

# Materia Inmunología

## Seminario 8

### Exploración de la respuesta inmune

**Año: 2020**

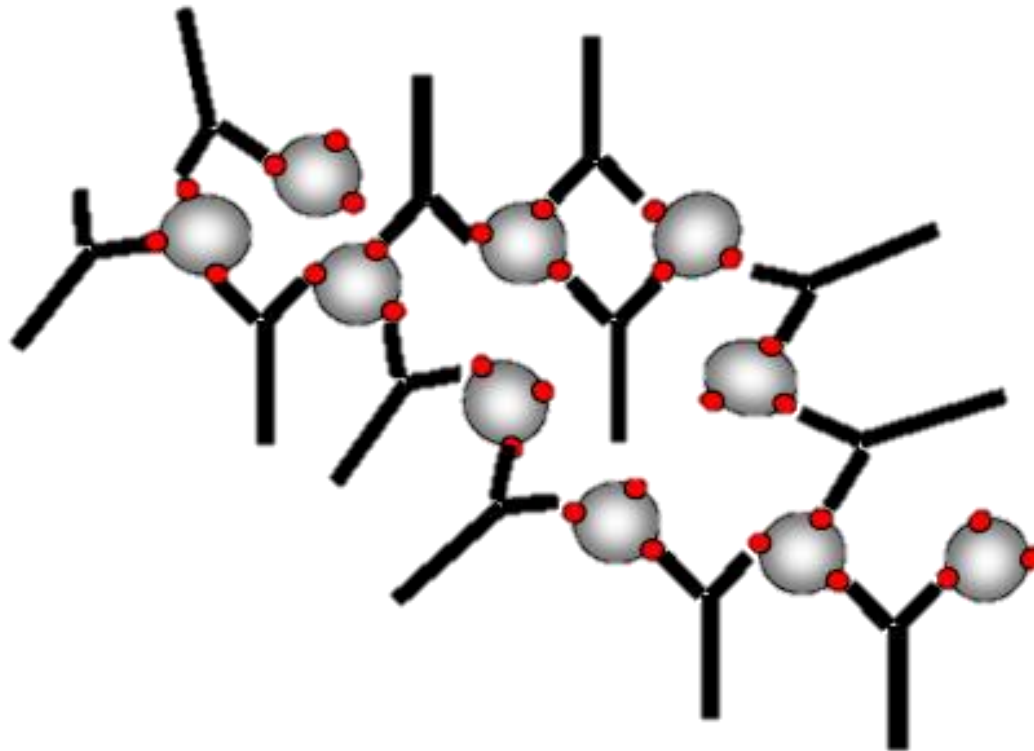


*Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Medicina*

# Objetivos

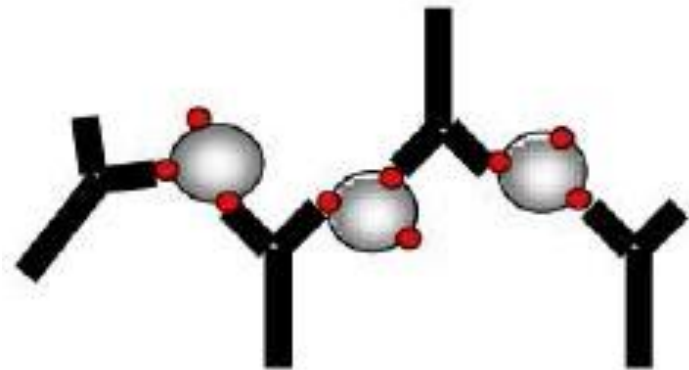
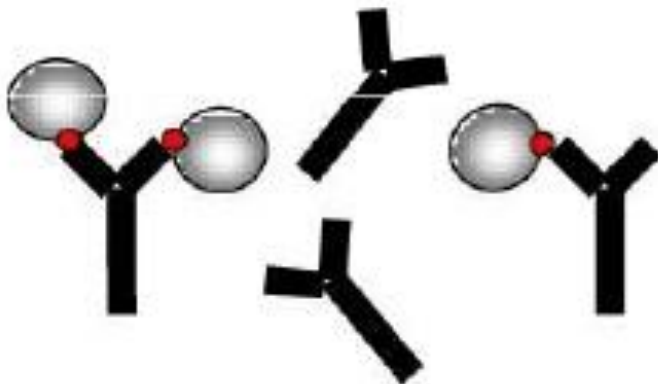
- Conocer cómo puede estudiarse la función del sistema inmune
- Interpretar los resultados de técnicas que usan como base las interacciones antígeno-anticuerpo
- Conocer las aplicaciones de las distintas técnicas en la clínica y en investigación

# Técnicas basadas en la interacción antígeno-anticuerpo



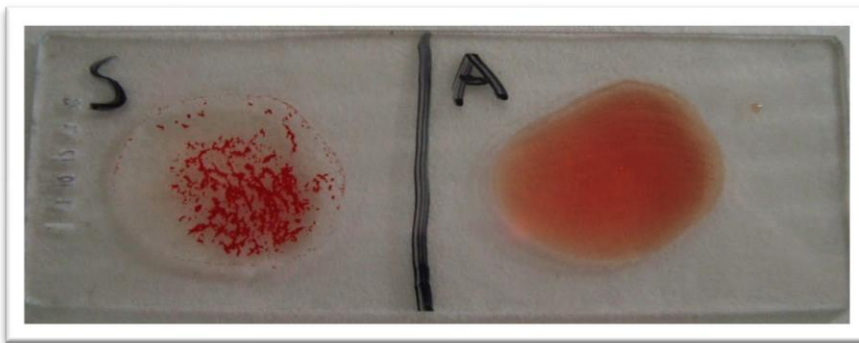
# Interacción antígeno-anticuerpo

- Interacción primaria → • Interacción secundaria
  - No visualizable
  - Antígeno monovalente
  - Requieren método de revelado
- Visualizable
- Antígeno multivalente
- Requieren altas concentraciones de Ag/Ac

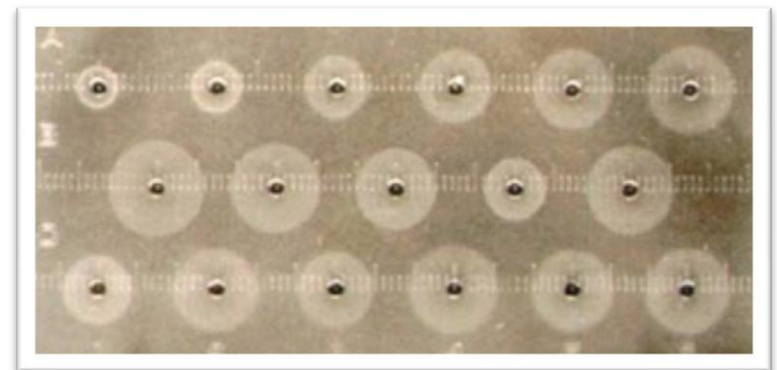


# Algunos conceptos

- Sensibilidad
- Especificidad
- Técnicas cuantitativas
- Técnicas cualitativas
- Técnicas semi-cuantitativas



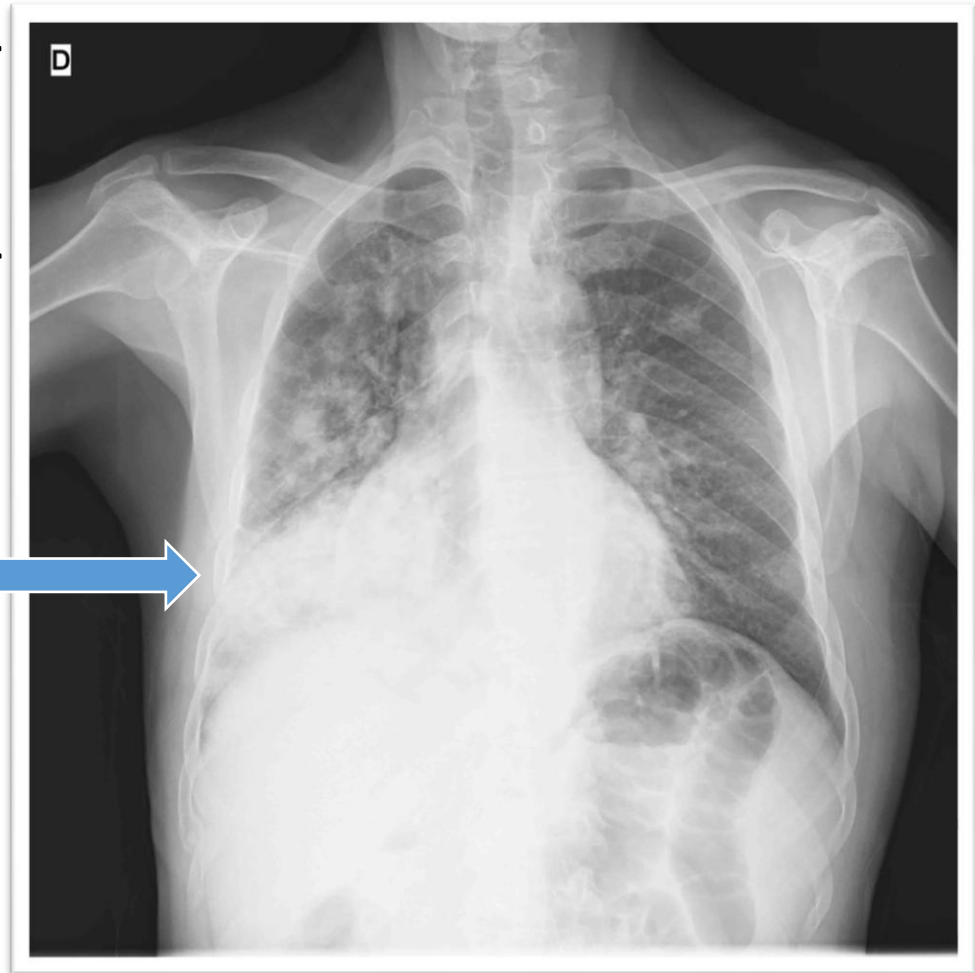
Agglutinación



Precipitación

# Caso 1

Enrique, de 71 años, consulta por presentar fiebre de 3 días de evolución ( $39.5^{\circ}\text{C}$ ), tos con expectoración purulenta y dolor punzante en la parrilla costal derecha. La radiografía muestra una imagen compatible con neumonía en base derecha.



**¿Cómo espera encontrar los valores de leucocitos circulantes?**  
**¿Y las proteínas?**

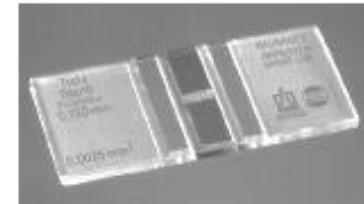
# Hemograma y eritrosedimentación

## Eritrosedimentación



## Hemograma con recuento y fórmula leucocitaria

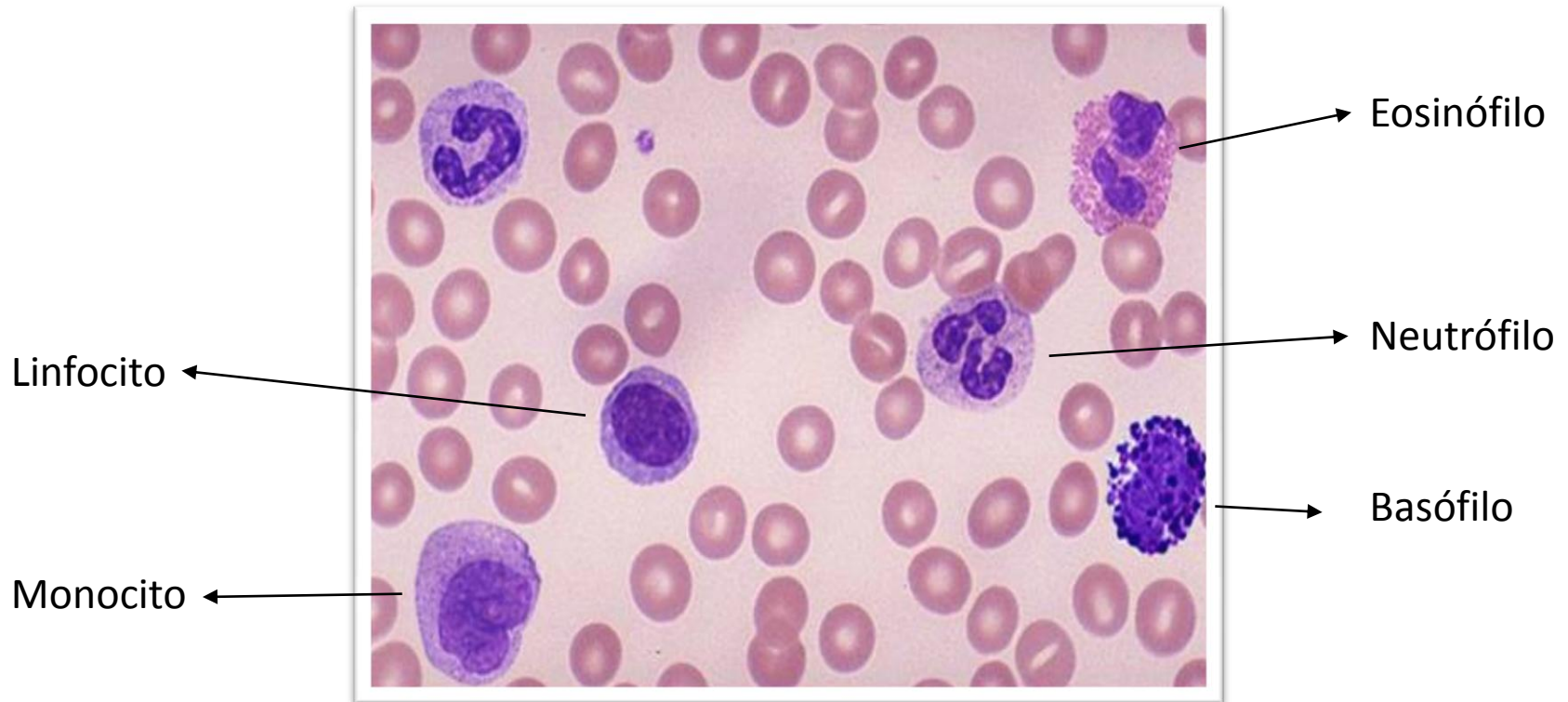
Recuento manual:  
cámara de Neubauer



Recuento automatizado:  
autoanalizadores  
(también calculan  
fórmula leucocitaria)



# Formula leucocitaria y frotis



Grupo de leucocitos	Valor %	Valor absoluto
Neutrófilos	55 a 70 %	2.500 a 8.000 mil/mm <sup>3</sup>
Linfocitos	20 a 40 %	1.000 a 4.000 mil/mm <sup>3</sup>
Monocitos	2 a 8 %	100 a 700 mil/mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	1 a 4 %	50 a 500 mil/mm <sup>3</sup>
Basófilos	0 a 1 %	25 a 100 mil/mm <sup>3</sup>



# Valores normales de subpoblaciones de linfocitos en adultos

**Tabla 1.** Intervalos de referencia de subpoblaciones linfocitarias en adultos sanos de acuerdo a sexo, ciudad de Lima, Perú

Subpoblaciones linfocitarias	Masculino (n=197)			Femenino (n=121)			p
	Media ± DE	LRI	LRS	Media ± DE	LRI	LRS	
		(IC 90%)	(IC 90%)		(IC 90%)	(IC 90%)	
CD3+ (linfocitos T)							
Recuento absoluto (10 <sup>3</sup> células/μL)	1,60 ± 0,5	0,8 (0,8 – 0,9)	2,9 (2,5 – 3,0)	1,6 ± 0,5	0,8 (0,7 - 0,9)	2,8 (2,5 - 3,0)	0,724
Recuento porcentual (%)	65,8 ± 7,9	47,3 (45,7 – 51,4)	80,9 (77,6 – 82,3)	68,8 ± 7,7	52,7 (48,0 - 55,1)	82,6 (81,0 - 87,7)	0,001
CD3+ CD4+ (linfocitos T cooperadores)							
Recuento absoluto (células/μL)	907,0 ± 294,0	431,0 (352,0 - 433,0)	1601,0 (1423,0 - 1819,0)	941,0 ± 271,0	437,0 (382,0 - 539,0)	1600,0 (1394,0 - 1679,0)	0,303
Recuento porcentual (%)	57,8 ± 8,1	42,2 (39,8 - 45,1)	79,2 (74,9 - 83,3)	58,9 ± 7,9	42,0 (38,9 - 44,8)	74,7 (70,5 - 75,5)	0,251
CD3+ CD8+ (linfocitos T citotóxicos)							
Recuento absoluto (células/μL)	538,0 ± 200,0	234,0 (176,0 - 284,0)	985,0 (910,0 - 1062,0)	542,0 ± 218,0	237,0 (213,0 - 275,0)	1114,0 (913,0 - 1406,0)	0,867
Recuento porcentual (%)	34,1 ± 7,3	20,8 (18,4 - 22,7)	50,2 (46,9 - 52,0)	33,0 ± 6,7	22,1 (16,7 - 23,2)	46,8 (44,9 - 50,5)	0,163
CD3+ CD4+ / CD3+ CD8+	1,7 ± 0,5	0,8 (0,7 - 0,9)	2,9 (2,8 - 3,1)	1,9 ± 0,6	0,9 (0,8 - 1,0)	3,2 (2,8 - 3,3)	0,083
CD19+ (linfocitos B)							
Recuento absoluto (células/μL)	373,0 ± 130,0	152,0 (130,0 - 169,0)	707,0 (633,0 - 723,0)	396,0 ± 155,0	170,0 (136,0 - 174,0)	761,0 (663,0 - 772,0)	0,156
Recuento porcentual (%)	13,4 ± 3,6	6,76 (5,2 - 7,5)	20,8 (19,4 - 21,8)	14,2 ± 4,3	7,0 (6,9 - 8,9)	24,7 (24,3 - 25,0)	0,086
CD3-CD56+ (linfocitos NK)							
Recuento absoluto (células/μL)	489,0 ± 169,0	143,0 (133,0 - 200,0)	765,0 (761,0 - 813,0)	415,0 ± 182,0	96,0 (61,0 - 144,0)	799,0 (712,0 - 903,0)	0,003
Recuento porcentual (%)	18,4 ± 4,9	8,6 (6,5 - 10,0)	28,1 (28,0 - 29,2)	15,1 ± 5,2	5,5 (3,5 - 6,5)	27,7 (22,1 - 31,0)	<0,001

DE: desviación estándar; LRI: límite de referencia inferior; LRS: límite de referencia superior. IC: intervalo de confianza

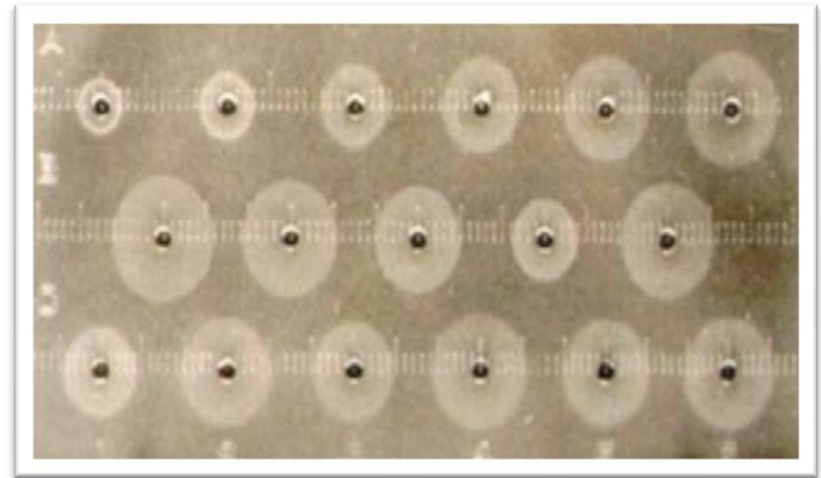
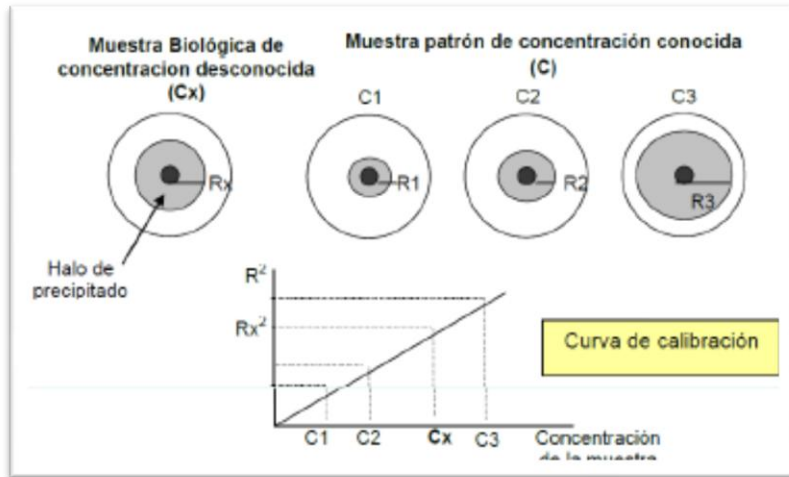
Nota: valores hallados por percentiles (intervalo del 95%) y sus intervalos de confianza (CLSI C28-A3) <sup>(8)</sup>

# Caso 2

Marcela, de 27 años, padece Lupus Eritematoso Sistémico. Hace una semana que presenta episodios de hematuria y tensión arterial elevada. Usted sospecha una nefritis lúpica, lesión que se produce por depósito de complejos inmunes en el glomérulo.

**¿Qué marcadores séricos le resultaría útil medir?**

# Inmunodifusión radial



- Técnica por precipitación
- Técnica cuantitativa
- Concentración sérica de IgG, IgM e IgA
- Concentración sérica de elementos del complemento (C1-C9, factor H, factor I, factor B, C1 inhibidor)

- Técnica poco sensible
- Técnica lenta (24 hs)
- Requiere concentraciones altas de antígenos para poder medirlos
- Tiende a ser reemplazada por técnicas turbidimétricas que emplean anticuerpos contra la proteína de interés, formando complejos inmunes insolubles, cuantificándose la turbidez por espectrofotometría.

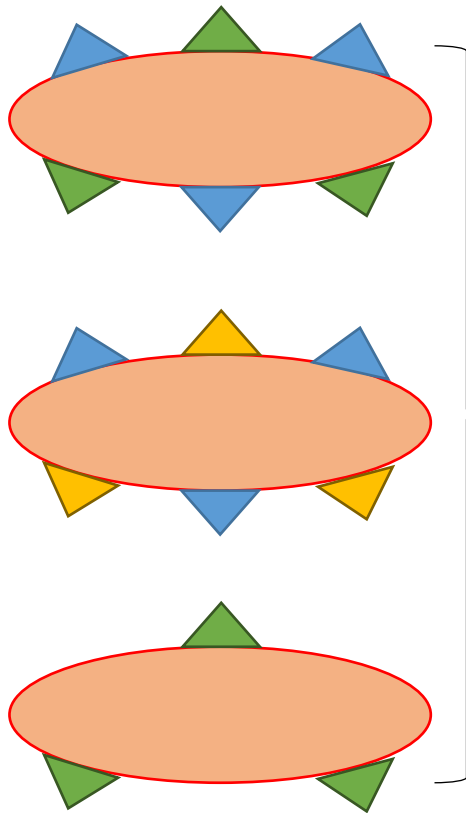
# Caso 3

Pablo, de 22 años, es traído a la guardia por una ambulancia tras un accidente de moto en la Autopista Buenos Aires-La Plata. Pablo presenta una lesión cortante con sangrado activo en el miembro inferior derecho. Su tensión arterial es 70/50. Además de la expansión con solución fisiológica, usted se plantea la necesidad de una transfusión

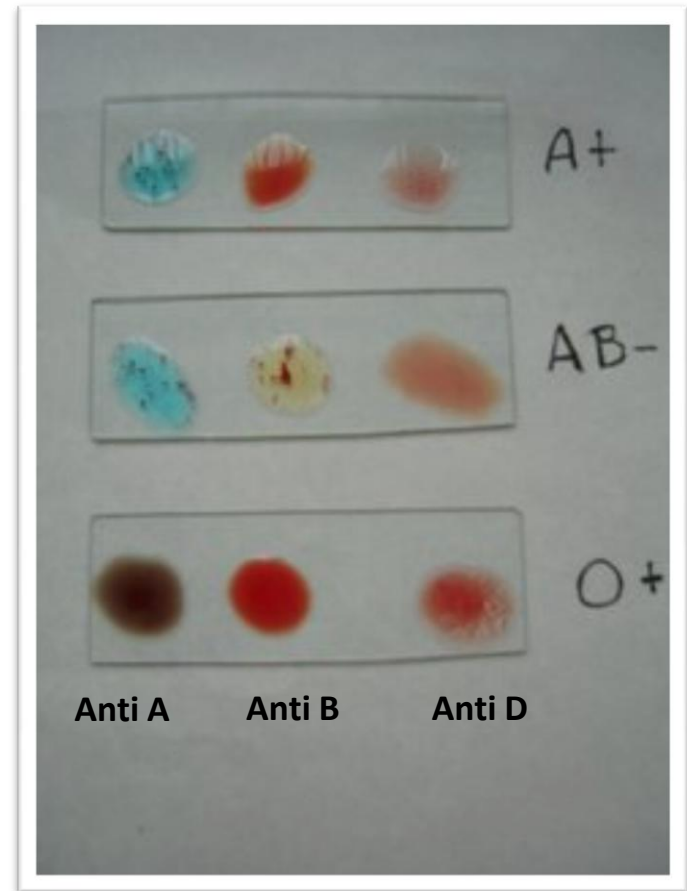
**¿Qué estudio de laboratorio debe hacer previo a la transfusión? ¿Por qué?**

# Determinación de grupo y factor

▲ Antígeno D    ▲ Antígeno B    ▲ Antígeno A



En presencia de Ac anti A, anti B y anti D



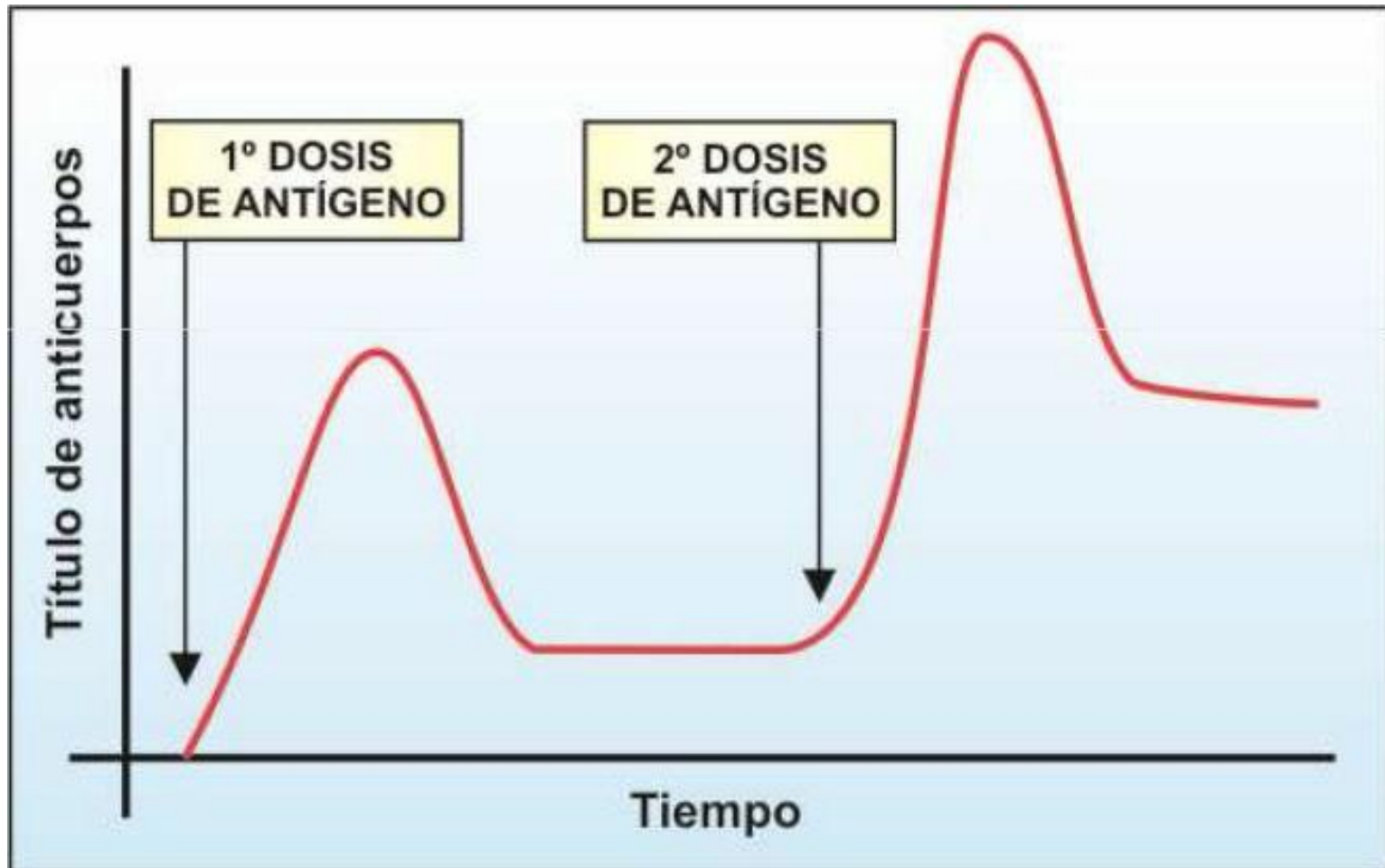
**Técnica cualitativa**

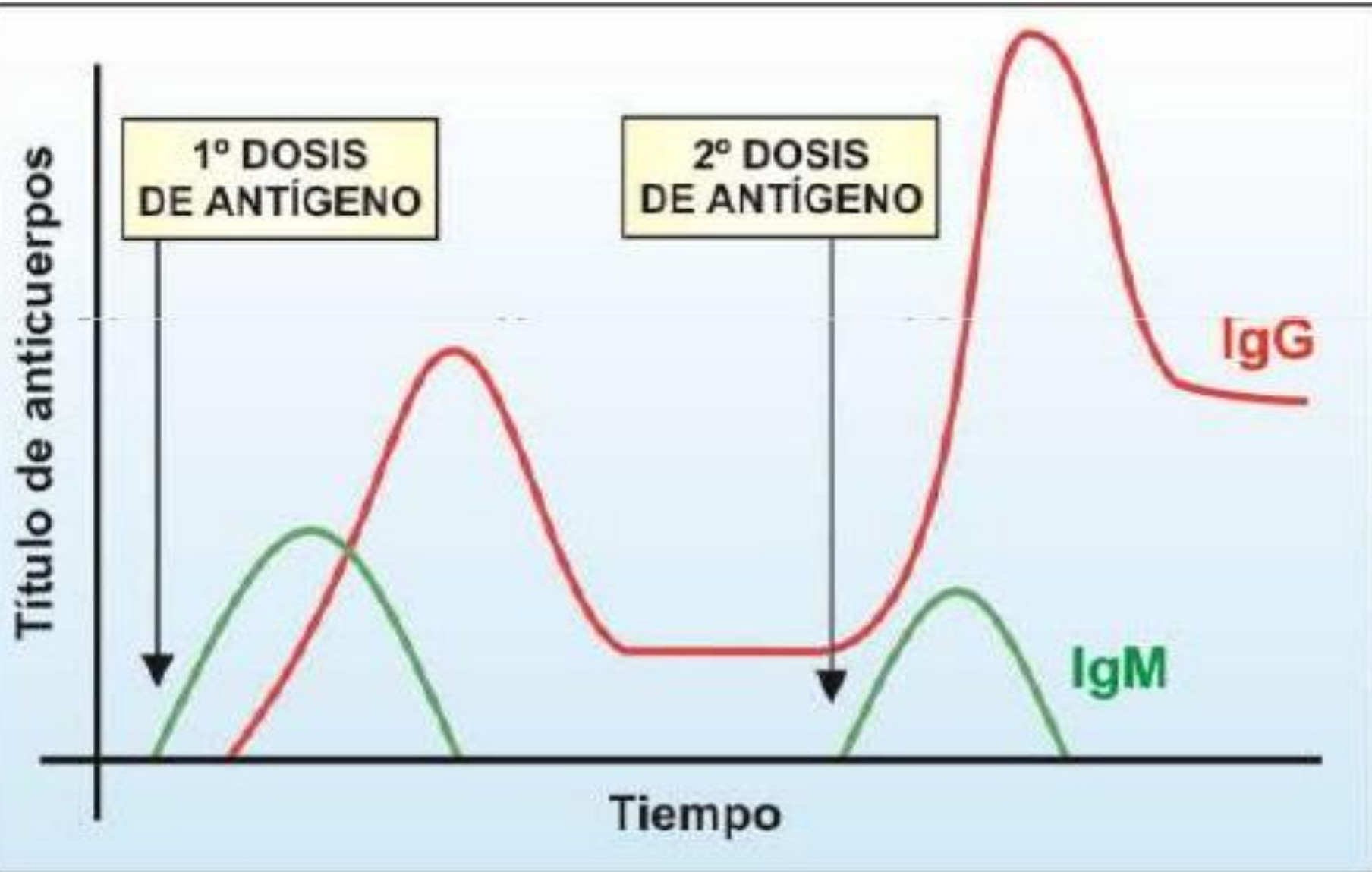
**Técnica por aglutinación directa**

# Determinación de la presencia y/o concentración de antígenos y anticuerpos



# Repaso – Respuesta B





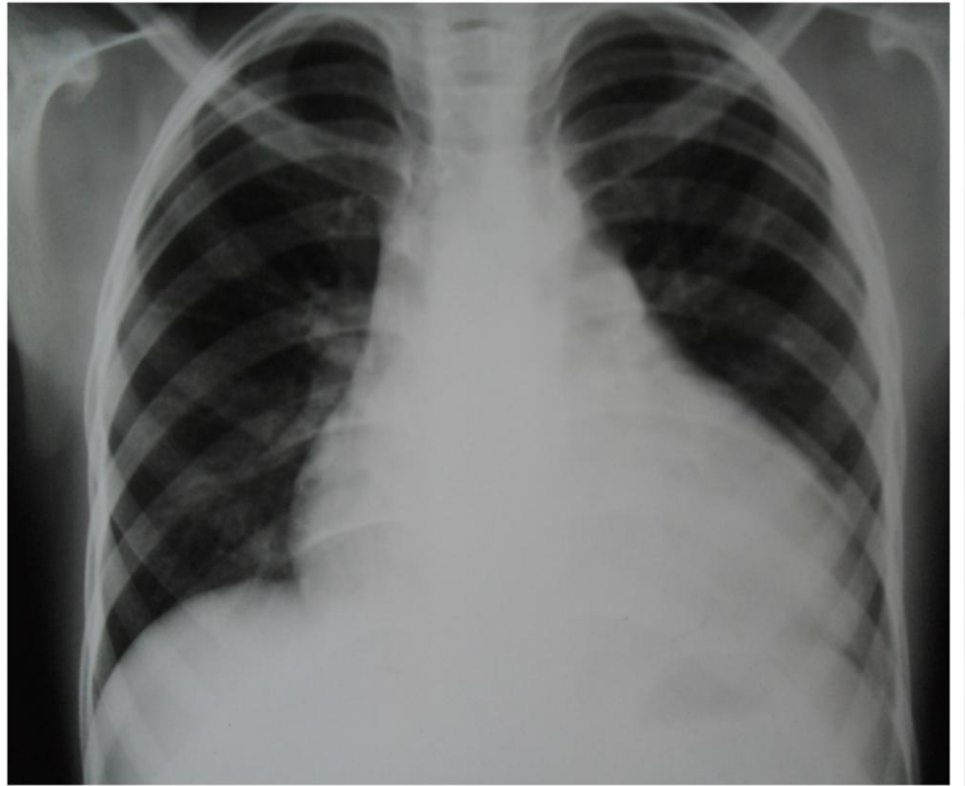


	Primaria	Secundaria
Tiempo requerido	5-10 días	1-3 días
Intensidad	menor	mayor
Isotipos	IgM > IgG	IgG, IgA, IgE
Afinidad Ac	Baja	Alta
Inmunogéno	Hidratos de carbono, lípidos, proteínas, glico- y lipoproteínas	Proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas

# Caso 4

Usted se encuentra realizando el control de salud de Filomena, de 55 años, oriunda de Santiago del Estero. En la radiografía de tórax y el ECG evidencia cardiomegalia y alteraciones funcionales. Usted decide descartar el diagnóstico de Enfermedad de Chagas

**¿Qué puede buscar en el suero del paciente para realizar el diagnóstico?**



# Hemaglutinación indirecta

**DILUCIÓN  
DEL SUERO**      2    4    8    16    32    64    128    256    512

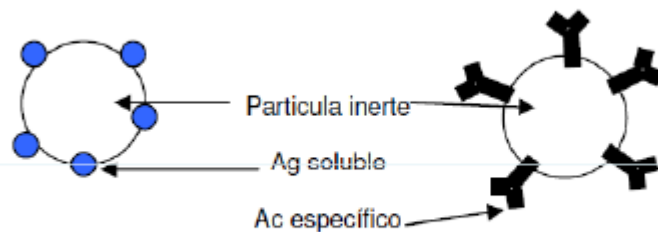
Paciente 1

Paciente 2

Paciente 3



## Aglutinación pasiva o indirecta



**Técnica por aglutinación indirecta**

**Técnica semi-cuantitativa**

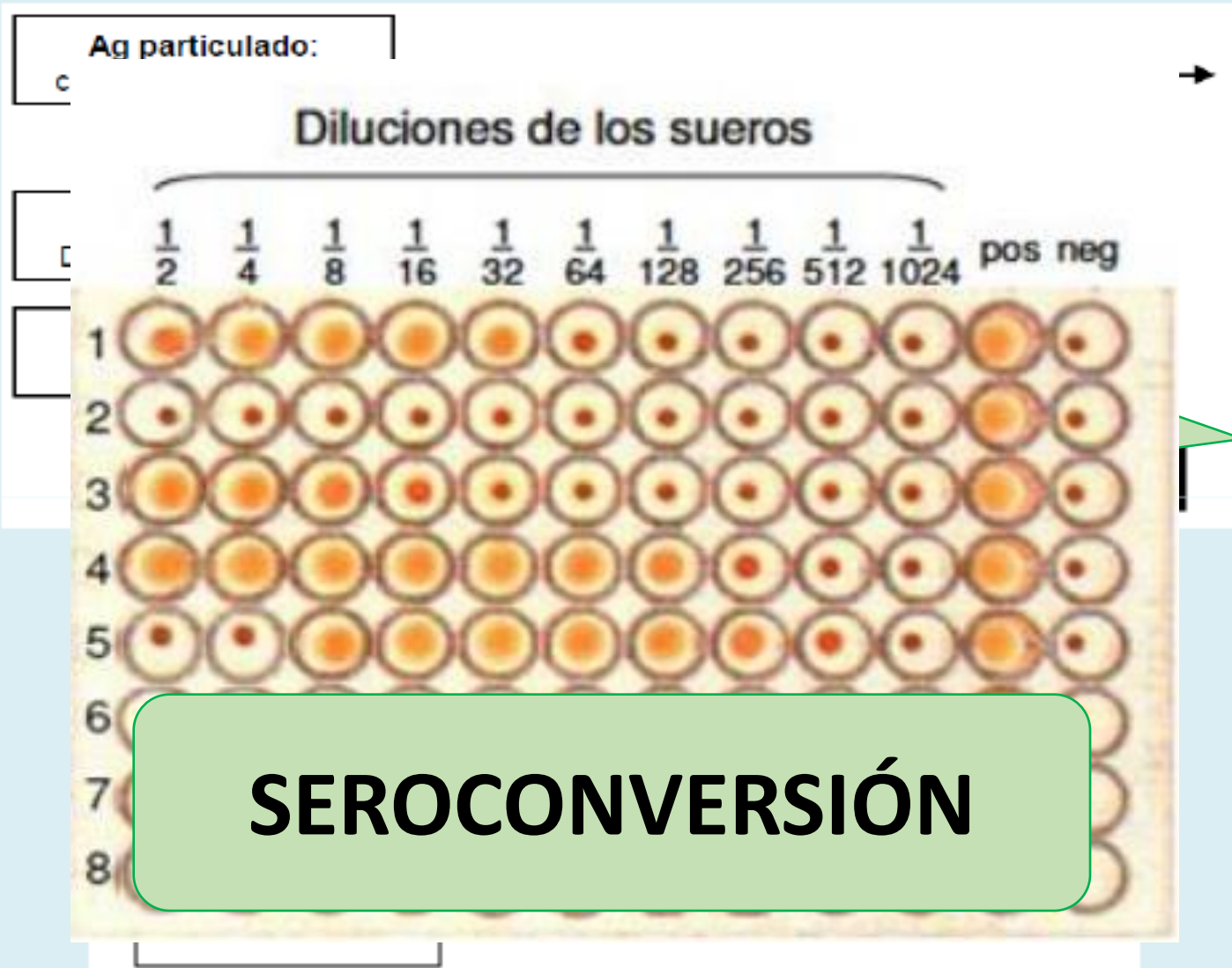
**Título / Prozona**

# Caso 5

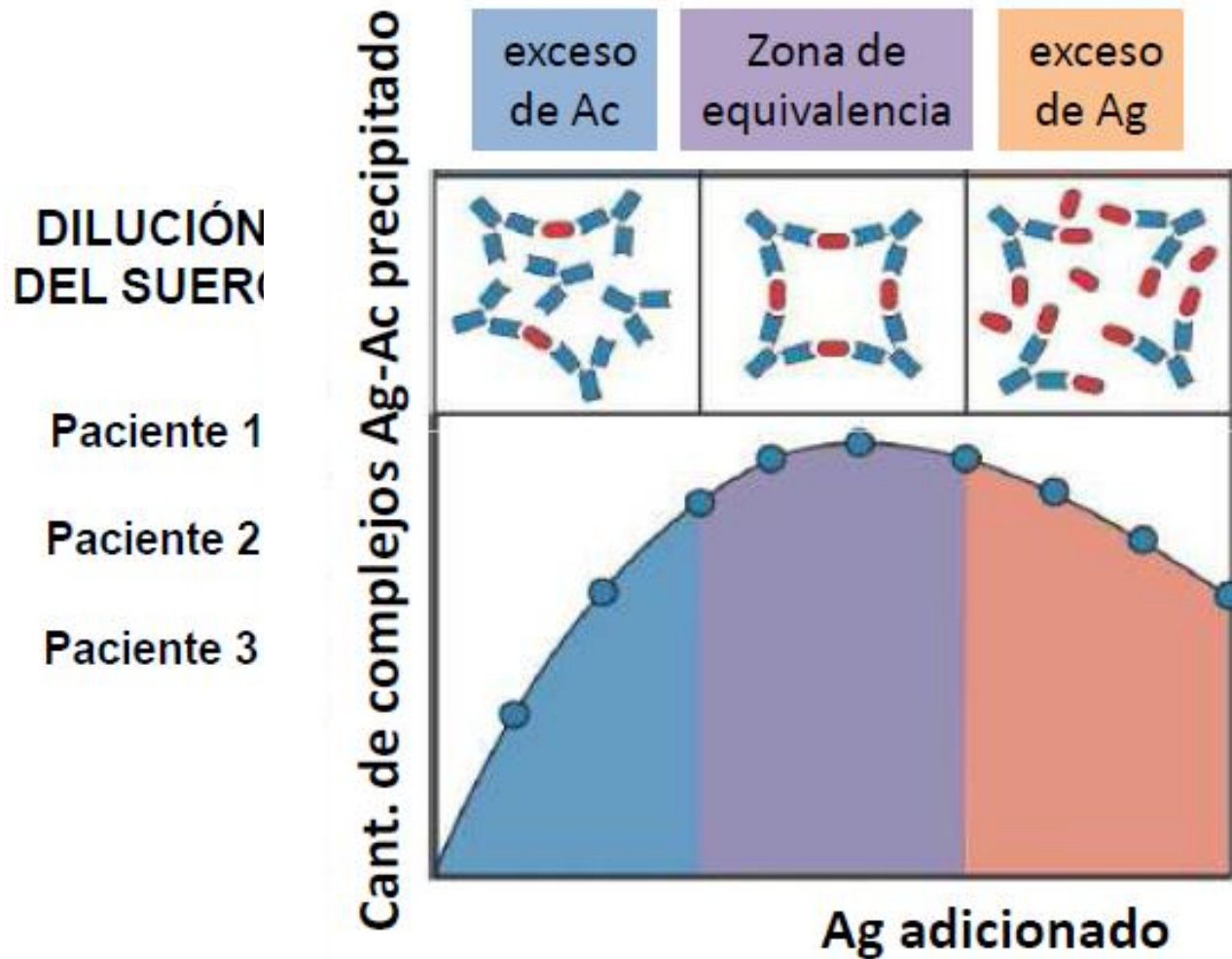
Joaquín, de 16 años, concurre a la consulta con su médico de cabecera por segunda vez. En la primera había expresado preocupación porque mantiene relaciones sexuales sin preservativo, y en el colegio le contaron que es posible contraer algunas enfermedades por esta vía. Usted solicitó en la pasada consulta los estudios pertinentes, y hoy trae los resultados, los cuales son todos negativos con excepción de un título de VDRL de 128

**¿Qué significa título? ¿Qué significa seroconversión?**

# Título



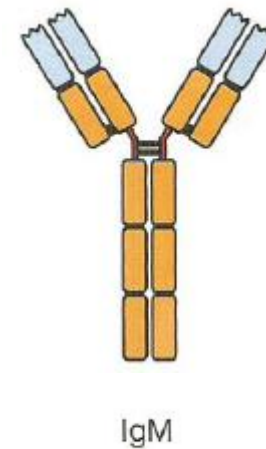
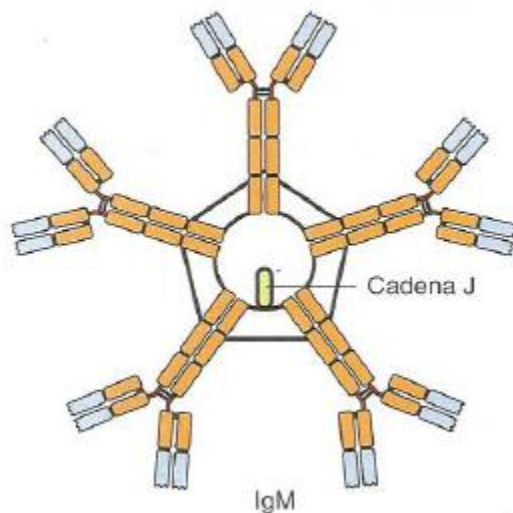
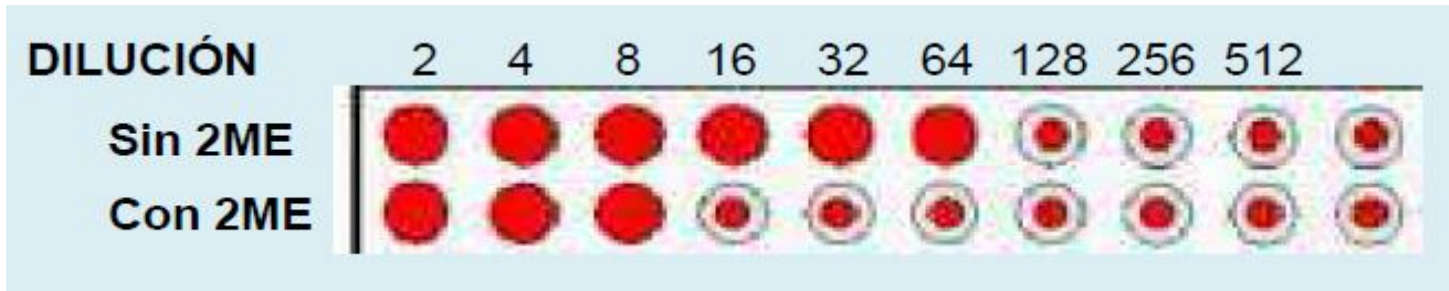
# Fenómeno de prozona





# Título IgG e IgM

## Tratamiento con 2-mercaptoetanol (2ME)



# Conceptos en práctica

Primera muestra	Segunda muestra	
IgM + IgG -		<b>Infección aguda</b>
IgM - IgG -	IgM - IgG +	<b>Infección aguda</b>
IgM - IgG +	IgM - IgG + (aumento 4 veces)	<b>Infección aguda</b>
IgM - IgG +	IgM - IgG + (sin aumento)	<b>Infección ya resuelta o crónica</b>

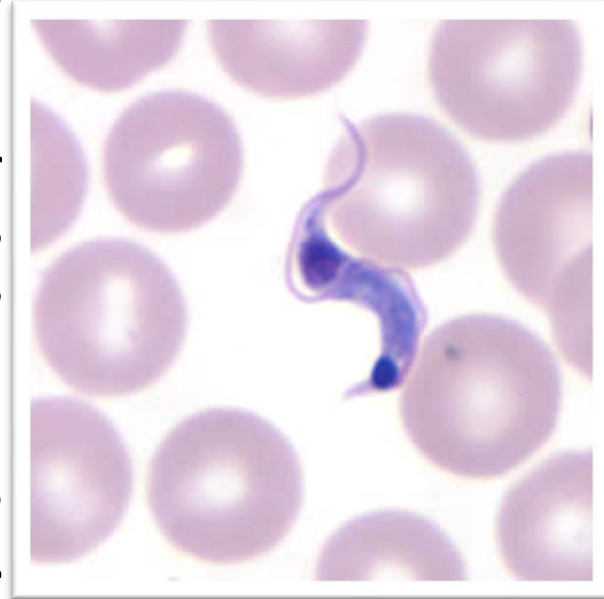
¿Título basal?



# Caso 6

Filomena, la paciente referida en el caso 4, vuelve al consultorio con un resultado 256 para HAI de Enfermedad de Chagas; pero usted sabe que según la “Guía para la atención del paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*”, a fin de confirmar infección crónica, usted debe tener dos resultados positivos por dos técnicas diferentes

**¿Qué otra técnica serológica emplearía?**  
**¿Cómo puede revelarse la interacción Ag-Ac primaria?**



# ELISA



Detectar Antígenos

Técnica de interacción primaria



Detectar Anticuerpos

Técnica cualitativa o cuantitativa

# Caso 7

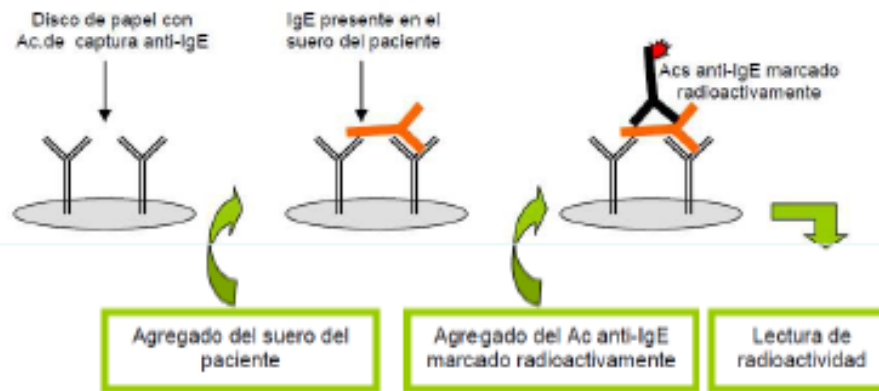
Sebastián, de 29 años, consulta por episodios repetidos de rinitis, sobre todo en primavera, y algunos episodios de dermatitis que se han agravado en los últimos meses. Usted sospecha que sus molestias podrían tener un origen alérgico.

**¿Qué le interesaría medir en el suero del paciente? ¿Usaría una técnica de interacción Ag-Ac primaria o secundaria? ¿Por qué?**



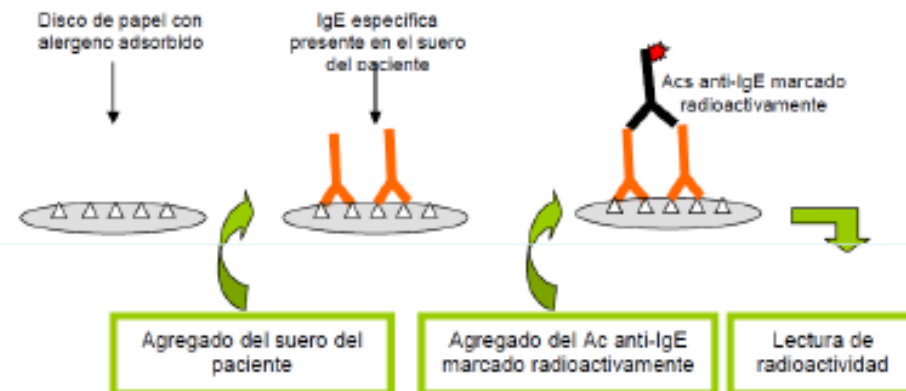
# Determinaciones de IgE

## PRIST



**IgE total**

## RAST

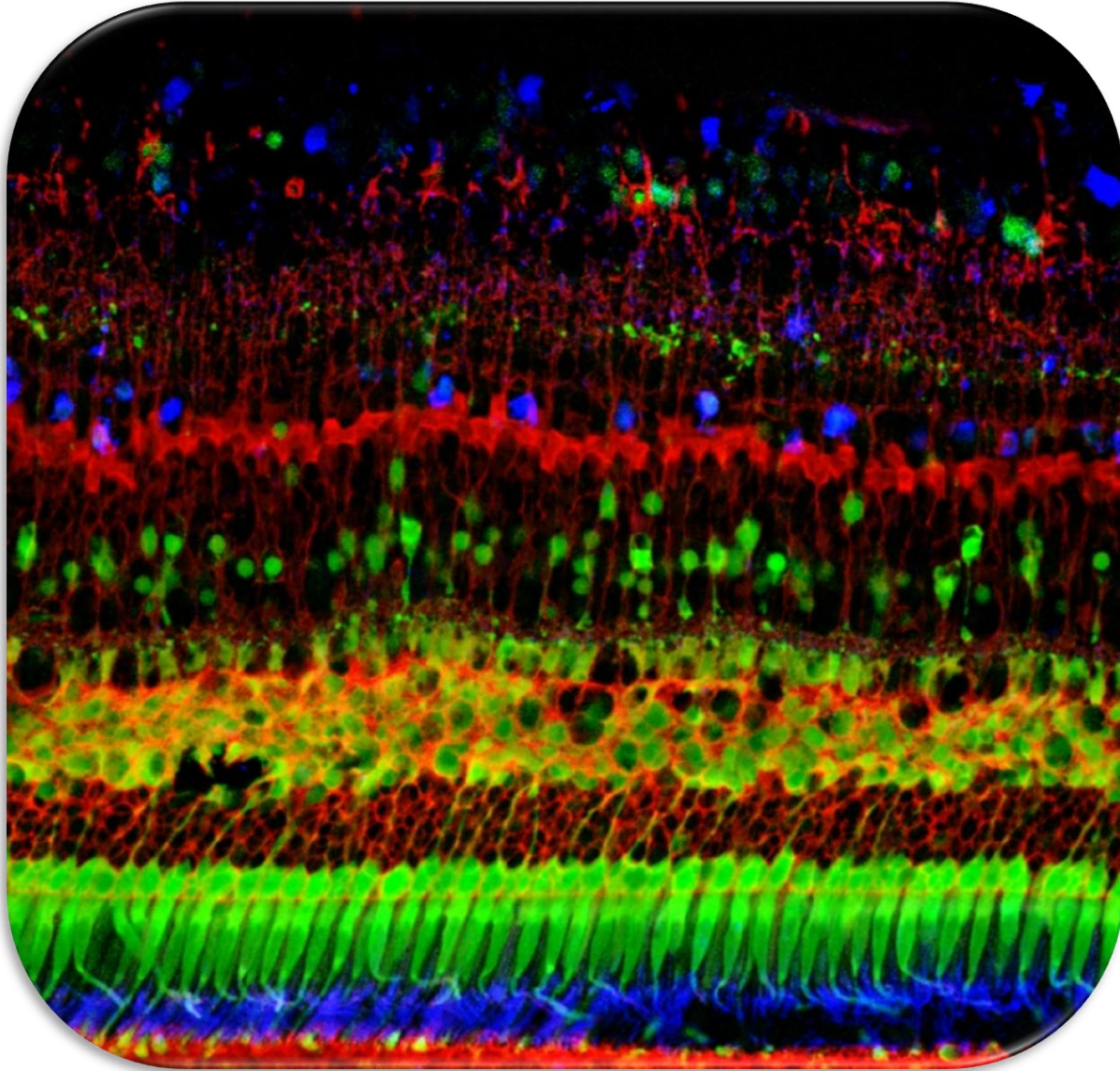


**IgE específica**

	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
concentración media en suero (mg/ml)	1.5	0.04	9	3	1	0.5	2.1	$3 \times 10^{-5}$



# Inmunomarcación



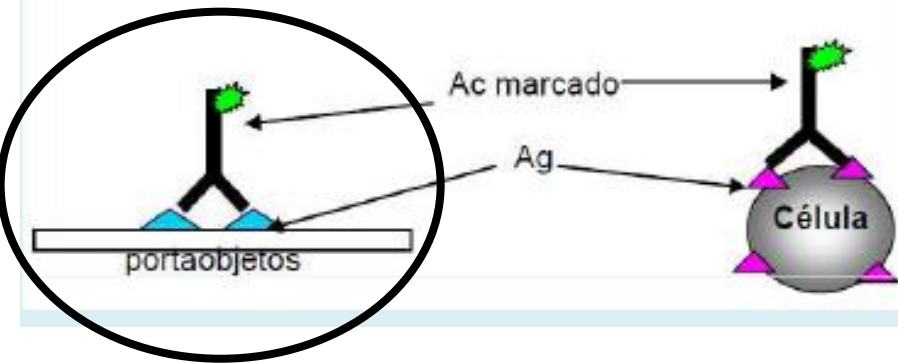
# Caso 8

Marcela, la paciente referida en el caso 2, fue finalmente internada con diagnóstico presuntivo de nefritis lúpica. Usted querría saber si Marcela presenta depósitos de complejos inmunes a nivel glomerular.

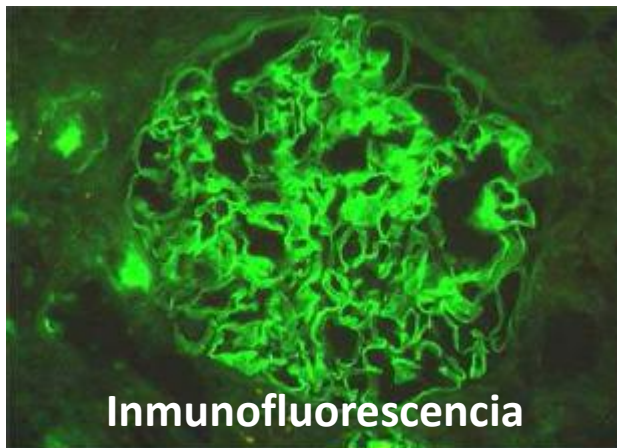
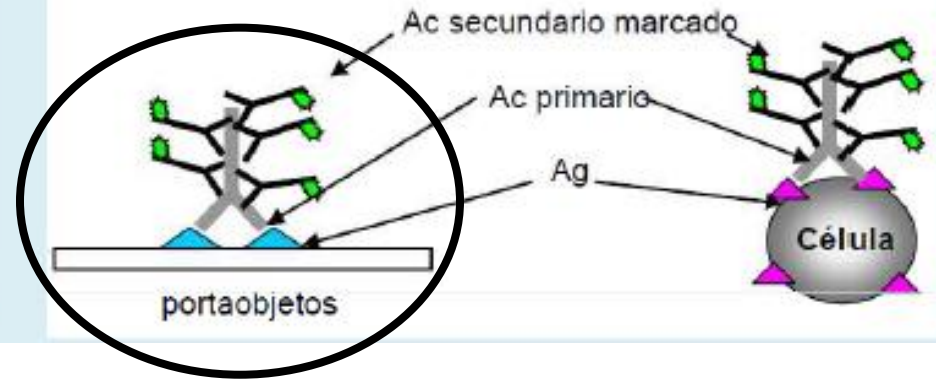
**¿Qué tipo de muestra necesita? ¿Cómo evidenciaría la presencia de complejos inmunes?**

# Inmunomarcación en portaobjetos

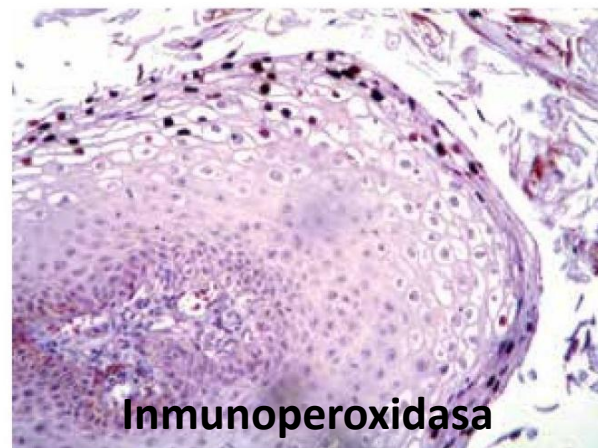
INMUNOMARCACION DIRECTA



INMUNOMARCACION INDIRECTA



Inmunofluorescencia



Inmunoperoxidasa

Técnica de interacción primaria

Técnica cualitativa

# Caso 9

Santino, de 5 años, presenta fiebre y adenopatías de varios días de evolución. En el hemograma presenta los siguientes resultados: GB 25.600; Neu 18%; Lin 77%; Mon 3%; Eo 2%; Bas 0%. Luego de descartar Mononucleosis infecciosas y otros síndromes mononucleosiformes, usted sospecha una leucemia de la estirpe linfoide.

**¿Qué otra información sobre los linfocitos le interesaría saber?**



# **APLICACIONES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO**

**DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE**

**CITOQUINAS**

**APOPTOSIS**

**CICLO CELULAR**

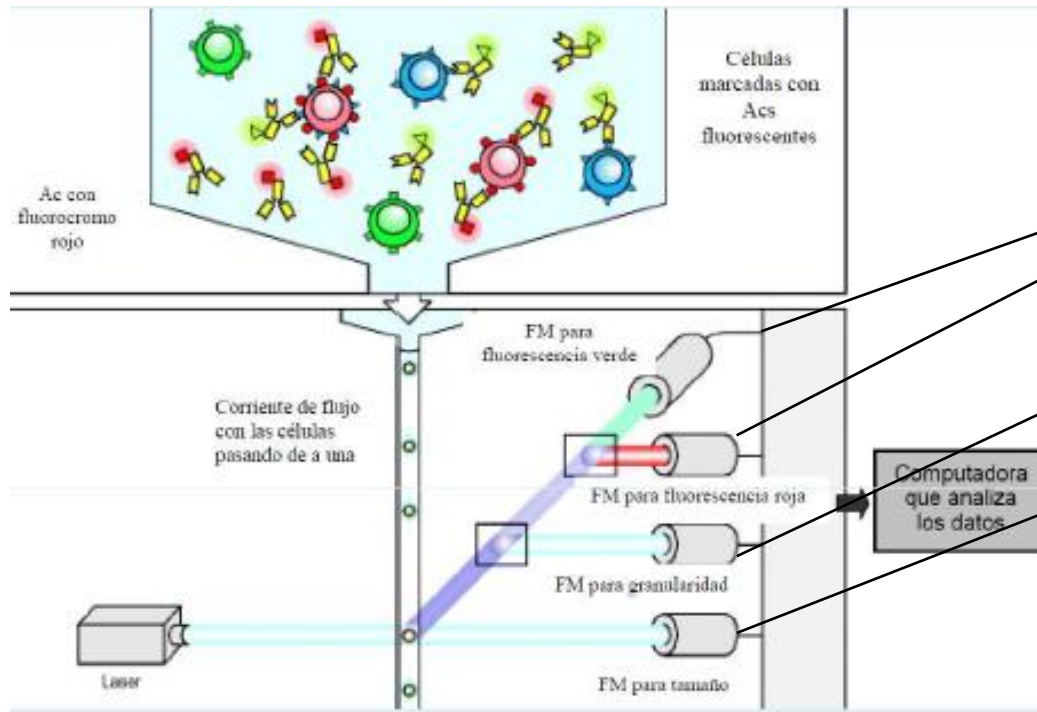
**PROLIFERACIÓN CELULAR**

**FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

**PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN**



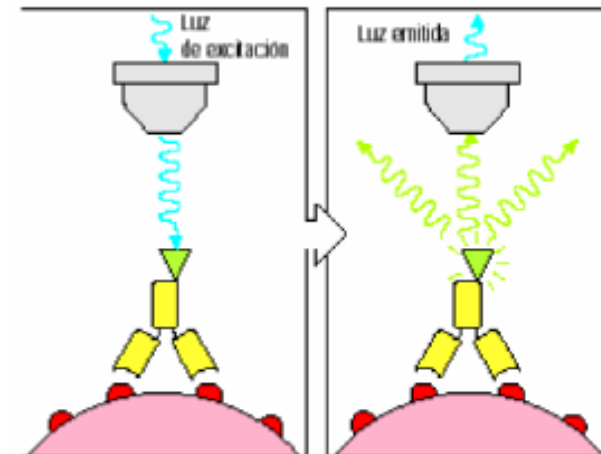
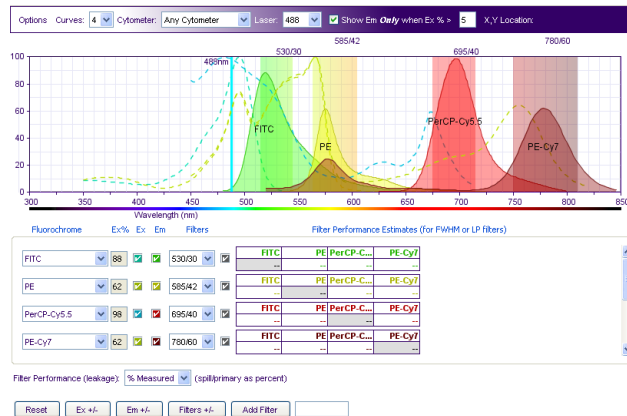
# Citometría de flujo



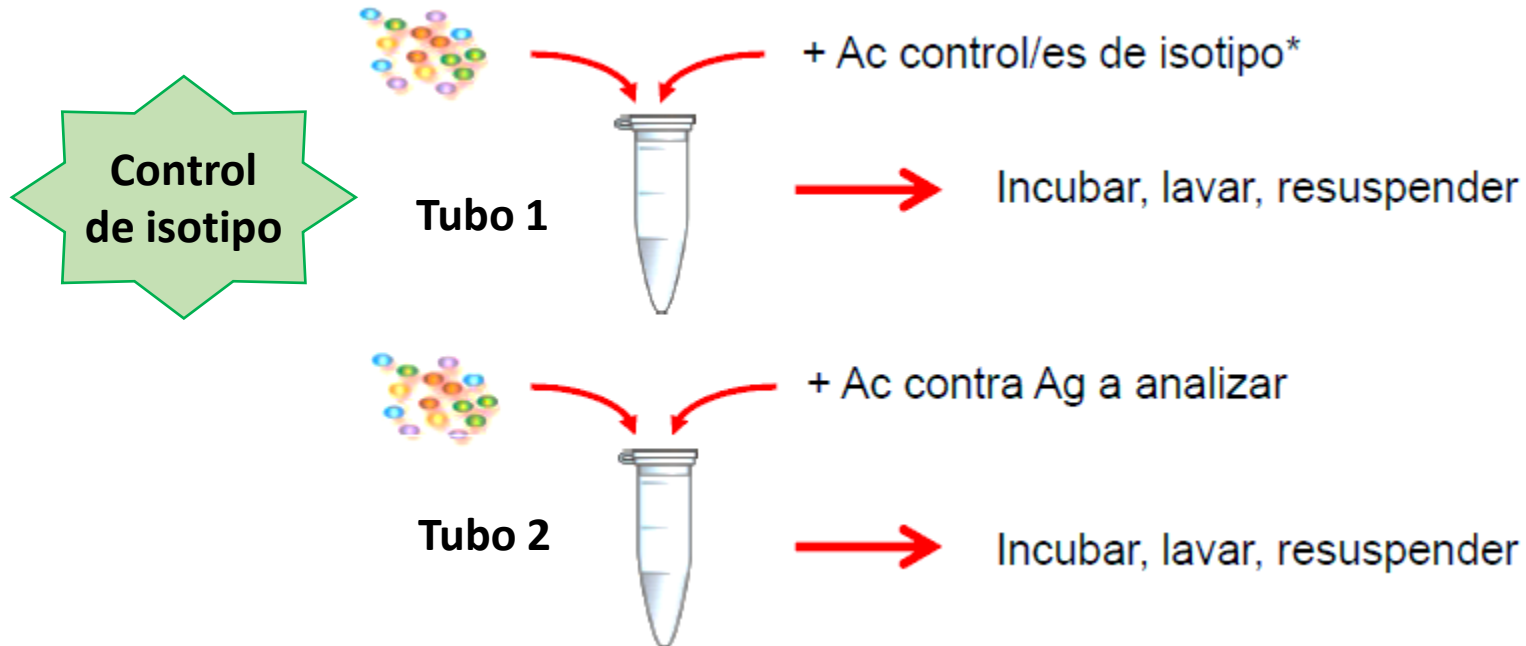
Marcadores  
específicos

Granularidad

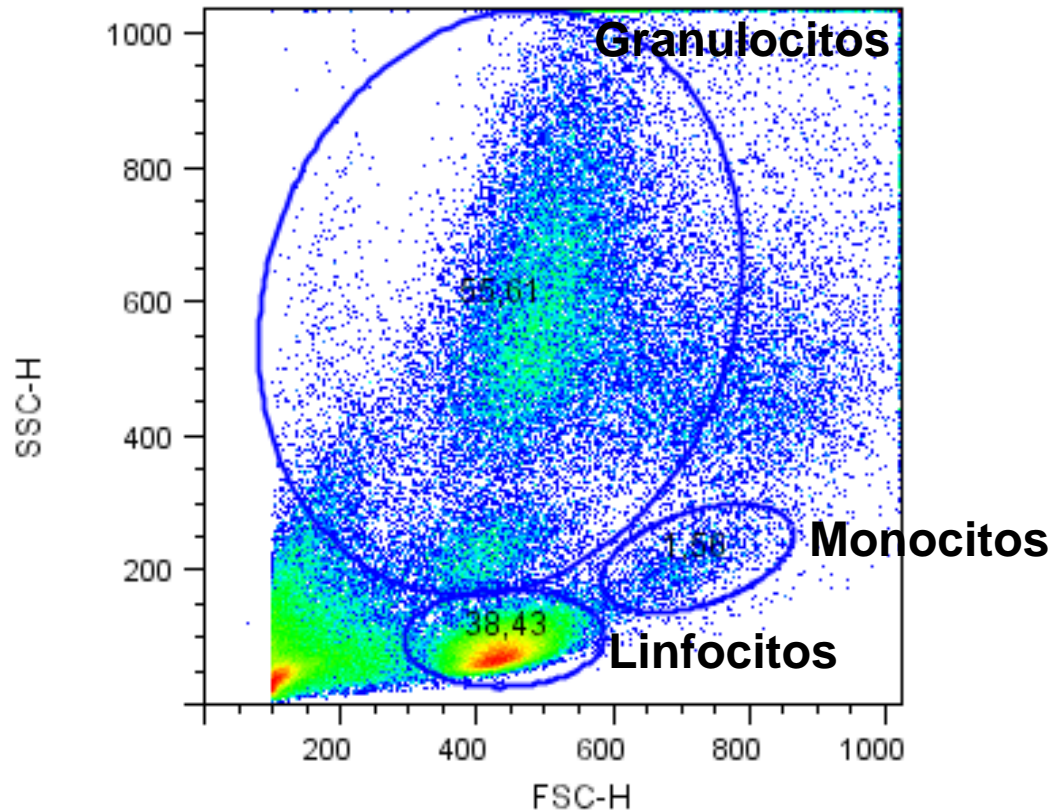
Tamaño



# Citometría de flujo - Protocolo



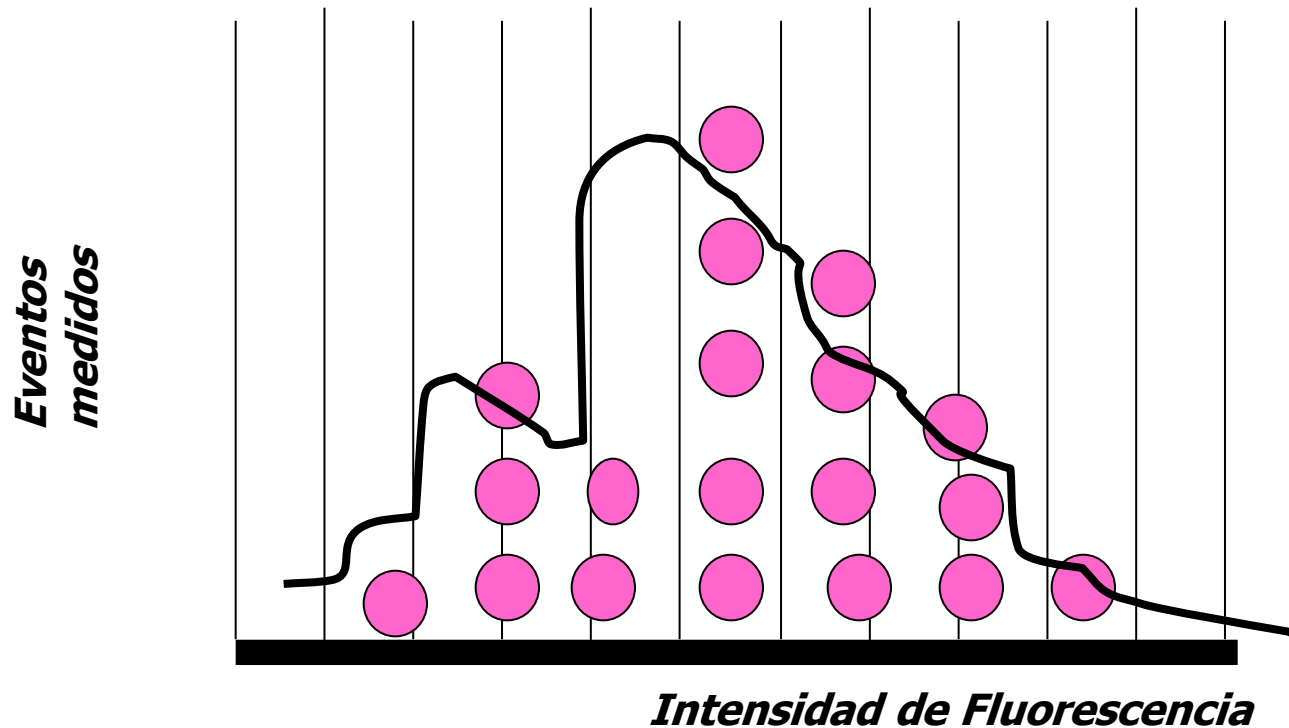
# Análisis por tamaño y granularidad en leucocitos de sangre periférica



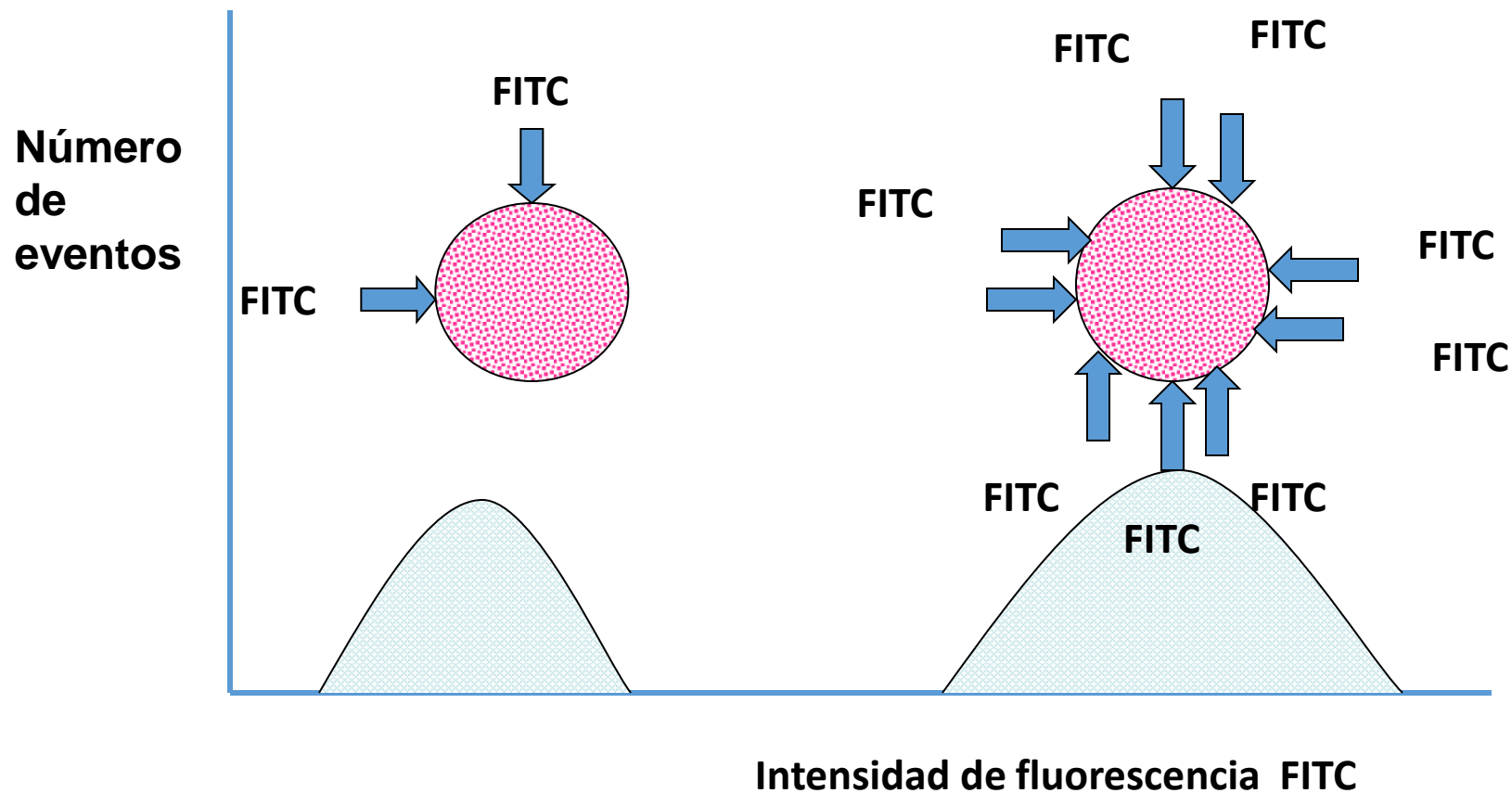
# ANALISIS con marcaciones

Los datos colectados se pueden observar de 2 maneras:

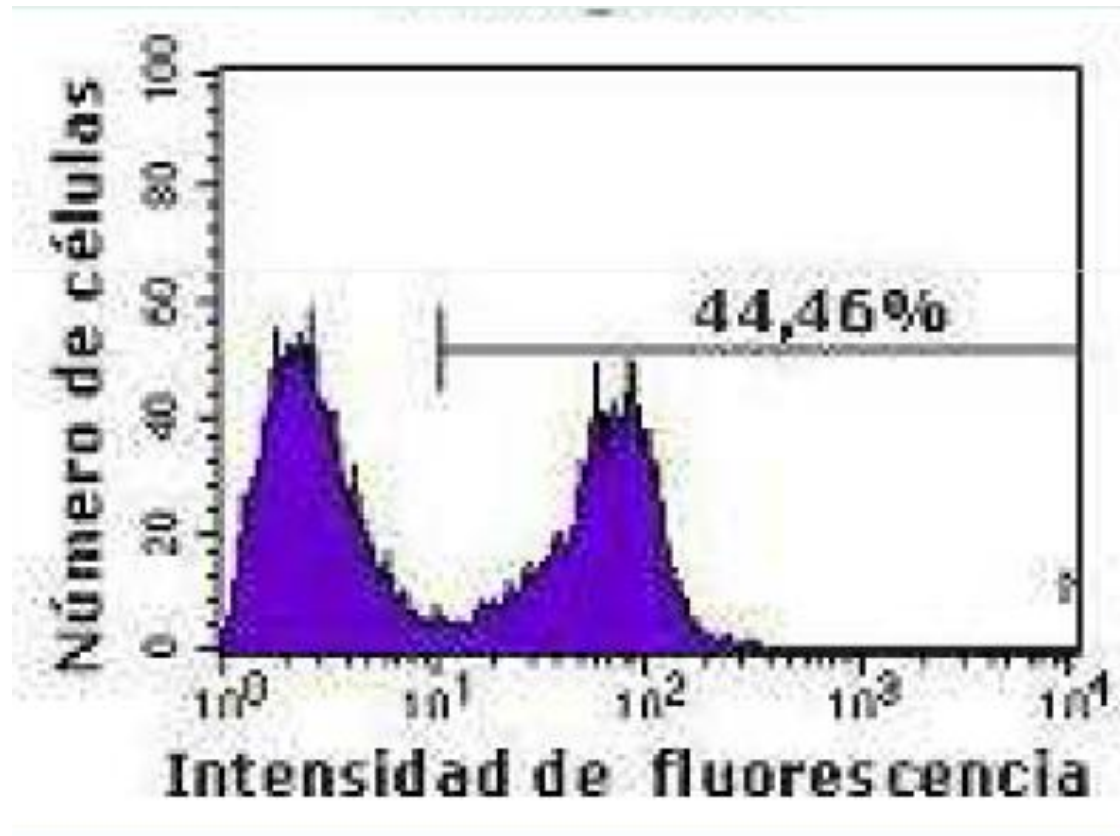
## 1) Histogramas



# Intensidad de fluorescencia y sitios de unión



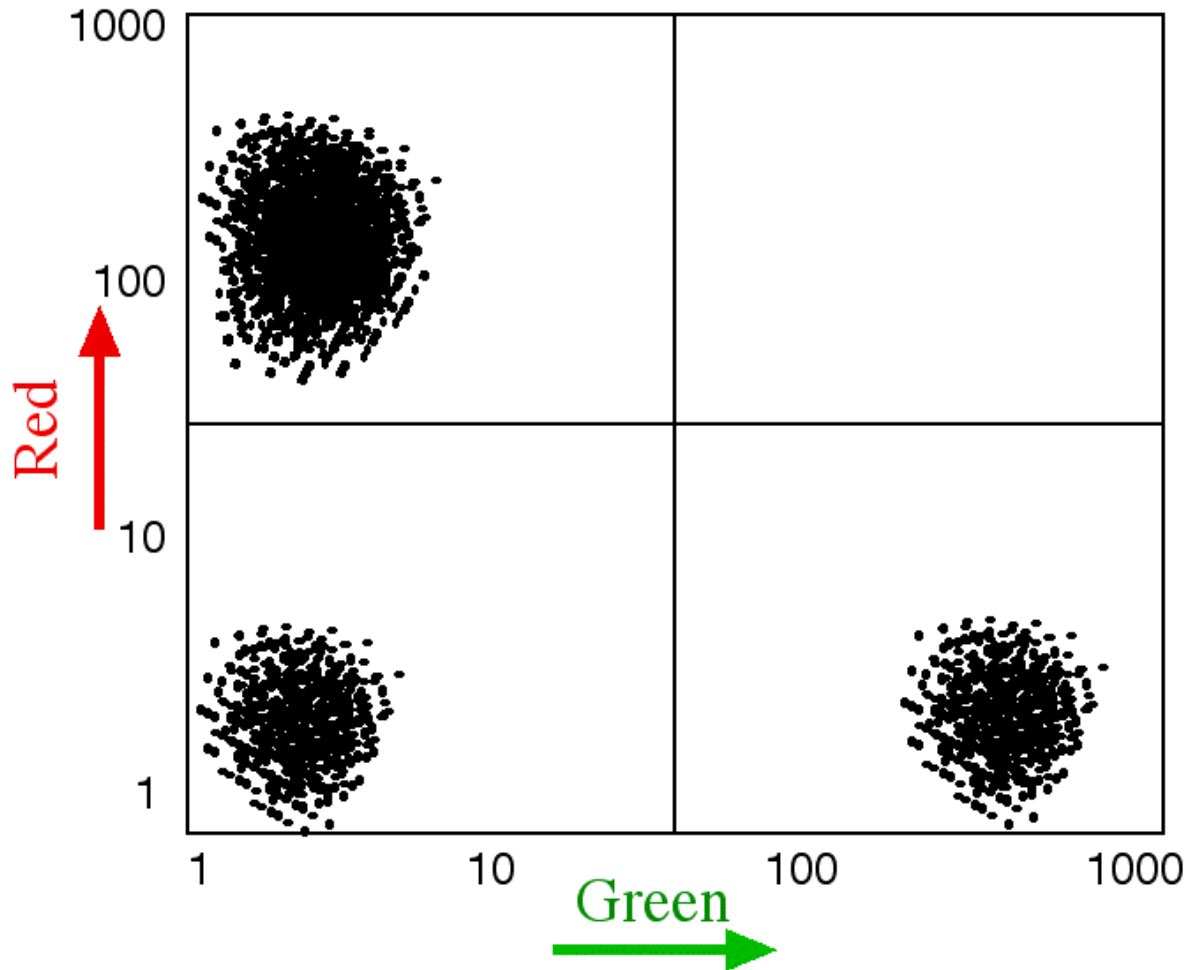
## Histogramas de fluorescencia: analizo un solo marcador



Los datos colectados se pueden observar de 2 maneras:

1) Histogramas

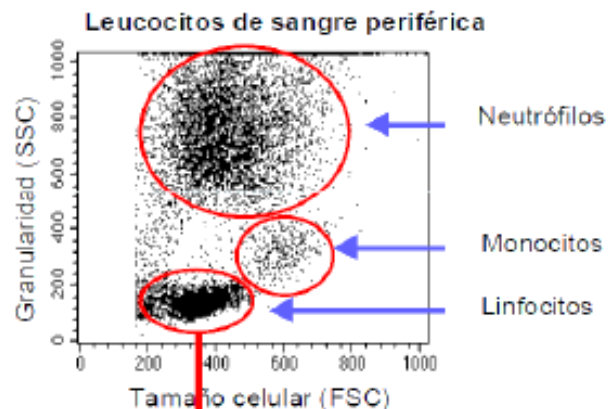
2) Gráficos Dot-plots



**Analizo dos marcadores**



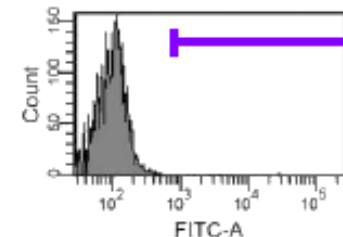
# Citometría de flujo - Análisis



Selección de una población mediante la determinación de una región o "gate" para posterior análisis (por ejemplo, células linfoides).

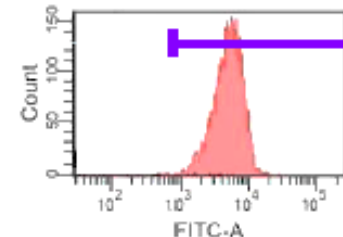
Control de isotipo

Elección de marcador

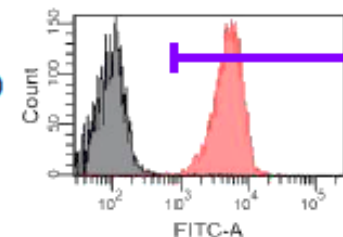


Seteo de posición basal del histograma

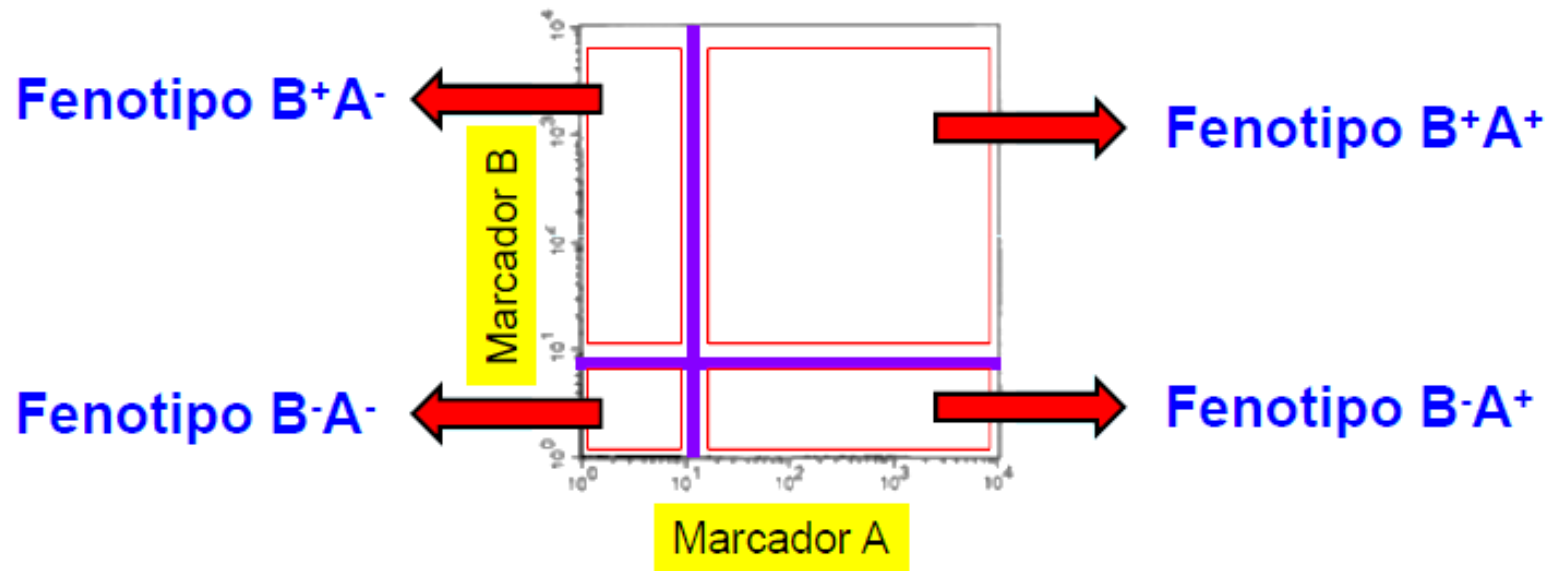
Ac específico



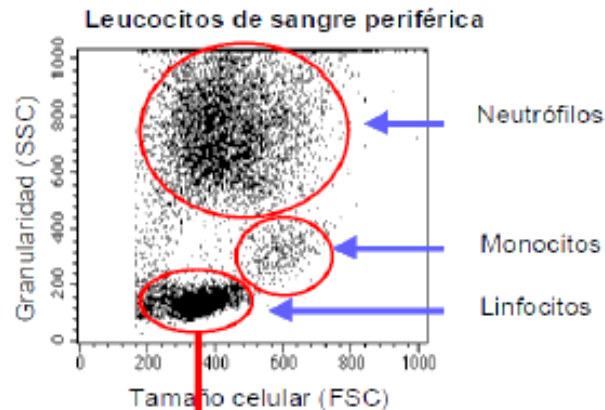
Solapamiento



Criterio general para interpretar dobles marcaciones y *dot plots* en citometría de flujo



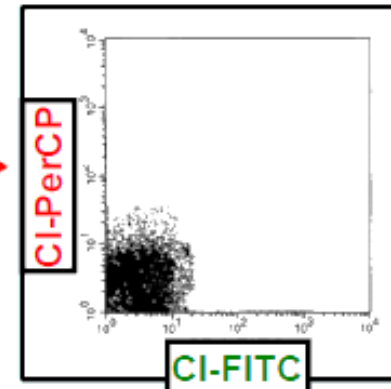
# Citometría de flujo - Análisis



Selección de una población mediante la determinación de una región o "gate" para posterior análisis (*por ejemplo, células linfoides*).

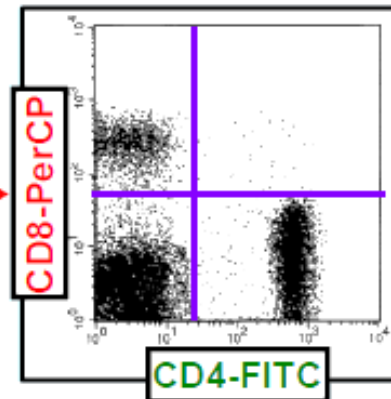
Determinación del porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> simultáneamente en la misma muestra

Controles de isotipo

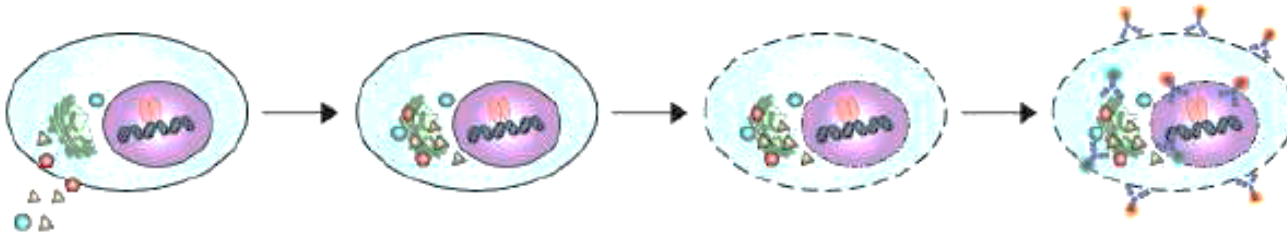


Seteo de cuadrantes

anti-CD4 y anti-CD8



# Citometría de flujo – Ag intracelulares

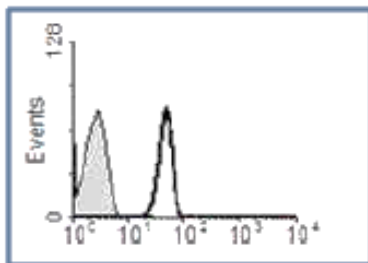


Tratar células con  
inhibidor/es del  
transporte intracelular

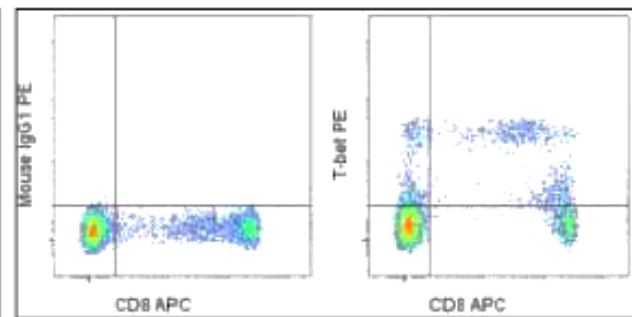
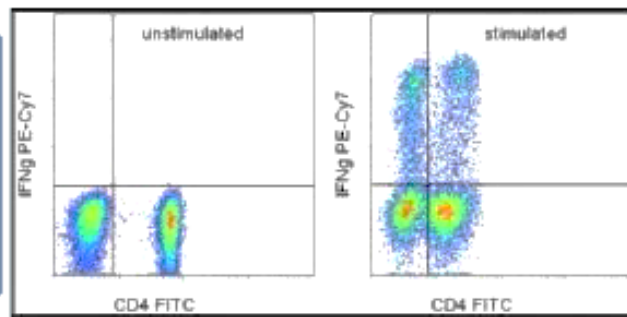
Fijar y permeabilizar  
las células

Realizar la  
inmunomarcación  
(incluyendo el control  
de isotipo)

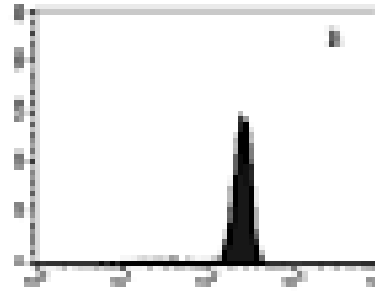
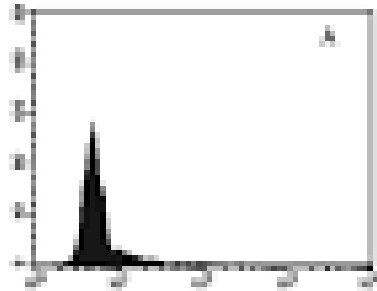
Analizar



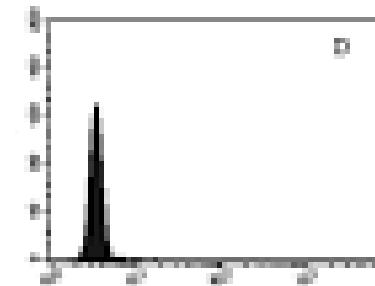
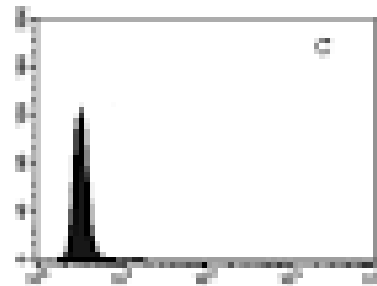
TLR3 en Células NK



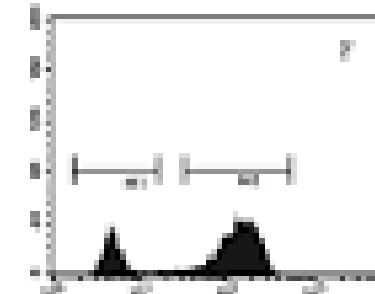
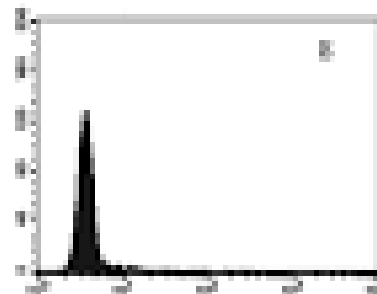
# Diagnóstico de Enfermedad Granulomatosa Crónica y Mosaicismo (DHR)



Hermano sano del paciente

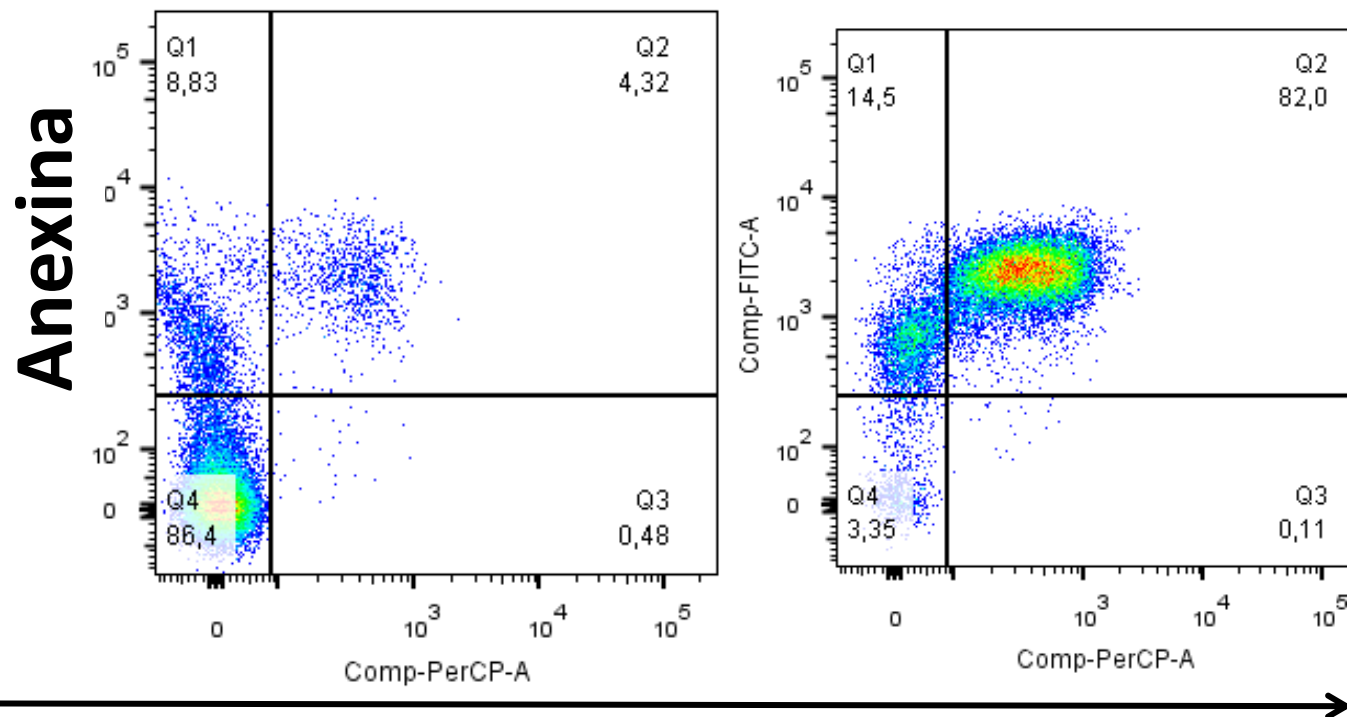


Paciente



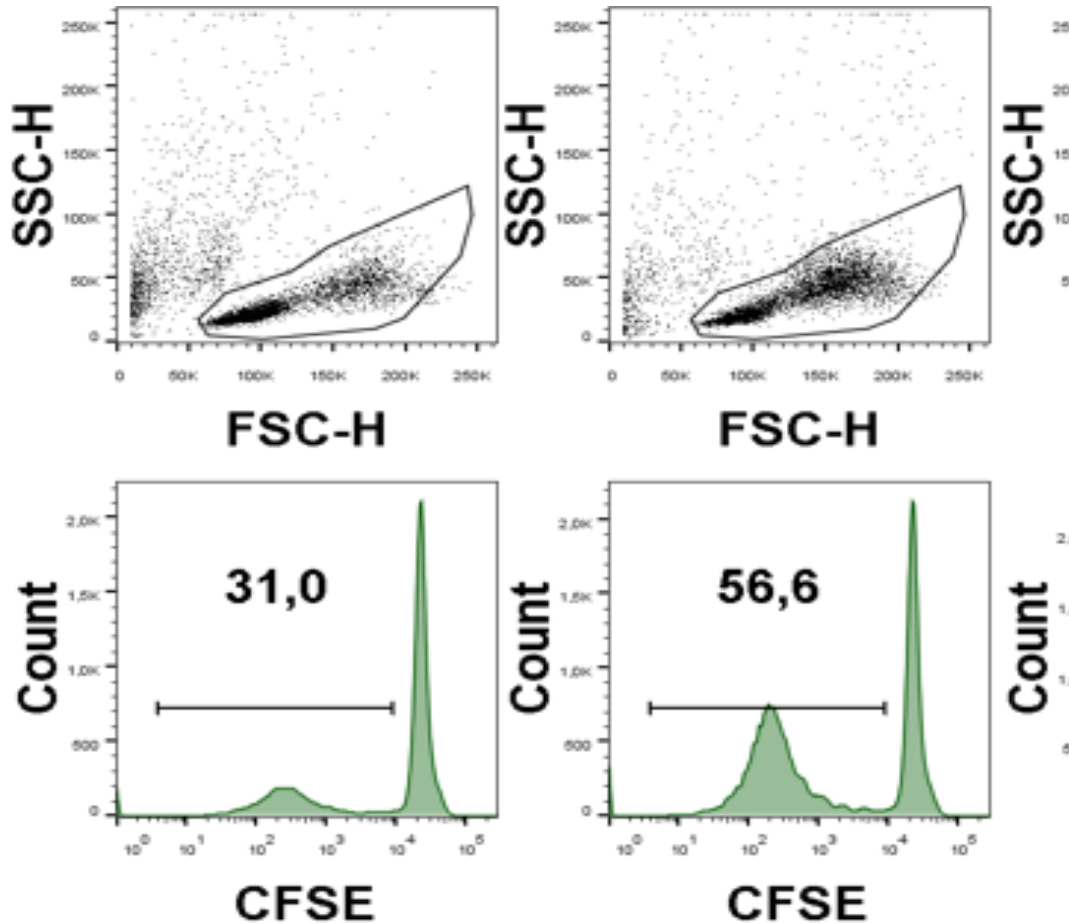
Madre

# Evaluación de apoptosis y necrosis (Anexina/Propidio)



IP

# Evaluación de proliferación celular en células T (CFSE)





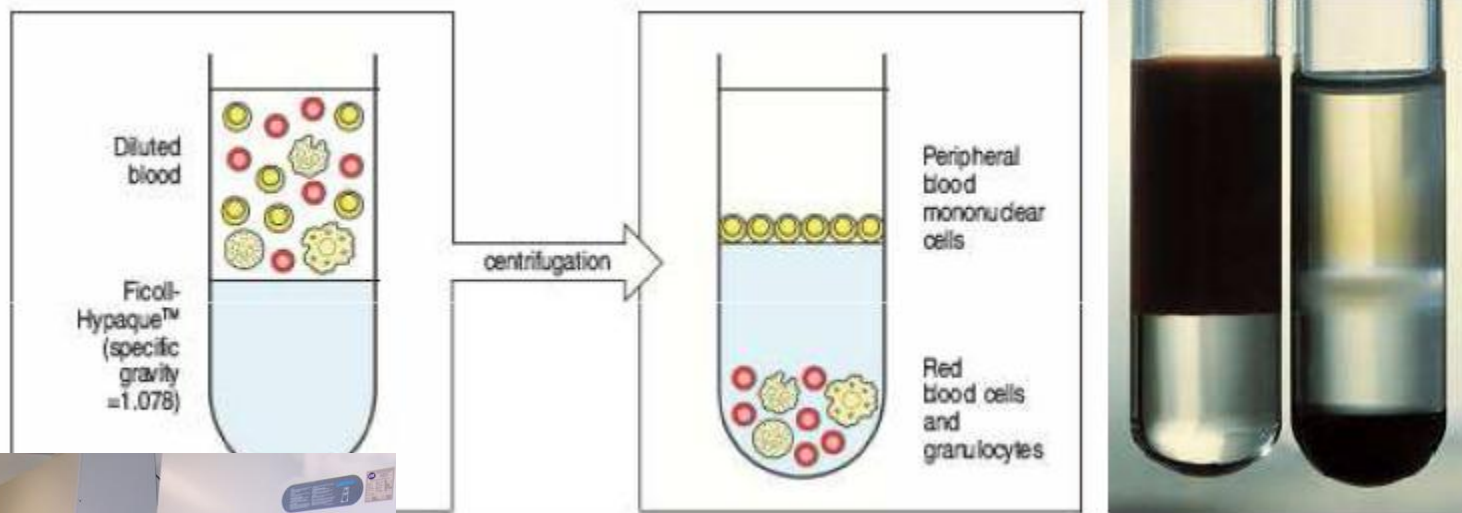
# Pruebas funcionales



# Estudio de capacidad proliferativa



Sembrar células (CMSPs)



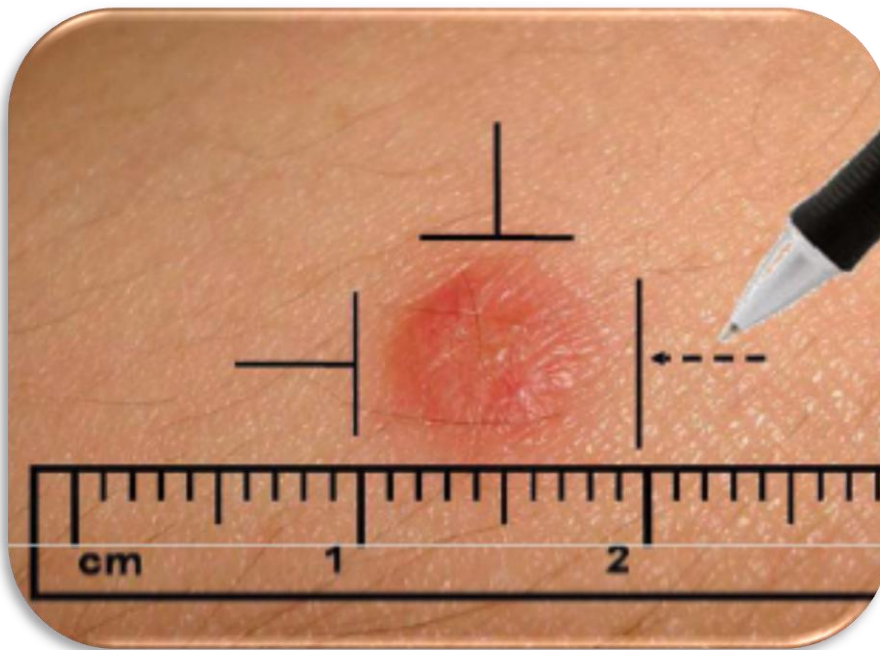
Cosechar y cuantificar cpm en contador beta



**Técnica in vitro**

**Estudio funcional**

# Intradermoreacción – Prueba de Mantoux



- Respuesta a vacuna BCG en niño
- Evaluación de contacto reciente con TBC en adultos
- Estudio de la respuesta inmune celular *in vivo* (pacientes sospechados de padecer IDP)
- Estudio de pacientes con hipersensibilidad

**Técnica in vivo**

**Estudio funcional**

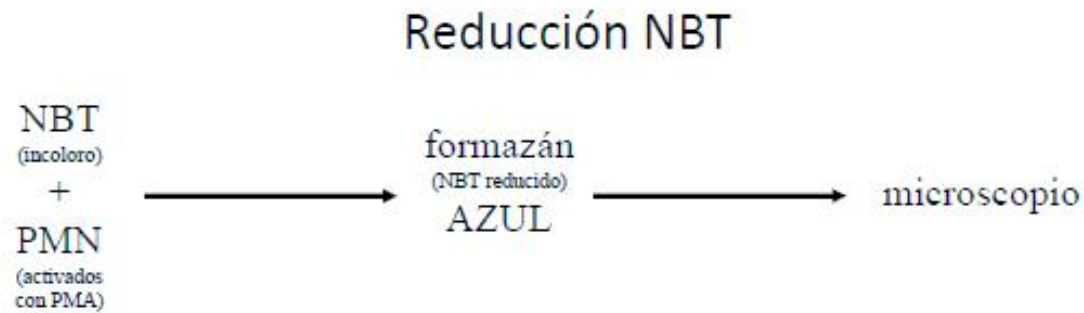
# Caso 10

Ramiro, de 7 años, es internado en la sala de pediatría con diagnóstico de neumonía. Ha presentado desde los 2 años, múltiples episodios de dermatitis, y en ocasiones, abscesos en múltiples localizaciones, otitis, diarreas y adenomegalias. Después de descartar causas comunes de infecciones recurrentes, usted cree que tal vez Ramiro tenga algún defecto en la función de sus fagocitos.

**¿Qué mecanismos de acción cree que puedan estar comprometidos? ¿Cómo los estudiaría?**

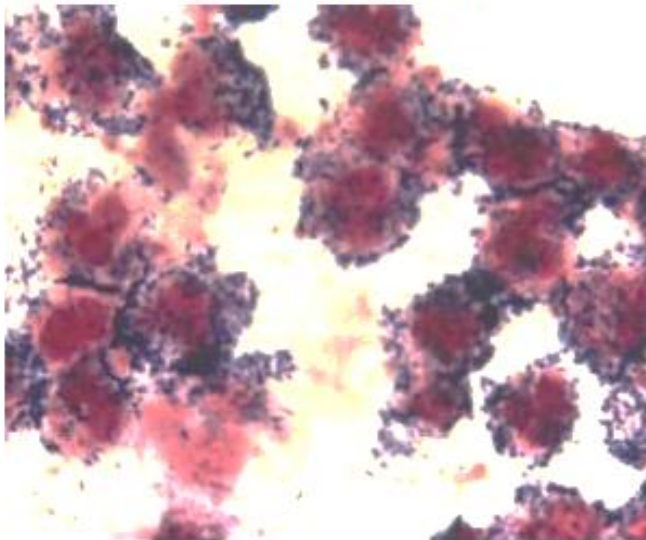


# Evaluación del estallido respiratorio



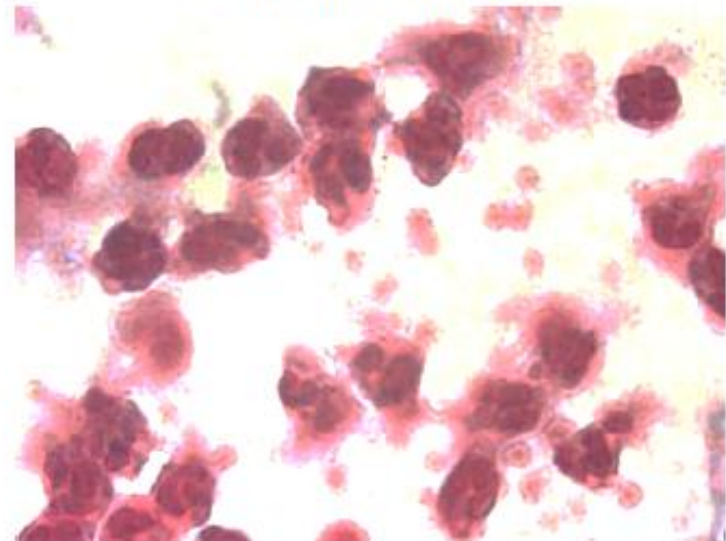
95% azules: SANO  
20-80% azules: Enf. Granul. Crónica

Individuo normal



Técnica cualitativa

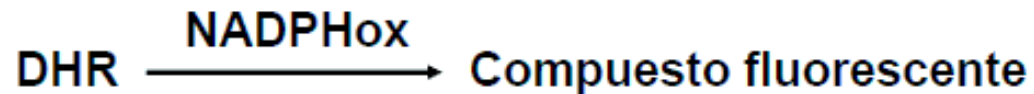
Paciente con EGC



Estudio funcional

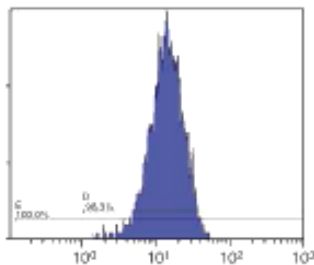
# Evaluación del estallido respiratorio

Reducción de la 1,2,3 Dihidrorodamina (DHR)

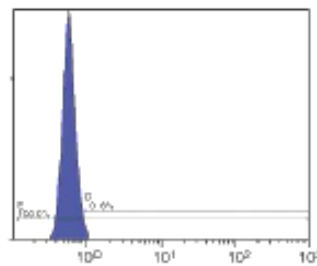


**Análisis por citometría de flujo**

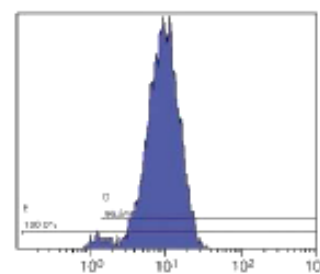
Normal



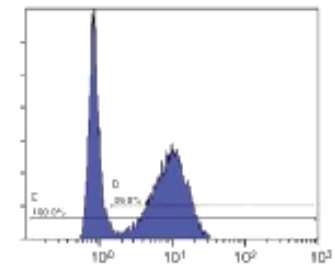
Paciente con EGC



Padre



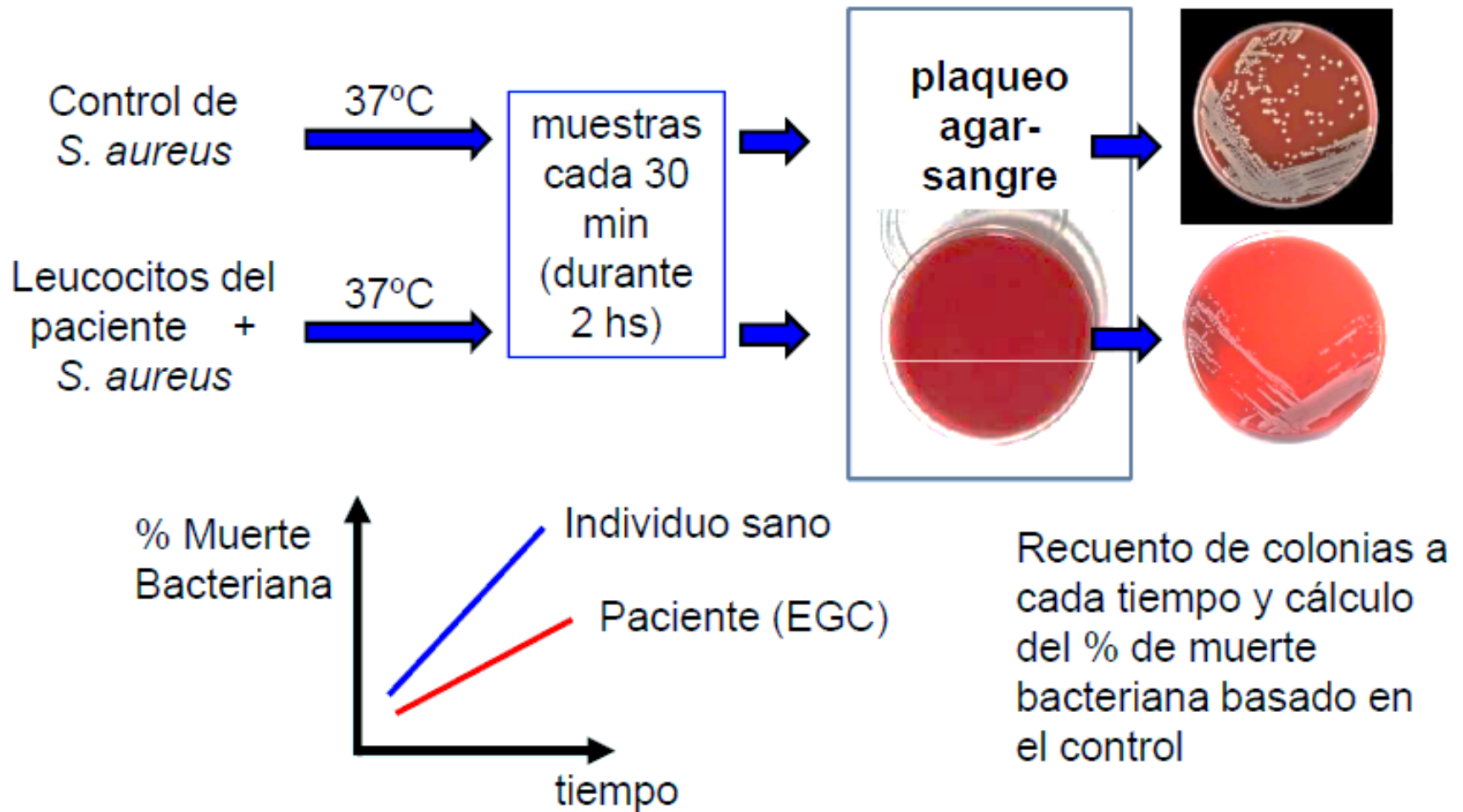
Madre



**Técnica cuantitativa**

**Estudio funcional**

# Evaluación de actividad bactericida



Técnica cuantitativa

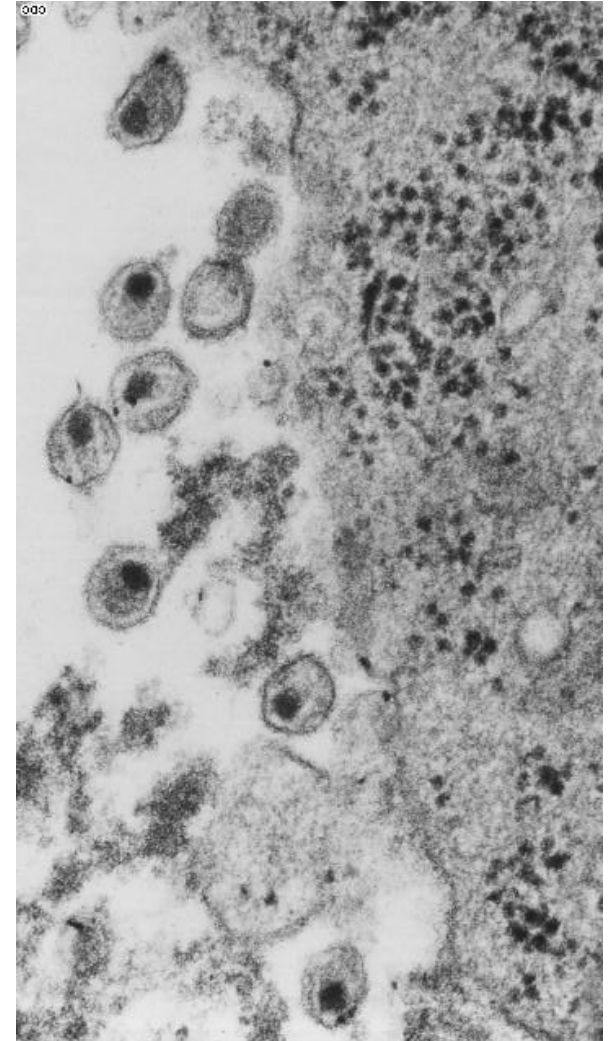
Estudio funcional



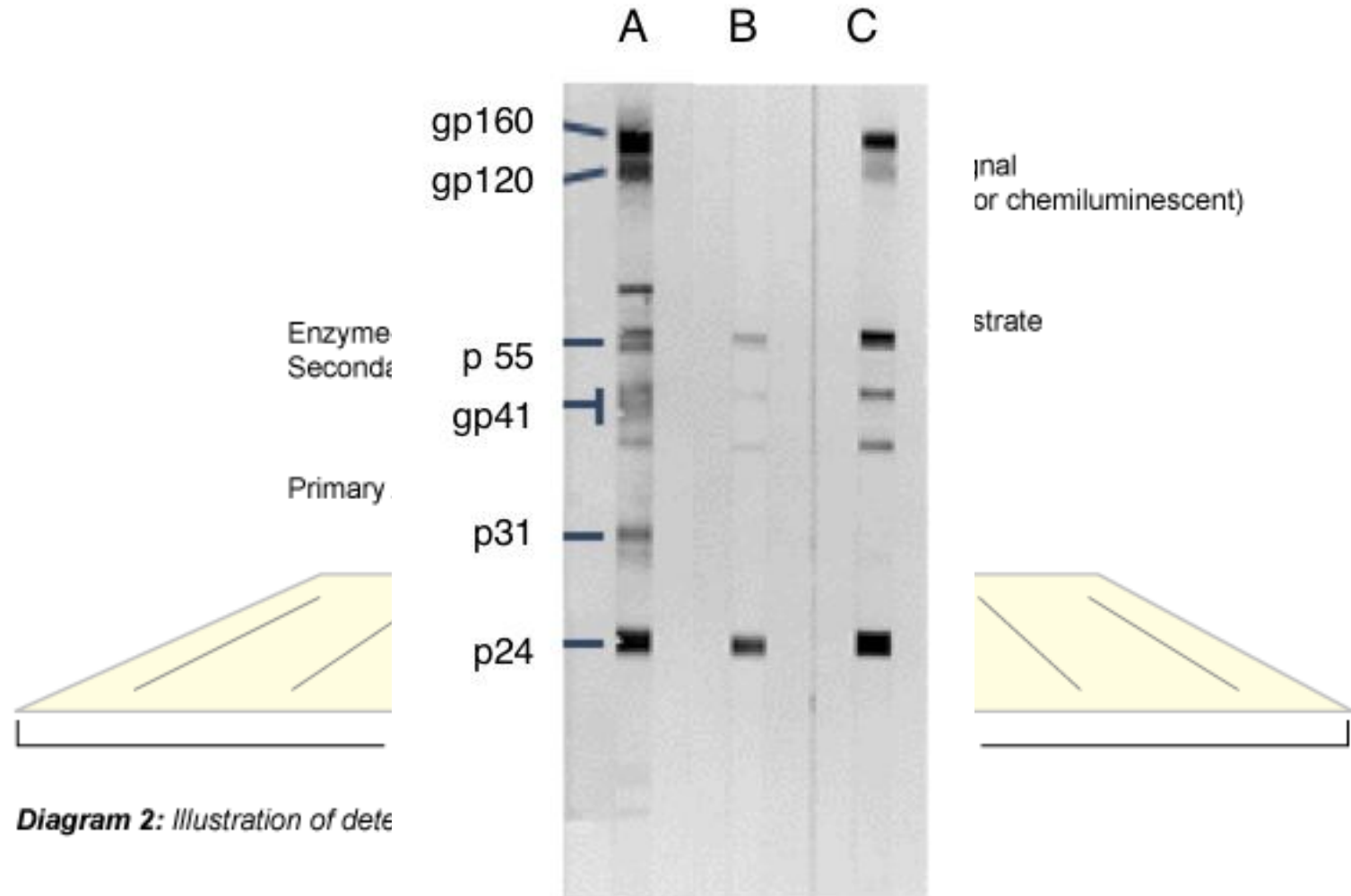
# Caso 11

Melina, de 33 años, lo consulta preocupada porque en un control de salud que se realizó obtuvo un resultado positivo para HIV por una técnica de ELISA. El diagnóstico debe ser confirmado por otra técnica.

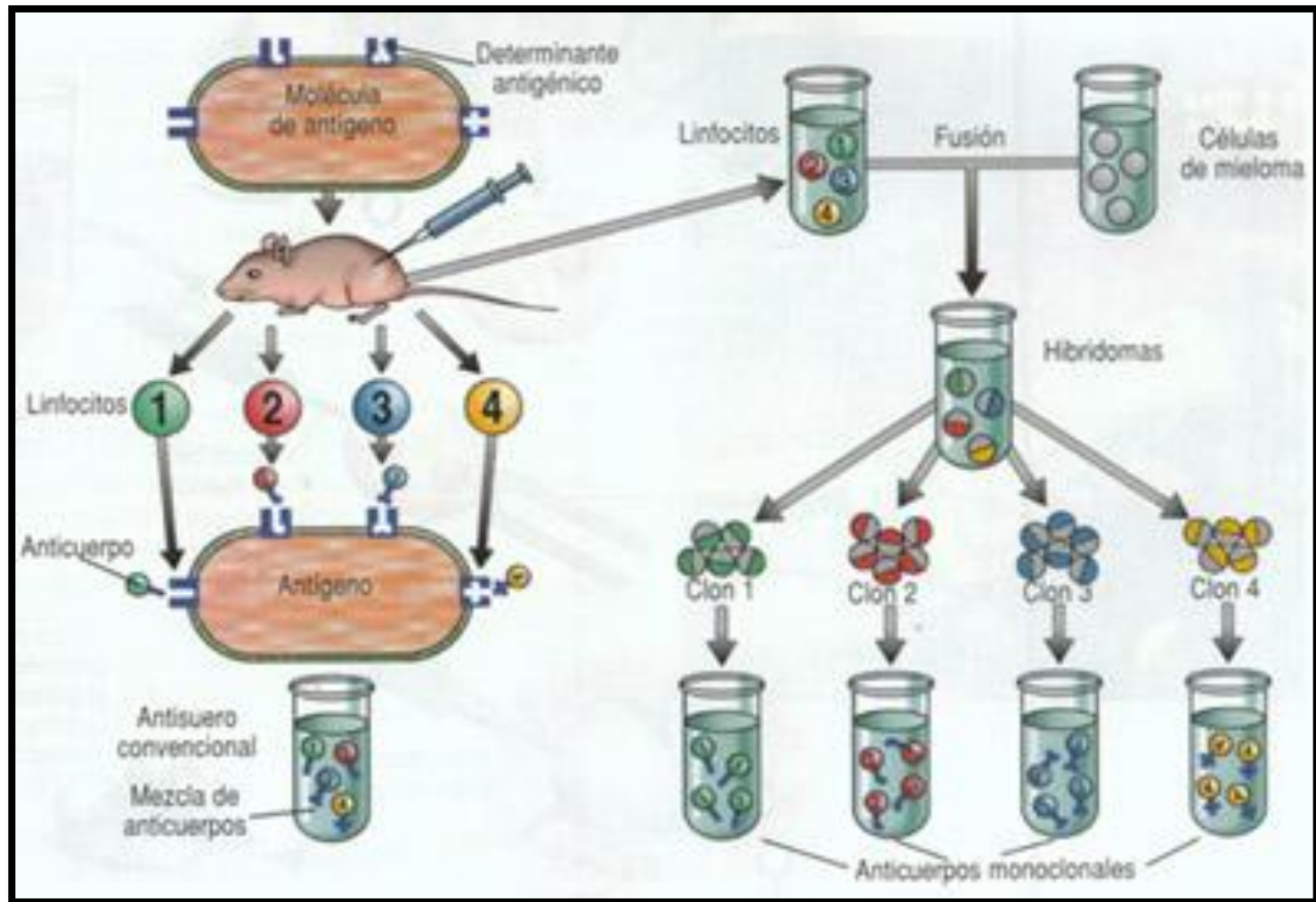
**¿Qué otra técnica le permitiría detectar anticuerpos contra distintas proteínas del HIV?**



# Western Blot

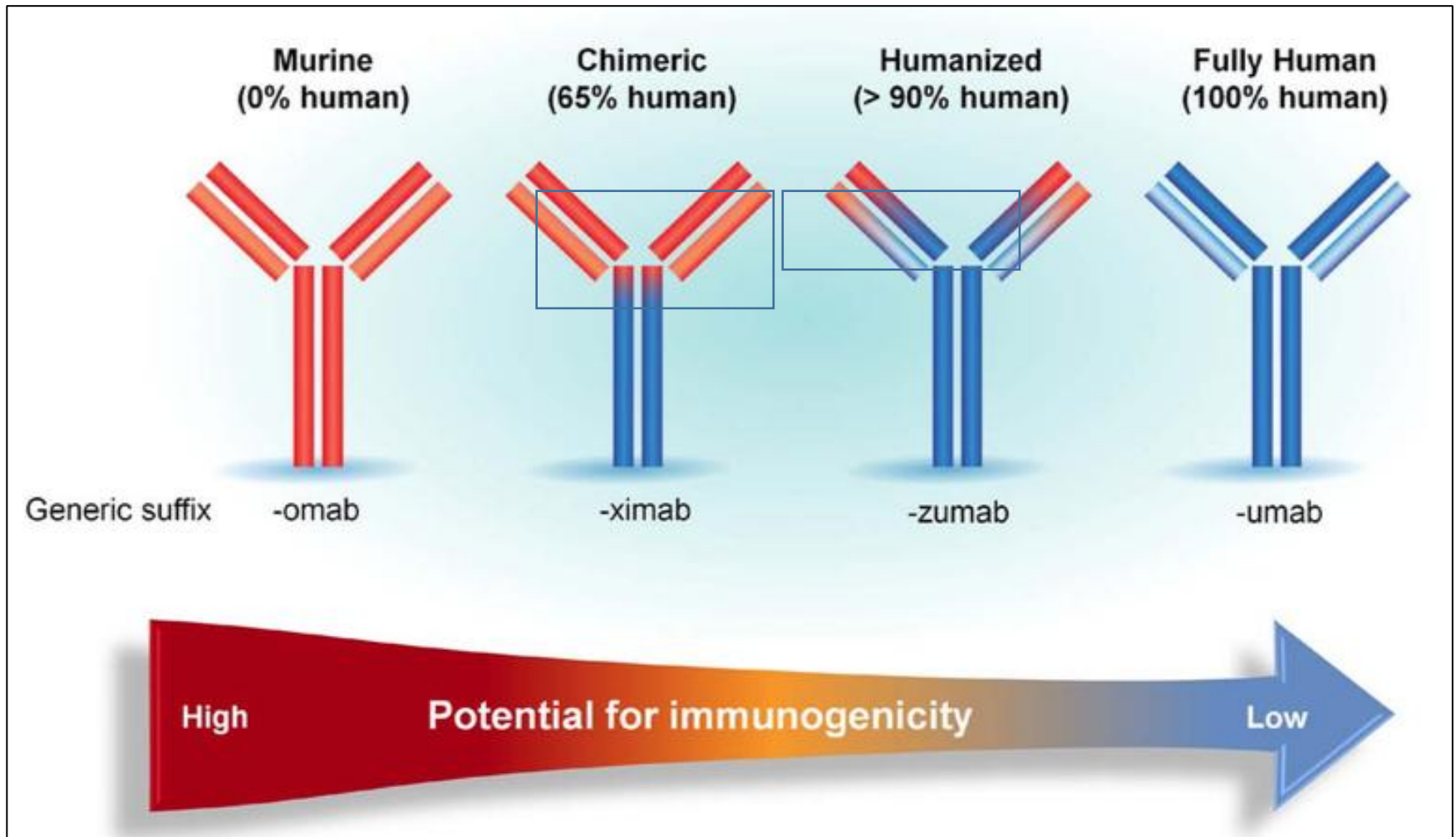


# Anticuerpos monoclonales



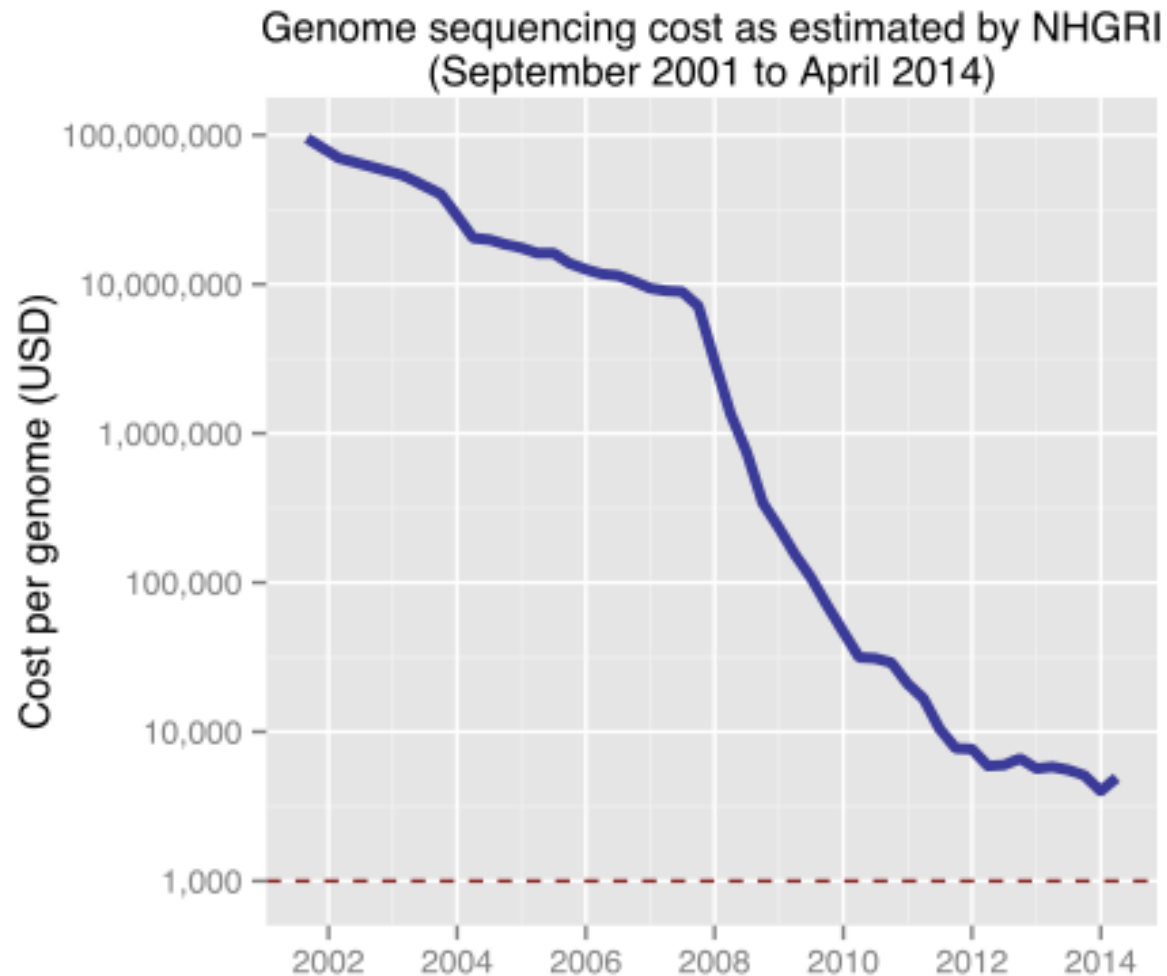
# **Anticuerpos monoclonales**

- **Inmortalización de plasmocitos por fusión con células de mieloma de ratón.**
- **Las células fusionadas (hibridomas) producirán inmunoglobulinas idénticas a las que producía el plasmocito.**
- **Por dilución terminal se puede aislar(clonar) cada hibridoma, mantenerlo y expandirlo en cultivo.**



**Nuevas y complejas técnicas.....  
cada vez más accesibles**

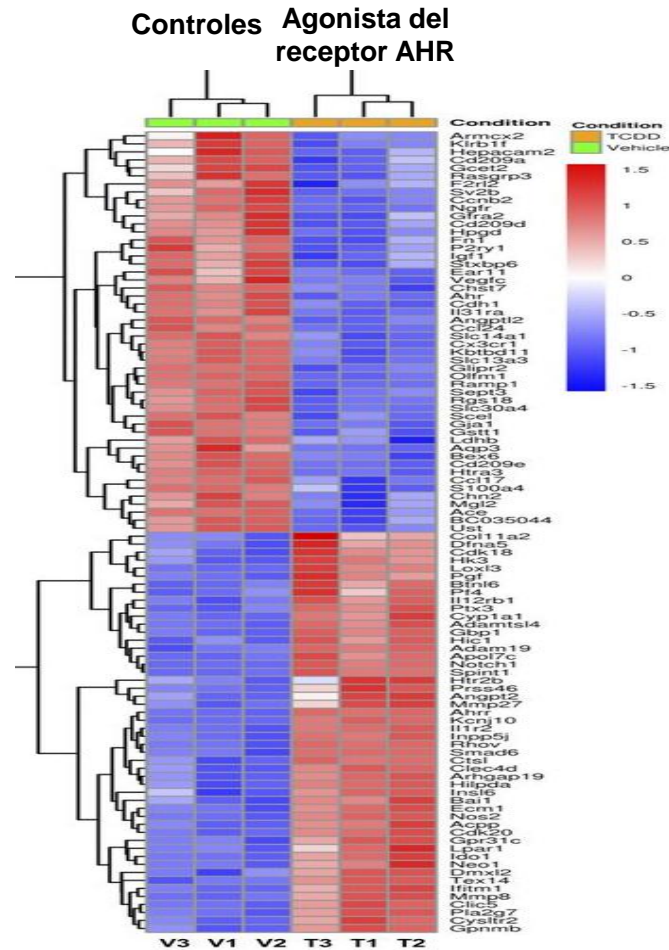
# Secuenciación del genoma humano





Secuenciación de ARN (RNAseq): permite el análisis y cuantificación de todos los transcritos en una población celular o tejido

## Transcriptoma de células dendríticas



# Genome-Wide Transcriptional Analysis Reveals Novel AhR Targets That Regulate Dendritic Cell Function during Influenza A Virus Infection

ImmunoHorizons June 1, 2019, 3 (6) 219-235; DOI:  
<https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1900004>

*Gracias*