

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González
Centro Universitario Contra el Cáncer UANL
Laboratorio de Hematología



Determinación de los cambios en la concentración de interleucinas en el suero de adultos que recibieron un trasplante ambulatorio de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica con un acondicionamiento de intensidad reducida en un centro académico del Noreste de México

T E S I S

Para obtener el grado en Maestría en Laboratorio de Hematología

P R E S E N T A

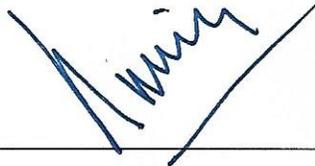
QBP. Roberto Solano Texta

Director:

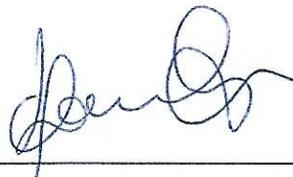
Dr. José Carlos Jaime Pérez

Monterrey, NL. 02-septiembre-2024

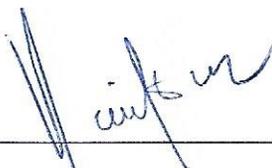
Determinación de los cambios en la concentración de interleucinas en el suero de adultos que recibieron un trasplante ambulatorio de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica con un acondicionamiento de intensidad reducida en un centro académico del Noreste de México



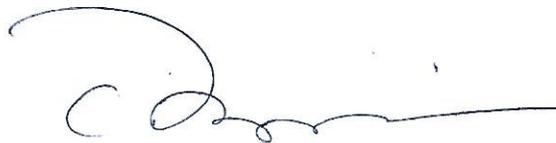
Dr. Med. José Carlos Jaime Pérez
Director de tesis



Dra. Olga Graciela Cantú Rodríguez
Codirectora de tesis



Dr. David Gómez Almaguer
Miembro sinodal de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÓRICO	4
1. Células progenitoras hematopoyéticas.....	4
1.1. Características	4
1.2. Fuentes de Células Progenitoras Hematopoyéticas.....	5
2. Trasplante de CPH.....	6
2.1. Tipos de trasplantes.....	6
2.2. Acondicionamiento de los pacientes	7
2.3. Recolección de CPH.....	7
3. Respuesta inmune al trasplante de CPH.....	8
3.1. Enfermedad injerto contra huésped.....	9
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	11
IV. JUSTIFICACIÓN	11
V. HIPÓTESIS	12
VI. OBJETIVOS	12
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	12
7.1. Material y métodos	12
7.2. Tamaño de la muestra y pacientes.....	13
7.3. Criterios de inclusión y exclusión	14
7.4. Análisis de las muestras.....	14
7.5. Análisis estadístico	16
7.6. Diagrama de trabajo.....	17
VIII. RESULTADOS	18
IX. DISCUSION.	24
X. CONCLUSION.	26
XI. REFERENCIAS	27
XII. ANEXOS.	31

I. INTRODUCCIÓN

Las células madre son una población de células indiferenciadas caracterizadas por proliferar y autorrenovarse, surgen de una sola célula (clonal) y se diferencian hacia líneas celulares con capacidades y funciones específicas. El objetivo de trasplantar células progenitoras hematopoyéticas es restaurar la hematopoyesis del paciente enfermo. Los primeros estudios para el HSCT se realizaron en modelos de ratones y se demostró que la infusión de componentes provenientes de una médula ósea sana hacia una médula ósea (MO) mielosuprimida induciría la recuperación de las células en el receptor.

Los estudios realizados hasta el día de hoy sobre las células madre son de gran utilidad ya que se han utilizado de manera exitosa en pacientes con enfermedades hematológicas, inmunodeficiencias, falla medular y desordenes metabólicos; sin embargo, existe un mayor riesgo de mortalidad para aquellas personas que reciben un trasplante alogénico debido al desarrollo de la enfermedad injerto contra huésped (EICH). Esta enfermedad puede clasificarse de 2 maneras: la forma aguda que se presenta entre 30 - 70% y se puede desarrollar en los primeros 100 días post-trasplante afectando principalmente la piel, el hígado y el tubo gastrointestinal; por otra parte, las afecciones en el estadio crónico se concentran en uno o varios órganos con mayor intensidad e incluso pueden durar hasta años.

La fisiopatología de la EICH es ocasionada por la quimioterapia a altas dosis para el acondicionamiento del paciente, el cual recibe como preparación para el trasplante (trasplante mieloablatoivo); en los últimos años se ha introducido un nuevo tipo de acondicionamiento de menor intensidad, conocido como no mieloablatoivo o de intensidad reducida, estos acondicionamientos inducen daño tisular junto con liberación de citocinas proinflamatorias y patrones moleculares asociados a daño (DAMP), generando una mejor presentación de aloantígenos a las células presentadoras de antígenos (CPA) que conlleva a la activación de las células T CD8+ y CD4+ las cuales, conjunto con los monocitos y macrófagos, empiezan a secretar más citosinas culminando en la apoptosis del tejido diana. Las interleucinas que se han reportado con un cambio significativo después del HSCT son: IL-1 β , IL-

2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 TNF-a, INF-y; por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar los cambios en las concentraciones de interleucinas en pacientes post-trasplantados que recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida y relacionarlas con las interleucinas reportadas en la literatura asociadas al desarrollo de la EICH.

II. MARCO TEÓRICO

1. Células Progenitoras Hematopoyéticas

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) forman parte del grupo de células madre multipotentes, capaces de producir todos los tipos de células derivadas de una sola capa embrionaria. Estas células tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse ya sea *in vivo* o *in vitro* hacia todos los linajes hematopoyéticos (2).

En su maduración, las CPH dejan de expresar antígenos en su membrana y comienzan a producir otros, esto a sido de gran utilidad para caracterizar los distintos linajes celulares. La detección de estos marcadores ha facilitado la identificación y aislamiento de grupos celulares particulares. La expresión del antígeno CD34 es mucho mayor en CPH inmaduras y disminuye progresivamente a medida que comienzan a diferenciarse a un determinado linaje (3).

1.1. Características

Las CPHs poseen tres características básicas: la primera de ellas es que son multipotentes, capaces de generar las 3 líneas sanguíneas: linaje eritroide que genera eritrocitos, la línea leucocitaria que produce 2 linajes; el linfoide, en donde se encuentran los linfocitos B, T y NK, y el mieloide, que produce basófilos, granulocitos y monocitos; la tercer linaje es el megacariocítico, que da origen a plaquetas. La segunda característica de las CPH es que tienen un alto potencial proliferativo, es decir, se dividen y producen una gran cantidad de células a lo largo de la vida. Por último, poseen la capacidad de generar nuevas células madre idénticas, capacidad conocida como auto renovación (4).

Las CPH se pueden clasificar en 2 tipos, células a largo plazo, capaces de autorrenovarse durante toda la vida y reconstituir el sistema hematopoyético cuando son trasplantadas; y células madre a corto plazo, las cuales se encargan de generar células progenitoras del linaje linfoide o mieloide en el momento que son requeridas (4).

1.2. Fuentes de Células Progenitoras Hematopoyéticas

En los primeros años de vida, la médula ósea activa (médula roja) se localiza en todos los huesos. La MO contiene células de origen mesenquimal, como células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y osteoblastos; o puede ser hematopoyético no-mesenquimal como los macrófagos y las células dendríticas. Estas células producen y depositan elementos en la matriz extracelular, además producen citocinas que pueden inducir o inhibir la proliferación y diferenciación de células progenitoras (5,6).

La autorrenovación y diferenciación de las CPH son regulados mecanismos extrínsecos e intrínsecos en los nichos hematopoyéticos (7), como las interacciones con los fibroblastos, quienes actúan sobre los procesos de crecimiento y diferenciación; otro de estos mecanismos son con las células endoteliales, las cuales facilitan la migración de las CPH desde la médula hacia el torrente sanguíneo, por otro lado, los osteoblastos mantienen la hematopoyesis gracias a la producción de factores estimulantes de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) permitiendo la adhesión de CPH primitivas (1,8,9).

El nicho hematopoyético está dividido en tres partes: una zona osteoblástica conformada por osteoblastos, en donde las CPH se estimulan para proliferar, madurar y diferenciarse; zona medular de CPH quiescentes donde se producen factores que inhiben la proliferación de las CPH y una zona vascular que permite la salida a la circulación. Este nicho además de suplir de oxígeno a las CPH en división, produce factores angiogénicos indispensables para el mantenimiento celular, como el factor de crecimiento vascular endotelial (5,10).

En la zona osteoblástica han sido descubiertas una gran variedad de moléculas de adhesión celular que favorecen la interacción de los osteoblastos con las CPH, entre ellas se encuentra la *N-caderina* que se expresa tanto en osteoblastos como en las CPH quiescentes, y la *β -1 integrina* que se une a la fibronectina y promueve la adhesión a las células estromales de la médula ósea.

2. Trasplante de CPH

El HSCT es un procedimiento que consiste en infundir CPH sanas para restaurar la funcionalidad de la médula ósea, la cual se encuentra dañada parcial o completamente debido a enfermedades propias de la médula ósea o por consecuencia de una alteración secundaria. El HSCT se ha propuesto para 2 situaciones fundamentales:

- a. Cuando la patología que afecta la médula ósea es tratable por medio de la sustitución total de las células por la obtención de un donante compatible.
- b. En el caso en que la toxicidad que recibirá la medula es un impedimento para el tratamiento.

Antes de llevar a cabo un HSCT se deben ejecutar una serie de pasos, iniciando con la selección del paciente y su diagnóstico para posteriormente elegir el tipo de trasplante y como se llevará a cabo la recolección de las CPH, en base a esto se determinará el régimen de acondicionamiento a utilizar, se realizarán estudios de laboratorio donde se estudia la compatibilidad de donador-receptor y otros estudios pre-trasplante (11).

2.1. Tipos de trasplantes

Dependiendo de el origen de las CPH, los trasplantes pueden ser autólogos o alogénicos; en el primero, los pacientes reciben sus propias células, recolectadas previo al acondicionamiento; este tipo de trasplante se lleva a cabo en tumores sólidos, para linfomas y mieloma múltiple (12). En el trasplante alogénico, los pacientes reciben las CPH de un individuo compatible. Las indicaciones para este tipo de trasplante son primeramente para leucemias agudas y crónicas, mielodisplasias y enfermedades no malignas como la aplasia medular, deficiencias inmunes y trastornos metabólicos hereditarios (13). Los donadores pueden ser relacionados, que es generalmente un hermano o uno de los padres. En el caso de hermanos gemelos, al trasplante se le denomina singénico, y si el donador es el padre o la madre, se le llama haploidéntico. Cuando el donador no está relacionado

con el receptor, las CPH provienen del cordón umbilical o de individuos registrados en bancos de CPH.

2.2. Acondicionamiento de los pacientes

El fundamento de los esquemas no mieloablativos es la inmunosupresión del receptor para favorecer el injerto del sistema inmune del donador, reduciendo además la toxicidad (14). El acondicionamiento del HSCT varía en el grado de mielosupresión e inmunosupresión desde dosis altas de mieloablativos hasta acondicionamiento de intensidad reducida. Estos regímenes de acondicionamiento también pueden provocar complicaciones a corto y largo plazo, como daño multiorgánico, mucositis, necesidad de transfusiones frecuentes de glóbulos rojos y plaquetas, infertilidad y neoplasias malignas secundarias (15). La elección del acondicionamiento de intensidad reducida depende de factores del huésped, como la edad, la disfunción del sistema orgánico, el índice de comorbilidad específico del trasplante de células hematopoyéticas, la puntuación de la evaluación de la mortalidad previa al trasplante, el riesgo de enfermedad, la profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped y las características del injerto del donante (16).

Los regímenes de acondicionamiento mieloablativos incluyen agentes alquilantes, inhibidores de la síntesis de ADN y/o irradiación corporal total que pueden tener el doble propósito de tratar trastornos malignos. Para los pacientes con enfermedad no maligna, los objetivos de los regímenes no mieloablativos son prevenir el rechazo de las células del donante y abrir nichos de médula de suficiente magnitud y duración para tratar la enfermedad subyacente mientras se minimiza la toxicidad (17).

2.3. Recolección de CPH

Las CPH se obtienen de diversas fuentes como la MO, sangre periférica y de sangre de cordón umbilical. Para identificar, aislar y cuantificar la población de CPH se utiliza el marcador de linaje CD34, el cual se encuentra expresado en células formadoras de colonias y en CPH de linaje linfoide y mieloide (18, 19).

Las células madre de la médula ósea se obtienen mediante múltiples punciones, principalmente en ambas crestas ilíacas posteriores, seguido de las anteriores y en otros casos, del fémur y esternón. Estas punciones se efectúan bajo anestesia general ya que permite un procedimiento más cómodo tanto para el médico como al paciente. La duración habitual de una aspiración de médula ósea es de 2 a 3 horas y el volumen aspirado es entre 10-20 ml por Kg de peso del donador o receptor (11,20).

Las CPH de la sangre periférica se recolectan actualmente y cada vez con mayor frecuencia por medio de leucoaféresis utilizando procesadores celulares automatizados, con la meta de obtener al menos 2.5×10^6 células CD34+/Kg de peso del receptor (21).

3. Respuesta inmune al trasplante de CPH

Existen varias fases en la alorespuesta que involucra tanto a los linfocitos T como a las células Natural Killer del donante interactuando con células específicas del receptor; en la fase inicial o de inducción, las células CD8+ y CD4+ del donante interactúan con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I que se encuentra en todas las células nucleadas, y clase II, presente en las CPA del receptor. La señal dada por el CMH a través de los receptores de células T y de las células CD3+, CD4+ ó CD8+, constituyen la primera señal para la activación de las células T, se requiere una segunda señal derivada de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 sobre las CPA para llevar a cabo la proliferación. En la segunda fase las células T proliferan bajo la influencia de la IL-2 e IL-12 para finalmente llevar a cabo la fase efectora donde las células T aloactivadas interactuarán con los antígenos en las células dianas del receptor, causando daño celular por citotoxicidad mediante la liberación de perforinas y granzimas (22-24).

Mientras tanto las células NK interactúan de manera más rápida con otras células, agilizando la respuesta inmune innata del paciente, produciendo así una señal para destruir las células, sin embargo, esta respuesta es mucho menos específica en comparación con la mediada por las células T. Normalmente estas células se encuentran suprimidas por los receptores KIR, que interactúan con las moléculas

clase I del sistema HLA de las células diana. Cuando las NK interactúan con células que tienen pérdida de HLA clase I o no son reconocidas como propias, no se produce la señal negativa y se liberan las perforinas y granzimas (25-26).

3.1. Enfermedad injerto contra huésped

En 1996, Billingham formuló 3 requisitos necesarios para la presencia de EICH:

1. Células del donador inmunológicamente competentes.
2. Falta de capacidad del receptor para destruir o inactivar las células del donador.
3. Falta de expresión de antígenos en las células del donador y que si estén presentes en el receptor

Los principales órganos blancos de la EICH son la piel, hígado e intestinos (27). La fisiopatología de EICH generalmente se puede considerar en 3 fases. En la fase 1, la quimiorradioterapia de acondicionamiento induce daño tisular y la liberación de citocinas inflamatorias como la IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF) alarminas (box-1, IL-1 α , IL-33) y moléculas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) las cuales mejoran la presentación de aloantígenos por parte de las CPA del huésped. En la fase 2, las células T CD8+ y CD4+ del donante trasplantado reconocen los aloantígenos presentados dentro de HLA clase I y II, respectivamente, se activan, se expanden y se diferencian en células T efectoras. En la fase 3, las citocinas como el IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17 secretadas por células T efectoras diferenciadas y fagocitos (incluidos monocitos y macrófagos) contribuyen a la apoptosis del tejido diana (13,16, 28).

El síndrome de injerto es una complicación asociada al trasplante de células madre hematopoyéticas que se observa tanto en trasplantes autólogos como alogénicos, se caracteriza por la presencia de fiebre no infecciosa, diarrea, erupción cutánea, infiltración pulmonar, edema pulmonar y alteración de la función hepática y renal.

3.2. Papel de las interleucinas para detección de la EICH aguda.

Las interleucinas proinflamatorias juegan un rol como mediadores de la EICH, especialmente IL-1, IL-6, TNF e IFN- γ (30). La IL-1 fue de las primeras interleucinas

en estudiarse en EICH, en estudios realizados a lo largo del tiempo se ha probado que el bloqueo de IL-1 reduce el grado de EICH en general por lo que respalda el papel de esta citosina en la fisiopatología de la enfermedad.

Kennedy y *col.* reportaron bajas incidencias de EICH agudo grado 2 a 4 en pacientes que recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida con fludarabina y melfalan, junto con aquellos que recibieron irradiación corporal total y una terapia con tolilizumab, un anticuerpo monoclonal capaz de atenuar la EICH aguda. La IL-6 es la principal interleucina detectable y desregulada después de un HSCT alogénico. Por otra parte, Gong y *col.* demostraron que la deficiencia de IL-17 en el injerto, promovió significativamente la respuesta de las células T además de aumentar la permeabilidad intestinal y elevar la producción de otras citosinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α , induciendo así la EICH; caso contrario, la sobreexpresión de esta interleucina mejoró la EICH. (31).

El proceso de reconstitución inmune, incluyendo el desarrollo de tolerancia inmunológica, está influenciado por las citocinas IL-2, IL-7 e IL-15, que son reguladores principales de la expansión homeostática periférica de células T CD4+ y CD8 + (33, 34). Kielsen y *col.* (35) demostraron que los niveles elevados de IL-7 e IL-15 están fuertemente asociados con el número de células T temprano después del HSCT y con una expansión de células T de memoria más tarde después del trasplante.

Se sugiere que las interleucinas pueden ser biomarcadores en la predicción de complicaciones posteriores al trasplante relacionadas con la aloreactividad y la EICH por lo que en este trabajo se realizara un inmunoensayo basado en perlas magnéticas para medir la concentración de las interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-17, IL-22 y TNF- α , correlacionando los resultados obtenidos con los datos clínicos posteriores al HSCT.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo se modifican los niveles de interleucinas séricas en pacientes que recibieron un trasplante de hematoprogenitores de la sangre periférica después de un régimen de condicionamiento de intensidad reducida?

IV. JUSTIFICACIÓN

Es de gran importancia investigar los cambios en la concentración de las diferentes interleucinas que se producen en la etapa posterior al trasplante de células hematopoyéticas después de administrar un régimen de condicionamiento de intensidad reducida a pacientes con enfermedades hematológicas debido a que pueden reflejar la magnitud de los cambios en el sistema inmune con dicho esquema, y estar asociados al desarrollo de complicaciones posteriores al procedimiento.

V. HIPÓTESIS

Los niveles séricos de interleucinas proinflamatorias correlacionan con la respuesta clínica del paciente al trasplante ambulatorio posterior al régimen de condicionamiento de intensidad reducida.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los cambios en la concentración de interleucinas séricas en pacientes adultos que se sometieron a un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Documentar los valores de interleucinas en suero antes y después del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas con un régimen de condicionamiento de intensidad reducida en pacientes sometidos al trasplante alogénico o autólogo.
- Analizar la relación entre los cambios en la concentración sérica de interleucinas pre y postrasplante y el desarrollo de EICH aguda en el trasplante alogénico.
- Correlacionar los cambios en los niveles séricos de interleucinas y las complicaciones infecciosas e inmunológicas postrasplante.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio prospectivo analizando los cambios en la concentración de interleucinas en suero a partir de muestras recuperadas de estudios de laboratorio realizados a los pacientes adultos que fueron sometidos a HSCT en el Servicio de Hematología del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el periodo agosto 2023 a junio 2024.

Se recolectarán 3 muestras por paciente: la primera previa al trasplante, la segunda dentro del lapso de 3 a 14 días después de la infusión de células y la tercera al mes de seguimiento, estas serán almacenadas en un ultracongelador a -80°C ubicado en el área de pruebas moleculares. Los datos del expediente clínico de los donadores serán utilizados a lo largo de todo el protocolo y por medio de un consentimiento verbal, se le pedirá al paciente el permiso de utilizar su suero para la realización de este protocolo.

7.2. Tamaño de la muestra y pacientes.

Para calcular el tamaño de muestra se utilizó la fórmula para población finita utilizando los datos de trasplantes que se llevaron a cabo en el servicio de hematología durante el 2022, con un aproximado de 10% de pérdidas y un nivel de confianza del 95%.

$$N = 82$$

$$\text{Nivel de confianza} = 95\%$$

$$\text{Proporción esperada de pérdidas} = 10\%$$

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{e^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

n = Tamaño de muestra buscado

N = Tamaño de la población

Z = Parámetro estadístico que depende el nivel de confianza,

e = Error de estimación máximo aceptado

p = Probabilidad de éxito

q = Probabilidad de fracaso

El tamaño estimado de muestra es $n = 45$ pacientes/año, en total se incluyeron 47 pacientes los cuales serán divididos en grupos dependiendo si se sometió a un trasplante autólogo o alogénico.

7.3. Criterios de inclusión y exclusión

Serán analizadas muestras de suero en pacientes mayores de 18 años aprobados para recibir un trasplante autólogo o alogénico y recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida en el Servicio de Hematología. Serán excluidos aquellos pacientes que se realizaron un trasplante, pero no tuvieron seguimiento el Servicio de Hematología y aquellos que fallecieron antes de los 30 días post infusión también, por último, se excluirán pacientes menores a 18 años.

7.4. Análisis de las muestras.

- *Human Procartaplex Mix&Match 10-plex* (Cat# PPX-10-MXRWGW6)

El ensayo consta de microesferas magnéticas marcadas con fluorocromo recubierto con un anticuerpo de captura IgG específico contra cada una de las interleucinas a estudiar. Previo al ensayo se dejarán descongelando las muestras a 4°C para evitar la degradación de la actividad biológica de las interleucinas a temperatura ambiente; una vez descongeladas se aplicará un ligero vortex para posteriormente centrifugarlas por 10 minutos a 10,000 x g con el fin de remover las partículas del suero que puedan interferir con el ensayo, además, se prepararán los reactivos WB 1X y UAB 1X (**Anexo 1**), así como el Mix de estándares (**Anexo 2**) y las diluciones seriadas correspondientes (**Anexo 3**).

En una placa de ELISA de 96 pocillos se agregarán 50ul de las perlas, después se colocará en una placa magnética (Cat# EPX-55555-000) para realizar un lavado (**Anexo 4**). Al término de este se agregarán 25ul de UAB 1X a cada pocillo, seguido de 25uL de las diluciones seriadas de los estándares y las muestras de suero en sus respectivos lugares de acuerdo a la hoja de trabajo (**Anexo 5**). La placa será cubierta con un plástico protector y colocada en un agitador para placas durante 30 minutos a 600 rpm x minuto a temperatura ambiente, posteriormente se incubará toda la noche a 4°C, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Pasando el tiempo de incubación de las interleucinas con las perlas, se agitará la placa otros 30 min y se realizarán 2 lavados más. Al término de estos, se agregarán 25uL de anticuerpo biotinilado (Lot. 401870-000) y se dejará mezclando 30 minutos a

temperatura ambiente, se realizarán otros 2 lavados. Después de que las interleucinas sean capturadas por la microesfera cubierta con un anticuerpo biotinilado, la muestra se incubará con 50uL de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (Lot. 378527-000), la cual es una molécula informadora, por 30 minutos más. Finalmente se realizarán 2 lavados más para desechar el reactivo sobrante y se agregarán 120uL de buffer de lectura (Lot. 23072860) a cada pocillo y se agitarán durante 5 minutos, las muestras estarán listas para ser procesadas en el Luminex donde las microesferas pasarán rápidamente hacia un rayo láser que excita los fluorocromos, marcando las microesferas que contiene el número de la IL; un segundo láser excita la molécula indicadora de ficoeritrina. Finalmente, el procesamiento informático identifica cada microesfera marcada con ficoeritrina en el sistema Luminex individual y cuantifica los resultados del bioensayo en base a las señales de la fluorescencia. Se determinará la concentración de IL a través del software Luminex IS y los resultados serán expresados en picogramos sobre mililitro (pg/mL). Una vez que se hayan procesado las muestras, estas serán desechadas en los contenedores de Residuos Peligrosos Biológicos-Infeciosos (RPBI)

- *Instrumento Luminex*

El sistema Luminex interroga los gránulos individuales por citometría de flujo. El sistema de fluidos del lector alinea los gránulos en una sola fila a medida que entran en una corriente de líquido envolvente y después en una celda de flujo. Cuando los gránulos están en una sola fila de la celda de flujo, cada gránulo se analiza individualmente para buscar el color del gránulo (analito) y la intensidad de la señal del ensayo (intensidad de fluorescencia de PE). Esta tecnología establecida garantiza la captura de todos los datos.

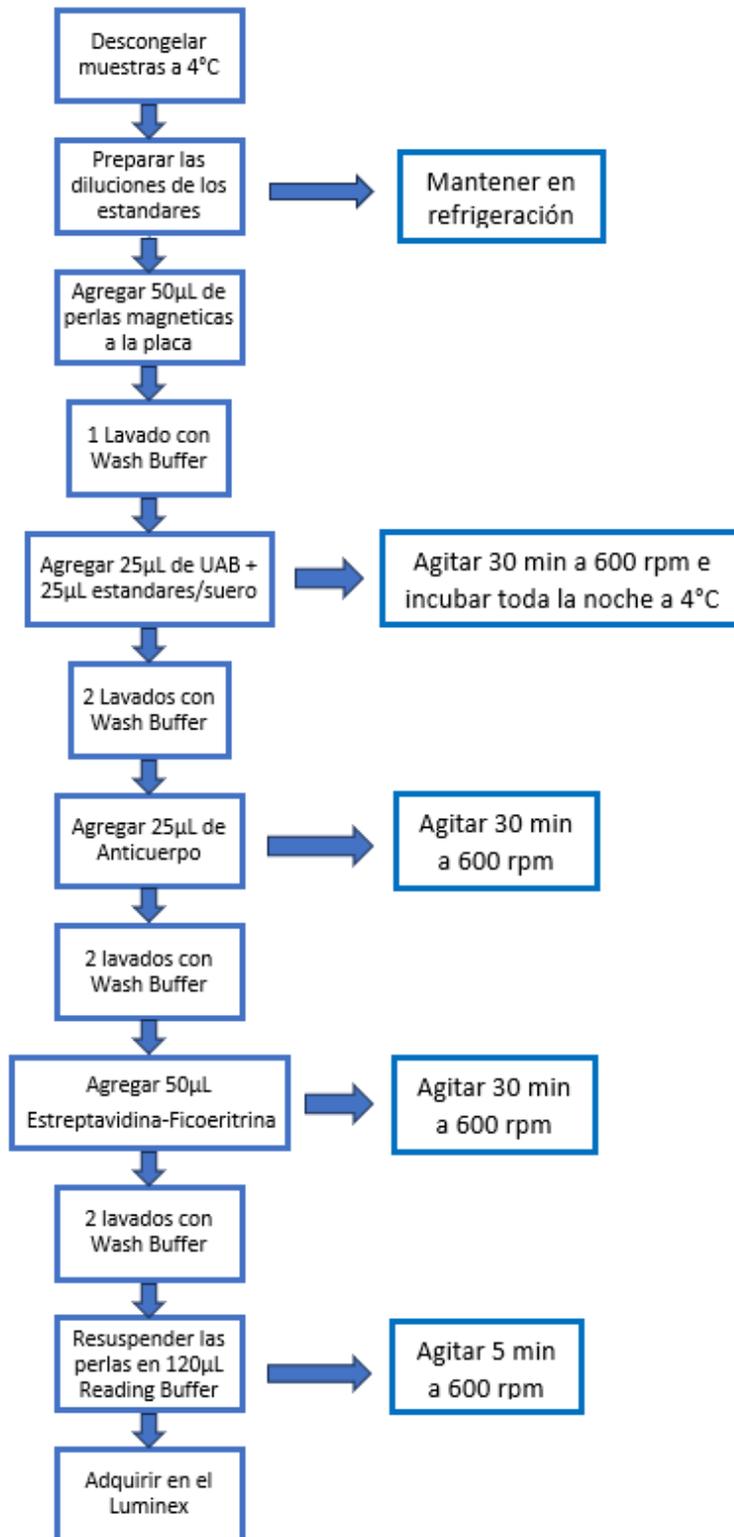
Los láseres tienen sensibilidad para detectar cantidades muy pequeñas de analitos. El lector utiliza un láser verde de 532 nm (láser «de ensayo») para excitar el tinte de PE del ensayo (estreptavidina-PE). El láser de estado sólido de 635 nm (láser rojo «de clasificación») se utiliza para excitar los tintes dentro de los gránulos y determinar su «color» o «región». También se utiliza para la discriminación de dobletes por dispersión de la luz. El sistema DR-SE xMapR INTELLIFLEX incluye

un láser adicional de indicador violeta (405 nm) que es capaz de medir hasta dos parámetros por región de gránulos.

7.5. Análisis estadístico

Para analizar los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico SPSS v.27 Se realizará el análisis descriptivo, obteniendo la media, la desviación estándar, medianas y rangos de acuerdo a la distribución de las variables calculado con la prueba de chi cuadrada. Las diferencias entre los grupos se analizó con la prueba t-Student para variables paramétricas y para pruebas no paramétricas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar los resultados séricos de las interleucinas antes y después del trasplante como también será utilizada para comparar el grupo de pacientes autólogos con los alogénicos. Un valor de $p < 0.05$ será tomado como estadísticamente significativo. Dentro de las variables cualitativas se encuentran tipos de trasplante (Autólogo o Alogénico), presento o no EICH y el suministro de aféresis plaquetarias o paquetes globulares posterior al trasplante. La única variable cuantitativa será el resultado de la cuantificación de las interleucinas en suero expresados con la unidad pg/mL.

7.6. Diagrama de trabajo



VIII. RESULTADOS

I. Obtención de datos y muestras.

El número total de pacientes que se sometieron a un HSCT en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario Dr. José E. González de la UANL fueron 47, sus datos clínicos previos y posterior al trasplante fueron recopilados de su expediente clínico, tanto físico como electrónico, así como de bitácoras de visitas a toma de muestra y transfusiones de plaquetas. Se recolectaron un total de 3 muestras por paciente: la primera, previa al acondicionamiento y al trasplante, la segunda, posterior a la infusión de CPH, entre un lapso de 3 a 10 días hábiles, y la tercera, al mes de seguimiento post-trasplante. Las muestras fueron recuperadas de remanentes de suero utilizados para los estudios pre-trasplante del donador y de perfiles bioquímicos como seguimiento; al final de la jornada laboral, estas se traspasaron de los congeladores a -30°C hacia los ultra congeladores a -70°C donde fueron separadas en bolsas específicas por fecha de muestreo (PRE, POST, 1 MES) y se mantuvieron ahí hasta el día de su procesamiento con el fin de mantener la actividad biológica de las interleucinas.

II. Análisis de las interleucinas.

El análisis de las interleucinas se llevó a cabo con el kit *Human Procartaplex Mix&Match 10-plex* de la empresa *Thermo fisher*, personalizado con las 10 interleucinas: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-17, IL-22, TNF- α . La conjugación de un anticuerpo específico a un gránulo distinto permite el análisis de las 10 interleucinas en un solo pocillo (**Figura 1, A**). Después, las muestras se mezclaron con los conjuntos de gránulos; una vez dada la unión de las perlas con las IL se añadieron anticuerpos de detección marcados con fluorescencia (ficoeritrina) específicos de los analitos de interés, formando un sándwich de antígeno-anticuerpo. **C)** Al término del ensayo, la placa es leída en el *Luminex 200* donde un láser clasifica el tipo de gránulo para determinar la IL que se detecta, mientras que un segundo láser determina la magnitud del analito enlazado (señal derivada de PE). **D)** El equipo genera una gráfica donde se observa la curva de los

estándares, así como una tabla con las concentraciones esperadas y el resultado obtenido.

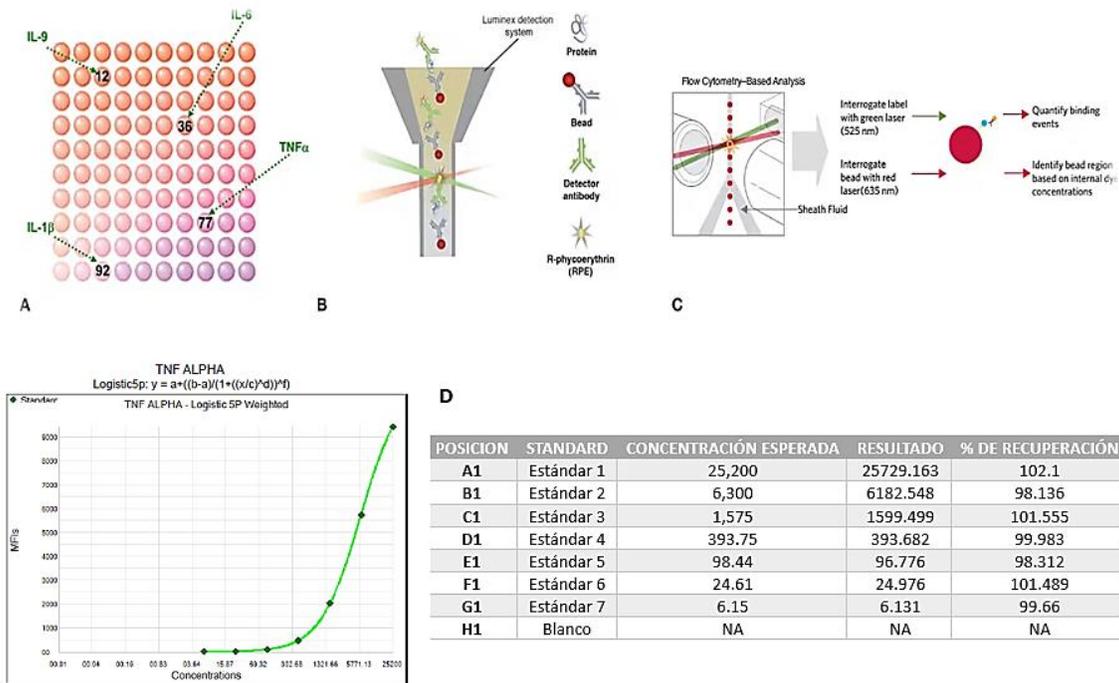


Figura 1. Ensayo Procortaplex

A) Anticuerpos de captura están unidos a gránulos Luminex que están teñidos internamente, el TNF- α se captura a través de la región 77. **B)** formación del complejo antígeno-anticuerpo. **C)** Lectura del ensayo por los láseres en el equipo Luminex **D)** Resultado de la curva de los estándares.

No existen valores de referencia específicos para las IL por lo que la dilución seriada de los estándares permite tener un límite de cuantificación diferente para cada analito; estos fueron los resultados: IL-1 β , <1.721; IL-2, <6.104; IL-4, <10.62; IL-6, <9.473; IL-7, <0.696; IL-8, <1.782; IL-15, <2.979; IL-17, <2.1; IL-22, <23.535, TNF- α , <6.152. Debido a que la concentración del estándar 7 para las interleucinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-22 y TNF- α no fue lo suficientemente bajas, el equipo no logro arrojar resultados cuantitativos para estas respectivas interleucinas por lo que con las interleucinas restantes se procedió a realizar las comparaciones entre sus respectivas variables clínicas representadas en las siguientes tablas (**Tabla 1, 2, 3, 4**) Se utilizó la prueba estadística *U* de Mann-Whitney para evaluar las asociaciones los niveles de citocinas y los resultados clínicos, los resultados demostraron que el género del donador, el tipo de trasplante y las transfusiones realizadas no están

relacionadas con los cambios en las concentraciones de interleucina 2, 7, 8 y 15 ya que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

TABLA 1. VARIABLES CLINICAS DE LOS PACIENTES RESPECTO A LA IL-2				
FACTORES	POST IL-2 <6.104	POST IL-2 >6.104	MES IL-2 <6.104	MES IL-2 >6.104
SEXO				
Masculino	16	14	14	16
Femenino	9	7	10	6
<i>Valor de p</i>	.852		.311	
TIPO DE TRASPLANTE				
Autólogo	10	9	10	9
Alogénico	15	12	14	13
<i>Valor de p</i>	.846		.959	
TRANSFUSIONES				
Sin transfusiones	3	6	6	3
Plaquetas + PG	6	2	5	3
Aféresis plaquetarias	16	13	13	16

TABLA 2. VARIABLES CLINICAS DE LOS PACIENTES RESPECTO A LA IL-7				
FACTORES	POST IL-7 <0.696	POST IL-7 >0.696	MES IL-7 <0.696	MES IL-7 >0.696
SEXO				
Masculino	1	29	2	28
Femenino	0	16	0	16
<i>Valor de p</i>	.465		.296	
TIPO DE TRASPLANTE				
Autólogo	0	19	0	19
Alogénico	1	26	2	25
<i>Valor de p</i>	.402		.230	
TRANSFUSIONES				
Sin transfusiones	0	9	0	9
Plaquetas + PG	1	7	1	7
Aféresis plaquetarias	0	29	1	28

TABLA 3. VARIABLES CLINICAS DE LOS PACIENTES RESPECTO A LA IL-8				
FACTORES	POST IL-8 <1.782	POST IL-8 >1.782	MES IL-8 <1.782	MES IL-8 >1.782
SEXO				
Masculino	7	23	9	21
Femenino	1	15	7	9
<i>Valor de p</i>	0.150		.356	
TIPO DE TRASPLANTE				
Autólogo	4	15	7	12
Alogénico	4	23	9	18
<i>Valor de p</i>	.587		.808	
TRANSFUSIONES				
Sin transfusiones	0	9	3	6
Plaquetas + PG	2	6	3	5
Aféresis plaquetarias	6	23	10	19

TABLA 4. VARIABLES CLINICAS DE LOS PACIENTES RESPECTO A LA IL-15				
FACTORES	POST IL-15	POST IL-15	MES IL-15	MES IL-15
	<2.979	>2.979	<2.979	>2.979
SEXO				
Masculino	18	12	22	8
Femenino	11	5	10	6
<i>Valor de p</i>	.562		.452	
TIPO DE TRASPLANTE				
Autólogo	12	7	15	4
Alogénico	17	10	17	10
<i>Valor de p</i>	.989		.251	
TRANSFUSIONES				
Sin transfusiones	7	2	7	2
Plaquetas + PG	4	5	3	4
Aféresis plaquetarias	21	10	19	8

Para analizar la concentración de las interleucinas antes y después del trasplante y su relación con el EICH se utilizó la prueba estadística T de Student ($p < 0.05$). Se observó un aumento de la concentración de las interleucinas 2 ($p < 0.007$), 7 ($p < 0.001$) y 15 ($p < 0.027$) al mes de haber recibido el trasplante en aquellos pacientes que desarrollaron algún tipo de EICH, esto podría estar relacionado con la propia función de las interleucinas, ya que todas participan activamente en la activación, maduración y proliferación del linaje linfoide; particularmente, la IL-2 promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK, así como el desarrollo de células LAK (células asesinas activadas por citocinas), que juegan un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad (**Figura 2**).

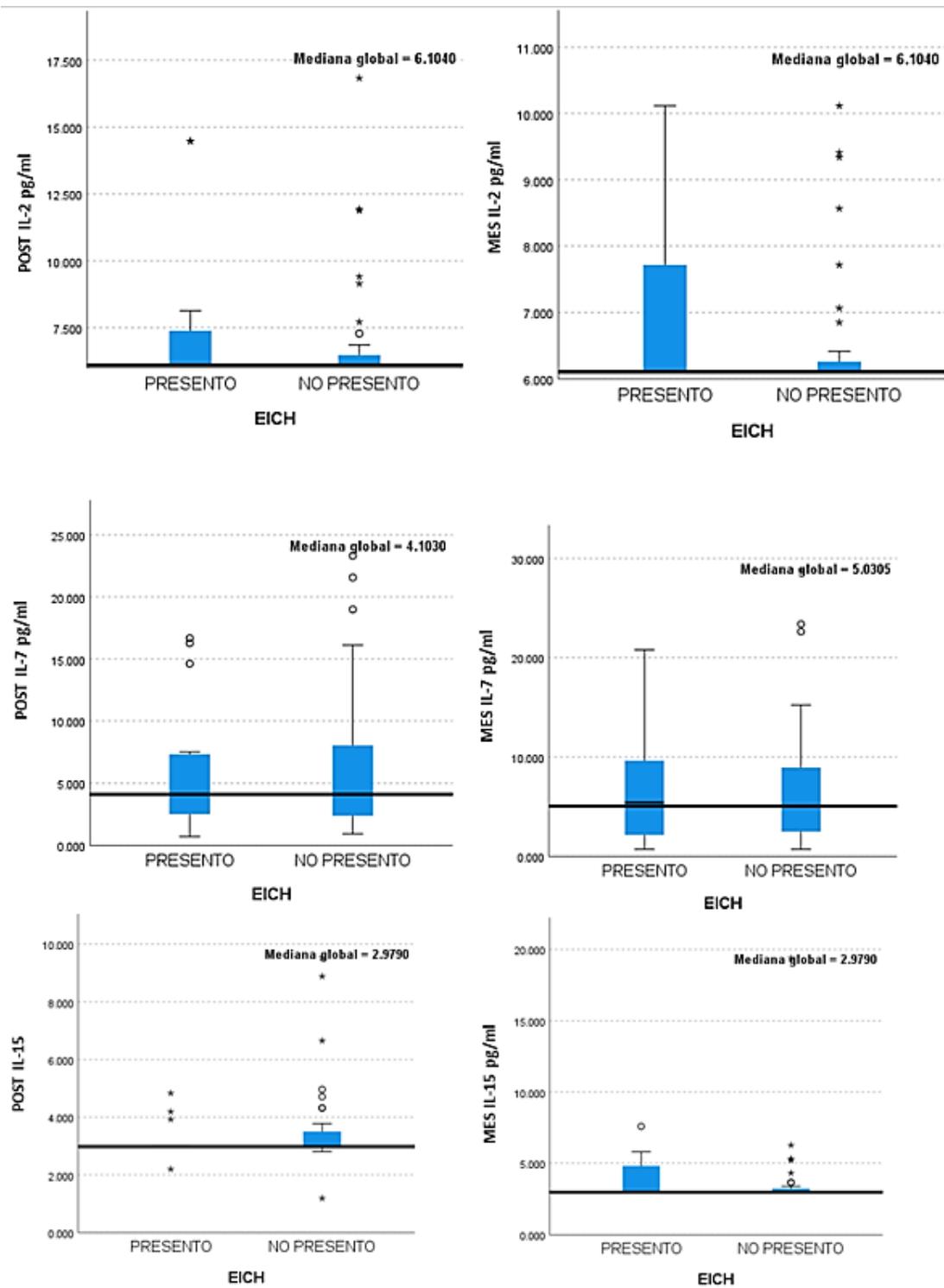


Figura 2. Aumento de niveles de interleucinas 2, 7 y 15 (IL-2, IL-7, IL-15) en pacientes con Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH).

IX. DISCUSION.

En este trabajo se buscó determinar los niveles de interleucinas séricas en pacientes que recibieron un HSCT con un régimen de condicionamiento de intensidad reducida, a partir de sangre periférica movilizada, y evaluar si los cambios en su concentración están asociados con las diferentes variables clínicas. El perfil de citosinas analizado se basó en la recopilación de información de varios estudios donde reportaban cambios en sus niveles séricos, algunos de estos estudios compartían características con el nuestro y otros fueron desarrollados con diferente metodología, o aplicado a un grupo distinto, sin embargo, estos fueron tomados en cuenta como punto de comparación para nuestros resultados.

Cada interleucina desempeña un papel diferente dentro de la respuesta inmune o trabaja en conjunto con otras para generar una respuesta más amplia y eficiente, en el caso de las IL-1 β , IL-6 y TNF- α , son producidas tanto por monocitos como por macrófagos, conocidas como citosinas proinflamatorias debido a que inducen la liberación de histamina y reactantes de fase aguda con el fin de combatir principalmente infecciones bacterianas por medio del aumento de temperatura del cuerpo. Los niveles de estas 3 interleucinas estuvieron por debajo del límite de cuantificación por lo que no se logró realizar un análisis estadístico específico. Por otra parte, estos datos podrían indicar que nuestros grupos de pacientes no generan una respuesta inmune tan potente contra infecciones bacterianas asociadas a la leucopenia post trasplante, conduciendo a la baja producción de estas interleucinas.

La IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 están fuertemente relacionadas con la respuesta inmune humoral y celular. La IL-2 juega un amplio papel en toda la respuesta inmune, tanto celular como humoral; sobre los linfocitos B estimula su crecimiento e incrementa la expresión de moléculas de MHC clase II, por otra parte, esta citocina es la principal promotora de la actividad citotóxica de las células T y NK. A la par de esta interleucina, se encuentra la IL-15 que posee características similares a las de la IL-2. La IL-7, por su parte, es secretada por células estromales de la medula ósea promoviendo la maduración de progenitores pro y pre B a linfocitos B maduros en la medula ósea, y de linfocitos T inmaduros en el timo, además de esto colabora en

conjunto con la IL-15 para la diferenciación y proliferación linfocitaria. Kielsen y *col.* obtuvieron resultados donde indican que la elevación temprana de IL-7 e IL-15 posterior al trasplante está relacionada a la linfopenia causada por el régimen mieloablatoivo, además de esto la IL-15 se encontró elevada en condiciones inflamatorias. Se observó un aumento en las concentraciones séricas de la IL-2, IL-7 e IL-15 al mes de seguimiento post-trasplante en el grupo de pacientes que desarrolló EICH, confirmando que el proceso de reconstitución inmune, incluyendo el desarrollo de tolerancia inmunológica, está influenciado por las citocinas IL-7 e IL-15. Gong y *col.* proporcionaron la primera evidencia de que la IL-17C puede regular la respuesta inmune y la patogénesis de la EICH aguda, funcionando como marcador pronóstico, sin embargo, en nuestro estudio no se logró evidenciar esto debido a las bajas concentraciones, se necesitaría realizar un estudio exclusivo para pacientes con EICH para confirmar más a fondo estos resultados.

X. CONCLUSION.

En esta tesis se demostró que después de un HSCT con condicionamiento de intensidad reducida las ILs 4, 17, 22 y TNF-alfa se elevaron, las ILs 1, 2, 6 y 15 mantuvieron valores normales, mientras que las ILs 7 y 8 disminuyeron su concentración en suero.

La medición de las interleucinas antes del HSCT empleando un esquema de intensidad reducida, y una modalidad ambulatoria después del mismo puede dar resultados predictivos que contribuyan al seguimiento de los pacientes, como se ha demostrado en diferentes estudios con regímenes mieloablatoivo, ya sea como marcadores pronósticos, como es el caso del desarrollo de la EICH, o como seguimiento a la reconstitución de las células del sistema inmune, principalmente linfocitos y neutrófilos así como la recuperación plaquetaria post trasplante, lo que puede dar información más precisa sobre si estos valores se ven influenciados por los diferentes factores clínicos. Los resultados obtenidos en este protocolo sugieren que en una fase subsecuente del estudio es importante establecer fechas específicas para la toma de muestra en ambos grupos de estudio, incluyendo los días exactos de recuperación mieloide y plaquetaria, así como los días de internamiento y ante los primeros signos de EICH.

XI. REFERENCIAS

1. Bellantuono, I. Haemopoietic stem cell. *The international Journal of biochemistry & Cell Biology*. 2004; 36: 607-620.
2. Carroll, D. and Clair, D. Hematopoietic Stem Cells: Normal Versus Malignant. *Antioxid Redox Signal*. 2018; 29: 1612-1632
3. Guo, Y., Lubbert, M. and Engelhardt, M. CD34 hematopoietic Stem Cells: Current Concepts and Controversies. *Stem Cells*. 2003; 21: 15-20
4. Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. The biology of graft-versushost disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood* 2014; 124: 354–362.
5. Mera, C., Roa, A. and Ramirez, S. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Cien. Salud*. 2007; 5: 67-89.
6. Dzierzak, E., and Bigas A. Blood development: hematopoietic Stem Cell. *Cell Press Journal*. 2018; 22: 639-651.
7. Mende, N., Bastos, H., Santoro, A., Mahbubani, K., Ciaurro, V., Calderbank, E., *et al*. Unique molecular and functional features of extramedullary hematopoietic stem and progenitor cell reservoirs in humans. *Blood*. 2022; 139: 3387-3401.
8. Jones, P., May, G., Healy, L., Brown, J., Hoyne, G., Delassus, S. *et al*. Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1998; 92: 1505-1511.
9. Gartlan, K., Koyama, M., Lineburg, K., *et al*. Donor T-cell-derived GM-CSF drives alloantigen presentation by dendritic cells in the gastrointestinal tract. *Blood Adv*. 2019; 3: 2859-2865.
10. Wattrus, S., Smith, M., Rodrigues, C., Hagedorn, E., Kim, J., Budnik, B., *et al*. Quality assurance of hematopoietic stem cells by macrophages determines stem cell clonality. *Science*. 2022; 377: 1413-1419.
11. Staal, F. and Clevers, H. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT situation. *Nat. Rev. Immunol*. 2005; 5: 21-30.
12. Gaytan, F. Hematopoietic stem cell transplantation in pediatric population; *Gaceta Mexicana de Oncologia*. 2013; 12: 174-181.

13. Oliveros, J., Sandoval, C., Cires, R., Blum, M. and Tafur, A. Hematopoietic stem cells transplant. *Revista "Medicina"*. 2003; 9: 174-185.
14. Hill, G. and Koyama, M. Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2020; 136: 418-428.
15. Gómez, D., Ruiz, G., Gutiérrez, C. and Jaime, J. Trasplante no mieloablativo de células progenitoras hematopoyéticas. Mitos y realidades. *Rev. Inv. Clin.* 2005; 57: 291-297.
16. Champlin, R., Khouri, I., Kornblau, S., Molldrem, J. and Giralt, S. Reinventing bone marrow transplantation: reducing toxicity using nonmyeloablative preparative regimens and induction of graft-versus-malignancy. *Curr Opin Oncol.* 1999; 87-95.
17. Simonetta, F., Alvarez, M. and Negrin, R. Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2017; 8:465
18. Saha, A. and Blazar, B. Antibody based conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2022; 13: 1-12.
19. Cuervas, M. Estudio económico del trasplante de progenitores hematopoyéticos procedentes de sangre de cordón umbilical en pacientes pediátricos. 2007; Tesis para obtener el grado de doctorado. Universidad Autonoma de Madrid.
20. Khaddour, K., Hana, C. and Mewawalla, P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Statpearls.* 2022.
21. European Group for blood and Marrow transplantation: Nurses group. Movilización y aféresis de células madre hematopoyéticas. *EBMT.* (Consultado 03 mayo 2023) Disponible en: <https://www.ammtac.org/docs/articulos/MOVILIZACION%20TMO.pdf>
22. Padmanabhan, A. Cellular collection by apheresis. *Transfusion.* 2018; 58: 598-604
23. Halverson, D., Schwartz, G., Carter, C., Gress, R., Fowler, D. In vitro generation of allospecific human CD8+ T cells of Tc1 and Tc2 phenotype. *Blood.* 1997; 90: 2089-2096.

24. Koyama, M., Mukhopadhyay, P., Schuster, I., Henden, A., Hülsdünker, J., Varelias, A., *et al.* MHC Class II Antigen Presentation by the Intestinal Epithelium Initiates Graft-versus-Host Disease and Is Influenced by the Microbiota. *Immunity*. 2019; 51: 885-898
25. Varnum, B., Xu, L., Brashem, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., *et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch 1 signaling. *Nat. Med.* 2000; 6: 1278-1281.
26. Marsh, S., Parham, P., Dupont, B. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) Nomenclature report. *Hum Immunol.* 2003; 64: 648-654.
27. Reilly, D. Síndrome de liberación de citocinas después del trasplante de células hematopoyéticas haploidénticas: incidencia, resultados y tratamiento. Univadis Clinical Summaries. 2014.
28. Leukemia & Lymphoma Society. Enfermedad Injerto Contra Huésped. (Internet). (Consultado 15 marzo 2023) Disponible en: https://www.lls.org/sites/default/files/National/USA/Pdf/Publications/FS32S_SPAN_GVHD_6.19_Update.pdf.
29. Lee, D., *et al.* ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019; 25: 625-638.
30. Piper C, Drobyski WR. Inflammatory Cytokine Networks in Gastrointestinal Tract Graft vs. Host Disease. *Front Immunol.* 2019; 10:163.
31. Gong H, Ma S, Liu S, Liu Y, Jin Z, Zhu Y, Song Y, Lei L, Hu B, Mei Y, Liu H, Liu Y, Wu Y, Dong C, Xu Y, Wu D, Liu H. IL-17C Mitigates Murine Acute Graft-vs.-Host Disease by Promoting Intestinal Barrier Functions and Treg Differentiation. *Front Immunol.* 2018; 9:2724.
32. Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JL. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 1993 56 :1518–23.
33. Guimond M, Fry TJ, Mackall CL. Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J Immunother.* 2005, 28:289-294

34. Rodewald HR, Kretzschmar K, Swat W, Takeda S. Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity*. 1995; 3: 313-319
35. Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JL. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation*. 1993; 56:1518-1523

XII. ANEXOS.

Anexo 1. Preparación de reactivos

- a) Wash Buffer 1X (WB)
4. Llevar a temperatura ambiente el WB 10X.
 5. Dar vortex durante 15 segundos.
 6. Mezclar 20mL del WB 10X (Lot 23096369) con 180mL de agua destilada.
 7. Mezclar gentilmente evitando formar burbujas.
 8. Almacenar de 2° – 8°C hasta 6 meses.
- b) Universal Assay Buffer 1X (UAB) (Lot. 23107549)
1. Llevar a temperatura ambiente el UAB 10X.
 2. Mezclar 10mL del UAB 10X con 90mL de agua destilada
 3. Mezclar suavemente evitando formar burbujas
 4. Almacenar de 2° – 8°C hasta 30 días.

NOTA: La dilución solo aplica cuando el UAB se encuentre al 10X

Anexo 2. Preparación del Mix de estándares

1. Centrifugar cada vial de estándar (Estándar Mix A Lot. 344248-000, Estándar Mix B Lot. 344248-000) a 2000 x g por 10 segundos.
2. Agregar 50µL de UAB 1X a cada vial.
3. Dar vortex a altas velocidades durante 30 segundos.
4. Centrifugar a 2000 x g por 10 segundos para llevar el contenido al fondo del vial.
5. Incubar a 4°C por 10 minutos para una completa reconstitución.
6. Mezclar el contenido de todos los viales en uno solo y llevar a 250µL con UAB 1X.
7. Dar vortex al Mix de estándares a altas revoluciones por 10 segundos.

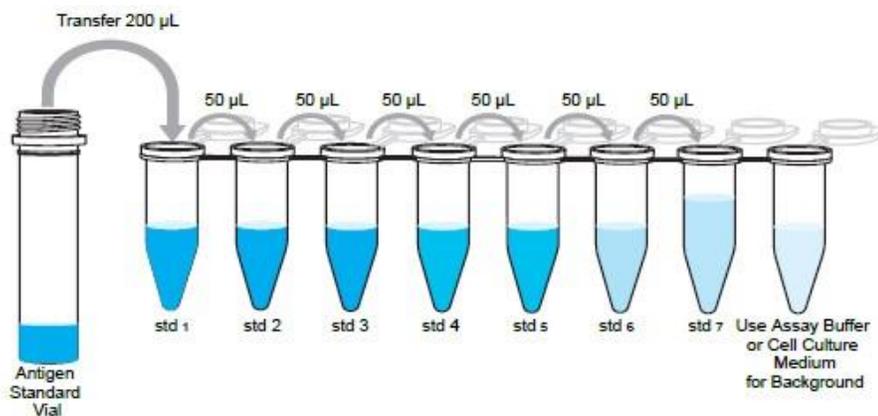
NOTA: El volumen final de 250µL dependerá del número de viales que vengan en el kit.

# Estándares	Reconstitución de cada vial	Volumen del pool de estándares	Volumen de UAB 1X para agregar	Volumen final
1	50µL	50 µL	200 µL	250 µL
2	50µL	100 µL	150 µL	250 µL
3	50µL	150 µL	100 µL	250 µL
4	50µL	200 µL	50 µL	250 µL
5	50µL	250 µL	0 µL	250 µL

Anexo 3. Preparación de diluciones seriadas del estándar

1. Rotular 8 microtubos (Std1, Std2, Std3, Std4, Std5, Std6, Std7, Blanco)
2. Agregar 200µL del Mix de estándares al Std1.
3. Agregar 150µL de UAB 1X al Std2 – Std7 y Blanco.
4. Transferir 50µL de Std1 a Std2
5. Mezclar por pipeteo 10 veces
6. Transferir 50µL de Std2 a Std3 usando una nueva pipeta
7. Mezclar por pipeteo 10 veces
8. Repetir estos pasos para los tubos Std4 – Std7 cambiando de pipeta entre cada dilución.
9. Mantener las diluciones en refrigeración hasta su uso.

NOTA: Los estándares reconstituidos no pueden almacenarse.



Anexo 4. Lavados de placa

1. Colocar la placa sobre el magneto y esperar 2 minutos permitiendo el asentamiento de las perlas magnéticas en el fondo.
2. Remover el líquido invirtiendo la placa rápidamente sobre un contenedor de desechos.
3. Secar la placa dando ligeros golpeteos sobre toallas absorbentes.
4. Agregar 150µL de WB 1X a cada pocillo y esperar 30 segundos
5. Remover el líquido invirtiendo la placa rápidamente sobre un contenedor de desechos.
6. Secar la placa dando ligeros golpeteos sobre toallas absorbentes.
7. Quitar la placa del magneto.

Anexo 5. Diseño de la placa

Estandares		Muestras									
Std1	Std1	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73
Std2	Std2	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74
Std3	Std3	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
Std4	Std4	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
Std5	Std5	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
Std6	Std6	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
Std7	Std7	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
Blanco	Blanco	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80