

Medición de citoquinas mediante una técnica multiplex por citometría espectral: aplicación en el estudio de la inmunobiología de la ascariasis

Ana Lozano,¹ Carolina Sánchez-Marrugo, Kevin Llinás-Caballero, Carlos Barrios, Nathalie Acevedo, Josefina Zakzuk, Luis Caraballo

¹Estudiante, Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena

²Médico, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena

³MSc. Inmunología, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena

⁴Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena

⁵Profesor Auxiliar, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena

⁶Docente asistente, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena

⁷Profesor Honorario de Inmunología y Alergología, Director, Instituto de Investigaciones Inmunológicas, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

Correspondencia:

Josefina Zakzuk

jzazuku@unicartagena.edu.co

Rev Alerg Mex 2024; 71 (1): 64-65

<https://doi.org/10.29262/ram.v71i1.1365>

Resumen

Objetivos: Cuantificar la producción de citoquinas Th1/Th2/Th17, inducida por antígenos de *Ascaris lumbricoides* en PBMCs, utilizando una técnica de multiplex.

Métodos: Se realizaron cultivos de PBMCs de personas con infección leve por *A. lumbricoides* (n = 20), y no infectadas (n = 21), y se estimularon con extracto de *A. lumbricoides* (ExtAscaris), un mix de anti-CD2/CD3/CD28 (CDmix), como control positivo, y solo medio (control negativo). Las citoquinas en los sobrenadantes, se midieron usando el estuche BD™ Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17, para identificar IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 e IL-17A. La lectura se realizó en un citómetro espectral (Northern Lights, Cytek, USA), y el análisis en software R, usando los paquetes *tidyverse*, *beadplexr*, *flowCore* y *arsenal*. Se calculó la concentración de citoquinas mediante ajuste de curva logística de cinco parámetros. Se empleó la prueba t para comparar casos y controles y una p < 0,05, se consideró como significativa. Se contó con autorización del Comité de Ética de la Universidad de Cartagena para hacer la investigación y con el consentimiento informado por parte de los participantes. Este trabajo fue financiado por el Sistema General de Regalías de Colombia, bajo el BPIN2020000100405 - BPIN2020000100364.

Resultados: Al utilizar el canal de detección R8 para identificar las citoquinas y el modelo de agrupamiento *mclust*, se extrajo eficientemente la intensidad de fluorescencia para cada citoquina (Figura 1). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de las siete citoquinas entre casos y controles (Figura 2). Aunque la respuesta de IFN-γ, y hacia ExtAscaris fue más alta en los casos de controles (252,5 ng/mL vs 173,1 ng/mL), la diferencia no fue significativa. La IL-17A (límite de detección: 18,9 pg/mL) fue más detectable en casos que en controles (cinco casos, 23% vs dos controles, 9,5%). La IL-4 solo se detectó en los sobrenadantes de cultivos estimulados con CDmix, pero no con el extracto de Ascaris (Figura 2).

Conclusiones: La técnica multiplex por citometría espectral, combinada con el análisis en software de licencia libre, se mostró aplicable para cuantificar citoquinas inducidas por antígenos de *A. lumbricoides* en PBMCs. Sin embargo, se requiere de un método más sensible para evaluar la respuesta de IL-4 en el contexto de la ascariasis. Los resultados no revelaron diferencias significativas en la producción de citoquinas entre casos y controles para los estímulos evaluados.

Palabras clave: Helmintos; Citometría de flujo; Citocinas; Leucocitos; Mononucleares.

Abstract

Objective: To quantify the production of Th1/Th2/Th17 cytokines induced by *Ascaris lumbricoides* antigens in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using a multiplex technique.

Methods: PBMCs were cultured from individuals with mild *A. lumbricoides* infection (n = 20) and uninfected individuals (n = 21) and stimulated with *A. lumbricoides* extract (ExtAscaris), a mix of anti-CD2/CD3/CD28 (CDmix) as a positive control, and only medium (negative control). Cytokines in the supernatants were measured using the BD™ Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 kit, to identify IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, and IL-17A. Readings were taken on a spectral cytometer (Northern Lights, Cytek, USA), and analysis was performed using R software with packages "tidyverse," "beadplexr," "flowCore," and "arsenal." Cytokine concentrations were calculated using a 5-parameter logistic curve. The t-test was used to compare cases and controls, and statistical significance was set at p < 0.05. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Cartagena and the participants provided informed consent. This study was financially supported by the Colombian Sistema General de Regalías under the BPIN2020000100405 - BPIN2020000100364.

Results: Efficient fluorescence intensity extraction for each cytokine was achieved using detection channel R8 and the "mclust" clustering model

(Figure 1). No significant differences were found in the levels of the seven cytokines between cases and controls (Figure 2). Although the IFN- γ response to ExtAscaris was higher in cases than in controls (252.5 ng/mL vs. 173.1 ng/mL), the difference was not significant. IL-17A (detection limit: 18.9 pg/mL) was more detectable in cases than controls (5 cases, 23% vs. 2 controls, 9.5%). IL-4 was only detected in the supernatants from CDmix-stimulated cultures but not with the Ascaris extract (Figure 2).

Conclusions: The multiplex technique using spectral flow cytometry combined with open-source *software* analysis proved applicable for quantifying cytokines induced by *A. lumbricoides* antigens in PBMCs. However, a more sensitive method is needed to evaluate IL-4 response in the context of ascariasis. The results did not reveal significant differences in cytokine production between cases and controls for the evaluated stimuli.

Keywords: Helminths; Flow cytometry; Cytokines; Leukocytes; Mononuclear.