

## DISEÑO DE UN ENSAYO DE INMUNO-PCR PARA LA VALORACIÓN BIOLÓGICA DE IFN- $\alpha$ 2b EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO

**Lozano, Victoria**

*Centro Biotecnológico del Litoral  
Director/a: Attallah, Carolina  
Codirector/a: Oggero Eberhardt, Marcos*

**Área: Ciencias Biológicas**

### INTRODUCCIÓN

La detección de biomoléculas resulta muy importante para el diagnóstico de enfermedades. Los inmunoensayos basados en la interacción entre antígenos y anticuerpos son los estudios más comúnmente empleados para detectar proteínas presentes en muestras biológicas. Sin embargo, muchos de estos métodos no son lo suficientemente sensibles para procedimientos de diagnóstico (Chang et al., 2016). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) establecida en 1985 (Saiki et al., 1985), puede detectar un número extremadamente bajo de copias de ADN, lo cual la convierte en un procedimiento altamente sensible, rápido y de bajo costo. En 1992, Sano y col. (Sano et al., 1992) diseñaron una nueva técnica llamada inmuno-PCR (iPCR) la cual combina la amplificación exponencial de la señal de una PCR con la versatilidad y flexibilidad de un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Esta combinación permite aumentar el límite de detección de 10 a 1000 veces comparado con un ELISA análogo (Sano et al., 1992; Niemeyer et al., 2005). El protocolo de iPCR inicial ha sufrido modificaciones que permiten al operador elegir entre estrategias que difieren en versatilidad, rapidez y costo (Niemeyer et al., 2007).

El IFN- $\alpha$  es una de las biomoléculas cuyos ensayos de detección no son lo suficientemente sensibles y/o específicos para cuantificar y discriminar entre los diferentes subtipos de IFNs de tipo I humanos (Kleiner et al., 2013; Jabs et al., 1999). El incremento de éstos, y en particular el IFN- $\alpha$ , está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades reumáticas (Niewold et al., 2010; Muskardin and Niewold, 2018).

En nuestro laboratorio hemos desarrollado anticuerpos anti-IFN- $\alpha$ 2b recombinante humano con fines terapéuticos. La necesidad de desarrollar ensayos de detección sensibles para valorar esta citoquina en muestras de suero humano resulta una valiosa herramienta para nuestro grupo de trabajo, ya que nos permitirá evaluar la capacidad neutralizante de la citoquina por parte de estos anticuerpos.

Título del proyecto: "Generación de nuevos bioterapéuticos antagonistas del interferón- $\alpha$ 2 humano: aplicación de ingeniería de anticuerpos y evaluación de inmunogenicidad"

Instrumento: CAI+D 2016 (PI: 50420150100006LI)

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director: Marcos R. Oggero Eberhardt

### OBJETIVOS

Desarrollo de una técnica de iPCR para la cuantificación de IFN- $\alpha$ 2b en muestras de

suero humano: 1) diseño y puesta a punto de un ELISA sándwich y la consiguiente iPCR; 2) análisis comparativo de ambos métodos en base a los respectivos parámetros estadísticos.

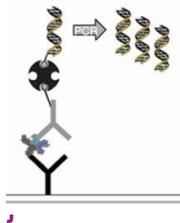
## METODOLOGÍA

### [1] Diseño y puesta a punto de un ELISA sándwich para cuantificar IFN- $\alpha$ 2b

Se emplearon anticuerpos anti-IFN- $\alpha$ 2b obtenidos previamente en nuestro laboratorio. Para la captura se utilizó un anticuerpo monoclonal (mAb) murino y para la detección, un anticuerpo policlonal (pAb) de conejo previamente biotinilado. Se realizó una curva de calibrado empleando como estándar rhIFN- $\alpha$ 2b (IFN- $\alpha$ 2b recombinante humano) en solución diluyente y distintas diluciones de suero humano para corroborar efectos de matriz. El ensayo se reveló con estreptavidina conjugada a múltiples moléculas de peroxidasa de rábano picante (sistema de amplificación), la cual se incubó con el sustrato y cromógeno correspondientes. Se determinaron todos los parámetros de funcionalidad del sistema.

### [2] Diseño y puesta a punto de una iPCR para cuantificar IFN- $\alpha$ 2b partiendo del ELISA desarrollado previamente

En base al ELISA sándwich desarrollado, se diseñó un ensayo de iPCR secuencial (Figura 1). En primer lugar se generó una sonda de ADN biotinilada por PCR empleando uno de los oligonucleótidos biotinilados. Luego, se desarrolló una PCR cuantitativa (qPCR) empleando oligonucleótidos específicos cuya eficiencia de amplificación se encontrara en el rango establecido como óptimo de 1,8-2,2. Por otro lado, se evaluó la posibilidad de adsorber el anticuerpo de captura en las placas empleadas para realizar la qPCR. Por último, se realizó la iPCR secuencial enlazando el inmunocomplejo y la qPCR a través de una molécula como la neutravidina que permite conectar la sonda biotinilada al anticuerpo de detección biotinilado. Luego, el ensayo de iPCR continuó con el agregado de los oligonucleótidos específicos y mezcla comercial que contiene los dNTPs, polimerasa, *buffer* de la enzima y EvaGreen.



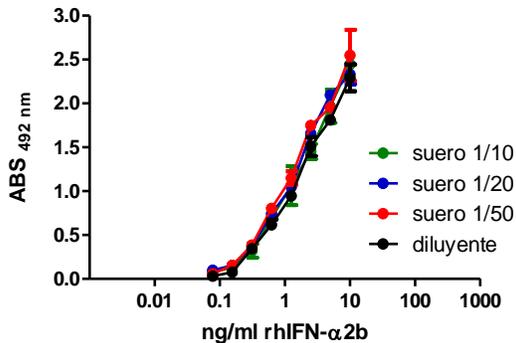
**Figura 1:** Esquema de la iPCR secuencial. Descripción en orden ascendente: mAb anti-rhIFN- $\alpha$ 2b empleado como captura; molécula de rhIFN- $\alpha$ 2b; pAb anti-rhIFN- $\alpha$ 2b biotinilado empleado para la detección; molécula de neutravidina empleada para conectar el inmunocomplejo y la qPCR; sonda biotinilada.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

En primer lugar, se evaluó el efecto matriz que podría provocar el suero humano en la cuantificación del rhIFN- $\alpha$ 2b mediante el ELISA sándwich diseñado con los anticuerpos previamente descriptos. Como puede observarse en la Figura 2A, no se observa tal efecto a las diluciones de suero evaluadas. Por lo tanto, se decidió trabajar con la dilución 1/10, ya que se debe considerar que en suero humano esta citoquina se encuentra en el orden de los pg/ml (1,5 pg = 1UI; Jabs et al., 1999). Posteriormente, se realizaron curvas de calibrado del rhIFN- $\alpha$ 2b partiendo de distintas concentraciones de la citoquina, con la finalidad de evaluar el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) del ELISA (Figura 2B).

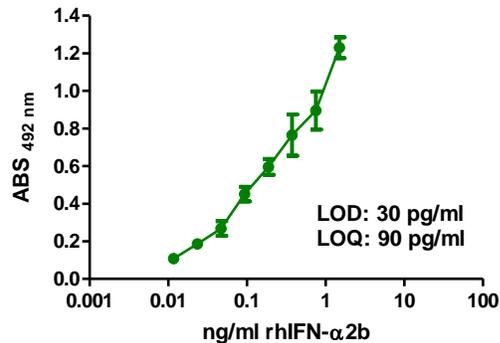
A

Curva estándar hIFN- $\alpha$ 2b  
Efectos de matriz



B

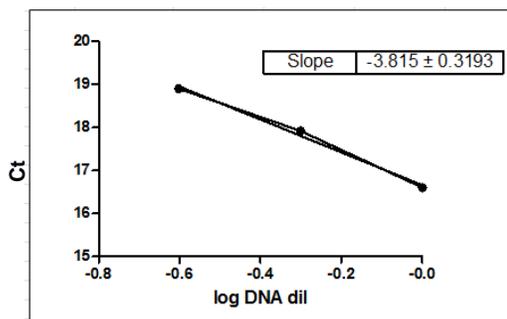
Curva estándar rhIFN- $\alpha$ 2b



**Figura 2:** A) ELISA sándwich: evaluación del efecto matriz B) ELISA sándwich: determinación de los parámetros LOD y LOQ.

Si bien el LOD se encuentra en el orden de los 30 pg/ml, este parámetro no es lo suficientemente sensible para valorar diferencias en muestras de suero humano ya que el LOQ está casi en el orden de los 100 pg/ml. Debemos considerar que esta citoquina se encuentra entre 3 y 31 UI/ml (4,5 y 46,5 pg/ml) en suero de personas sanas (Jabs et al., 1999).

Respecto de la iPCR, en primer lugar se biotiniló una sonda de ADN mediante PCR empleando uno de los oligonucleótidos biotinilado. Se utilizó como molde de la reacción el vector pBKS. Se corroboró la incorporación de la biotina en la molécula de ADN mediante un ELISA de competencia, con otra molécula biotinilada, por la neutravidina inmovilizada (resultado no mostrado). Luego, se evaluó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos diseñados para el ensayo de qPCR (Figura 3).



$$m = -\left(\frac{1}{\log E}\right) \quad (1)$$

$E = 1,83$   
 $m$ : pendiente  
 $E$ : eficiencia

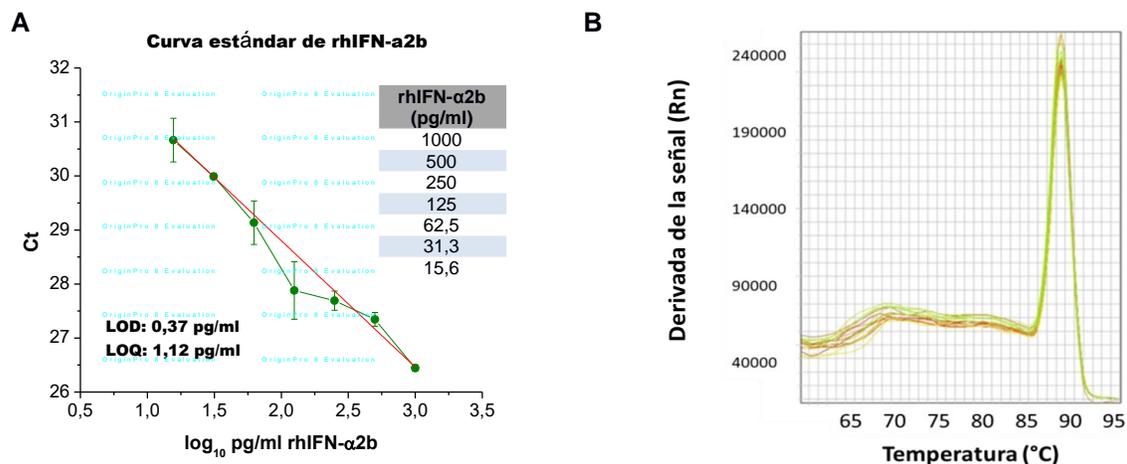
**Figura 3:** Gráfica Ct obtenido a partir del ensayo de qPCR vs. el  $\log_{10}$  de las diluciones de la sonda biotinilada.

A partir de la pendiente de la recta presentada en la Figura 3, se calculó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos empleados en la qPCR (Ecuación 1), corroborándose que la misma se encuentra dentro del rango considerado como óptimo. Posteriormente se evaluaron diferentes concentraciones de sonda biotinilada (0,5 pM; 1 pM y 2 pM), basándonos en la bibliografía existente, con la finalidad de optimizar la reacción (resultado no mostrado). En función de los resultados, se decidió realizar los experimentos con 0,5 pM de sonda. Además, se corroboró que las placas empleadas para qPCR pueden emplearse para capturar el mAb anti-rhIFN- $\alpha$ 2b en *buffer* carbonato 0,05 M; pH 9,6 (resultado no mostrado).

Por último, se realizó un primer ensayo de iPCR realizando una curva estándar de rhIFN- $\alpha$ 2b a partir de 1 ng/ml. En la Figura 4A, se observa la respuesta lineal de Ct vs. el

$\log_{10}$  de la concentración de la citoquina. Se calculó el LOD y LOQ, siendo ambos parámetros muy inferiores respecto del ELISA sándwich. Cabe aclarar que resta evaluar concentraciones menores de rhIFN- $\alpha$ 2b ya que los parámetros obtenidos son inferiores incluso a las concentraciones ensayadas. Las curvas de *melting* (Figura 4B) nos indican la identidad del producto amplificado.

Estos resultados son muy prometedores para el grupo de trabajo ya que el LOQ de la iPCR obtenido hasta el momento permite la cuantificación del rhIFN- $\alpha$ 2b en suero humano.



**Figura 4:** A) Representación de la iPCR graficada como Ct vs.  $\log_{10}$  de la concentración del estándar de rhIFN- $\alpha$ 2b: determinación de los parámetros LOD y LOQ. En la tabla se detallan las concentraciones evaluadas. B) Curvas de *melting* para las diferentes concentraciones ensayadas.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chang L., Li J. & Wang L.** 2016. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Anal. Chim. Acta* 910, 12–24.
- Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N.** 1985. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*. 230, 1350–1354.
- Sano T., Smith C. L. & Cantor C. R.** 1992. Immuno-PCR: Very Sensitive Antigen Detection by Means of Specific Antibody-DNA Conjugates. 258, 120-122.
- Niemeyer C., Adler M. & Wacker R.** 2005. Immuno-PCR: High sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol.* 23, 208–216.
- Niemeyer C. M., Adler M. & Wacker R.** 2007. Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. 2, 1918–1930.
- Kleiner G., Marcuzzi A., Zanin V., Monasta L. & Zauli G.** 2013. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediat. Inflamm* 2013, 434010.
- Jabs W. J., Hennig C., Zawatzky R. & Kirchner H.** 1999. Failure to Detect Antiviral Activity in Serum and Plasma of Healthy Individuals Displaying High Activity in ELISA for IFN-  $\alpha$  and IFN-  $\beta$ . *J. Interf. CYTOKINE Res.* 19, 463–469.
- Niewold T. B., Clark D. N., Salloum R. & Poole B. D.** 2010. Interferon Alpha in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–8.
- Muskardin, T. L. W. & Niewold, T. B.** 2018. Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 14, 214–228.