



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FCB

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Laboratorio de Inmunología y Virología**



**Inmunidad Innata en Salud y Enfermedades infecciosas
Modulo práctico 4 Monterrey
24 al 28 de Septiembre de 2018**

SEDE

**Laboratorio de Inmunología y Virología
Facultad de Ciencias Biológicas, UANL
Monterrey; Nuevo León, México**



Modulo Práctico 4 Monterrey

Profesores:

Dr. Cristina Rodríguez Padilla
Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Profesores colaboradores:

M.C. Leonardo Castillo León
M. A. Herlinda Juanita Vielma Ramírez
M. C. Ashanti C. Uscanga Palomeque

**PROGRAMA DEL CURSO
PROGRAMA DEL CURSO INTERNACIONAL
INMUNIDAD INNATA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

MÓDULO PRÁCTICO 4. MONTERREY

Días	Título	Ponente	Horas	
Lunes 24 de Septiembre	Bienvenida al curso	Dra Cristina Rodríguez Padilla	9:00-9:30	
	Introducción	Dra Lydia Gpe. Rivera Morales	9:30-10:15	
	Receso /Café			10:15-10:30
	Fagocitosis	MC Leonardo Castillo León	10:30-11:30	
	Práctica de Fagocitosis	MA Herlinda J. Vielma Ramírez	11:30-13:30	
	Comida			13:30-15:00
	Estallido respiratorio	MC Leonardo Castillo León	15:00-15:30	
	Práctica Reducción NBT	MA Herlinda J. Vielma Ramírez	15:30-17:30	
	Revisión de casos clínicos de alteraciones durante la fagocitosis presentada por estudiantes del Módulo 4			
Martes 25 de Septiembre	Parte práctica			
	Microtécnica de fagocitosis	Dra Lydia Gpe. Rivera Morales	9:15-11:15	
	Receso / Café			11:15-11:30
	Ensayo de NBT: Método colorimétrico	Mc Leonardo Castillo León	11.30-13:00	
	Comida			13:00-15:00
	Citometría (parte teórica)	MA Herlinda J. Vielma Ramírez	15:00-16:00	
	Revisión de publicaciones sobre Inmunidad innata presentada por estudiantes del Módulo 4			

Días	Título	Ponente	Horas
Miércoles 26 de Septiembre	Citocinas e Inmunidad Innata	Dra Lydia Gpe. Rivera Morales	9:00-10:00
	Introducción CBAs.	MC Ashanti C. Uscanga Palomeque	10:00-10:30
	Receso /Café		10:30-10:45
	Práctica CBSs: procesamiento de muestras	MC Ashanti C. Uscanga Palomeque	10:45-13:00
	Comida		13:00-15:00
	Continuación de la práctica Y lectura	MC Ashanti C. Uscanga Palomeque	15:00-17:00
	Revisión de publicaciones sobre Inmunidad innata presentada por estudiantes del Módulo 4 (en tiempos libres)		
Jueves 27 de Septiembre	Parte teórica sobre eventos del fenómeno fagocítico		
	Señalamiento durante fenómenos fagocíticos	MC Ashanti C. Uscanga Palomeque	9:15-12:00
	Comida		12:00_14:00
	Revisión de publicaciones sobre Inmunidad innata presentada por estudiantes del Módulo 4		
Viernes 28 de Septiembre	Exámen parte práctica del módulo 4	Dra Lydia Gpe Rivera Morales	9:15-11_00
	Receso		11:00-11:30
	Clausura Curso Práctico Módulo Monterrey	Profesores del Curso	12:00

INTRODUCCIÓN

Inmunidad innata

El sistema inmune tiene dos componentes, uno sumamente específico y otro que responde de una forma más general. Este último se refiere a la inmunidad innata, la cual es la primera línea de defensa contra agentes de naturaleza infecciosa. Los componentes del sistema inmune innato existen antes de la infección, se caracterizan por no ser específicos de un patógeno, sino que incluye componentes celulares y moleculares, los cuales son capaces de reconocer moléculas que con frecuencia se encuentran en una amplia gama de patógenos.

La primera barrera que debe superar un agente infeccioso es la piel, seguido de las membranas mucosas. Por su parte el componente ácido presente en el ambiente estomacal y el sudor son otros mecanismos de defensa de suma importancia. Algunas enzimas como la lisozima, presente en las lágrimas, atacan las paredes celulares de algunas bacterias.

Adicional a las barreras físicas, el sistema inmune innato incluye diversas células, como los fagocitos, otro elemento de suma importancia es la síntesis de péptidos con naturaleza antimicrobiana por parte del hospedador, los cuales son capaces de reconocer y neutralizar a los invasores con base en marcadores moleculares de superficie comunes. Diversos factores de naturaleza soluble contribuyen a la inmunidad innata, un ejemplo son las proteínas del interferón y componentes del sistema del complemento.

Muchas de las moléculas que participan en la inmunidad innata tienen la propiedad del reconocimiento de patrón, que se define como la capacidad de identificar una clase específica de moléculas, que se destacan por ser exclusivas de los microbios y nunca se encuentran en organismos multicelulares, por lo que la capacidad de reconocer y combatir de inmediato a invasores que poseen estas moléculas es una característica muy útil de la inmunidad innata.

Si un patógeno supera las barreras físicas y químicas del hospedador, es posible que sea detectado por moléculas de reconocimiento de patrón del hospedador y atrapado por células fagocíticas, lo que hace que el sistema experimente una reacción inflamatoria. Por todo lo anterior es de suma importancia que existe un fino equilibrio entre todos los componentes del sistema inmune innato.

ENSAYOS DE FAGOCITOSIS Y MUERTE PARA ESPECIES DE *Candida*

Los ensayos de fagocitosis *in vitro* son realizados con células fagocíticas/cultivos de *Candida* sobre muestras tomadas a puntos de tiempo específicos. Un método de evaluar la fagocitosis es por la observación directa al microscopio de las células con levaduras en su interior.

Protocolo de aislamiento de Polimorfonucleares de sangre periférica

1. Colectar 20 mL de sangre periférica por medio de punción venosa utilizando el dispositivo de aguja Safety-Lock de BD Vacutainer en tubos al vacío heparinizados.
2. Trasladar la sangre en tubos Falcon de 50 mL y diluirla 1:1 con PBS.
3. Colocar 20 mL de Polilymphoprep en 1 tubo Falcon de 50 mL de fondo cónico con el uso de una pipeta de 10 mL. De manera muy cuidadosa, tomar 20 mL de la muestra de sangre y verterla despacio por la pared del tubo de 50 mL que contienen el Polilymphoprep de tal forma que no se rompa la fase entre los dos líquidos.
4. Al terminar de verter la sangre, tapar los tubos y centrifugarlos a 400 g por 30 minutos a una temperatura de 25°C, asegurándose de que el freno de la centrifuga esté desactivado.
5. Una vez que transcurran los 30 minutos, se espera observar en el tubo 2 capas de células: la primera capa de células de color blanco que es donde se encuentran las células mononucleares, la siguiente capa es la que corresponde a los polimorfonucleares y finalmente en el fondo del tubo el paquete globular (glóbulos rojos).
6. Con la ayuda de una micropipeta de 1,000 µL y de forma muy cuidadosa, colectar en un tubo de 50 mL de fondo cónico solamente la segunda capa de células que son los polimorfonucleares, teniendo cuidado de no aspirar tanto el plasma ni tampoco el

Polilinphoprep que está en la parte inferior, esto con el fin de evitar contaminación celular de plaquetas y eritrocitos.

7. Una vez que se colecte la capa de células polimorfonucleares someter a dos lavados las células utilizando PBS 1X o solución slina estéril, pH de 7.2. Para el primer lavado, añadir un volumen de 35 mL y centrifugar a 200 g por 15 minutos a 25°C.
8. Transcurridos los 10 minutos, decantar el sobrenadante y conservar el pellet celular.
9. Resuspender el pellet en 35 mL de PBS 1X y centrifugar nuevamente a 200 x g por 10 min a 25°C.

Nota: Las células fagocíticas pueden ser obtenidas también con una solución dextran/salino en un tubo falcon de 15 mL y dejarlo en posición vertical cerca de 30 min a 1 h. Con este procedimiento se obtiene un plasma rico en leucocitos.

Ajustar la concentración de las células a 4×10^6 /mL con solución salina o resuspender las células en medio RPMI-1640. (la proporción de levaduras /polimorfonucleares debe ser 10:1). Para determinar la viabilidad celular, mezcle 15 μ L de células en suspensión con 15 μ L de solución azul tripan en un tubo de 1.5 mL, y cuente las células usando un hemocitómetro para observar viabilidad. Las células están listas para uso inmediato. De otra forma, mantenga a 4°C por no más de 6-8 horas.

Desarrollo de Fagocitosis

1. Mezclar en un tubo 0.2 mL de la suspensión de levaduras y 0.2 mL de suero fresco, incubar en baño María a 37°C durante 30 min, agitando suavemente cada 5 minutos. Dejar esta mezcla en hielo hasta su uso.
2. Tomar 0.2 mL de la mezcla de levaduras y adicionar 0.2m mL de la suspensión de polimorfonucleares
3. Incubar durante 30 min.
4. Centrifugar la muestra 200 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Eliminar el sobrenadante.

6. Depositar 1 gota con una pipeta de 50 uL para preparar extendidos muy finos en portaobjetos desengrasados.
7. Secar al aire.
8. Fijar la muestra con metanol durante 5 minutos.
9. Colocar la lámina en un soporte con la extensión hacia arriba. Cubrir la preparación con la solución colorante de Giemsa (2 a 3 mL) por 15 minutos.
10. Lavar las láminas con agua corriente.
11. Facilitar el secado colocándolas en posición inclinada.
12. Realizar el conteo de los neutrófilos que fagocitaron con objetivo 100X. Además, anotar la cantidad de levaduras en el interior del citoplasma de cada célula.
13. Determinar el porcentaje de células que ingirieron las levaduras en 100 neutrófilos examinados.
14. Calcular el índice fagocítico de cada muestra como la media del número de levaduras ingeridas por neutrófilo.
15. Los intervalos de referencia se mencionan en la siguiente tabla:

	Media	Desviación estándar	Rango normal
Expresado en porcentaje	74	31	41-96
Expresado en índice fagocítico	1.89	31	0.75-3.76

ENSAYO DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO (NBT)

La destrucción de patógenos por las células fagocíticas es mediada por dos procesos fundamentales 1) la activación del sistema enzimático NADPH- oxidasa que permite la producción de especies reactivas de oxígeno durante el estallido respiratorio y 2) la formación del fagolisosoma con destrucción del patógeno por la acción de enzimas lisosomales (hidrolasa ácidas, proteasas neutras y factores microbicidas).

La NADPH-oxidasa en células en reposo está inactiva, solo se activa al iniciar el proceso de fagocitosis, y con ello aumenta el consumo de oxígeno y glucosa. Este sistema oxidasa, cataliza la transferencia de un electrón, desde la NADPH hacia el oxígeno con la formación del radical superóxido, estos productos son capaces de ejercer efectos tóxicos sobre el microorganismo ingerido.

PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA REDUCCION DE NBT

1. Preparar una cámara húmeda con una caja Petri
2. Dentro de la caja petri, colocar una gasa o papel absorbente
3. Sobre la gasa colocar dos palillos de madera
4. Humedecer con agua corriente la gasa o papel absorbente.
5. Colocar sobre los aplicadores un portaobjetos completamente limpio y libre de grasa.
6. Depositar una gota de 0.5 ml a 1 ml de sangre sin anticoagulante sobre el portaobjetos.
7. Cerrar la caja e incubar por 1 hr a 37°C
8. Después del tiempo de incubación, retirar el coágulo con un aplicador de madera.
9. Lavar con Solución salina al 0.9 % por escurrimiento, cuidando de no barrer las células adheridas a la superficie del portaobjetos

10. Cubrir la superficie del portaobjetos con NBT al 0.023% e incubar por una hora a 37°C
11. Retirar por escurrimiento el NBT sin lavar.
12. Cubrir la superficie del portaobjetos con metanol y esperar 5 min.
13. Retirar por escurrimiento el metanol, sin lavar.
14. Cubrir la superficie del portaobjetos con safranina al 1% por 15 min
15. Retirar por escurrimiento la safranina y lavar con agua bidestilada con mucho cuidado.
16. Observar al microscopio a 10X para seleccionar el área donde se observen las células completas y cambiar al objetivo 100x para contar 100 células.

Las células positivas a la reducción del NBT, toman una coloración azul en el citoplasma o presentan gránulos azul oscuros sobre el núcleo rojo o citoplasma debido a los depósitos de formazán, mientras que las células negativas sólo presentan el núcleo rojo.

Las células que no reducen el formazán, tienen un sistema deficiente NADPH-oxidasa por lo que son incapaces de producir especies reactivas de oxígeno, por tanto, carecen de este mecanismo microbicida y no pueden reducir NBT. El resultado se reporta en % de células positivas.

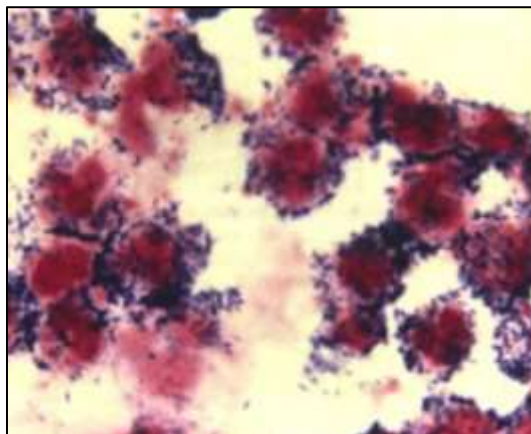


Fig. Células formazán positiva

ENSAYO CUANTITATIVO DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO (NBT) PARA DETERMINACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO INTRACELULAR

Hying Sim Choi and cols

En este tipo de ensayo modificado de NBT, es un método colorimétrico que es sensible y puede ser determinado cuantitativamente en comparación al método convencional del ensayo de NBT por microscopía. El ensayo de NBT es usado para determinar la producción de anión superóxido (O_2^-) por varias células fagocíticas.

La capacidad de las células fagocíticas para producir anión superóxido (O_2^-) en respuesta a un estímulo dado como N formil-metionin-leucil-fenilalanina (FMLP) o forbol 12 miristato 13 acetato (PMA) varía dependiendo del tipo de células y de la especie de animal de donde provienen las células. Este ensayo puede medir la producción de anión superóxido (O_2^-) intracelular. (ver procedimiento)

Microtécnica de fagocitosis y muerte intracelular de *C.albicans*

La fagocitosis es un mecanismo muy importante en la Inmunidad innata, las células que poseen capacidad fagocítica son atraídas por sustancias quimiotácticas y migran hacia los focos donde se encuentran los microorganismos, inmunocomplejos y células muertas por apoptosis. Por lo tanto, una deficiencia en la capacidad de fagocitar, incrementaría el riesgo para tener infecciones y trastornos inmunopatológicos.

Las técnicas de evaluación de la capacidad fagocítica han mostrado presentar procesos prolongados, requieren de gran cantidad de muestra sanguínea y excesiva manipulación de las células analizadas, por otro lado, la microtécnica de muerte celular de *Candida* para el análisis de la función fagocítica es una técnica rápida, y requiere de muy poca cantidad de sangre. Esta puede ser una herramienta diagnóstica importante, reproducible para evaluar el funcionamiento del sistema inmune innato, específicamente en la fagocitosis.

Obtención de células adherentes (polimorfonucleares neutrófilos)

Tres gotas de sangre sin anticoagulante se colocaron en una laminilla de vidrio de 22 x 22mm, con reborde definido de 1cm de diámetro; estas muestras fueron incubadas en cámara húmeda a 37°C por 1 hora. El coágulo se retiró y la laminilla fue lavada con solución buffer de Hank's (pH 7.2) precalentada a 37°C, para retirar las células no adherentes. Cada muestra fue procesada por duplicado.

Solución de *Candida albicans*

De un cultivo no mayor de 24 horas de *Candida albicans* en agar Saboreaud se tomó una alícuota, la cual fue lavada tres veces con solución de Hank's precalentada a 37°C, para obtener una concentración final de 2×10^6 UFC/mL de candida.

Pool de opsoninas

Como fuente de opsoninas (complemento e inmunoglobulinas) se usó un pool de sueros de personas normales que fue separado en alícuotas y conservado a -80°C hasta el momento de su uso.

Microtécnica de fagocitosis y muerte intracelular de *Candida albicans*

Las células adheridas al vidrio fueron incubadas a 37°C durante 10 minutos en cámara húmeda con 120 uL de la solución de *Candida albicans* y 50 uL del pool de opsoninas. Posteriormente, las laminillas fueron lavadas 2 veces con solución de buffer Hank's, previamente precalentada a 37°C; adicionalmente, para evitar la desecación, se adicionaron 200 uL del buffer a las células adheridas e incubadas en cámara húmeda a 37°C durante 40 minutos. Finalmente, la tinción de células vivas y muertas se llevó a cabo adicionando 50 μ L de solución de azul de metileno (1M en solución de Hank's) e incubado por 10 minutos a 37°C en cámara húmeda. La lectura se realizó en microscopio de luz, contando 100 PMN con el número total de candidas fagocitadas. El índice de fagocitosis se calcula teniendo en cuenta el número de candidas que fagocitó un PMN. Para la muerte intracelular de candida, el porcentaje es calculado teniendo en cuenta del total de candidas fagocitadas, cuantas capturaron el colorante (candidas muertas).

CITOMETRÍA DE FLUJO

INTRODUCCIÓN

La citometría de flujo es un método de análisis celular que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células en suspensión que producen una señal de forma individual al incidir en una fuente de luz.

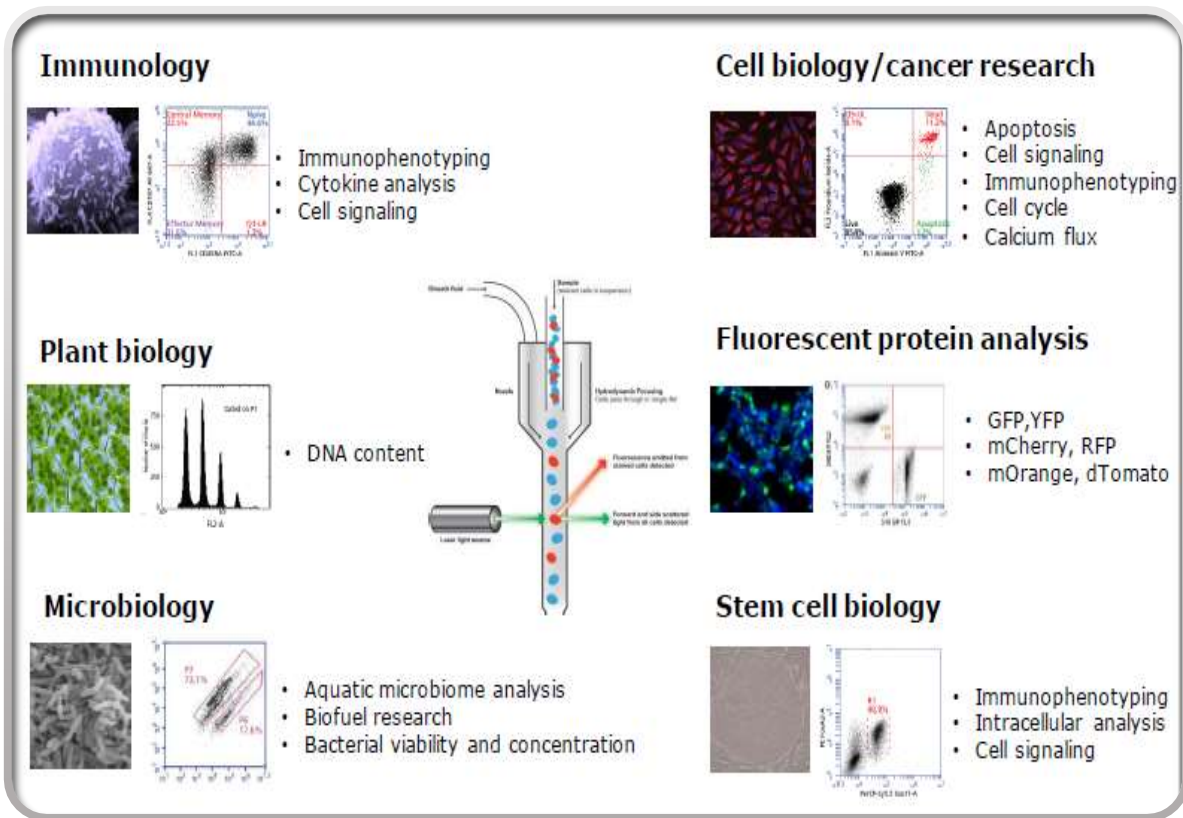
Las características celulares analizadas mediante esta tecnología son el reflejo de dos grandes grupos de parámetros:

1. Los derivados de la luz: Que al incidir sobre la célula o partícula es dispersada y que se relacionan entre otras características con el tamaño y la granularidad celular. (Forward/ Side scatter).
2. Fluorescencia: Los que se asocian con la luz generada como consecuencia de la presencia en la célula de fluorocromos, bien de forma natural (auto fluorescencia) o unidos a ella artificialmente (FL1, FL2, FL3, FL4).

El citómetro nos puede medir el tamaño, granularidad y fluorescencia emitida por alguna molécula intra o extracelular de manera natural o marcada intencionalmente.

Algunas de las aplicaciones de la citometría de flujo son:

- Inmuno-fenotipo, Identidad de linaje, función y activación.
- Ciclo celular en células fijadas o vivas.
- Expresión génica.
- Separación de células en flujo a alta velocidad.



Es necesario conocer los elementos básicos del citómetro de flujo; para ellos a continuación se enumeran, las características más importantes.

Sistemas del citómetro de flujo

- Sistema de fluido: enfoque hidrodinámico.
- Sistema óptico: tamaño, células vivas, debris o basura, granularidad.
- Sistema electrónico: detección de fluorescencia para la señalización electrónica

Procesamiento de señales

La luz llega a un fotodetector que genera una pequeña corriente, que es amplificada por un convertidor.

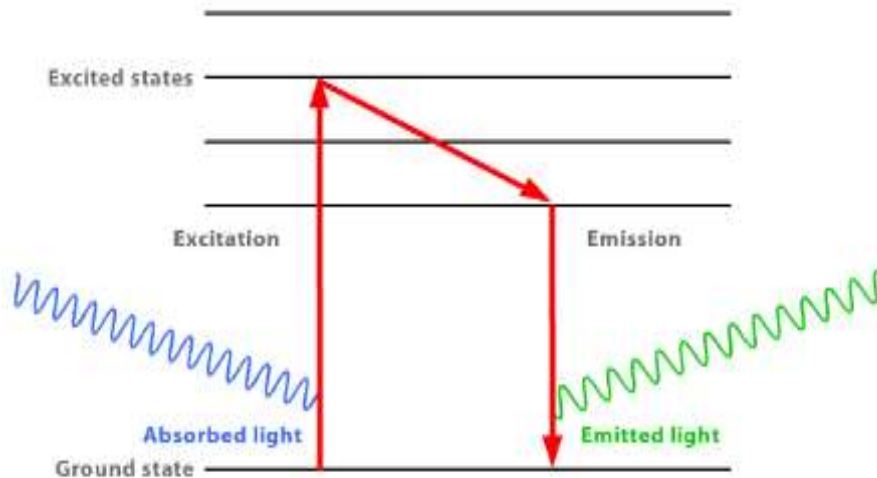
La medida de cada detector se refiere como parámetro:

- Forward scatter
- Side scatter
- Fluorescencia

Evento: número de células que muestran la característica o el marcador de interés.

Fluorocromos y luz

- Colorantes, que aceptan energía de un láser a una determinada longitud de onda y re-emite la señal en una longitud mayor.



Consejos para citometría de flujo

1. Preparación de la muestra

Es esencial optimizar la preparación de muestras, especialmente en el análisis de las células adherentes o derivadas de tejido tras la tripsinización. Los procedimientos utilizados no deben influir negativamente en la viabilidad celular y el uso de procedimientos de aislamiento enzimáticos no debe tener ningún efecto sobre la expresión de los marcadores que están siendo estudiados.

2. Eliminar uniones inespecíficas

En la muestra, es esencial evitar uniones no específicas de anticuerpos a las células. Esto se puede lograr mediante la incubación de muestras con suero de la misma especie que los anticuerpos que se están utilizando (10% de concentración durante 10 minutos antes de la tinción) o mediante el uso de soluciones de bloqueo específicas. Además la incubación, lavado y almacenamiento de las muestras deberán ser lo menos posible expuestos a la luz visible.

3. Titular los anticuerpos

Es esencial valorar todos los anticuerpos con el fin de asegurar la cantidad apropiada para cada experimento. El exceso de anticuerpo podría aumentar las uniones no específicas mientras que muy poco anticuerpo podría producir que no se detectara la presencia del antígeno diana. Aunque los anticuerpos se pueden titular por separado, es posible que la concentración óptima sea diferente cuando el anticuerpo se utiliza integrado en un panel. Por lo tanto, el control Fluorescencia Minus One (FMO*) debe realizarse con el fin de evaluar la cantidad de interferencia de un fluoróforo en un detector particular y para confirmar los límites de población. Si las poblaciones analizadas son claramente distintas entre sí, entonces no hay necesidad de realizar la FMO. La FMO es un componente esencial para asegurar la correcta puesta a punto y compensación del instrumento.

4. Detección y eliminación de células muertas

Las células muertas pueden ser una fuente de tinción no específica. Pueden ser detectadas mediante el uso de un colorante de ADN que sólo entra en las células si la integridad de la membrana ha sido comprometida.

5. Detección y Supresión de dobletes

Los dobletes (cuando dos células están pegadas y se analizan como una) aumentan falsamente la intensidad de la fluorescencia de las células que pasan por el punto de impacto del láser. Pueden ser fácilmente separados creando un diagrama que enfrente la intensidad del Forward Scatter H (luz desviada hacia adelante) frente al Forward Scatter A.

6. Estabilidad del fluorocromo

Tenga en cuenta que los fluorocromos en tándem pueden degradarse con el tiempo, la luz y la exposición al calor. Esto puede dar un falso negativo en el canal correcto y un falso positivo en el canal que es excitado por el fluorocromo original. Por ejemplo, el tandem PE-APC (Ficoeritrina – Alofocianina) pueden separarse y generar señal en los canales PE y

APC. Es, por lo tanto, esencial almacenar los reactivos correctamente y mantener las muestras protegidas de la luz.

7. Fijación y permeabilización de los reactivos

Ciertos antígenos intra-celulares pueden ser difíciles de teñir. La elección de las soluciones de fijación y permeabilización es importante y dependerá del antígeno que está siendo examinado. Por tanto, es esencial optimizar el protocolo de tinción utilizando reactivos disponibles o reactivos recomendados por el fabricante.

8. Elección del fluorocromo

Se deben conocer las configuraciones de los instrumentos (láser, filtros) y los espectros de excitación y emisión de los fluorocromos que se estén considerando utilizar. Es imposible diseñar un experimento con éxito sin disponer de esta información. También debe tener en cuenta el brillo de las diferentes opciones ya que normalmente, se debe utilizar un fluorocromo brillante para detectar antígenos que se expresan con baja intensidad así como fluorocromos más atenuados para detectar antígenos con mayor expresión. Sin embargo, la elección del fluorocromo también es importante para la compensación y se debe sopesar la posibilidad de que fluorocromos brillantes pueden causar problemas debido al solapamiento de los espectros de emisión.

9. Compensación

Debe tener en cuenta la complicación que implica utilizar muchos fluorocromos en un experimento, debido a la superposición espectral y a la invasión de fluorescencias entre los diferentes canales. Hay que tener en cuenta cuestiones tales como la pérdida de la sensibilidad, las interacciones entre reactivos y la transferencia de energía no deseada entre fluorocromos adyacentes. Si es posible, se deben separar lo más posible la emisión de los fluorocromos utilizando la excitación de múltiples láseres, con el fin de minimizar tanto solapamiento espectral como la compensación.

Los controles de compensación se pueden configurar utilizando microesferas fluorescentes, en lugar de realizarlos utilizando muestras que pueden ser valiosas.

10. Almacenamiento de las muestras

Idealmente, las muestras deben ser analizadas inmediatamente. Sin embargo, si no es posible, pueden ser resuspendidas en 100 microlitros de fijador (por ejemplo, formaldehído al 1-2%). Se pueden almacenar hasta 24 horas (o incluso más tiempo si se optimiza el proceso) a 4 ° C y protegidas de la luz.

Aunque estos son algunos consejos, muchos otros aspectos deben ser considerados y abordados con el fin de garantizar el éxito del experimento, como por ejemplo la correcta adquisición y análisis de datos, los procedimientos de preparación de la muestra y del tampón estándar etc. Sin embargo, la clave es entender los principios y la práctica de la citometría de flujo y ser conscientes de las dificultades y limitaciones de esta técnica para el análisis detallado de células.

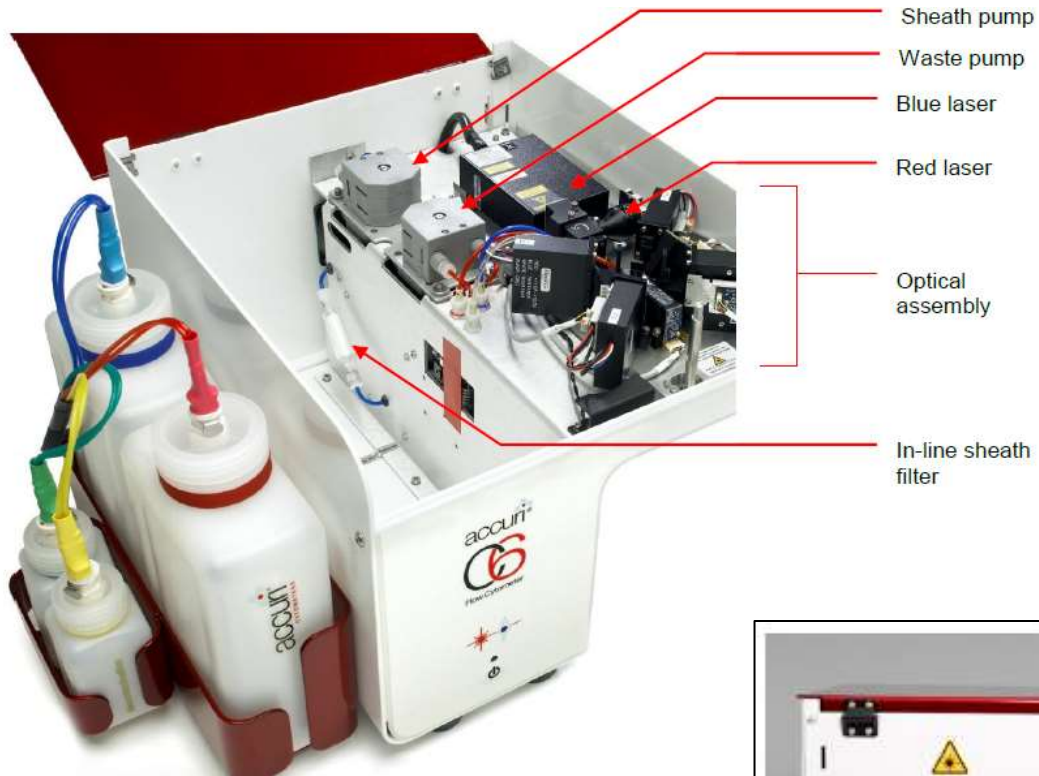
BD Accuri™ C6 Flow Cytometer Instrument Manual



- Especificaciones de BD Accuri C6

Laser	488 nm 640 nm
Detectores de emisión	4 colores, filtros estándares. <ul style="list-style-type: none">• FL1 533/30 nm (e.g. FITC/GFP)• FL2 585/40 nm (e.g. PE/PI)• FL3 > 670 nm (e.g. PerCP, PerCP-Cy™5.5, PE-Cy7)• FL4 675/25 nm (e.g. APC)
Detección mínima de tamaño de partícula	.5 µm

PARTES DEL CITÓMETRO ACCURI C6



In-line Sheath Filter



SIP Collar

SIP

Sample Stage

- FL1—533/30
- FL2—585/40
- FL3—670LP
- FL4—675/25



Sheath pump

Waste pump



Collect **Analyze** **Statistics** **Batch Analysis**

A01 Click Here To Restore Sample

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	41	42	43	44	45	46	47	48	49	410	411	412
B	51	52	53	54	55	56	57	58	59	510	511	512
C	61	62	63	64	65	66	67	68	69	610	611	612
D	71	72	73	74	75	76	77	78	79	710	711	712
E	81	82	83	84	85	86	87	88	89	810	811	812
F	91	92	93	94	95	96	97	98	99	910	911	912
G	01	02	03	04	05	06	07	08	09	010	011	012
H	101	102	103	104	105	106	107	108	109	1010	1011	1012

OK Calendar not connected.

Run Settings

Run Detached Run with Links

Flow **Events**

Min **Sec**

Do not collect events visible

Threshold
 in FSC-H

Buttons:

Run

Get Data Compensation

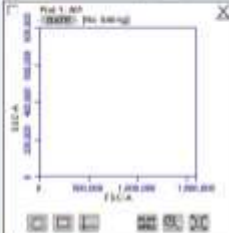
Last Run **Compensative** **Event Events** **Viewing**

0:00:00 **Time** 0:00:00 **All**

0: **Monitors** 0 **Custom**

0: **Events** 0 **Events**

Data Capacity Used
 0% of 68,000,000 Events



Select plot type to make a new plot.



Select plot type to make a new plot.



Select plot type to make a new plot.



Select plot type to make a new plot.



Select plot type to make a new plot.



Plot 1: SSC - FSC: No string	Event	Volume (L)	% of This Plot	% of All	Mean FSC-A	Mean SSC-A	CV FSC-A	CV SSC-A	Median FSC-A	Median SSC-A
41	0	0	100.00%	100.00%	0.00	0.00	0.00%	0.00%		

Plot 1: SSC - FSC: No string	Event	Volume (L)	% of This Plot	% of All	Mean FSC-A	Mean SSC-A	CV FSC-A	CV SSC-A	Median FSC-A	Median SSC-A
41	0	0	100.00%	100.00%	0.00	0.00	0.00%	0.00%		

INMUNO-ENSAYO MULTIPLEX BASADO EN PERLAS CBA DE BD

CITOCINAS

Estos análisis, nos proporcionan mayor cantidad de datos utilizando una única muestra. Los ensayos multiplex son especialmente útiles cuando se tiene una pequeña cantidad de la muestra, lo que maximiza el número de proteínas que pueden ser analizadas.

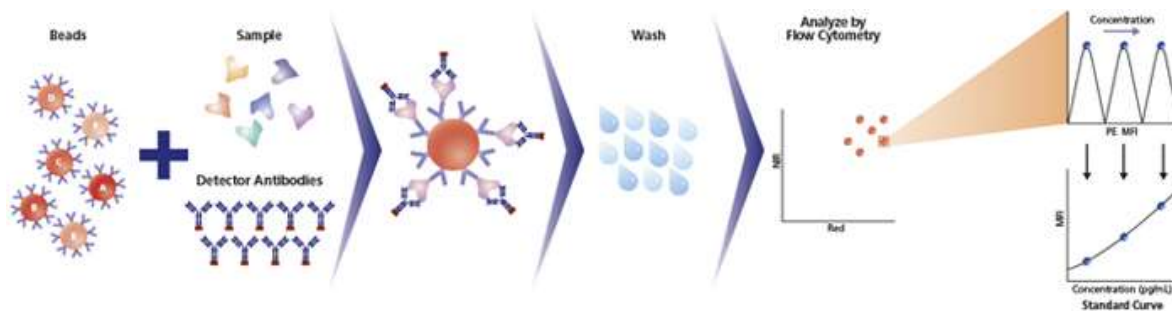
Con CBA (Cytometric Bead Array) se pueden analizar de hasta 30 proteínas utilizando sólo 25 a 50 µl de muestra. Otros métodos tales como ELISA y Western blot requieren una cantidad similar de la muestra, pero sólo una proteína puede ser analizada.

Con el sistema de sensibilidad Flex Set BD CBA mejorada, es posible detectar tan bajo como 0.274 pg/ml en un ensayo.

Se incluye ensayos para la medición de una gran variedad de proteínas solubles e intracelulares, incluyendo citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, y proteínas de señalización celular fosforilados.

- Principios

Cada perla de captura tiene una intensidad de fluorescencia única y se recubre con un anticuerpo de captura específico para un solo analito.



Una combinación de diferentes perlas se mezcla con la muestra o los estándares y una mezcla de anticuerpos de detección que se conjuga con una molécula reportera (PE).

Después de la incubación y posterior lavado, las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo, el cual determina la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada analito. Se genera una curva estándar y lleva a cabo la interpolación de concentraciones de la muestra en comparación con la curva estándar y genera un informe de análisis.

Evaluación de producción de citocinas humanas mediante perlas con el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit

Reactivos:

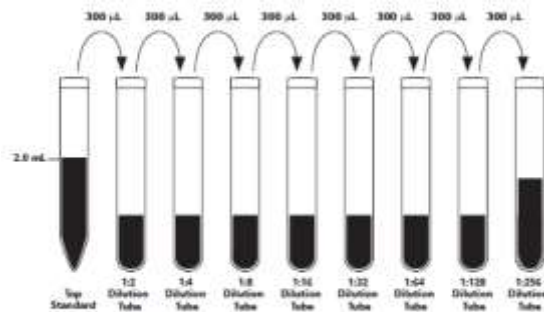
Vial label	Reagent	Quantity
A1	Human IL-2 Capture Beads	1 vial, 0.8 mL
A2	Human IL-4 Capture Beads	1 vial, 0.8 mL
A3	Human IL-6 Capture Beads	1 vial, 0.8 mL
A4	Human IL-10 Capture Beads	1 vial, 0.8 mL
A5	Human TNF Capture Beads	1 vial, 0.8 mL
A6	Human IFN- γ Capture Beads	1 vial, 0.8 mL
A7	Human IL-17A Capture Beads	1 vial, 0.8 mL
B	Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent	1 vial, 4 mL
C	Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Standards	2 vials, 0.2 mL lyophilized
D	Cytometer Setup Beads	1 vial, 1.5 mL
E1	PE Positive Control Detector	1 vial, 0.5 mL
E2	FITC Positive Control Detector	1 vial, 0.5 mL
F	Wash Buffer	1 bottle, 130 mL
G	Assay Diluent	1 bottle, 30 mL
H	Serum Enhancement Buffer	1 bottle, 10 mL

- **Reconstitución y dilución de estándares:**

1. Abrir el vial con el estándar liofilizado y transferir las esferas en un tubo cónico de polipropileno de 15mL. Marcarlo como “Top Standard.”
2. Reconstituir el estándar con 2mL de diluyente.
 - a. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
 - b. Mezclar el mix reconstituido, solo con pipeta. No mezclar vigorosamente.

El reactivo estándar se compone de una concentración conocida de cada una de las citocinas que se pretende analizar.

3. Se etiquetaron 8 tubos de 12 x 75mm. con la siguiente nomenclatura: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.
4. Agregar 300µL de diluyente en cada tubo recién etiquetado.
5. Realizar la dilución seriada como se indica:
 - a. Pasar 300µL del tubo “Top Standard” al tubo marcado como dilución 1:2 y mezclar con la pipeta.
 - b. Continuar con las diluciones transfiriendo 300µL del tubo 1:2 al marcado con 1:4 y así sucesivamente hasta la dilución 1:256.
 - c. Mezclar con la pipeta, no usar el vórtex.



6. Preparar un tubo con 300µL solo del diluyente, el cual servirá como control negativo 0 pg/mL.

- **Preparación del Mix de perlas de captura:**

1. Determinar el número de ensayos, incluyendo los estándares requeridos para el experimento. (ejemplo, 8 muestras problema, 9 diluciones del estandar y 1 control negativo = 18 tubos).
2. Agitar vigorosamente usando el vórtex, cada suspensión de perlas de captura (Capture Bead) durante 3 a 5 segundos.

Nota: las perlas conjugadas con anticuerpo se sedimentarán con el tiempo. Es necesario agitar en vórtex el vial antes de tomar una alícuota de suspensión de perlas.

3. Adicionar 10 μ L de cada perla de captura, por cada ensayo en un solo tubo etiquetado como "mix de perlas" (ejemplo, 10 μ L de las perlas de IL-2 \times 18 ensayos = 180 μ L de IL-2 son requeridos).
4. Mezclar vigorosamente con ayuda del vórtex.

Si está utilizando muestras de suero o plasma, debe realizar este procedimiento. Este procedimiento es opcional para todos los demás tipos de muestra.

- **Enriquecimiento de las perlas de captura:**

1. Centrifugare el mix de perlas a 200g por 5 minutos.
2. Cuidadosamente descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet de mix de perlas en el buffer enriquecedor de suero (serum enhancement buffer) a un volumen igual que lo que se desechó en el paso anterior y mezclar vigorosamente.
4. Incubar el mix de perlas durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz.

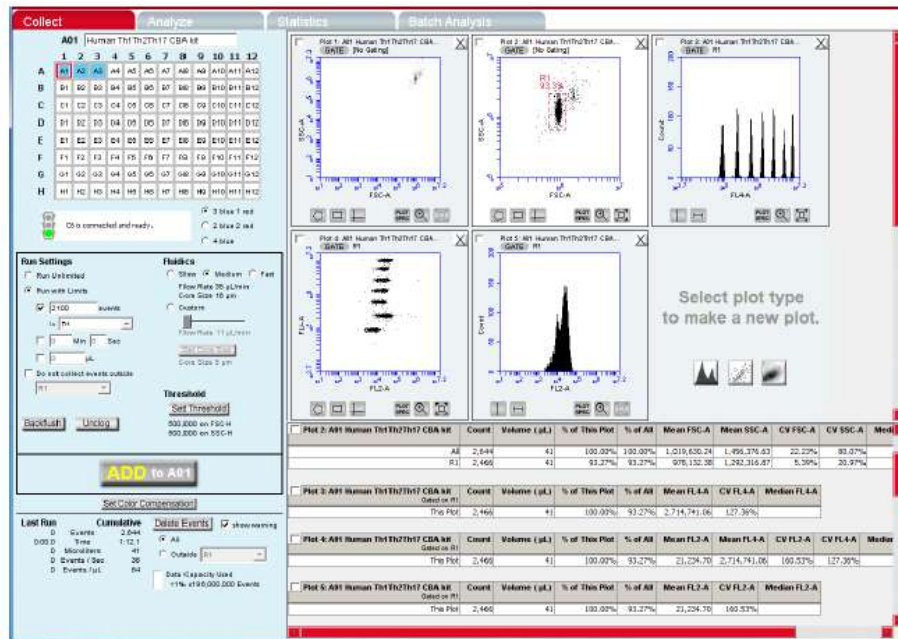
Preparación de estándares y muestras para el análisis:

1. Etiquetar los tubos necesarios para el ensayo, ya sean muestras problemas o los estándares.
2. Mezclar mediante vórtex, el mix de perlas y agregar 50µL a cada tubo.
3. Adicionar 50µL de cada punto de la curva estándar en el tubo correspondiente. Como se muestra en la tabla:

Tubo	Concentración (pg/mL)	Dilución de los estándares de las Citocina
1	0 (control negativo)	Solo diluyente
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312.5	1:16
7	625	1:8
8	1250	1:4
9	2500	1:2
10	5000	Top standard

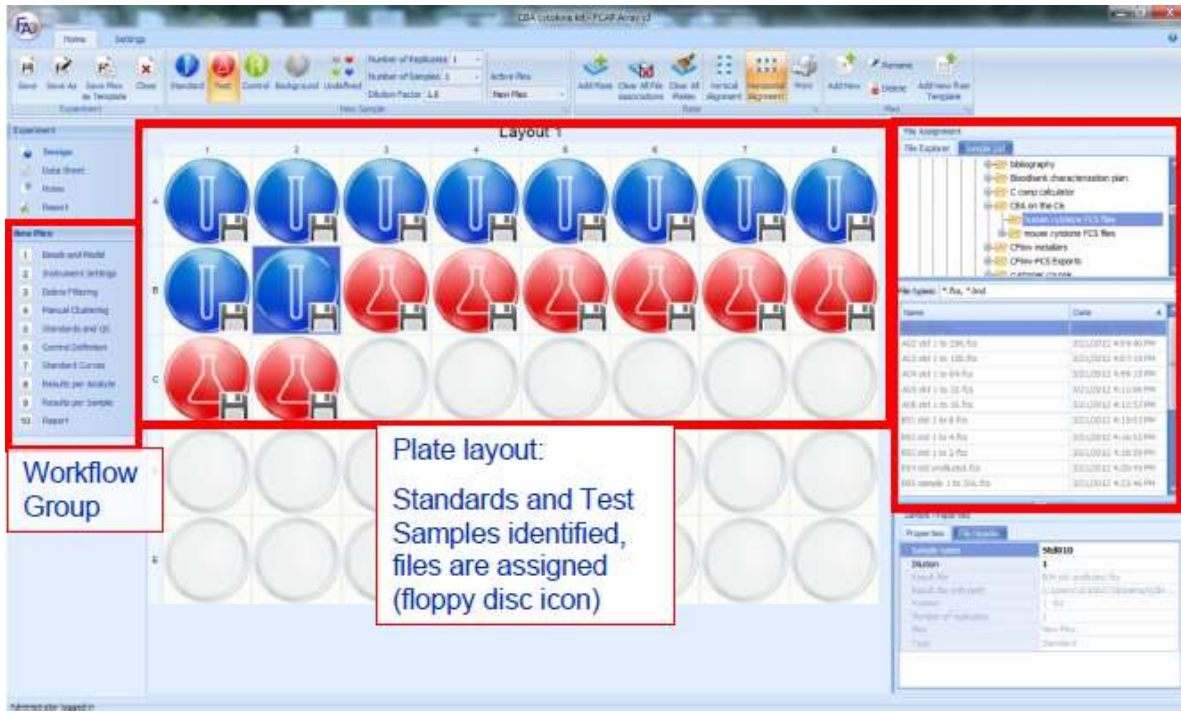
4. Agregar 50µL de cada muestra problema a los tubos con los 50µL del mix de perlas agregados en el paso 2.
5. Adicionar 50µL del reactivo para detección marcado con PE (Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent) a cada tubo.
6. Incubar los tubos durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz.
7. Pasado el tiempo, agregar 1mL del buffer de lavado a cada tubo y centrifugar a 200g por 5 minutos.
8. Cuidadosamente retirar el sobrenadante y descartarlo.
9. Adicionar 300µL del buffer de lavado a cada tubo y resuspender el pellet.

10. Ir al citómetro.

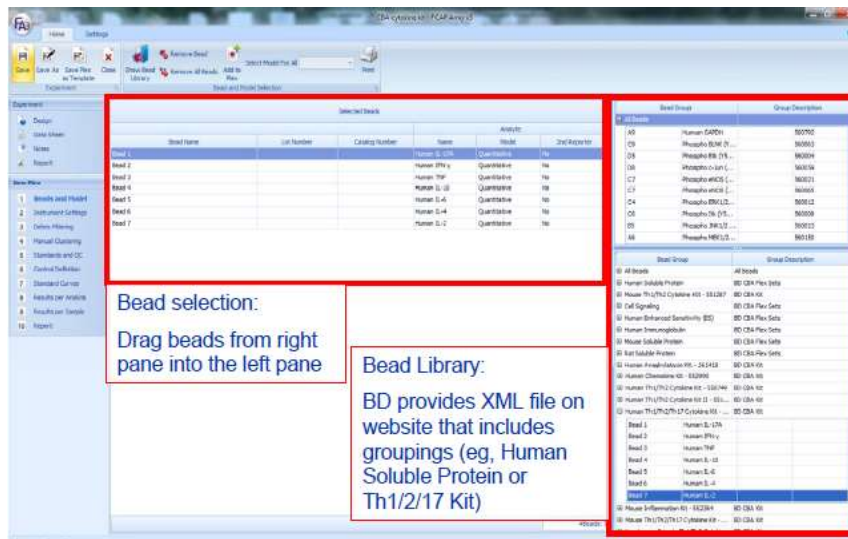


Software de análisis FCAP Array V3.0

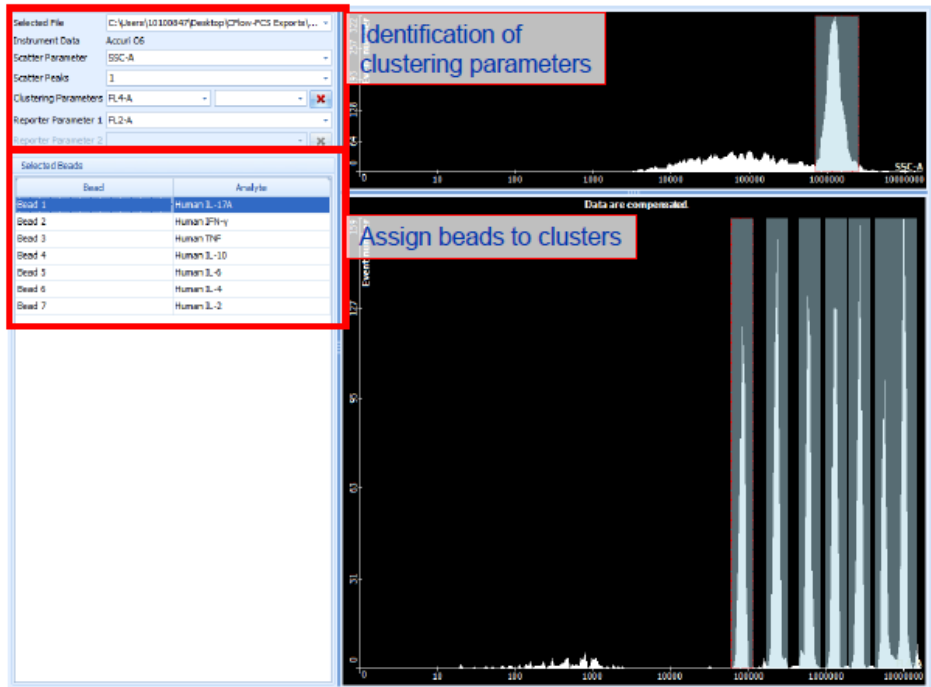
- Diseño del ensayo
 - Identificar el archivo.
 - Asignar los datos a estándares y muestras.



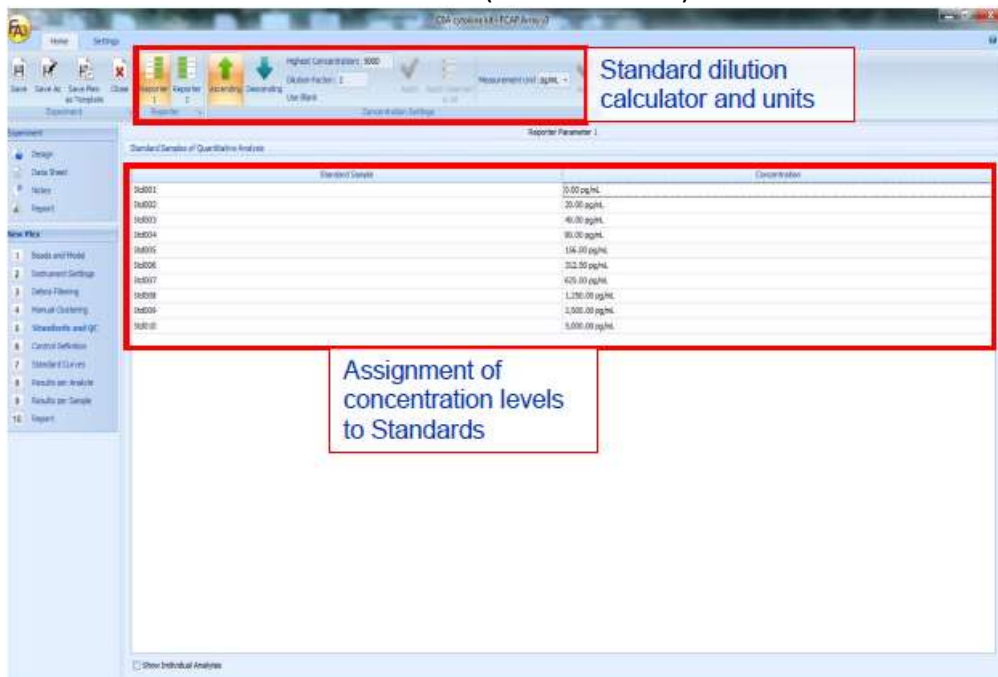
- Perlas y modelos
 - Seleccionar las perlas correspondientes al ensayo (librería).



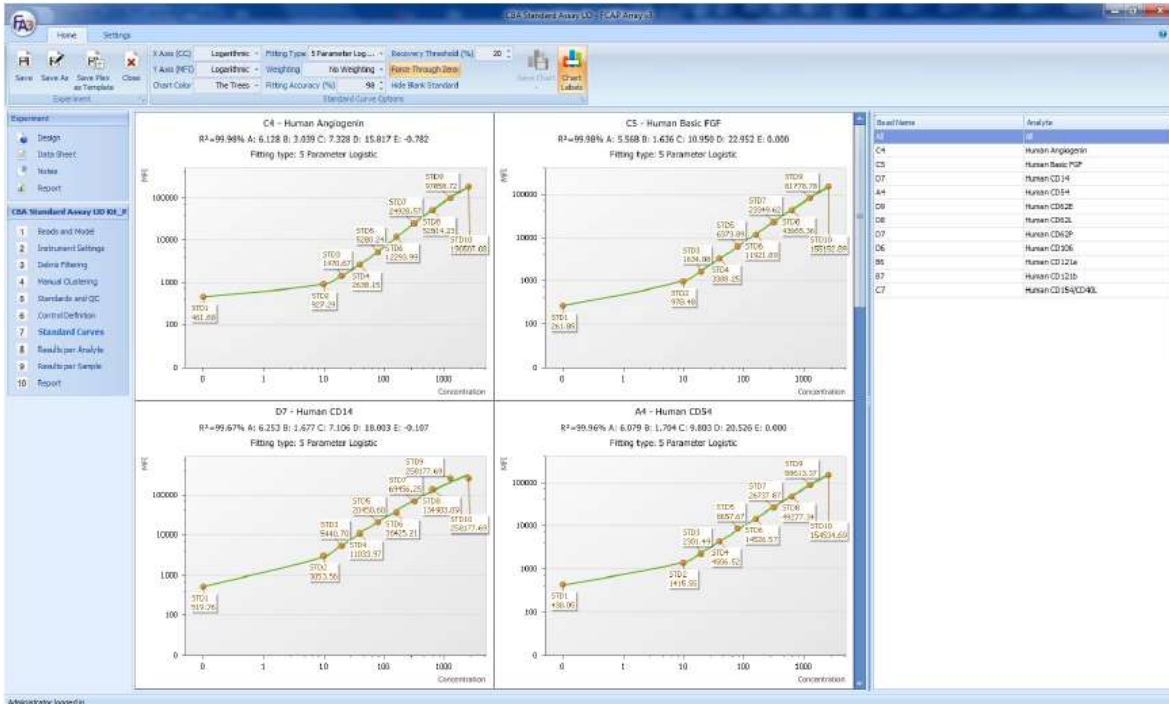
- Configuración
 - Seleccionar los parámetros scatter, cluster y reportero.
 - Asignar el nombre de las perlas a los clusters.



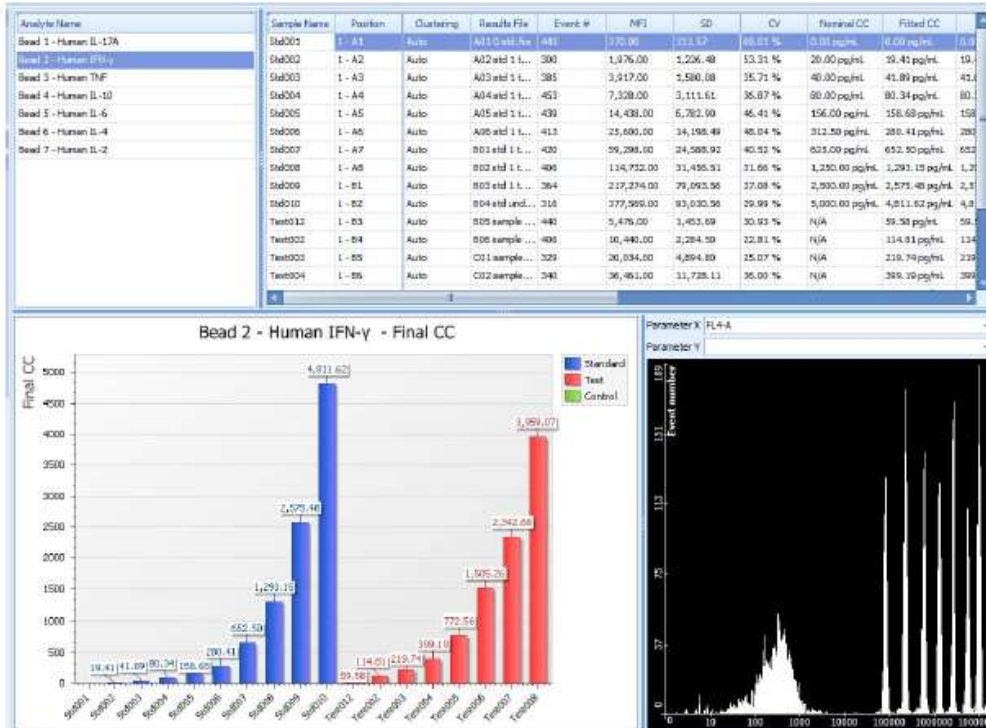
- Curva estándar y concentraciones
 - Asignar el nivel de concentración a la curva estándar.
 - Colocar el factor de dilución (si es necesario)



- Curva estándar



- Resultados



Bibliografía

1. Badurdeen S. *et al.* 2012. Elevated Serum Cytokine Levels Using Cytometric Bead Arrays Predict Culture-Positive Infections in Childhood Oncology Patients With Febrile Neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol* . 34 (1): e36-e38.
2. Cascales Angosto M. 2005. Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 365-386.
3. Choi H. *et al.* 2006. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*. 27: 31–44.
4. Dauer M. , Obermaier B., Herten J. and Cols. 2003. Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *J. Immunol.* 170: 4069–4076.
5. Navarrete J. *et al.* 2007. Determinación de Valores de Referencia para la microtécnica de fagocitosis y muerte intracelular de *Candida albicans* en un grupo de población sana en Bogotá. *Nova. Publicación Científica*. 31-37
6. Rodríguez-Padilla C. y Tamez-Guerra R. *Manual de Inmunología*. Ed Trillas. 2010
7. Rojas-Dotor S., Pérez-Ramos J. and Rico-Rosillo M.G. 2009. Quimiotaxis y enfermedad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 47 (1): 51-56.
8. Rojas-Espinosa O. y Arce-Paredes P. 2003. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias (1ª. Parte). *BIOQUIMIA VOL.* 28 (4): 19-30.
9. Rojas-Espinosa O. y Arce-Paredes P. 2004. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias (2ª. Parte). *BIOQUIMIA VOL.* 29 (1): 18-31.
10. Rojas-Espinosa O. y Arce-Paredes P. 2004. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias (3ª. Parte). *BIOQUIMIA VOL.* 29 (2): 55-67.