferenciación, inmunoglobulinas y otros, así como la liberación de los mismos receptores solubles. En conjunto, las citocinas participan en la inducción, expresión y modulación de las respuestas inmunitarias, en el desarrollo y regulación de las respuestas inflamatorias. En la tabla se agrupa algunas de las citocinas en función de su actividad predominante, aunque muchas de ellas pueden tener más de una función. Además cada día hay más evidencias de su participación en las funciones de los sistemas nervioso y endocrino.^{1,2, 11}

En la inmunidad natural, las citocinas efectoras son producidas principalmente por fagocitos mononucleares, y se denominan citocinas, las cuales son hormonas solubles con funciones efectoras tanto inmunorreguladoras y en las respuestas normal y patológicas. Las citocinas son responsables del reclutamiento de otras células inflamatorias, y los efectos sistémicos de la inflamación, como la fiebre.^{1,2, 11}

La producción de factores de crecimiento y su acción sobre el endotelio vascular indica su participación en la reparación tisular. Las citocinas interaccionan con

receptores específicos presentes en las membrana celulares, la mayoría poliméricos, algunos acoplados a proteínas G, donde se generan señales que se transducen al interior de las células, a través de una cascada de protein-tirosin-cinasa dentro de las cuales se incluye las cinasas Jak (Janus Kinases)cuyos substratos son los factores de transcripción STAT(single transducer and activator transcripton proteins), que a su vez son reguladores directos de las respuestas genómicas por citocinas.^{1,2, 11}

Citocina	Función
IL-6	Activa a las células T e induce su diferenciación en células citotóxicas (Tc). Induce la diferenciación de las células B en células plasmáticas, favoreciendo la secreción de anticuerpos IgG1
IL-12	Estimula en las células Th1, la síntesis y a liberación de IL-2 y de IFN. Activa a las células NK, incrementando su producción de IFN y su actividad citolítica.
TNF-a	Citotóxico para las células tumorales que sobre expresan el receptor TNFR; la muerte se induce por apoptosis. Estimulan los macrófagos la producción de óxido nítrico. Funciona como un potente quimioattractantes de neutrófilos. Activa la función de los macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células endoteliales y otras células

Tabla 4. Principales Citocinas producidas por el monocito/macrófago y su función

Obtenido de: Rojas E (2008) Inmunología de Memoria

Actividad	
Pro inflamatorias	IL-1, IL-6, TNF-a, IFN-Y, IFN-B
Promotoras del crecimiento y diferenciación	IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13
Factores de crecimiento Hematopoyético	IL-3, GM-CSF, IL-9,IL-11
Reguladoras de la actividad de los linfocitos	EGF, IFN-Y, TGF-B

Tabla 5. Grupo de citocinas en función de su actividad predominante.

Obtenido de: Rojas E (2008) Inmunología de Memoria

Aunque esta secuencia de eventos es más o menos general, cada citocina puede inducir la activación de diferentes cascadas de cinasas y diferentes factores de transcripción, ocasionando diferentes respuestas celulares.¹¹

3.2.1 Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α)

El Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina producida principalmente por macrófagos activados. William Coley a inicios del siglo utilizó extractos bacterianos con cierto éxito en el tratamiento de cáncer en pacientes terminales. Sin embargo, no fue hasta 1975 que la proteína responsable fue identificada y posteriormente recibió el nombre de factor de necrosis tumoral por Elizabeth Carswell.¹²⁻¹⁴

Ratones y conejos fueron tratados inicialmente con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) durante un periodo de 10 a 14 días, seguido por la administración de lipopolisacárido con la consiguiente liberación de TNF- α . Cuando los ratones con sarcoma inducido por metilcolantreno se trataron con sueros que contenía TNF- α , sus tumores se sometieron a necrosis hemorrágica y un estadio de regresión.¹²⁻¹⁴

Posteriormente cuando el gen humano fue clonado como cDNA, se encontró que este también se expresaba en *Escherichia coli*. Por lo tanto, grandes cantidades de TNF- α se hicieron disponible para su uso en investigación y clínica. El gen se localiza en el brazo corto del Cromosoma 6 cerca del locus HLA-B en el MHC. La posición de TNF- α en el MHC ha conducido a la especulación sobre el papel del gen de TNF- α en la etiología de enfermedades relacionadas con el MHC, especialmente aquellos con un componente inflamatorio o autoinmune como en el caso de la Diabetes Mellitus dependiente de Insulina o Lupus Eritematoso Sistémico.¹²⁻¹⁴

El TNF- α humano es una citocina con un peso molecular de 17 kDa que consiste en 157 aminoácidos con una pre-secuencia de 76 aminoácidos. El TNF- α se produce como una proteína transmembranal de 26 kDa con una cola transmembranal que se escinde adicionalmente por la enzima de conversión

metaloproteinasa. Tras la secreción como una proteína de 17 kDa soluble que forma un trímero, interactúa con dos receptores diferentes: el receptor de TNF- 1 (p55) y el receptor de TNF- 2 (p75).¹²⁻¹⁴

El procesamiento del precursor TNF- α por la metaloproteinasa ha sido recientemente objeto de intensa investigación, así como los inhibidores de metaloproteinasas ya que estos pueden tener un potencial terapéutico en enfermedades en las que el TNF- α se sabe que tiene un papel fisiopatológico.¹²⁻¹⁴

El TNF- α es una citocina producida principalmente por monocitos y macrófagos, sin embargo, otras células también la pueden producir: linfocitos, mastocitos, neutrófilos, queratinocitos, astrocitos, células de paneth, células tumorales etc.¹²⁻¹⁴

Muchos estímulos pueden inducir la producción de TNF- α tales como el lipopolisacárido, diversas citocinas (incluyendo IL-1, GM-CSF y TNF- α). Así mismo es una citocina pleiotrópica con numerosos efectos biológicos incluyendo citotoxicidad, modulación del crecimiento y diferenciación celular. El interés en las actividades antes mencionadas se ha visto en cierta medida ensombrecido por la capacidad del TNF- α para incitar una respuesta inflamatoria y actuar como un agente inmunomodulador, principalmente sus actividades citotóxicas y proinflamatoria son las que han atraído un mayor interés de investigación.¹²⁻¹⁴

El TNF- α activa a los macrófagos para mejorar tanto la actividad fagocítica y la producción de especies reactivas del oxígeno, también puede inducir la apoptosis y la proliferación de células T, la pérdida de peso y la resorción ósea.¹²⁻¹⁴

La citotoxicidad del TNF- α en una gama de células malignas humanas y murinas es la propiedad que ha sostenido el mayor potencial terapéutico en la última década. Sin embargo, el modo de acción celular de la citotoxicidad de TNF- α no se entiende totalmente.¹²⁻¹⁴

Las terapias de anti- TNF- α se han introducido para el tratamiento de artritis reumatoide moderada a severa, enfermedad de Crohn y otras enfermedades

inflamatorias crónicas. Las terapias aprobadas son anticuerpos monoclonales o moléculas inhibitoras que bloquean la actividad de TNF- α .¹²⁻¹⁴

El fundamento terapéutico detrás de su desarrollo es la reducción de acciones pro-inflamatorias de la citocina. El TNF- α , que se encuentra elevada con otras citocinas en las lesiones autoinmunes. Pero el TNF- α no es sólo una citocina proinflamatoria. También se ha propuesto para ser una molécula inmunorreguladora que pueden alterar el equilibrio de las células T reguladoras.

Lo que es normal o incluso a niveles elevados de actividad de TNF- α desempeña un papel esencial como un regulador inmune que disminuye o previene la autoinmunidad. Si ese fuera el caso, el bloqueo de los efectos del TNF- α puede llegar a ser contraproducente en ciertas formas de autoinmunidad o en etapas seleccionadas de la enfermedad.¹²⁻¹⁴

Al tener papeles fisiológicos duales, como pro-inflamatoria e inmunoregulatoria, podría explicar por qué en terapias anti-TNF- α se presenta un cuadro complejo: las terapias son eficaces para la mayoría de los pacientes con artritis reumatoide autoinmunes con la destrucción final del órgano debido a la inflamación, pero empeoran o inducen autoinmunidad para una minoría significativa de estos pacientes. Ese tipo de evento adverso es consistente con numerosos estudios en animales y humanos que muestran que la reducción de la actividad de TNF- α agrava o inicia ciertas formas de autoinmunidad.¹²⁻¹⁴

3.2.2 Interleucina 12 (IL-12)

La interleucina-12 (IL-12) es una citocina que juega un papel esencial en la interacción entre los grupos de la inmunidad innata y adaptativa. Es producida por células fagocíticas, células B, células dendríticas y posiblemente otras células accesorias siguiendo el encuentro con agentes infecciosos.¹⁵⁻¹⁶

La IL-12 actúa sobre células T y NK generando y mejorando su actividad citotóxica, así como su proliferación y la producción de citocinas, especialmente IFN- γ . IL-12 es también la principal citocina responsable de la diferenciación de

linfocitos T Helper 1, que son potentes productores de IFN- γ , este a su vez, tiene un poderoso efecto sobre la mejora de la capacidad de los fagocitos y las células dendríticas para producir IL-12 actuando por lo tanto como un potente mecanismo de retroalimentación positiva que conduce a una respuesta fuerte y defensiva contra patógenos intracelulares, y que representa un mecanismo potencialmente peligroso en una producción incontrolada de citocinas, como en choque o inducción de la autoinmunidad.¹⁵⁻¹⁶

IL-12 es una molécula heterodimérica compuesta de una cadena α - (subunidad p35) y una cadena β (subunidad p40) unidas por un puente disulfuro para formar el heterodímero biológicamente activo con un peso molecular de 74 kDa.¹⁵⁻¹⁶

Los receptores de IL-12 (IL-12R) se expresa principalmente en células T activadas y células NK. La expresión de IL-12R en otros tipos de células también se ha demostrado. El cDNA para dos subunidades de IL-12R se ha clonado a partir de células T humanas y de ratón y se han designado como IL-12R β 1 y IL-12R β 2.¹⁵⁻¹⁶

Ambas subunidades pertenecen al subgrupo gp130 de la superfamilia de los receptores de citocinas, siendo del tipo I de glicoproteínas transmembrana, con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa (IL-12R β 1) y 130 kDa (IL-12R β 2). En la superficie celular, cada uno de los dos subunidades recombinantes de IL-12 se produce como dímeros/oligómeros, su coexpresión de IL-12R β 1 y IL-12R β 2 es necesaria para la generación de sitios de unión de alta afinidad humanos de IL-12.¹⁵⁻¹⁶

Tanto en humanos y ratón, la subunidad de IL-12R β 2 parece funcionar como el componente de transducción de señales del complejo receptor de alta afinidad. La evidencia reciente sugiere que la expresión de proteínas IL-12R β 2 tanto en humano y ratón pueden estar confinadas a las células Th1 y que su expresión se correlaciona con la capacidad de respuesta de IL-12 en estas células.¹⁵⁻¹⁶

La IL-12 tiene una potente actividad antitumoral basada en la inducción de IFN- γ y la activación de células efectoras tales como células T CD8 + y células NK.

Juega un papel importante in vivo en la regulación de respuestas inflamatorias, así como en resistencia innata a la infección, y la inmunidad adaptativa. Se requiere para la resistencia eficaz a muchos agentes patógenos, bacterias y parásitos intracelulares en particular donde las respuestas Th1 inducida por IL-12 son muy eficaces.¹⁵⁻¹⁶

Los pacientes con deficiencias genéticas en la expresión de la cadena p40 de IL-12 o IL-12R β 1 son susceptibles a las infecciones bacterianas, particularmente por cepas de *Mycobacterium* y *Salmonella*.¹⁵⁻¹⁶.

En los modelos tumorales, el tratamiento con IL-12 tiene a menudo un efecto considerable en tumores trasplantables, al inhibir el establecimiento del tumor o la regresión de la inducción de tumores establecidos, principalmente en los tumores inducidos por carcinogénesis química, y en los tumores que surgen espontáneamente en ratones modificados genéticamente.¹⁵⁻¹⁶

Los mecanismos de la acción anti-tumoral de IL-12 son complejos. La IL-12 puede utilizar los mecanismos efectores tanto de la resistencia innata y la inmunidad adaptativa para mediar una resistencia anti-tumoral. Así, el reconocimiento del antígeno específico de tumor no siempre puede ser necesario para los efectos de la IL-12. Las células efectoras requeridas para el efecto anti-tumoral de la IL-12 incluyen NK, NKT, y células T tanto CD8 + y CD4 +.¹⁵⁻¹⁶

Otros tipos de células que pueden ser también objetivo de IL-12, de forma indirecta, pero posiblemente también directamente, incluyen células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, y células endoteliales. Los linfocitos citotóxicos (T CD8 +, NK, las células NKT) están implicados a menudo en mecanismo de acción de IL-12, pero su actividad citotóxica en algunos casos no es necesaria para su función.¹⁵⁻¹⁶

En la mayoría de los modelos experimentales, el efecto anti-tumoral de IL-12 requiere de la inducción de IFN- γ . La capacidad de la IL-12 para inducir una inmunidad específica de antígeno se basa principalmente en su capacidad de inducir o aumentar las respuestas de Th1 y linfocitos T citotóxicos.¹⁵⁻¹⁶

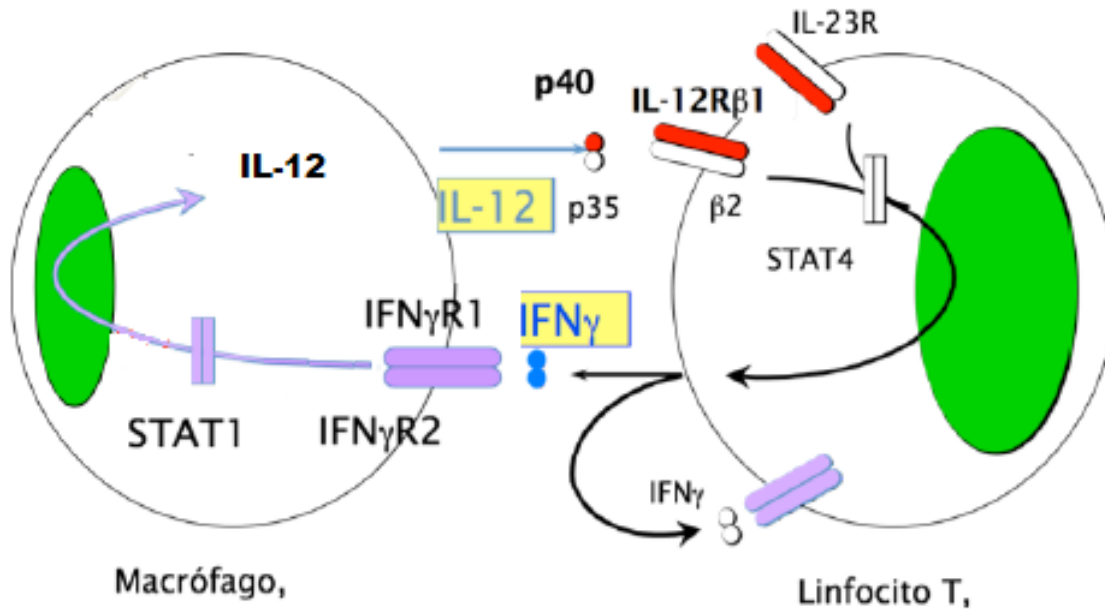


Figura 4. Representación del eje IFN- γ /IL-12/IL-23
Ramírez A (2010) Mutaciones que conducen al desarrollo de infecciones micobacterianas por susceptibilidad Mendeliana

Debido a esta capacidad, IL-12 tiene una actividad adyuvante, aunque, especialmente en dosis altas, esta actividad inmunoestimulante puede ser prevenida por una potente inmunosupresión secundaria a las respuestas inflamatorias inducidas por IL-12. Además del aumento de la respuesta inmune celular, IL-12 mediante la inducción de las respuestas Th1 también aumenta la producción de opsonización y la fijación de complemento mediante anticuerpos de clase IgG que se ha demostrado que tienen actividad anti-tumoral in vivo. Debido a su capacidad de inducir respuestas inflamatorias, su administración a animales produce una considerable toxicidad que recuerda a los síndromes inflamatorios localizados o sistémicos asociados a la respuesta a infecciones graves.¹⁵⁻¹⁶

Los datos prometedores obtenidos en los modelos pre-clínicos de inmunoterapia antitumoral han planteado muchas esperanzas de que la IL-12 pudiera ser un poderoso agente terapéutico contra el cáncer. Sin embargo, la excesiva toxicidad clínica y la respuesta modesta clínica en los ensayos clínicos reportados hasta ahora han humedecido mucho este entusiasmo.¹⁵⁻¹⁶

Los protocolos clínicos que minimizan la toxicidad sin afectar el efecto anti-tumor de IL-12 necesitan ser planificados. En particular, algunos ensayos clínicos se han realizado aún para analizar el uso de IL-12 como adyuvante en vacunas contra el cáncer, una utilización de esta citocina que todavía parece prometedor y en el que la toxicidad de la molécula es de menos interés.¹⁵⁻¹⁶

3.2.3 Interleucina 6 (IL-6)

La Interleucina 6 (IL-6) fue originalmente conocida por diversos nombres tales como: Interferón- γ , factor 26K, factor estimulante de células B, factor crecimiento de hibridoma, factor estimulante de hepatocitos, factor hematopoyético y factor de diferenciación de células T, cada nombre refleja una actividad biológica diferente controlada por la misma proteína. Ahora está claro que la IL-6 juega un papel central en diversos mecanismos en la defensa del huésped, tales como la respuesta inmune, hematopoyesis, y reacciones de fase aguda.¹⁷⁻¹⁹

De acuerdo con su pleiotropía funcional, se ha implicado en la patología de muchas enfermedades incluyendo mieloma múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Castlman, SIDA, glomerulonefritis proliferativa etc.¹⁷⁻¹⁹

Dada la asociación de valores de IL-6 fuera de los rangos y trastornos clínicos, existen teorías de alto interés para la comprensión de los mecanismos bioquímicos controlados por IL-6, y en el desarrollo de agonistas y antagonistas funcionales como potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento enfermedades relacionadas con IL-6.¹⁷⁻¹⁹

En individuos sanos, la concentración en suero de IL-6 es por lo general menor a 10 pg/mL. Una teoría muy extendida es que la producción local y la acción de las

citocinas puede ser una forma económica para que el cuerpo utilice la misma citocina para efectuar diferentes actividades biológicas.¹⁷⁻¹⁹

El hallazgo relativamente reciente de las citocinas distintas que muestran actividades biológicas superpuestas tienen sistemas de receptores que se componen de un ligando único, con una baja afinidad de unión de la cadena α , la transducción de alta afinidad convertir la cadena β ha sido un importante paso adelante en nuestra comprensión de la citocinas acción.¹⁷⁻¹⁹

Por ejemplo, IL-6, factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), IL-11 y la cardiotrofina 1-(CT-1) comparten una cadena P llamada gp130. De manera similar, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, e IL-15 comparten la subunidad (p64) del receptor de IL-2 e IL-3, IL-5 Estas subunidades del receptor compartido en parte, proporcionar una base molecular para la redundancia funcional de las citocinas.¹⁷⁻¹⁹

El gen IL-6 está localizado en el cromosoma 7p21 y 5 en los genomas humanos y de ratón, respectivamente. Los genes de humano, ratón, rata IL-6 se han clonado y secuenciado, y todos contienen cuatro intrones y cinco exones.¹⁷⁻¹⁹

La Interleucina-6 es el principal factor implicado en la respuesta de fase aguda, la inducción de la síntesis de la proteína C-reactiva (PCR) y otros reactivos de fase aguda. Teniendo en cuenta el papel de la IL-6 en la regulación de la PCR, el uso combinado de los niveles de PCR e IL-6 como indicadores de inflamación pueden proporcionar una mejor predicción de riesgo asociado con la inflamación que el uso de cualquiera indicador solo. Mientras que el TNF- α determina la fuerza, la eficacia, y la duración de las reacciones inflamatorias al oponerse al papel de la IL-10. Diferencias interindividuales en la regulación de TNF- α pueden ser críticos respecto al resultado final de una respuesta inflamatoria..¹⁷⁻¹⁹

3.2.4 Técnicas de Medición

Actualmente existen diversas técnicas para la determinación de citocinas entre ellas se encuentra:

- 1- La PCR-TR la cual mide el nivel de expresión a nivel de *mRNA*²⁰⁻²¹
- 2- *ELISA*²² que mide principalmente las citocinas en sobrenadantes de cultivos celulares.
- 3- Citometría de flujo la cual realiza la determinación de citocinas intracelulares

La citometría de flujo al ser una técnica multiparamétrica que permite medir la funcionalidad y cuantificar el número de células productoras de citocinas; para la cuantificación de citocinas se requiere el uso adicional de soluciones CBA (Cytometric Bead Array) para realizar una curva estándar.²³⁻²⁷. A continuación se hace un resumen de sus principales componentes

3.3 Citometría de Flujo

3.3.1 Introducción

Los avances en los tratamientos de los pacientes con frecuencia se encuentran estrechamente relacionados al desarrollo de métodos de análisis cuantitativos. La citometría de flujo es una metodología importante ya que puede ser aplicada a células individuales permitiendo a los investigadores obtener información acerca de las propiedades funcionales de estas, lo cual permite evaluar las diferencias en una preparación celular heterogénea o entre células de muestras separadas.²⁸

Los avances en la instrumentación, reactivos y anticuerpos fluorescentes han contribuido al enorme crecimiento de las aplicaciones clínicas de la citometría de flujo y la expansión mundial de laboratorios que utilizan esta tecnología desde sus inicios a finales de 1960.²⁸

La disponibilidad de una gran variedad de anticuerpos monoclonales finalmente conllevó a la vanguardia a la Citometría de Flujo. El brote del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), provocó un aceleramiento en la aceptación de citómetros de flujo como instrumentos de laboratorio de rutina, debido a la gran

demanda de pruebas auxiliares: la relación de células T supresoras como técnica de detección temprana de la epidemia del SIDA.²⁸

Sin embargo, el citómetro de flujo ha sido adoptado rápidamente por los laboratorios de hematología y oncología como una herramienta rutinaria ya que los anticuerpos monoclonales son más específicos del linaje celular o el grado de desarrollo para las células hematopoyéticas.²⁸

El mérito principal de la Citometría de Flujo es su capacidad de medir simultáneamente varios parámetros (dispersión de luz, dispersión lateral, y fluorescencia), y los datos así obtenidos se pueden almacenar para su posterior análisis. Además el *Sorting* permite el estudio de los grupos celulares separados sin necesidad de técnicas tediosas de aislamiento.²⁹⁻³²

Ventajas	Desventajas
Análisis de un número estadísticamente significativo de células (1000 a más de 100.000 células). Múltiples marcajes de una sola célula. Análisis de alto número de partículas en corto tiempo (5.000 eventos /seg.). Alta sensibilidad y objetividad. Medidas separadas de cada célula (no sólo el promedio). Medidas cuantitativas: discriminación de las células según la cantidad de marcador. Múltiples parámetros: define subpoblaciones complejas. Miles de células por segundo.	Poca información morfológica de la célula No proporciona información de la localización celular en un tejido Puede analizar solamente una cantidad limitada de material (10 millones de células / hora) Necesita suspensión de células individuales. Costos de la tecnología Método destructivo. Incapacidad de visualizar las células que se analizan.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de la técnica citometría de flujo
 Citometría de Flujo (2012) Modificado de
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/citometria.htm>

En la actualidad algunas de sus aplicaciones son

- I. Hematología: tipificación y conteo de células, reticulocitos y análisis de medula ósea.
- II. Farmacología: estudios de cinética celular
- III. Oncología: Diagnostico y pronostico ,monitores de tratamientos

- IV. Microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico ,estudios de sensibilidad a los antibióticos
- V. Genética: Cariotipo y diagnóstico de portador y prenatal.
- VI. Inmunología: subpoblaciones de linfocitos ,tipaje tisular, Receptores de Quimiocinas y Determinación de Citocinas Intracelulares

3.3.2 Instrumentación

El citómetro de flujo posee una capacidad versátil para medir varios parámetros simultáneamente, estos incluyen propiedades físicas de las células (por ejemplo, tamaño celular y granularidad citoplasmática), así como diferentes antígenos en la superficie de membrana y/o citoplasmáticos de células individuales, las cuales se encuentran en suspensión.²¹⁻²⁴

Los antígenos de superficie y citoplasmáticos se detectan por medio de anticuerpos conjugados con fluorocromos. Estos antígenos son las propiedades extrínsecas de la célula, mientras que las propiedades físicas de la célula son las propiedades intrínsecas, ya que no se añaden reactivos exógenos para su detección. Estos parámetros se miden a través de un sistema óptico, y la señal de luz generada se registra en un sistema electrónico. El sistema del ordenador es responsable del almacenamiento de datos, gating y la representación gráfica en una pantalla.²⁹⁻³²

Sistema de Transporte Líquido

El flujo en un citómetro de flujo comienza en un depósito con líquido, denominado líquido envolvente, el cual proporciona el soporte vehicular para dirigir las células a través del haz de láser. El depósito de líquido envolvente está presurizado, para conducirlo a través de un filtro para eliminar partículas extrañas.²⁹⁻³²

Esta corriente de líquido envolvente es generalmente una disolución amortiguadora de una composición adecuada para los tipos de partículas que se analizan. Para los leucocitos esta normalmente es una solución salina de fosfatos, otras células u otras partículas pueden tener otras preferencias.²⁹⁻³²

La suspensión de células se aspira por medio de presión diferencial de aire o vacío en la tubería que conduce a la cámara de flujo. En la cámara de flujo, que es una boquilla cónica, la muestra está rodeada por una corriente libre de células con líquido envolvente produciendo una configuración de flujo laminar. El líquido envolvente exterior fuerza a las células en la muestra alineando una por una.²⁹⁻³²

Cuando las muestras salen de la cámara de flujo a través de un orificio estrecho, la velocidad de flujo se vuelve notablemente elevada (alrededor de 1 a 10 m / s). El flujo de células se reúne entonces a la fuente de luz en el punto de intercepción de la luz en la zona de detección, y señales eléctricas u ópticas se generan.²⁹⁻³²

Sistema Óptico

Actualmente, todos los citómetros de flujo utilizan el láser óptico como fuente de luz, y óptica en lugar de señales eléctricas generadas. Los láseres pueden entregar luz monocromática intensa, coherente (ondas de luz que son paralelos y unidireccional), lo que resulta en baja divergencia y el alto brillo de las señales generadas.²⁹⁻³²

El láser de argón ionizado produce 15 mW con longitud de onda de 488 nm. Este haz proporciona un campo de visualización que es lo suficientemente grande para que la mayoría de células estén completamente iluminadas dentro del haz, cuando lo interceptan y a su vez proporciona excitación relativamente uniforme a través de la corriente de muestra. A medida que el haz del láser enfocado interactúa con una célula que tiene marcadores fluorescentes, se crean al mismo tiempo señales luminosas dispersas y de fluorescencia.²⁹⁻³²

Sistema Electrónico

Después de viajar a través de todos los filtros y lentes, los fotones de luz inciden en los detectores y se convierten en electrones (efecto fotoeléctrico). Los detectores incluyen tubos fotomultiplicadores, que se utilizan comúnmente para el lado de la dispersión frontal y señales de fluorescencia, y de fotodiodos, que se utilizan para señales de absorción, la extinción, y la dispersión frontal.²⁹⁻³²

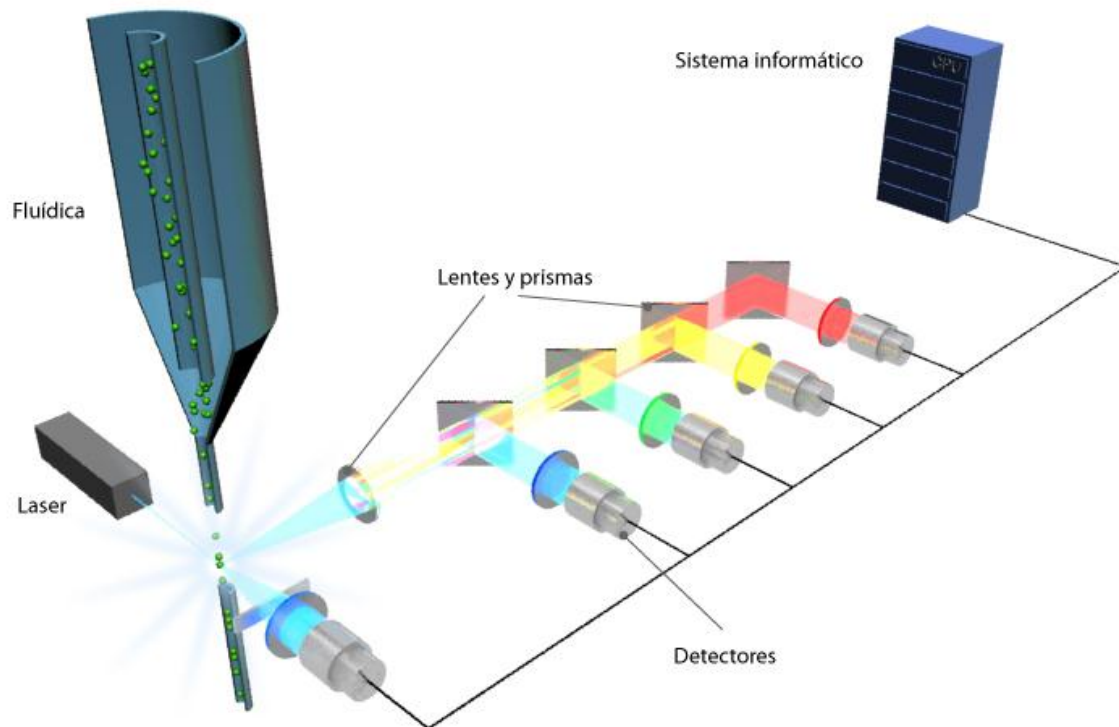


Figura 5. Estructura Fundamental de un Citómetro de Flujo
 Díaz V (2010) Citometría de Flujo. Obtenido de http://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104_a_tecnica_citometra

Señales Fluorescentes

Las señales de dispersión de luz se utilizan generalmente para el cribado. Sin embargo, la caracterización de las células se basa principalmente en su superficie y antígenos citoplasmáticos, que son detectados a través de una señal óptica especial: la señal fluorescente.³³

Las señales fluorescentes se generan a través de los anticuerpos marcados con fluorocromos que reaccionan específicamente con los antígenos de diferentes células, facilitando así la identificación del linaje de células, etapa de desarrollo, y los grupos especiales de células tumorales.³³

Un fluorocromo es una molécula que posee en su estructura dobles enlaces conjugados y que en respuesta a una estimulación por un fotón emite otro fotón de longitud de onda superior a la del fotón excitador. Cada fluorocromo se caracteriza por un espectro de excitación y de emisión. Los fluorocromos más ampliamente utilizados son los siguientes.³³

Nombre	Excitación Max (nm)	Emisión Max (nm)	Color
Ioduro de Propidio	488	620	Rojo
<i>Peridin-Clorofila (Per-CP)</i>	488	670	Rojo
Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	494	517	Verde
Ficoeritrina (PE)	495	576	Naranja
Rodamina	545	575	Naranja
Rojo de Texas	596	615	Rojo
Ficocianina	620	655	Rojo
Aloficocianina (APC)	620	660	Rojo
Cianina 5	633	670	Rojo

Tabla 7. Longitud de onda y color de los principales fluorocromos utilizados en Citometría de Flujo Nguyen (2007) FlowCytometry in Hematopathology

En un láser, los electrones se excitan por medio de la energía de un voltaje aplicado. La diferencia entre los niveles de energía de los orbitales de un fluorocromo estrictamente determinará en que color de la luz, en particular puede absorber. Cuando los electrones caen de vuelta de sus estados excitados a sus niveles basales, se emite luz de un color que depende de la diferencia en los niveles de energía entre los dos orbitales. Debido a que la energía no se crea ni se destruye, siempre se pierde en cierta medida, en forma de calor, el color de la luz emitida cuando un electrón vuelve desde un estado excitado a su estado fundamental es siempre de una energía algo menor (es decir, de una longitud de onda más larga) que la energía absorbida en el aumento del electrón al orbital más alto en el primer lugar.²⁹⁻³³

La luz emitida cuando un electrón cae de un estado excitado a su estado fundamental orbital se llama fluorescencia. El tiempo requerido para que tenga

lugar la fluorescencia es de aproximadamente 10 nano segundos después de la activación inicial del fluorocromo por el haz de excitación.²⁹⁻³³

Para llevar a cabo la separación de colores, se utilizan espejos dicroicos y filtros espectrales, que reflejan o transmiten longitudes de onda específicas. Debido a que las longitudes de onda de emisión del fluorocromo pueden ser muy amplias, también es necesario eliminar la superposición de fluorescencia no deseada ajustando apropiadamente circuitos del instrumento de compensación o mediante el uso de software de compensación.²⁹⁻³³

Sistema Informático

El citómetro de flujo puede ser interconectado con un sistema informático externo que realiza tres funciones importantes: Almacenamientos, gating y representación gráfica. El Gating se realiza para aislar electrónicamente este grupo especial de células para el análisis, evitando la difícil tarea de purificar la población de células por medios biológicos. Dependiendo de la capacidad del software, varios "gate" pueden ajustarse de manera que la información puede ser recogida en poblaciones de células.²⁹⁻³³

Varios programas informáticos se encuentran disponibles para el análisis de los datos de citometría de flujo. Si bien cada uno de ellos es único en la forma de procesar los datos, las estrategias generales son similares.²⁹⁻³³

3.3.3Análisis de Datos

Scattergram

Esta es una representación gráfica de puntos como se determina por dos parámetros relacionados a lo largo de los ejes X & Y. Por ejemplo, se puede trazar FSC vs SSC cada punto representa un solo evento. Sobre la base del tamaño célula y granularidad citoplasmática, el diagrama de dispersión por lo general muestra tres grupos distintos de células en muestras de sangre periférica.²⁹⁻³³

Histograma individual

Este gráfico se usa normalmente para mostrar el número de células (eje y) frente a la intensidad de fluorescencia (eje x). Cuando las células se tiñeron con un anticuerpo marcado con un fluorocromo, un solo histograma proporciona los porcentajes de poblaciones positivas y negativas.²⁹⁻³³

Intensidad de Fluorescencia Media

La Intensidad de Fluorescencia Media es un parámetro que permite relacionar la cantidad de moléculas expresadas en cada célula analizada en el citómetro; debido a que el brillo de los fluorocromos acoplados a los anticuerpos se capta como mayoritario, en la medida que dicho anticuerpo se acopla a más moléculas en la superficie de la célula interrogada por el láser durante la adquisición por citometría.³⁴⁻³⁸

Este parámetro permite conocer el nivel de expresión de los marcadores por célula, y de esta manera, conocer el comportamiento de la población a través del cambio en la intensidad de la Fluorescencia de una población de células. En caso de que las tinciones de toda la población sean con diferentes niveles de anticuerpo, sería apropiado reportar valores de IFM sobre la base de algún tipo de control. Para demostrar un aumento o disminución en la expresión de este marcador.³⁴⁻³⁸

4. Tinciones de citocinas Intracelulares

El uso de múltiples tinciones analizadas por citometría de flujo permite una evaluación objetiva, así como la identificación simultánea de diferentes subconjuntos de células. Con el fin de alcanzar niveles detectables de las células productoras de citocinas por lo general se necesita un mínimo de hasta 4 horas de incubación después de la estimulación con activadores, junto con la presencia de agentes que bloquean específicamente la secreción de proteínas.³⁶⁻³⁹

En los diferentes trabajos revisados existen dos principales métodos para la obtención de células monocíticas: el uso de sangre con anticoagulante (citrato de sodio) el cual representa un sistema in vitro que conserva tanto como sea posible el medio de interacción entre el LPS y las células, tal como ocurre in vivo, empleando una solución de lisis para eritrocitos y la obtención de células monocíticas obtenidas por gradiente de densidad en medio de cultivo suplementado. Se recomienda el uso de diferentes activadores tales como LPS, PMA, Fito-Hematoaglutinina (PHA), IFN- γ , la toxina de *S.aureus* y sus concentraciones oscilan entre los 0.05 ug/mL hasta 1 ug/mL. Así mismo se emplean diferentes inhibidores de secreción de proteínas entre los que destacan Brefeldrina A o Monensina:³⁶⁻³⁹

Actualmente no existe un protocolo estandarizado para medir la producción de citocinas en monocitos, la casa comercial Becton Dickinson proporciona diferentes alternativas para su cuantificación en linfocitos.⁴⁰

Por lo cual el objetivo de dicho trabajo es comparar dos técnicas de tinción intracelular de citocinas en células monocíticas por citometría de flujo, para su implementación en la rutina de pacientes pediátricos, a continuación se hace una reseña de los principales reactivos utilizados y su función dentro del procedimiento

4.1 Separación por Gradiente

Para conseguir separaciones más eficaces de células se centrifuga la muestra sobre un medio de densidad intermedia entre los dos tipos de células que se quieren separar. Utilizando Lymphoprep el cual tiene una densidad de 1.077 g/mL que es idéntica a la de linfocitos y monocitos es posible recuperar las células mononucleares de sangre periférica.⁴¹⁻⁴²

El Lymphoprep es una combinación de un polímero de sacarosa de alto peso molecular y un compuesto orgánico. Los granulocitos y eritrocitos poseen una mayor densidad y cuando se centrifuga la sangre periférica en dicho gradiente,

pasan a través de este formando un paquete en el fondo del tubo. Las plaquetas tienen una densidad menor y permanecen en la fracción plasmática y los mononucleares se localizan en la interface.⁴¹⁻⁴²

4.2 Cultivo Celular

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Los cultivos en suspensión suelen coincidir con los de aquellas células que "in vivo" son circulantes, en general células sanguíneas. El gran interés que tiene el cultivo de células sanguíneas principalmente en linfocitos ha extendido notablemente la caracterización de los cultivos en suspensión.⁴³⁻³⁶

Los componentes más significativos de la fase gaseosa son el oxígeno y el dióxido de carbono. Las necesidades de oxígeno para la mayor parte de los cultivos celulares son cubiertas con la tensión atmosférica.⁴³⁻³⁶

El dióxido de carbono juega un complejo papel en el medio debido a que influye la cantidad de CO₂ disuelto, el pH y la cantidad de iones HCO₃⁻. Cada medio tiene una concentración recomendada de bicarbonato y tensión de CO₂ para alcanzar el pH correcto. Sin embargo, se emplean otras sustancias amortiguadoras en la formulación de muchos medios en la actualidad, lo que permite una estabilidad superior del pH en el medio, así como una mayor capacidad amortiguadora por ejemplo HEPES, Tricina etc.⁴³⁻³⁶

El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es de 7,4 aunque existen pequeñas variaciones. El indicador de pH que se suele emplear es rojo fenol, que presenta color rojo a pH 7,4, naranja a pH 7,0, amarillo a pH 6,5, azul-rojo a pH 7,6 y púrpura a pH 7,8.⁴³⁻³⁶

La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, de ahí la importancia de un buen control de ésta en la incubación. Influye asimismo

en el pH del medio, por lo que se recomienda o bien ajustar el pH a 0,2 unidades por debajo del óptimo, a temperatura ambiente, o bien preparar el medio completo, incluso suero, dejar equilibrar en la estufa y después ajustar el pH, antes de añadirlo al cultivo.⁴³⁻³⁶

La viscosidad del medio viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento. Sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a más viscosidad).⁴³⁻³⁶

La principal dificultad para el establecimiento de las líneas celulares es el de obtener medios nutritivos adecuados que sean capaces de reemplazar al medio "natural" como extractos embrionarios, hidrolizados de proteína o sueros.⁴³⁻³⁶

- I. Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10%).
- II. RPMI 1640. Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados

Es necesario suplementar el medio basal con los aminoácidos esenciales. Asimismo se suplementa con otros aminoácidos, pues los requerimientos pueden variar de una célula a otra. Un suplemento común es el de glutamina, a 2 mM final, aunque hay algunas líneas celulares pueden usar el glutamato. La glucosa es la fuente de energía en muchos medios. Metabolizada preferentemente vía glucólisis hacia piruvato que puede ser convertido en lactato o acetoacetato que entra el ciclo de Krebs, y genera CO₂.⁴³⁻³⁶

Las hormonas y factores de crecimiento en los medios no definidos suele aportarlos el suero. Los tipos de suero empleados son suero de ternera, suero bovino fetal, suero de caballo y suero humano. El más usado es el suero de ternera, mientras que el suero bovino fetal es usado en líneas más exigentes, y el suero humano en líneas humanas. La utilización de suero es problemática pues a pesar de que la composición del suero es conocida, existen gran cantidad de

componentes presentes en cantidades variables en éste que pueden influir notablemente en el cultivo.⁴³⁻³⁶

4.3 Brefeldrina A (BFA)

La BFA es una lactona macrocíclica sintetizado a partir de palmitato (C6) por una variedad de hongos. Aunque inicialmente se aisló y caracterizó como un antibiótico y antiviral, la utilidad de BFA para los biólogos celulares comenzó con el reconocimiento de que las células tratadas con BFA, inhibían la secreción de la proteína en una primera etapa en la vía secretoria. Es comúnmente utilizado para mejorar las señales de tinción intracelular de citocinas mediante el bloqueo de los procesos de transporte durante la activación celular. BFA conduce a la acumulación de la mayoría de las citocinas en el Retículo E/Complejo Golgi. Las condiciones óptimas para la utilización dependen del tipo de célula y del tiempo. Por lo general, los inhibidores de la proteína de transportes se incluyen en los medios de activación de células in vitro durante 4-24 horas antes de su cultivo.⁴³⁻³⁶

4.4 Activadores

El lipopolisacárido es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram-negativa, se localiza en la capa externa de la membrana y en cepas no capsuladas, expuesta en la superficie celular. Dentro de las bacterias Gram-negativas, los lipopolisacáridos de membrana protegen a la bacteria contra la acción de las sales biliares y antibióticos lipófilos.⁴⁹⁻⁵¹

Los lipopolisacáridos son endotoxinas estables al calor y han sido reconocidos como un factor clave en el shock séptico (septicemia) en los seres humanos y en la inducción de una fuerte respuesta inmune en células normales de mamíferos. El resto del lípido A se ha identificado como crítico para la actividad de endotoxina de lipopolisacárido.⁴⁹⁻⁵¹

Los Lipopolisacáridos están compuestos de un lípido hidrofóbico (un lípido, que es responsable de las propiedades tóxicas de la molécula), una cadena de

polisacárido núcleo hidrófilo, y una cadena antigénica O hidrofílica. En la mayoría de los casos, las cadenas O específicas están construidos de unidades repetitivas de oligosacáridos que presentan una diversidad estructural específica de cepa.⁴⁹⁻⁵¹

La endotoxina purificada se denomina generalmente como lipopolisacárido o LPS, para distinguirla de la forma natural de la membrana celular. La porción de núcleo de la cadena de polisacárido es común a LPS a partir de cepas bacterianas silvestres y mutantes.⁴⁹⁻⁵¹

El receptor para el lipopolisacárido activo ha sido identificado como el complejo receptor de CD14/TLR4/MD2, que promueve la secreción de citocinas proinflamatorias incluyendo factor de necrosis tumoral- α y la Interleucina-1. Mientras que el componente lípido A es principalmente responsable de la activación de la respuesta inmune.⁴⁹⁻⁵¹

4.5 Viabilidad Celular

La determinación de la viabilidad celular es importante en el cultivo de tejidos y estudios de citotoxicidad, y hay varios ensayos de viabilidad que utilizan la exclusión de ciertos colorantes por las membranas celulares en vivo. Hay varios problemas con estos procedimientos de tinción de rutina, que limitan su utilidad. Por ejemplo la exclusión de azul tripán es la prueba más común para la viabilidad celular, es algo impreciso en la identificación de las células muertas. Las células deben ser contadas dentro de 3 a 5 minutos debido a que el número de células con tinción azul aumenta con el tiempo después de la adición del colorante. El tiempo es menos crítica cuando se utiliza eosina, pero la identificación de células muertas es más subjetiva. Nigrosina es menos tóxica, pero la realizar la tinción de manera correcta requiere por lo menos 10 minutos y por lo tanto lleva más tiempo.⁵²

Ciertos tintes fluorescentes son indicadores más fiables de la viabilidad de las células que son los tintes de colores más tradicionales. Los tintes intercalante bromuro de etidio y yoduro de propidio se sabe que solo pasan a través de las

membranas de células muertas. Existen tinciones dobles con Naranja de Acridina y bromuro de etidio se realiza habitualmente en las suspensiones de células y pueden ser evaluadas por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.⁵²

El 7-amino-actinomicina D (7-AAD), se utiliza como un fluorocromo específico para la citometría de flujo de ADN. Se ha demostrado anteriormente que este compuesto se une específicamente al ADN in vitro, así como in situ en preparaciones citológicas. El máximo de absorción está situada en la región espectral verde y por lo tanto es adecuado para la excitación del láser de argón de su fluorescencia.⁵³

El 7-amino-actinomicina D (7-AAD) que se puede utilizar en lugar de yoduro de propidio (PI) para la exclusión de células no viables en ensayos de citometría de flujo. La ventaja de 7-AAD sobre PI es la capacidad de ser utilizado en conjunción con ficoeritrina (PE) - e isotiocianato de fluoresceína (FITC)-anticuerpos monoclonales marcados en un análisis de doble color, con un mínimo solapamiento espectral entre la fluorescencia de emisión de 7-AAD, PE y FITC. El Via-Probe™ se detecta la fluorescencia en el rango rojo lejano del espectro (650 nm de longitud de filtro de paso).³⁻⁵⁴

Materiales y Métodos

4.1 Material

1. Pipeta automática de 1-10 μL
2. Pipeta automática de 40-200 μL
3. Pipeta automática de 100-1000 μL
4. Pipetas graduadas de 5 mL
5. Tubos Falcon®
6. Tubos Vacutainer® (Heparina)
7. Puntas para pipeta automática de 100 y 1000 mL

4.2 Equipo e Instrumentos

1. Agitador Vortex Shelton S
2. Campana de Flujo Laminar VECO
3. Congelador REVCO
4. Centrífuga
5. Citómetro FACS Calibur®

4.3 Reactivos y Material Biológico

- ✓ BD FACS *Lysing Solution*
- ✓ Solución fijadora (p-formaldehído 1%)
- ✓ LymphoprepTM
- ✓ RPMI 1640 con L-Glutamina (Lanza BioWhittaker)
- ✓ Solución Permeabilizadora / Fijadora Citofix – Citoperm
- ✓ Mem-Non-Essential AminoAcid(GIBCO)
- ✓ Sodium Pyruvate 100 mM (GIBCO)
- ✓ Brefeldrina A Solution 100X
- ✓ Anticuerpo monoclonal CD14- PerCp
- ✓ Anti-human IL12-FITC, anti humanTNF- α -PE, anti human IL-6-FITC

- ✓ Lipopolisacárido Sigma
- ✓ Via probe (7-AAD)
- ✓ FACS Flow
- ✓ Suero Fetal Bovino
- ✓ Perlas Calibrite 3
- ✓ Sangre heparinizada por punción venosa

5. Metodología

I. Preparación de LPS

Se realizó una disolución stock de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LPS en solución de buffer de fosfatos (PBS). Se realizaron alícuotas de 20 μL , a estas se les añadió 180 μL de PBS con una concentración final de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

II. Preparación de Medio de Cultivo Suplementado

Se preparó un medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio al 1 %, MEM al 1 %, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Brefeldrina en medio RPMI 1640.

III. Conteo celular

- I. En un Tubo TruCont se colocaron 30 μL de la suspensión de células mononucleares.
- II. Se realizó una tinción de las células con 5 μL de Anticuerpo Monoclonal anti (CD14-PerCp) incubando durante 30 minutos en la oscuridad.
- III. Se agregaron 250 μL de Solución fijadora y se homogenizan las células
- IV. Se calibro el citómetro de flujo con perlas calibre 3.
- V. Se adquirieron 150 000 eventos en el Citómetro de flujo y análisis en el software Infinicyt®

IV. Técnica I. Tinción Intracelular de células mononucleares obtenidas por un gradiente de densidad

- I. En la campana de flujo laminar y en condiciones estériles, se separaron las células mononucleares mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep en una relación 1: 2 (1 parte de Lymphoprep con 2 Partes de Sangre).
- II. A un tubo falcón se agregó Lymphoprep y se colocó a 45° para agregar lentamente la sangre por las paredes del tubo con una pipeta graduada.
- III. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- IV. Las células mononucleares se separaron con una pipeta transfer, y se colocaron en un tubo falcón, se realizaron dos lavados con 3 mL de PBS estéril centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos.
- V. Las células mononucleares se cultivaron en una concentración final de 1×10^6 células aproximadamente por mL en condiciones estándar (37°C) en medio RPMI suplementado.
- VI. La activación de las células se realizó incubándolas con LPS con las siguientes concentraciones y tiempos (Ver Tabla 8), a una temperatura (37°C).
- VII. Al término de la incubación se concentraron las células.
- VIII. Se realizó la tinción de superficie de (CD14)

Tiempo(hrs)	Concentración(ug/ml)				
4	0(basal)	0.05	0.1	1.0	2.0
6	0(basal)	0.05	0.1	1.0	2.0
16	0(basal)	0.05	0.1	1.0	2.0
24	0(basal)	0.05	0.1	1.0	2.0

Tabla 8. Activación de células mononucleares a diferentes tiempos y concentraciones

- IX. Se agregó 250 uL de Solución Permeabilizante BD y se incubaron durante 20 minutos a 4°C.
- X. Se realizaron dos lavados con el buffer de lavado 1X agregando 1 mL por tubo, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos.
- XI. Se separó una alícuota de 50 uL de las células sin teñir como control de auto fluorescencia
- XII. Se realizó una doble tinción de las células con 5 uL de Anticuerpo Monoclonal (IL-6, TNF- α) incubando durante 45 minutos en la oscuridad.
- XIII. Se realizó un último lavado con PBS, centrifugándolas a 1500 rpm durante 5 minutos.
- XIV. Se agregaron 250 uL de Solución fijadora y se homogenizaron las células.
- XV. Se calibro el citómetro de flujo con perlas calibre 3.
- XVI. Se adquirieron 150 000 eventos totales en el Citómetro de flujo y analizo en el software Infinicyt®.

5. Técnica II. Tinción Intracelular de monocitos en sangre total obtenidas por Lisis

- I. En la campana de flujo laminar y en condiciones estériles, se colocaron 70 uL de Sangre Total y 140 uL de Medio de Cultivo Suplementado.
- II. La activación de las células se realizó incubándolas con LPS con las siguientes concentraciones y tiempos (Ver Tabla 9), a una temperatura (37°C).

Tiempo(hrs)	Concentración(ug/ml)				
4	0(basal)	2.0	4.0	6.0	
6	0(basal)	0.05	0.1	1.0	2.0
16	0(basal)	0.05	0.1	1.0	2.0
24	0(basal)	0.05	0.1	1.0	2.0

Tabla 9. Activación de monocitos en sangre total a diferentes tiempos y concentraciones

- III. Al término de la incubación se concentraron las células se agregaron 750 uL de BD *FACS Lysing Solution* a cada tubo, incubándolas durante 15 minutos a Temperatura ambiente.
- IV. Se realizó un lavado con 3 mL PBS, centrifugándolas a 1500 rpm durante 5 minutos.
- V. Se realizó la tinción de superficie de (CD14)
- VI. Se agregó 250 uL de Solución Permeabilizante BD y se incubaron durante 20 minutos a 4°C.
- VII. Se realizaron dos lavados con el buffer de lavado 1X agregando 1 mL por tubo, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos.
- VIII. Se separó una alícuota de 50 uL de las células sin teñir como control de auto fluorescencia
- IX. Se realizó una doble tinción de las células con 5 uL de Anticuerpo Monoclonal (IL-6, TNF- α) incubando durante 45 minutos en la oscuridad.

- X. Se realizó un último lavado con PBS, centrifugándolas a 1500 rpm durante 5 minutos.
- XI. Se agregaron 250 uL de Solución fijadora y se homogenizan las células
- XII. Se adquirió en el citómetro de flujo y analizo en el software Infinicyt®.

V. Viabilidad Celular

- I. Se realizó la determinación de la viabilidad celular con una doble tinción de las células con 5 uL de Anticuerpo Monoclonal (CD14) y 5 uL de Via-Probe, a la concentración, tiempo y técnica estandarizada obtenidos al final del análisis.

Tiempo	Concentración LPS(ug/mL)	Alícuota
Control	-	50 µL Sangre Total + 50 50 µL Sangre Total(7 días)
0	0	50 µL Sangre Total
8	0	50 µL Sangre Total
0	0	50 µL células mononucleares
4	1	50 µL células mononucleares
16	1	50 µL células mononucleares
24	1	50 µL células mononucleares

Tabla 10. Determinación de Viabilidad Celular en monocitos en sangre total y células mononucleares separadas a diferentes tiempos y concentraciones

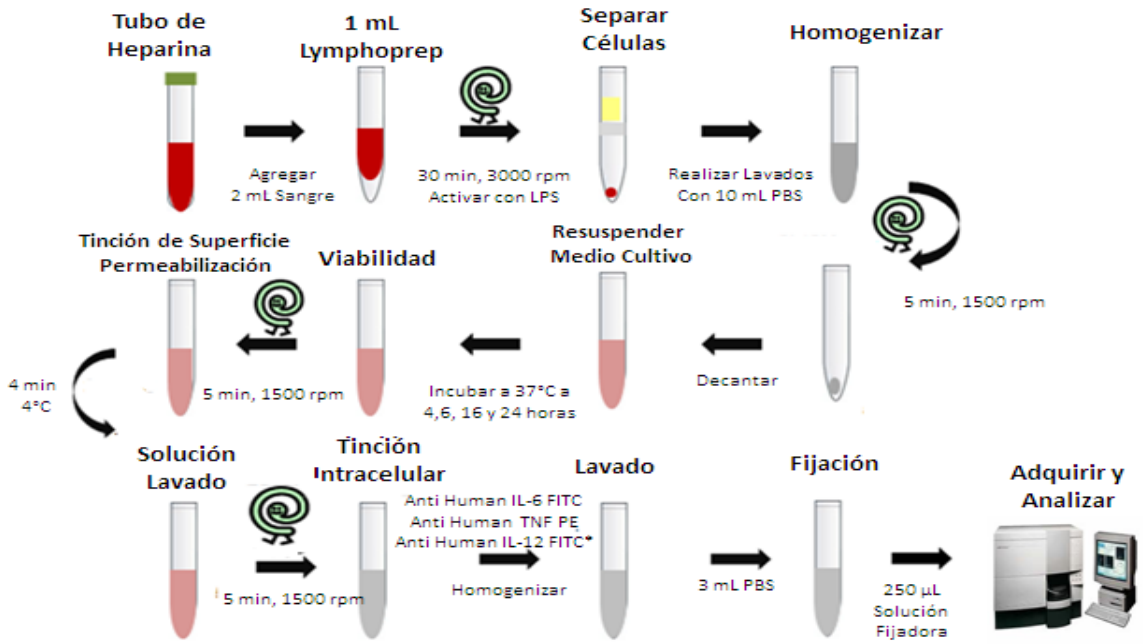


Figura 7. Diagrama General de la técnica de tinción intracelular de monocitos obtenidos por gradiente de densidad

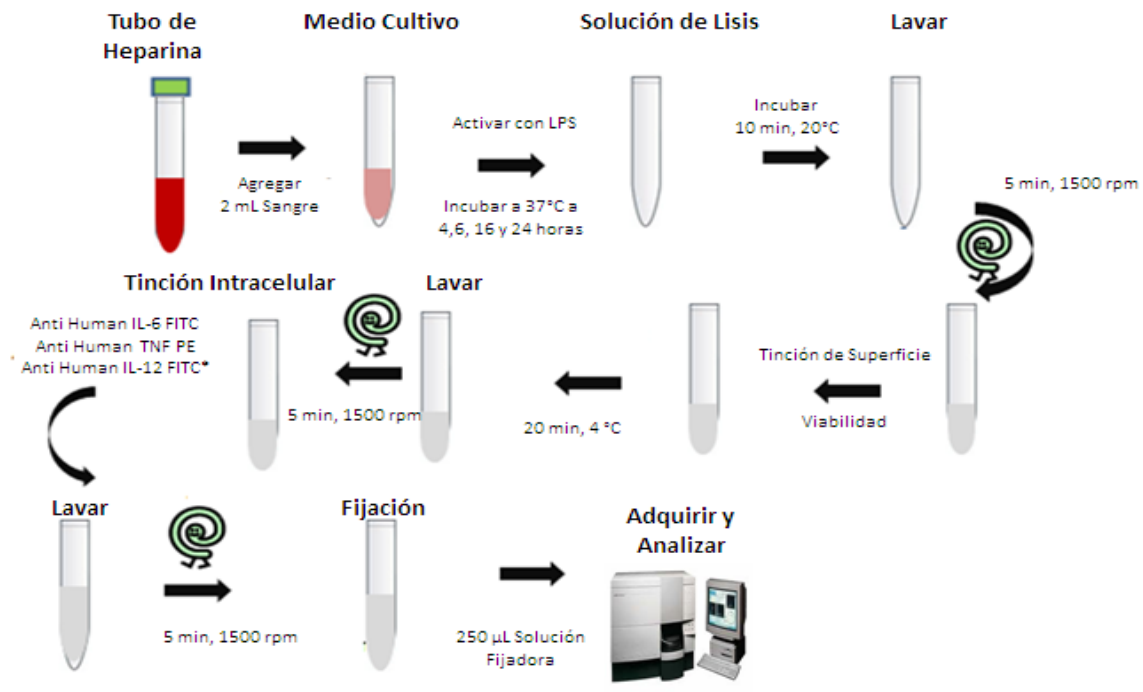


Figura 8. Diagrama General de la técnica de tinción intracelular de monocitos de sangre total obtenidos por solución de lisis

Resultados

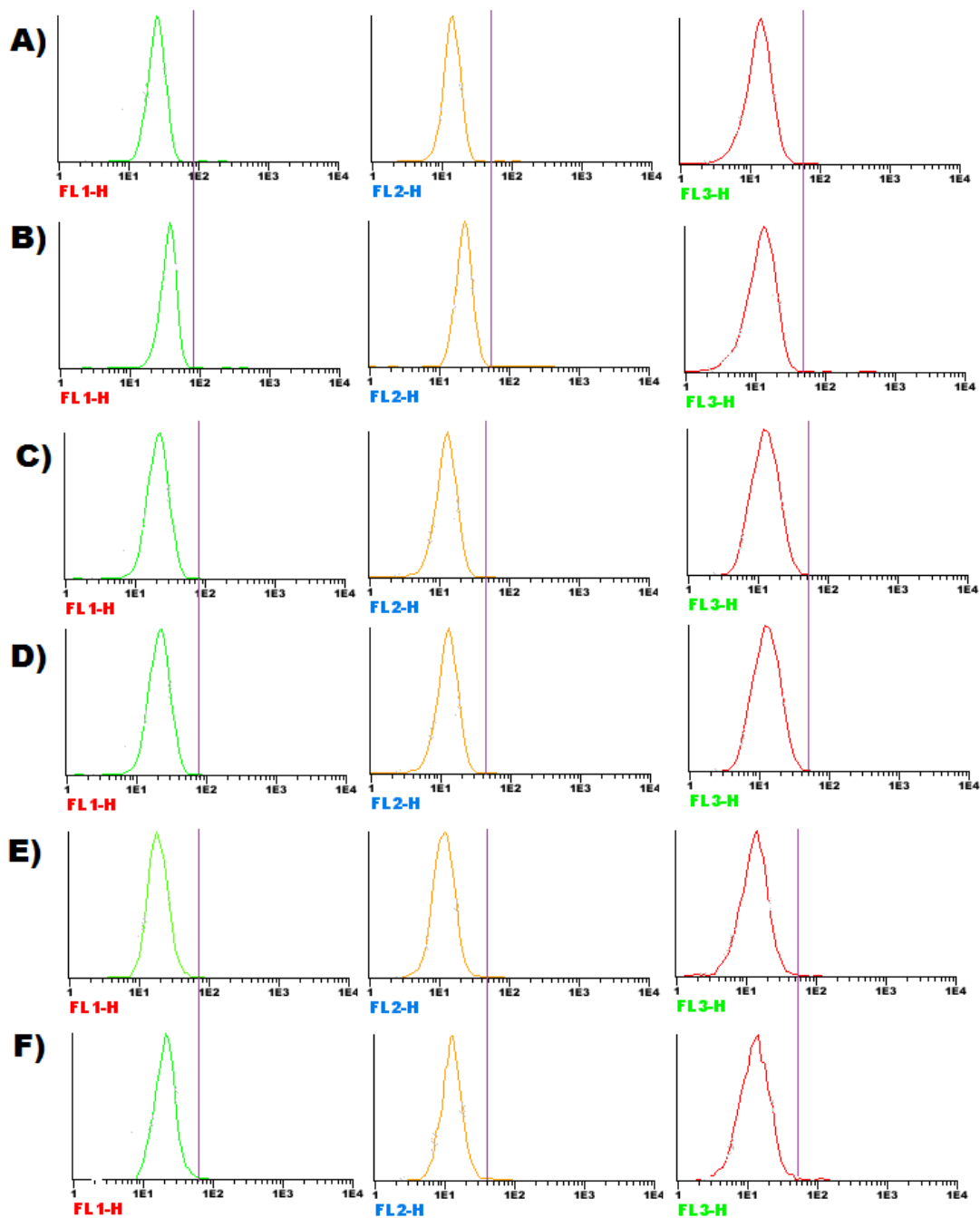


Figura 9. Histograma de las tres fluorocromos utilizados en Monocitos, usando células sin teñir e Isotipo respectivamente a diferentes tiempos: A,B) 4 horas C, D) 6 horas y E,F) 16 horas

Conteo Celular

Formula:

$$\frac{\# \text{ Eventos en la Region que contiene Celulas}}{\# \text{ Eventos en la Region de Perlas}} \times \frac{\# \text{ Perlas por Test}}{\text{Volumen de Prueba}} = \text{Conteo Absoluto de Celulas}$$

Calculo:

$$\frac{1072 \text{ CD14+}}{832 \text{ Perlas}} \times \frac{48809}{30 \text{ uL}} = 2096 \frac{\text{Monocitos}}{\text{uL}} * 500 \text{ uL} = 1.048 * 10^6 \text{ monocitos CD14+}$$

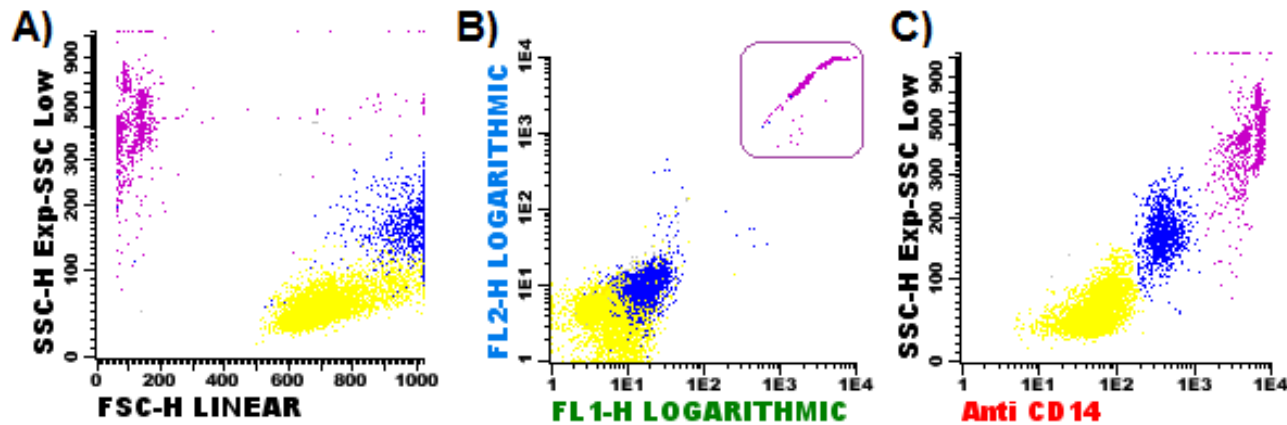


Figura 10. Determinación del número de monocitos obtenidos por gradiente de densidad

- A) DotPlot de Complejidad vs Tamaño
- B) DotPlot para la visualización de la región de perlas restantes
- C) DotPlot para al determinación de células CD14+

Expresión de IL-6 en Monocitos con LPS (4 horas)

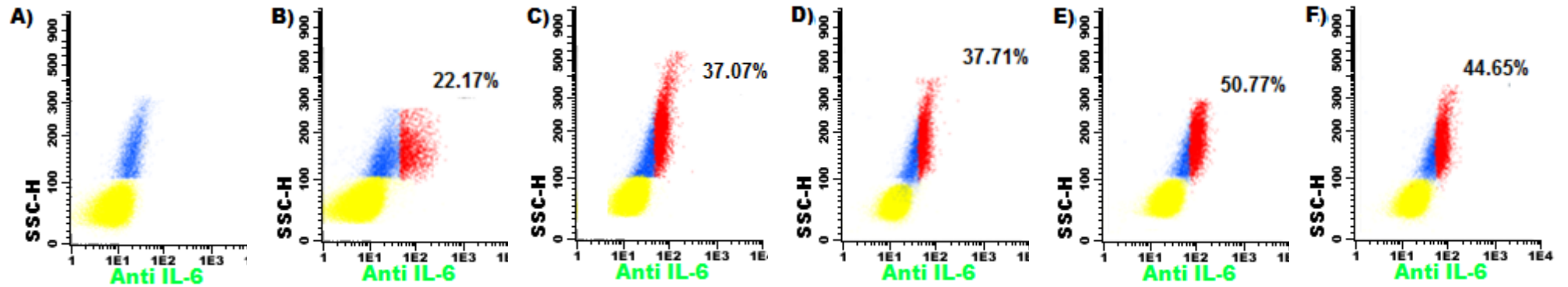


Figura. 11a. DotPlot de Células Mononucleares incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 4 horas para la producción de IL-6. **A)** Control de AFB) 0.0 ug/mL **C)** 0.05 ug/m **D)** 0.1 ug/mL **E)** 1 ug/mL **F)** 2 ug/mL

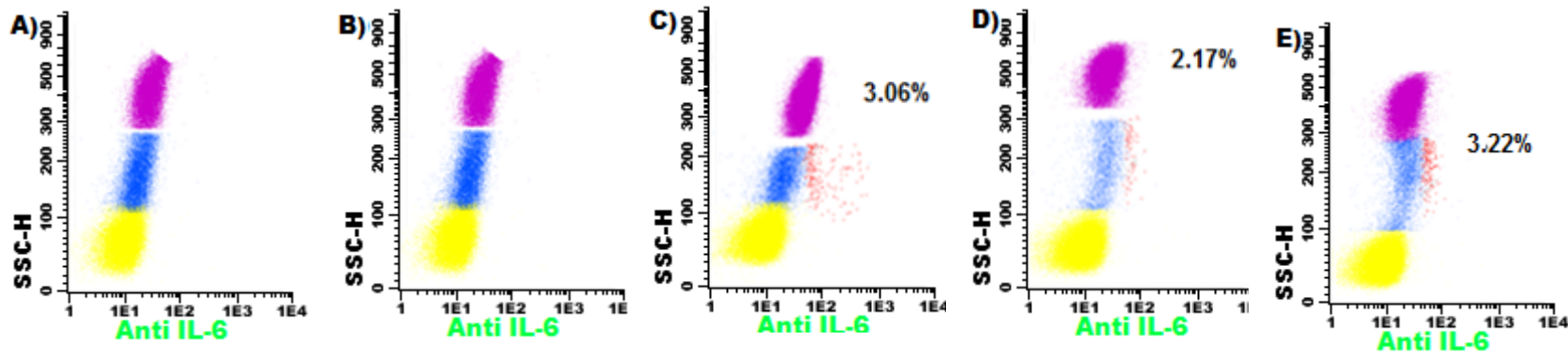


Figura. 11b. DotPlot de Leucocitos en Sangre Periférica incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 4 horas para la producción de IL-6. **A)** Control de AFB) 0.0 µg/mL **C)** 2 µg/mL **D)** 4µg/mL **E)** 6 µg/mL

Expresión de IL-6 en Monocitos con LPS (6 horas)

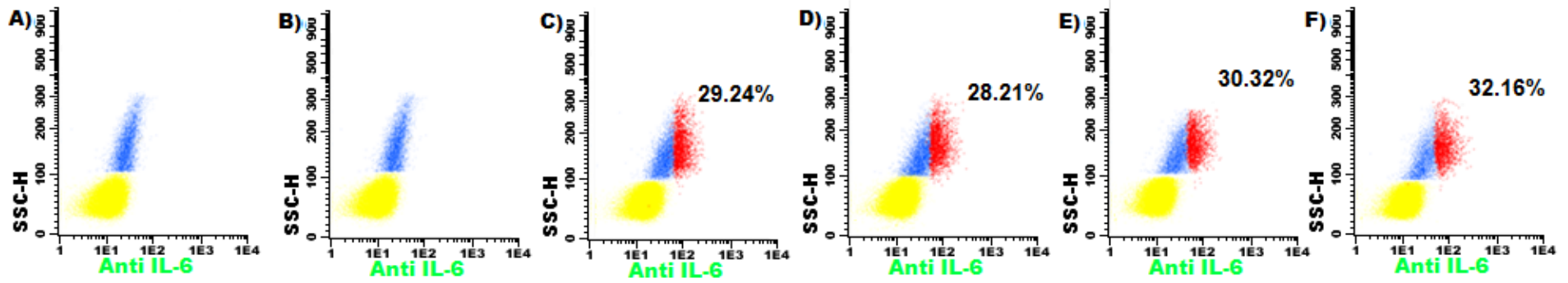


Figura. 12a. DotPlot de Células Mononucleares incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 6 horas para la producción de IL-6 .A) Auto Fluorescencia B) Basal Sin activar C) 0.05 µg/mL D) 0.1 µg/mL E) 1 µg/mL F) 2 µg/mL

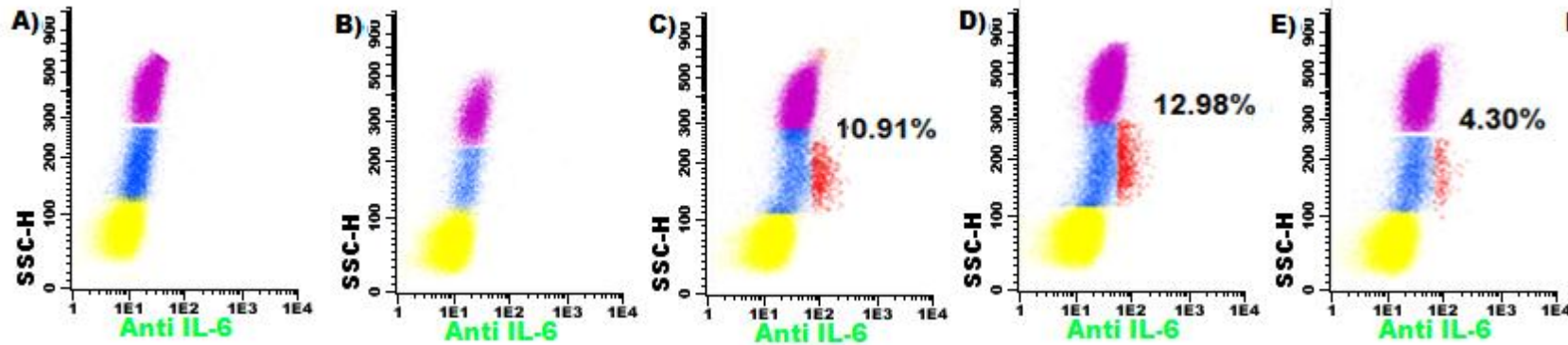


Figura. 12b. DotPlot de Leucocitos en Sangre Periférica incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 6 horas para la producción de IL-6. A) Control de Auto Fluorescencia B) 0.0 µg/mL C) 0.05 µg/mL D) 0.1 µg/mL E) 1 µg/mL

Expresión de IL-6 en Monocitos con LPS (16 horas)

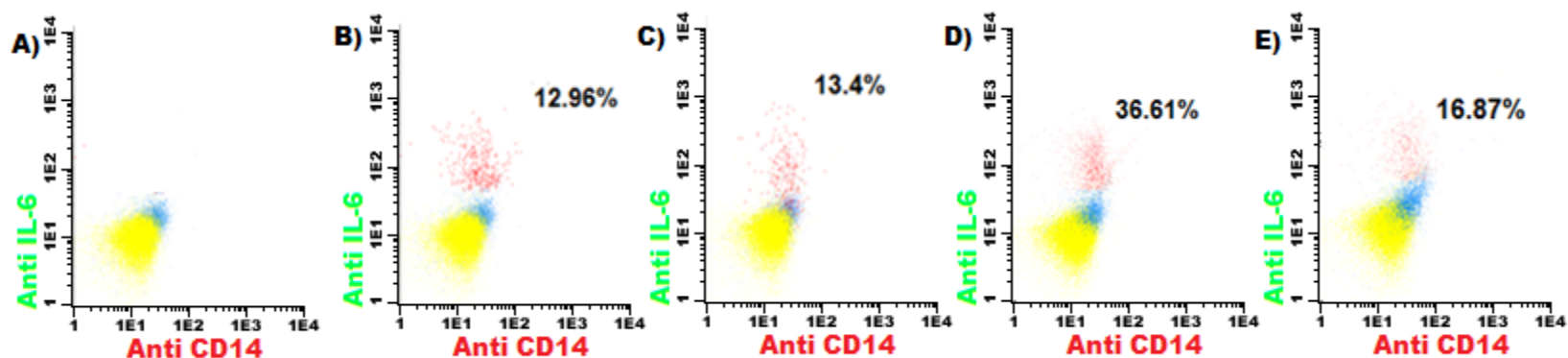


Figura. 13a. DotPlot de Células Mononucleares incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 16 horas para la producción de IL-6. **A)** Auto Fluorescencia **B)** 0.0 µg/mL **C)** 0.05 µg/mL **D)** 0.1 µg/mL **E)** 1 µg/mL

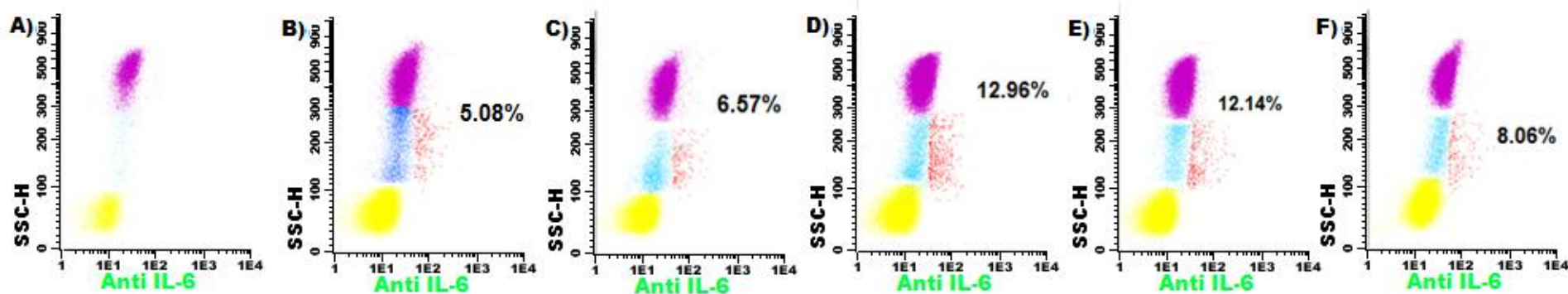


Fig 13b. DotPlot de Leucocitos en Sangre Periférica incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 16 horas para la producción de IL-6. **A)** Control de Auto Fluorescencia **B)** 0.0 µg/mL **C)** 0.05 µg/mL **D)** 0.1 µg/mL **E)** 1 µg/mL **F)** 2 µg/mL

Expresión de TNF- α en Monocitos con LPS (4 horas)

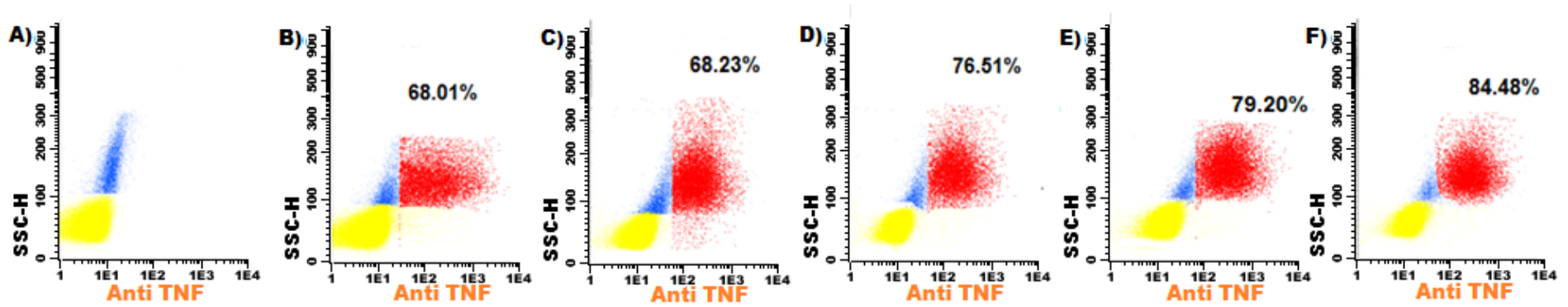


Figura. 14a. DotPlot de Células Mononucleares incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 4 horas para la producción de TNF- α . A) Control de AFB) 0.0 $\mu\text{g/mL}$ C) 0.05 $\mu\text{g/mL}$ D) 0.1 $\mu\text{g/mL}$ E) 1 $\mu\text{g/mL}$ F) 2 $\mu\text{g/mL}$

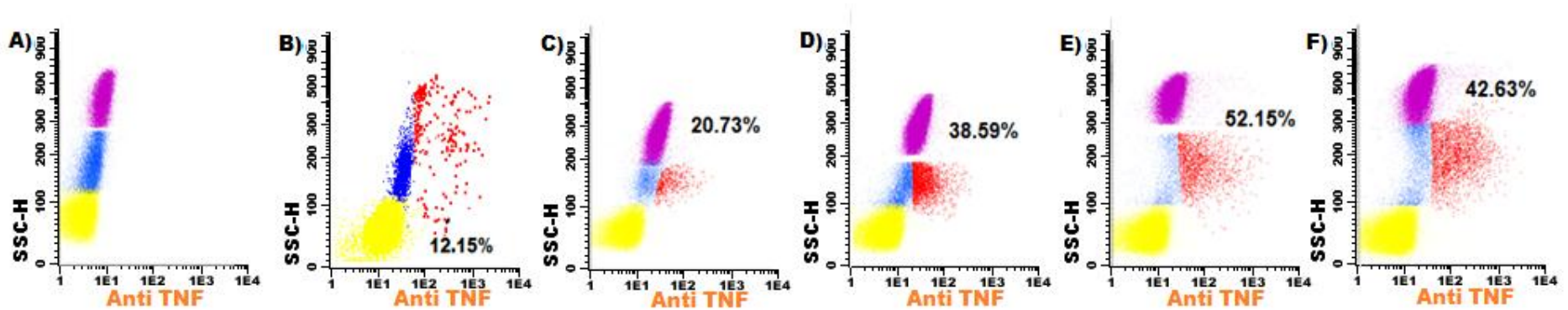


Figura. 14b. DotPlot de Leucocitos en Sangre Periférica incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 4 horas para la producción de TNF- α A) Control de AFB) 0.0 $\mu\text{g/mL}$ C) 0.05 $\mu\text{g/mL}$ D) 0.1 $\mu\text{g/mL}$ E) 1 $\mu\text{g/mL}$ F) 2 $\mu\text{g/mL}$

Expresión de TNF- α en Monocitos con LPS (6 horas)

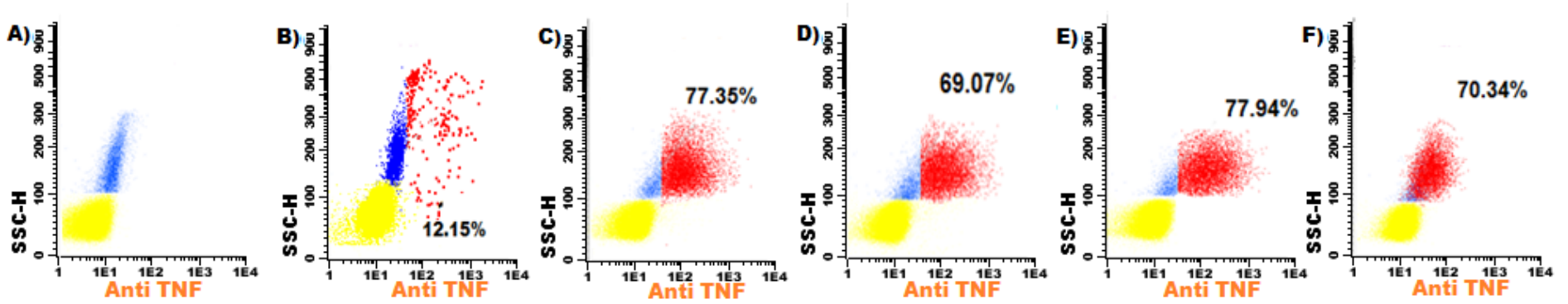


Figura. 15a. DotPlot de Células Mononucleares incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 6 horas para la producción de TNF- α . **A)** Control de AFB) 0.0 $\mu\text{g/mL}$ **C)** 0.05 $\mu\text{g/mL}$ **D)** 0.1 $\mu\text{g/mL}$ **E)** 1 $\mu\text{g/mL}$ **F)** 2 $\mu\text{g/mL}$

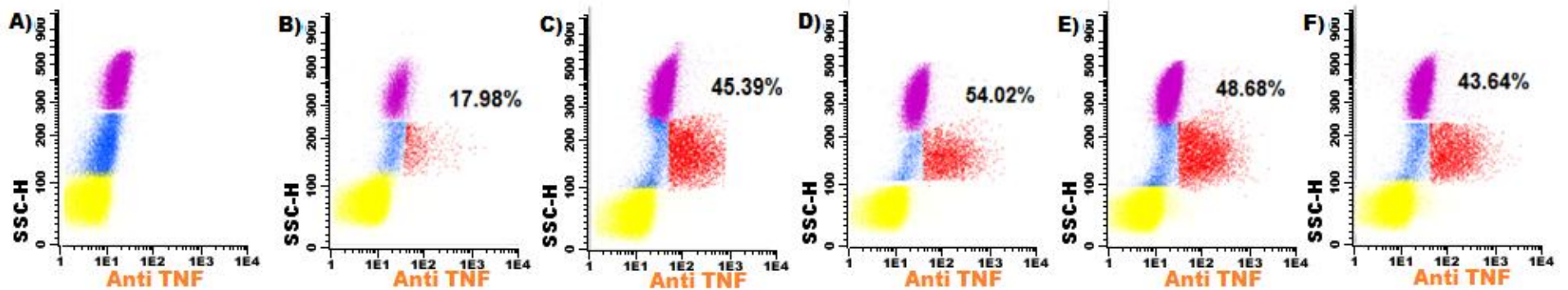


Figura. 15b. DotPlot de Leucocitos en Sangre Periférica incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 6 horas para la producción de TNF- α . **A)** Control de AFB) 0.0 $\mu\text{g/mL}$ **C)** 0.05 $\mu\text{g/mL}$ **D)** 0.1 $\mu\text{g/mL}$ **E)** 1 $\mu\text{g/mL}$ **F)** 2 $\mu\text{g/mL}$

Expresión de TNF- α en Monocitos con LPS (16 horas)

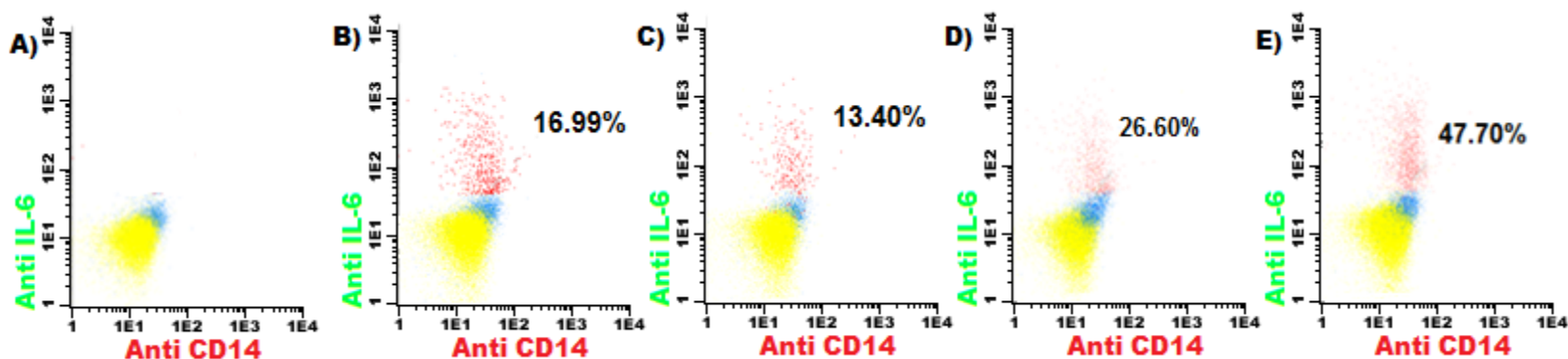


Figura. 16a. DotPlot de Células Mononucleares incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 16 horas para la producción de TNF- α . **A)** Control de AFB) 0.0 $\mu\text{g/mL}$ **C)** 0.05 $\mu\text{g/mL}$ **D)** 0.1 $\mu\text{g/mL}$ **E)** 1 $\mu\text{g/mL}$ **F)** 2 $\mu\text{g/mL}$

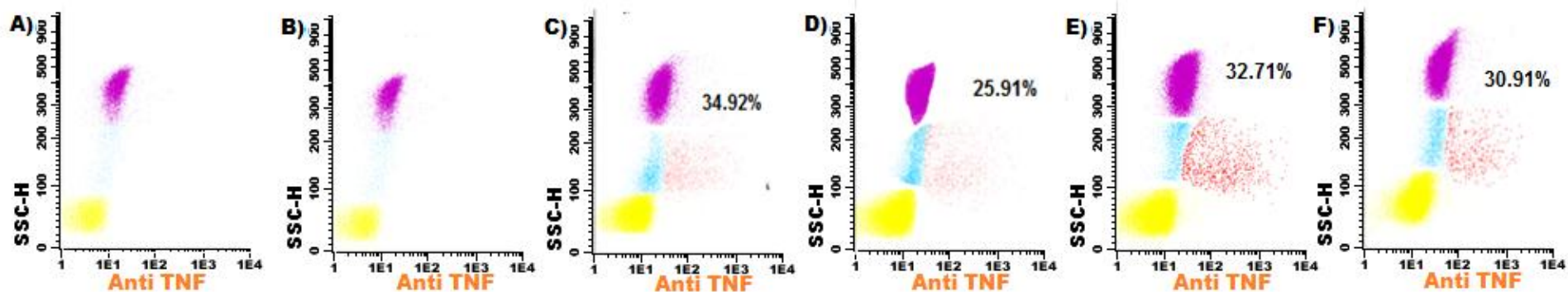


Figura. 16b. DotPlot de Leucocitos en Sangre Periférica incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 16 horas para la producción de TNF- α . **A)** Control de AFB) 0.0 $\mu\text{g/mL}$ **C)** 0.05 $\mu\text{g/mL}$ **D)** 0.1 $\mu\text{g/mL}$ **E)** 1 $\mu\text{g/mL}$ **F)** 2 $\mu\text{g/mL}$

Expresión de IL-6 Y TNF- α en Monocitos con LPS (24 horas)

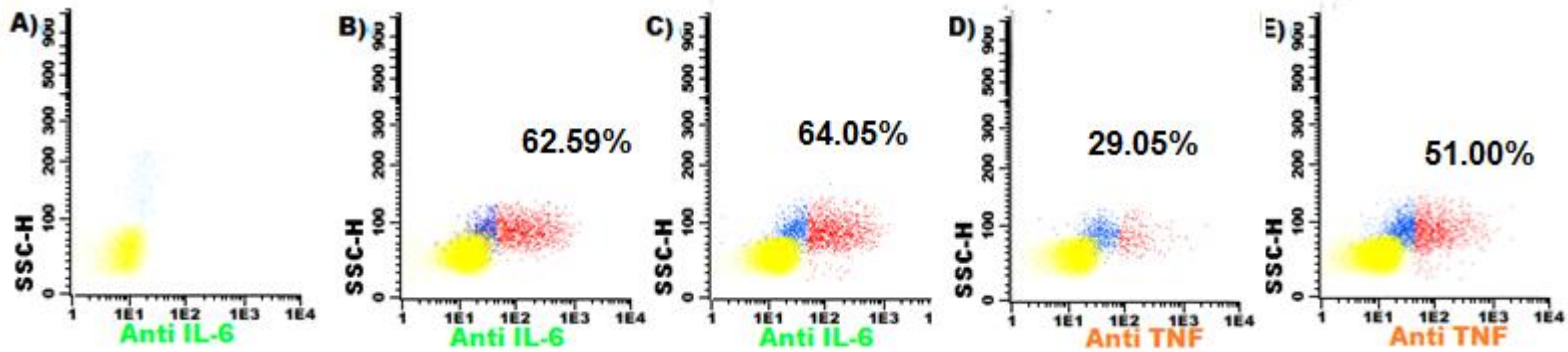


Figura. 17a. DotPlot de Células Mononucleares incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 24 horas para la producción de IL-6 y TNF- α . **A)** AFB, **C)** 0 y 1 μ g/mL de IL-6 **D), E)** 0 y 1 μ g/mL para TNF

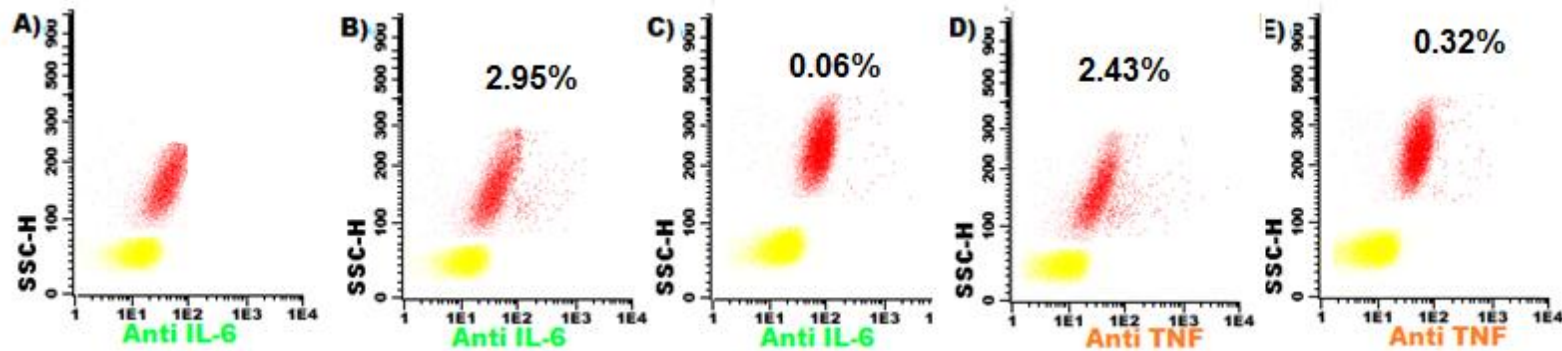


Figura. 17b. DotPlot de Leucocitos en Sangre Periférica incubadas a 37°C con diferentes concentraciones de LPS, durante 16 horas para la producción de IL-6 y TNF- α . **A)** Auto Fluorescencia **B, C y D)** 0 μ g/mL **E), F)** 1 μ g/mL

Expresión de CD14 en Monocitos

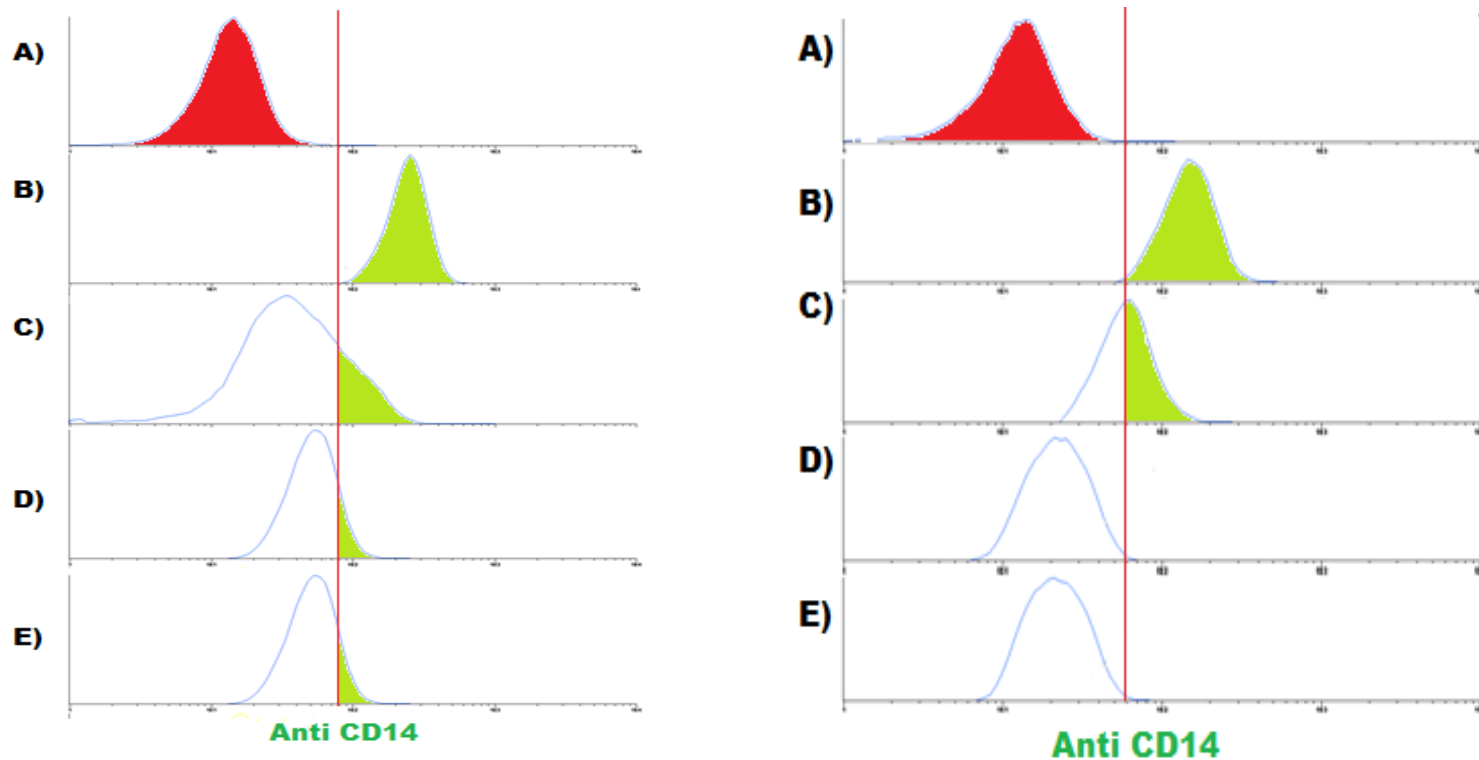


Figura. 18 y 19. Histograma con su correspondiente DotPlot para la expresión de CD14 en monocitos obtenidos por gradiente de densidad y en sangre total respectivamente

A) Control de AF, **B)** Células sin activar 0 horas **C)** Células Sin Activar a 4 horas **D)** Células Activadas con LPS 4 horas **E)** Células Activadas con LPS 6 horas

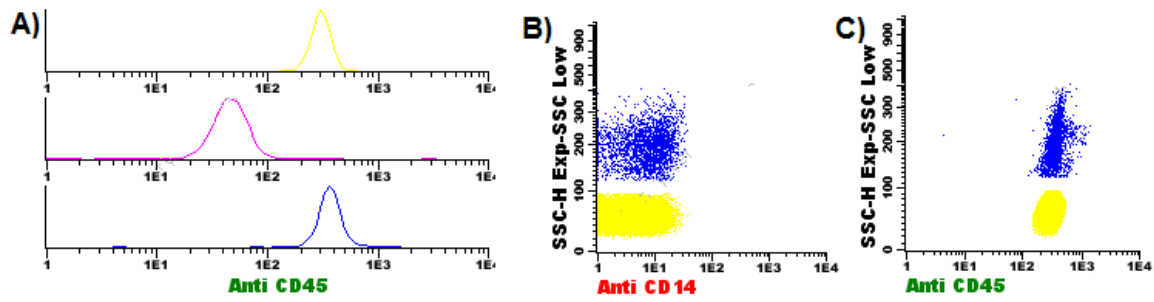


Figura. 20 Identificación de Monocitos usando un segundo anticuerpo monoclonal Anti CD45/ FITC. A) Histograma de Leucocitos CD45+ comparados con células negativas B) DotPlot de células mononucleares para la expresión de CD14 C) DotPlot de células mononucleares para la expresión de CD45+

Determinación de Viabilidad en Celulas Mononucleares

Titulación de IL-12

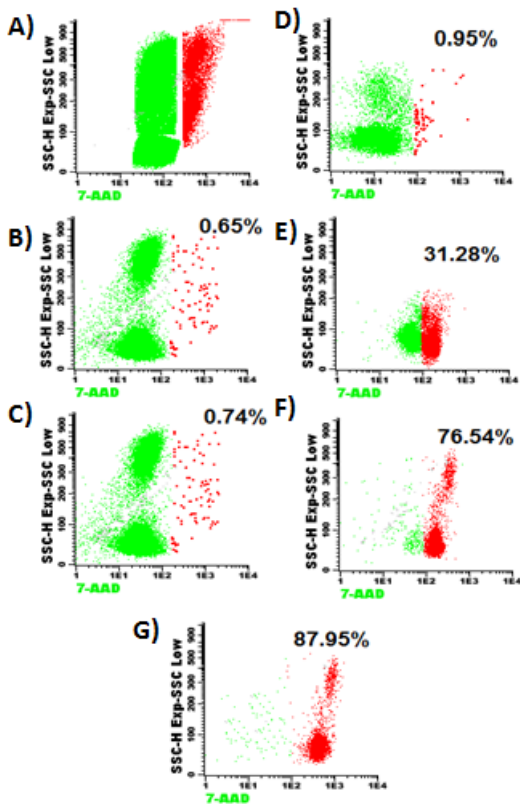


Figura. 21 Dotplot para la determinación de Viabilidad Celular en Leucocitos de Sangre Periférica y PBMCs.

- A) Control
- B) Sangre Total 0 horas
- C) Sangre Total 8 horas
- D) PBMCs recién separadas
- E) PBMCs con LPS durante 4 horas
- F) PBMCs Incubadas con LPS durante 16 horas
- G) PBMCs Incubadas con LPS durante 24horas

Titulación de Ac-Monoclonal Anti IL-12

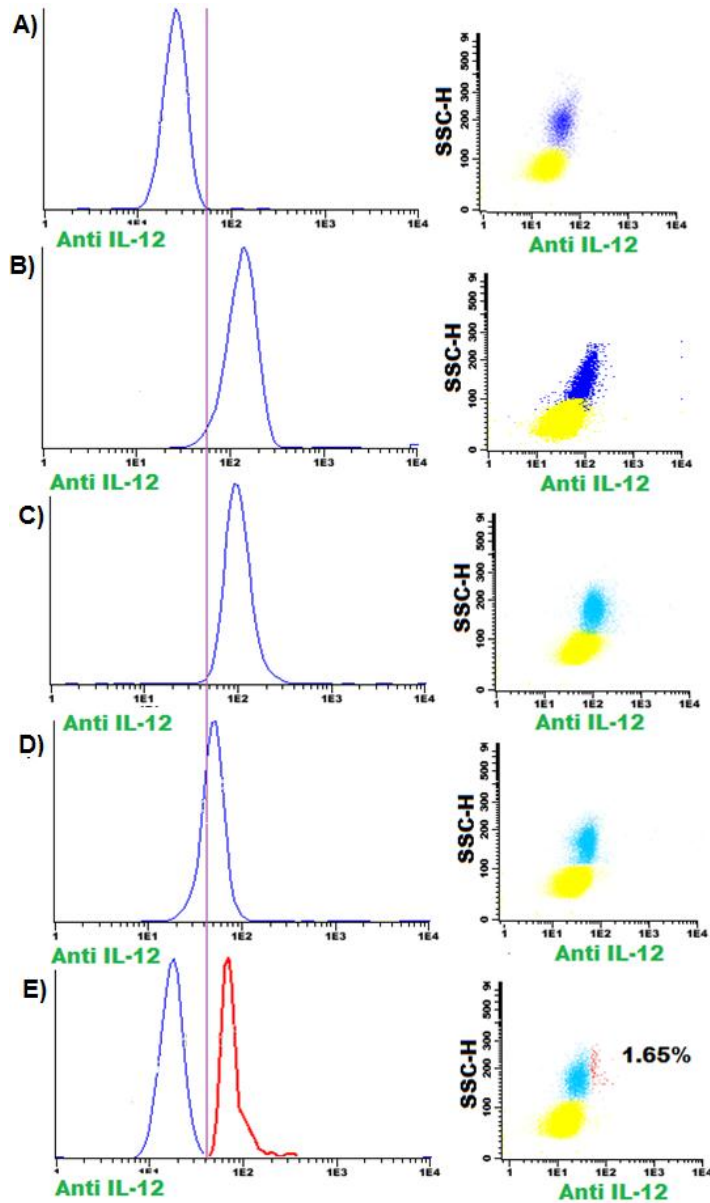


Figura. 22. Titulación de IL 12 con diferentes concentraciones de Anticuerpo Monoclonal anti IL-12/FITC para un millón de células monocíticas por mL

- A) Control AF
- B) 1 μg
- C) 0.5 μg
- D) 0.25 μg
- E) 0.1 μg

Obtención de IFN- γ para la producción de IL-12

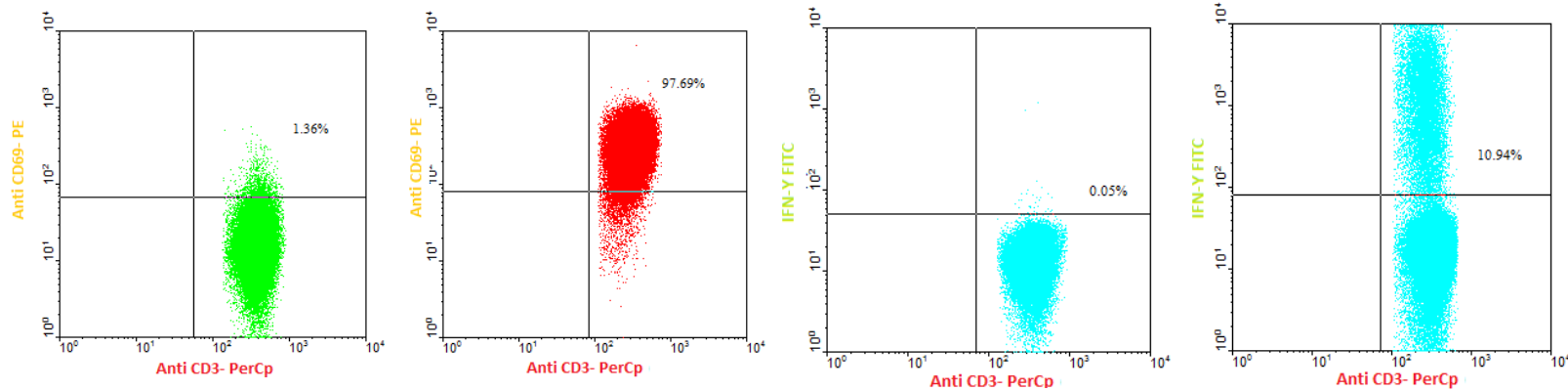


Figura. 23 Producción de IFN- γ en linfocitos CD3+ activados con PMA+ Ionomicina de un testigo sano, utilizando como marcador de activación CD69

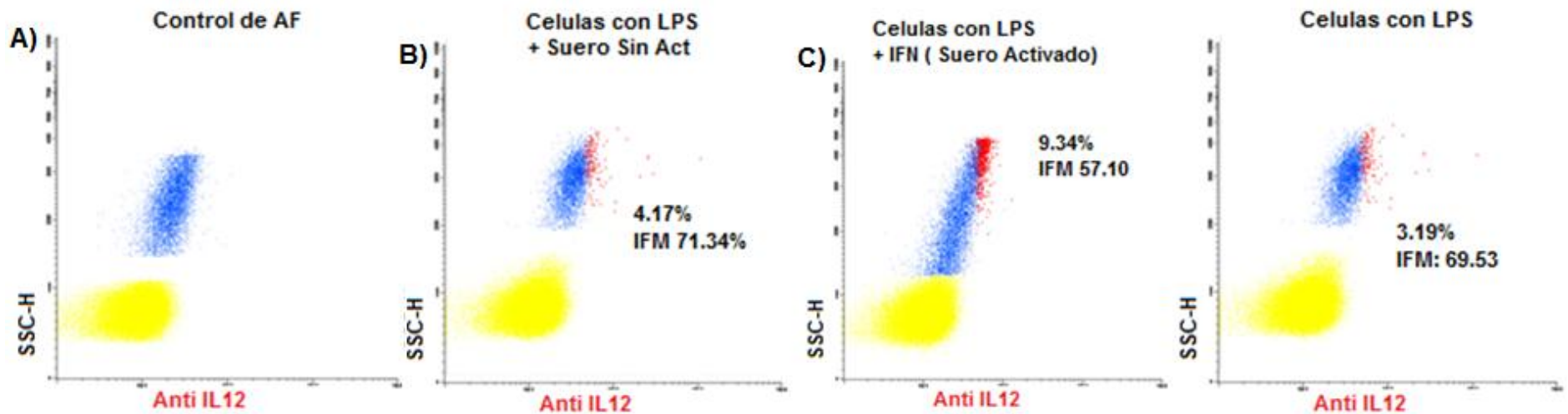


Figura. 24. Producción de IL-12 utilizando LPS e IFN- γ producido por activación de linfocitos de un Sujeto Sano
A) Control de AFB) 1 1 μ g/mL LPS + Suero sin activar **C)** 1 μ g/mL + IFN- γ **D)** 1 1 μ g/mL LPS

Reproducibilidad Intralaboratorio:

Se evaluó una muestra de sangre periférica con recuentos de leucocitos normales obteniendo las células monocíticas por gradiente de densidad, en diferentes días. En la siguiente tabla se muestra el porcentaje medio de expresión de IL-6 y TNF – α respecto al total de monocitos, la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos:

Nivel de Leucocitos	Numero de Muestras	Citocina	Porcentaje Medio de Monocitos	Desviación Estándar (SD)	Coficiente de Variación (CV%)
Normal	5	TNF- α	72.38	2.65	3.66
Normal	5	IL-6	49.39	2.84	5.77

Tabla 11. Resultados de la reproducibilidad de la técnica de tinción intracelular obteniendo células monocíticas por gradiente de densidad

Obtención de un “Valor de Referencia”

Se evaluaron diez muestras de sangre periférica con recuentos de leucocitos normales obteniendo las células monocíticas por gradiente de densidad, En las gráficas se muestra el valor promedio y la DE

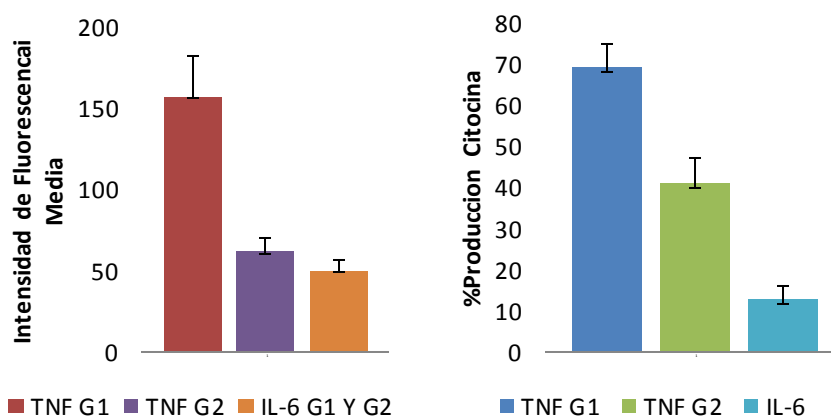


Figura 25. Valores promedios de la producción de IL-6, TNF- α e IFM en ambos grupos (Grupo 1: 22-28 años y Grupo 2: 45-55 años)

Análisis de Resultados

Debido a la inexistencia de controles de calidad comerciales tanto para muestras positivas y negativas, se implementaron dos controles internos negativos el primero un control isotipo y el segundo fue células sin teñir para determinar la fluorescencia basal de cada muestra. Comparando ambos histogramas, se observa que el comportamiento de estos es el mismo con ambos controles (Ver Figura 9), el control isotipo nos permite deducir que no existen uniones inespecíficas de los diferentes anticuerpos utilizados hacia los monocitos por medio de receptores IgG o Fc y el aumento de la fluorescencia es exclusivo de la unión del anticuerpo con su antígeno, lo cual respalda la especificidad de la prueba, la autofluorescencia de las células vivas sin teñir sirve como blanco de referencia.

El análisis de las curvas de cinética que se muestran a continuación, indican que el mayor número de células productoras de citocinas se observa entre las 4 horas de incubación con una concentración de 1 ug/mL de LPS para ambas técnicas.

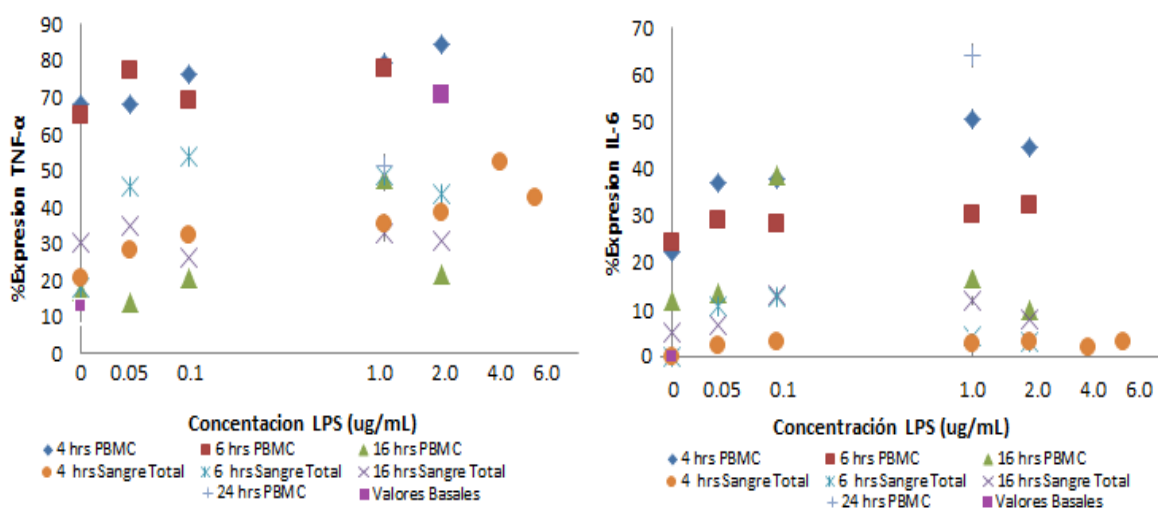


Figura 26. Cinética de IL-6 y TNF-α en monocitos incubados a 37°C a diferentes concentraciones de LPS e intervalos de tiempo

Sin embargo la gran diferencia observada entre estas dos técnicas se debe a un efecto sinérgico entre el LPS y los polisacáridos procedentes del Lymphoprep, dicha hipótesis se respalda con los resultados obtenidos en los controles basados, donde al no haber LPS en las células PBMC se observa una producción significativa, dicho efecto no se ve en las muestras de células utilizadas por sangre total.

Que exista una mayor producción de citocinas en las células monocíticas obtenidas por gradiente de densidad lo que le confiere una mayor sensibilidad a la técnica comparado con las células obtenidas por lisis y es uno de los principales factores para seleccionarla.

Una de las principales dificultades al realizar el análisis en los software es la identificación de los monocitos mediante un marcador específico, actualmente diferentes autores recomiendan su identificación mediante CD14, sin embargo nosotros observamos que una vez las células monocíticas pasan a un estado de activación, el marcador de superficie CD14 disminuye considerablemente en los monocitos en ambas técnicas (Ver Figura 4). Se reporta una disminución de su expresión con diferentes activadores debido a un sumergimiento de este o su liberación como CD14s (49) sin embargo en muestras de sangre total se observa una ausencia total de CD14 después de la incubación lo cual se pudiera atribuir a la liberación de Proteasas principalmente a la elastasa, producidas por los neutrófilos tal como reportan (50). En el caso de la técnica de PBMC al realizar el análisis solo tenemos dos poblaciones y la presencia de CD14 permite diferenciar entre estos dos linajes, sin embargo en las muestras de sangre total, la presencia de neutrofilos dificulta el análisis por lo cual sugerimos una tinción alternativa con anti-CD45 para mejorar la especificidad y hacerla una opción viable que permita mejorar el análisis para identificación de las células. (Ver Figura 5).

Los análisis de viabilidad son importante pues se requieren células vivas para ver su funcionalidad, nuestros resultados (Ver figura 6) muestran que el 99% de las células son viables desde el momento de la toma de muestra hasta 8 horas después, conservando la muestra a 4°C. El Lymphoprep no resulta toxico para las

células durante el tiempo de separación, ya que no se observa un cambio significativo en el porcentaje de células muertas. Después de 4 horas de incubación con el LPS existe un 31.75 % de células no viables del cual solo un 6 % se atribuye a monocitos. A 16 horas existe un 76.5% de células no viables sin embargo la gran mayoría conserva aún sus propiedades estructurales, por lo cual pudiera dar falsos positivos de aquí la importancia de dicha tinción, a 24 horas la gran mayoría ha perdido su estructura dificultando su identificación por complejidad y tamaño.

Para la producción de IL-12 se encontraron diferentes dificultades, la estimulación con LPS no es suficiente para obtener una cantidad apreciable de dicha citocina, por lo cual la titulación del anticuerpo se realizó a 4 horas, para establecer la cantidad de anticuerpo óptima se realizó mediante dos parámetros, las células IL-12 (-) tuvieran la misma IFM que los monocitos del control de autofluorescencia y la visualización de células IL-12(+) (Ver Figura 22) encontrando como concentración óptima 0.1 µg de Anticuerpo monoclonal anti IL-12/FITC ,

La IL-12 juega un rol importante dentro del eje IFN- γ /IL-12/IL-23, por lo cual diversos autores reportan un efecto sinérgico en la producción de IL-12 cuando se activa con IFN- γ y LPS, este fue colocado de manera exógena mediante la producción por la activación de Linfocitos de un Testigo Sano usando como mitógenos PMA + Ionomicina. En la Figura 23 se observa que un 10.94% de los linfocitos son productores a las 18 horas. La producción de IL-12 aumenta moderadamente a un 9%(Ver Figura 24), por lo cual se sugiere probar el uso de IFN- γ biotecnológico para poder determinar la concentración óptima y ver si existe un aumento, debido a que se desconoce el valor de referencia en la producción de IL-12.

Comparando con otros estudios internacionales ellos reportan como mejor tiempo a 6 y 8 horas respectivamente comparando sus valores porcentuales se observa una mayor producción de IL-6 e IL-12, esta diferencia se la atribuimos principalmente a la edad promedio de los individuos sanos analizados, su edad promedio del grupo de C.Bueno et-al fue de 35 años mientras que la nuestra

fueron dos grupos de 25 y 55 años respectivamente encontrándose para el TNF- α una diferencia significativa entre ellos. Los valores obtenidos de expresión de TNF- α por grupos de edad son los siguientes valores: 69.04% \pm 5.56% y 40.88% \pm 6% respectivamente. Estos resultados respaldan la importancia de obtener valores de referencia en niños en la siguiente etapa del proyecto, pues no esperábamos un cambio significativo en adultos, debido a la maduración de la respuesta inmune y un valor constante durante este transcurso. Actualmente no existen trabajos realizados en pacientes pediátricos.

	Experimental (INP, México) Sujetos Sanos n=10		C.Bueno et-al (Salamanca, España) Sujetos Sanos n=10		Schuerwegh et-al (Alemania) Sujetos Enfermos n=10
IL-6	15.76% \pm 3.66% IFM: 55 \pm 5		84% \pm 18% IFM: 324 \pm 217		96.1% \pm 3.7%
TNF-α	69.04% \pm 5.56% IFM: 150 \pm 20		79 % \pm 20% IFM: 777 \pm 371		97.3% \pm 20.4%
IL-12	4.14% IFM: 71.34 (LPS)	9.34% IFM: 57.10 (LPS+IFN)	52.12% IFM: 121.15 (LPS)	71.0 % IFM: 352 (LPS+ IFN)	No determinado

Tabla 12. Comparación con de resultados con dos estudios internacionales para la producción de citocinas por citometría de flujo

El valor promedio de TNF es similar al nuestro, siendo esta la principal citocina que se mantiene constante hasta los 40 años, sin embargo nosotros observamos un decremento significativo en el grupo de 55 años, probablemente a un decaimiento de la respuesta inmune a esta edad.

En el caso de la Interleucina 12, nuestros porcentajes de células producto está por debajo del valor obtenido de C.Bueno et-al, una característica común es el aumento de su producción al utilizar IFN- γ como co-activador.

Los resultados de Schuerweghtet-al no son similares a los nuestros, se observa una tendencia a elevarse casi al 100%. Esto se debe a que su determinación se realizó en pacientes adultos diagnosticados con Artritis Reumatoide, esto da un ejemplo de su aplicación dentro del laboratorio clínico.

Los valores de Intensidad de Fluorescencia Media no son similares en ambos estudios, esto se debe a la diferencia entre las marcas comerciales y distintas clonas de los anticuerpos monoclonales utilizados, así como al fluorocromo conjugado en cada caso, por lo cual este valor es de utilidad como control interno dentro del laboratorio.

La determinación de citocinas por citometría de flujo presenta dos cualidades importantes: la primera la cuantificación como método analítico al obtener el porcentaje de células que producen dicha citocina y la segunda: la obtención del parámetro de Intensidad de Fluorescencia Media que nos proporciona de manera relativa el número de moléculas producida por célula. Pudimos observar una alteración en este parámetro en uno de los testigos sanos donde sus datos de biometría hemática mostraban una ligera leucocitosis y un aumento en el número de monocitos absolutos, el valor promedio del porcentaje de producción entraba dentro del valor de referencia obtenido, pero no así su intensidad de fluorescencia media la cual resultó tres veces mayor comparado con el grupo 1 de testigos sanos.

Por último debido a que no se cuenta con parámetros de calidad reportados en la literatura para la técnica, se estableció que los CV fueran menores a un 6% en la reproducibilidad intralaboratorio.

La obtención de un valor de referencia en adultos tiene como objetivo, establecer un control positivo interno para cada corrida.

Conclusiones

- 1) Se seleccionó la técnica de tinción intracelular en células monocíticas obtenidas por gradiente de densidad, debido a 1) su mayor producción de ambas citocinas 2) el menor número de células muertas para observar una mayor funcionalidad de estas y 3) una IFM que permite discriminar entre células productoras de las no productoras, siendo las condiciones óptimas para la determinación de IL-6 y TNF- α una incubación de 4 horas a 37°C con una concentración de 1 μ g/mL de LPS
- 2) La tinción con un anticuerpo monoclonal Anti-CD14 no permite identificar a los monocitos una vez activados, se recomienda el uso de otro marcador de superficie por ejemplo CD45.
- 3) La determinación de IL-12 requiere que se complemente su estudio con la estimulación de diferentes concentraciones de IFN- γ biotecnológico comercial.

Bibliografía

1. Kindt T, Goldsby R & Osborne. Inmunología de Kuby. 6ª. ed. España: McGraw-Hill , 2007
2. Travers P, Walport M & Inmunobiología de Janeway .7ª ed. Editorial McGrawHill. Mexico, DF 2009
3. Abbas A, & Lichtman A. Inmunología Celular y Molecular. 5ª. ed. España: Elsevier; 2004.
4. Regueiro GJ. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª. ed. España: Panamericana.
5. Yona S & Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. Current Opinion in Hematology. Jan 2010; 17(1):53-59.
6. Serbina N, Jia T, Hohl T, & Pamer E. Monocyte-Mediated Defense against Microbial Pathogens. Annu. Rev. Immunol. 2008. 26:421–52
7. Auffray C, Sieweke M & Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. Annu. Rev. Immunol. 2009. 27:669–92
8. Targan S, Shanahan S & Karp L. Inflammatory Bowel Disease. Translating basic science into clinical practice (2011). Editorial Wiley-Blackwell pp 752
9. Akira S, Hirano T, Taga T & Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). FASEB J. 1990 Aug; 4(11):2860-7.
10. Antal-Szalmás P, Poppelier MJ, Broekhuizen R, Verhoef J, van Strijp JA & van Kessel KP. Diverging pathways for lipopolysaccharide and CD14 in human monocytes. Cytometry. 2000 Dec 1; 41(4):279-88.
11. Rojas-Espinosa. Inmunología de Memoria (2008). 3 ediciones. Editorial Médica Panamericana. México, DF. pp. 161-164

12. Barbara JA, Van ostadeX&Lopez A. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol.* 1996 Oct; 74(5):434-43.
13. S. Kodamaa, Davis M &Faustman DL. The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *Cell MolLifeSci.* 2005 Aug; 62(16):1850-62.
14. Bell SJ&KammMA . Review article: the clinical role of anti-TNFalpha antibody treatment in Crohn's disease. *AlimentPharmacolTher.* 2000 May; 14(5):501-14.
15. FieschiC&Casanova JL. The role of interleukin-12 in human infectious diseases: only a faint signature. *Eur J Immunol.* 2003 Jun; 33(6):1461-4.
16. Colombo MP&Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Apr; 13(2):155-68.
17. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM&Ward LD. Interleukin-6: structure-function relationships. *ProteinSci.* 1997 May; 6(5):929-55.
18. Giovannini S, Onder G, Liperoti R, Russo A, Carter C, Capoluongo E, et al. Interleukin-6, C-reactive protein, and tumor necrosis factor-alpha as predictors of mortality in frail, community-living elderly individuals. *J Am Geriatr Soc.* 2011 Sep;59(9):1679-85
19. Heinrich PC, Castell JV&Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990 Feb 1; 265(3):621-36.
20. DallmanMJ, Montgomery RA, LarsenCP, Wanders A, Wells AF. Cytokine gene expression: analysis using northern blotting, polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Immunol Rev.* 1991 Feb;119:163-79.
21. Carter LL1, SwainSL. Single cell analyses of cytokine production. *Curr Opin Immunol.* 1997 Apr;9(2):177-82.

22. Cannon JG¹, Nerad JL, Poutsika DD, Dinarello CA. Measuring circulating cytokines. *J Appl Physiol* (1985). 1993 Oct; 75(4):1897-902.
23. Verbruggen A, De Clerck LS, Bridts CH, Van Offel JF, Stevens WJ. Flow cytometrical determination of interleukin 1beta, interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in monocytes of rheumatoid arthritis patients; relation with parameter. *Cytokine*. 1999 Nov;11(11):869-74.
24. Jung Tz, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993 Feb 26;159(1-2):197-207.
25. Prussin C¹, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods*. 1995 Dec 15;188(1):117-28.
26. Maino, V. C., & Picker, L. J. (1998). Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry*, 34(5), 207-215.
27. Schuerwegh, A. J., De Clerck, L. S., De Schutter, L., Bridts, C. H., Verbruggen, A., & Stevens, W. J. (1999). Flow cytometric detection of type 1 (IL-2, IFN- γ) and type 2 (IL-4, IL-5) cytokines in T-helper and T-suppressor/cytotoxic cells in rheumatoid arthritis, allergic asthma and atopic dermatitis. *Cytokine*, 11(10), 783-788.
28. Longobardi G. *Flow Cytometry. First Principles*. 2^o ed. EE.UU: Wyles-Liss. 2001.
29. Schmid I. *Clinical Flow Cytometry - Emerging Applications*. 1a ed. EE.UU: InTech, 2012
30. Hawley T. *Flow Cytometry Protocols (Methods in Molecular Biology)*. 2a ed. EE.UU Lippincott Williams & Wilkin, 2011

31. Nguyen, D. T., Diamond, L. W., & Braylan, R. C. (2007). Flow cytometry in hematopathology: A visual approach to data analysis and interpretation. Humana Press.
32. Tsieh Sun. Flow Cytometry and Immunohistochemistry for Hematologic Neoplasms, 1a ed. EE.UU: Lippincott Williams & Wilkins, 2008
33. Morel G, Cavalier A, G.Caballero T & Gallego R. Hibridación in situ en microscopía óptica. Chile: Universidad de Santiago Compostela, 2000.
34. Cruz BC, Sarraloz SM & Laclette S. Análisis de la población de células T reguladoras Foxp3 en el modelo murino de amibiasis intestinal. N O V A 2011; 8(13) : 20-26
35. Carrillo EF, Delgado G, Ojeda P, Rodríguez CA, Buitrago MR & Aristizábal FA. Modulación de la diferenciación de células dendríticas por antígenos tumorales pulmonares. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (2), 172-192, 2009
36. Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH & Stevens WJ. Comparison of intracellular cytokine production with extracellular cytokine levels using two flow cytometric techniques. Cytometry B Clin Cytom. 2003 Sep; 55(1):52-8.
37. Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. Cytometry. 2001 Jun 15; 46(3):172-6.
38. Le Meur Y, Lorgeot V, Aldigier JC, Wijdenes J, Leroux-Robert C, & Praloran V. Whole blood production of monocytic cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, sIL-6R, IL-1Ra) in haemodialysed patients. Nephrol Dial Transplant. 1999 Oct; 14(10):2420-6.
39. Bueno C, Almeida J, Alguero MC, Sánchez ML, Vaquero JM, Laso FJ, et al. Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. Cytometry. 2001 Feb 15; 46(1):33-40.

40. Becton, Dickinson. Activation of Immune Cells for Cytokine Production
 Disponible en: http://wwwbdbiosciences.com/resources/protocols/activation_immune_cells.jsp Acceso el 10 de Agosto de 2013
41. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968;97:7.
42. Yeo C, Saunders N, Locca D, Flett A, Preston M, Brookman P, et al. Ficoll-Paque versus Lymphoprep: a comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations. Regen Med. 2009 Sep;4(5):689-96.
43. Anaya JM, Shoenfeld Y, Correa P, Garcia M & Cervera R. Autoinmunidad Y Enfermedades Autoinmunes. 1ª ed Colombia: Corporación para investigaciones Biológicas, 2005
44. BeckmanCoulter Protocolos y Técnicas de Cultivos y Soluciones Celulares. Disponible en: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf. Acceso el 10 de Agosto de 2013
45. Sagretin ME. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales) Disponible en: <http://www.argenbio.org/adu/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf> Acceso el 10 de Agosto de 2013
46. Gil-Loyzaga PE. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. 1ª ed. España: Vision Libros, 2011.
47. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. J Cell Biol. 1992 Mar; 116(5):1071-80.
48. CellSignaling. Brefeldrin A. Disponible en: <http://www.cellsignal.com/pdf/9972.pdf>. Acceso el 10 de Agosto de 2013.

49. Amura C, Kamei T, Ito N, Soares M & Morrison D. Differential Regulation of Lipopolysaccharide (LPS) Activation Pathways in Mouse Macrophages by LPS Binding Proteins. *J Immunol* 1998; 161:2552-2560.

50. Sigma A. Glycobiology Analysis Manual. Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/1/glycobiology-analysis-manual.pdf.

Acceso el 10 de Agosto de 2013

51. Triantafilou, M., & Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in immunology*, 23(6), 301-304.

52. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem*. 1985 Jan;33(1):77-9.

53. Zelenin AV, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, Kolesnikov VA, Nikitin SM et al. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry*. 1984 Jul;5(4):348-54.

54. Beckton Dickinson & Company. Cell Viability Solution Via Probe.

Disponible en: [http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/BD%20Pharmingen/](http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/BD%20Pharmingen/555816.pdf)

555816.pdf. Acceso el 10 de Agosto de 2013

55. Bazil V & Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol*. 1991 Sep 1;147(5):1567-74.

56. Le-Barillec K, Si-Tahar M, Balloy V & Chignard M. Proteolysis of monocyte CD14 by human leukocyte elastase inhibits lipopolysaccharide-mediated cell activation. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(7):1039-46.

57. Ramirez A. Detección de Mutaciones que conducen al desarrollo de infecciones micobacterianas por susceptibilidad Mendeliana. (Tesis de Maestría). Mexico: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, 2010.

58. Lexberg, M. H., Taubner, A., Albrecht, I., Lepenies, I., Richter, A., Kamradt, T., ... & Chang, H. D. (2010). IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *European journal of immunology*, 40(11), 3017-3027.

59. Castaño, D., & Rojas, M. (2012). Alteraciones en fagocitos mononucleares: un viraje al significado de la muerte de monocitos y macrófagos en la inmunopatogénesis de la tuberculosis. *Biomédica*, 30, 45-64.

Apéndices

6. Apéndice

I. Cuestionario para la Inclusión y Partición de Individuos de Referencia

NOMBRE: _____ Teléfono _____
Domicilio: _____
Edad: _____ Sexo: (M) (F)

Contestar el siguiente cuestionario.

Pregunta	Opciones	
¿Considera que su hijo se encuentra sano	Si	No
¿Actualmente está bajo el cuidado de algún médico?	Si	No
¿Ha sido hospitalizado recientemente? (En caso confirmatorio) ¿Cuál fue la razón?	Si	No
¿Ha sido vacunado recientemente?	Si	No
¿Es alérgico a algún medicamento o Alimento? En caso Afirmativo mencione a cual: _____?	Si	No
¿Existen trastornos hereditarios en su familia? (En caso confirmatorio) Mencione cual _____	Si	No
¿Ha tenido algún resfriado o alergia reciente?	Si	No
¿Ha presentado fiebre en los últimos 7 días?	Si	No