

Materia Inmunología

Seminario 8

Exploración de la respuesta inmune

Año: 2020

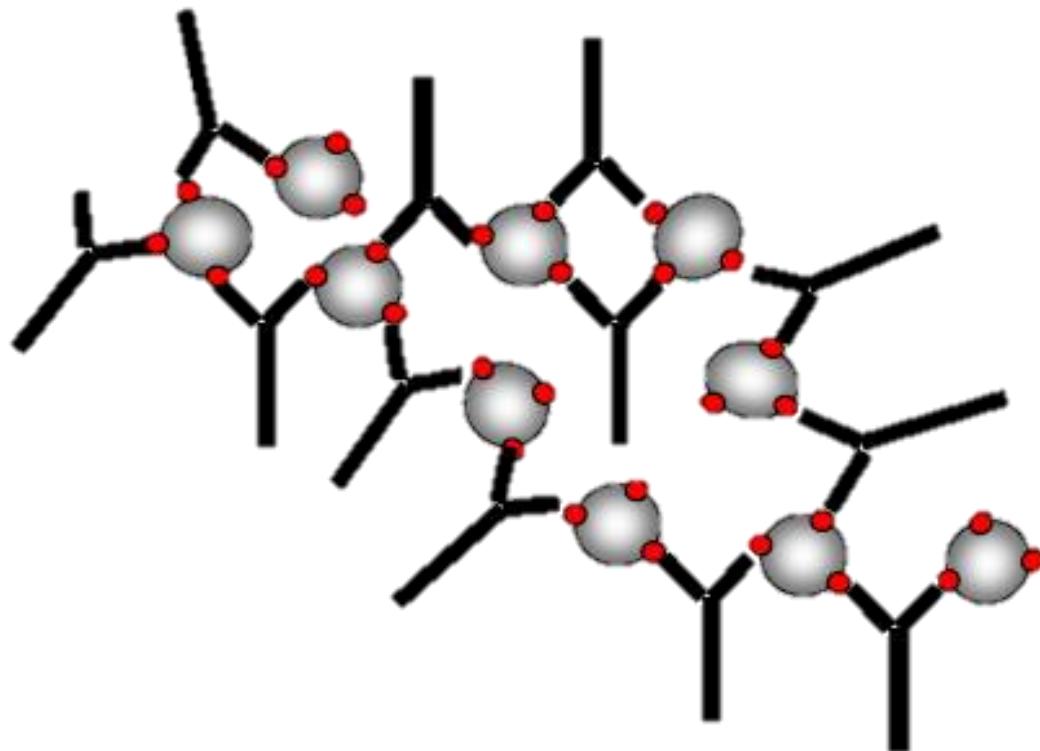


*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Medicina*

Objetivos

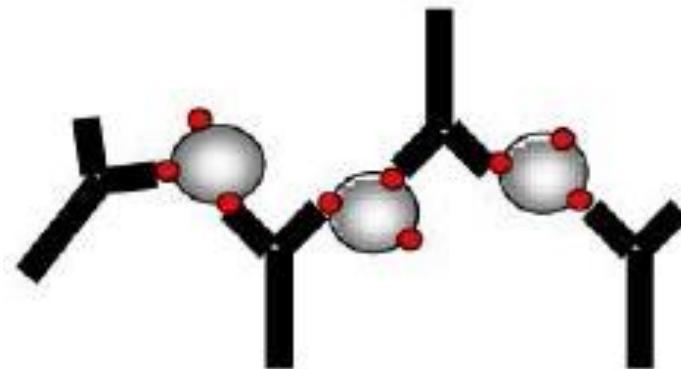
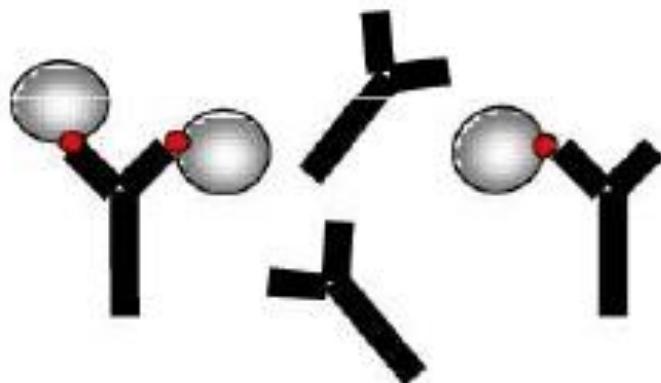
- Conocer cómo puede estudiarse la función del sistema inmune
- Interpretar los resultados de técnicas que usan como base las interacciones antígeno-anticuerpo
- Conocer las aplicaciones de las distintas técnicas en la clínica y en investigación

Técnicas basadas en la interacción antígeno-anticuerpo



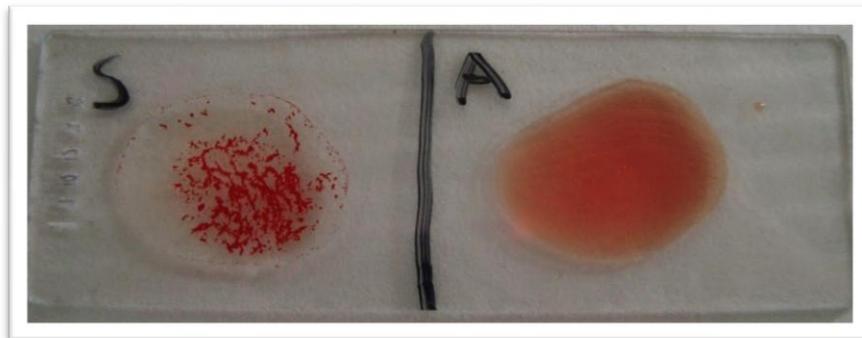
Interacción antígeno-anticuerpo

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

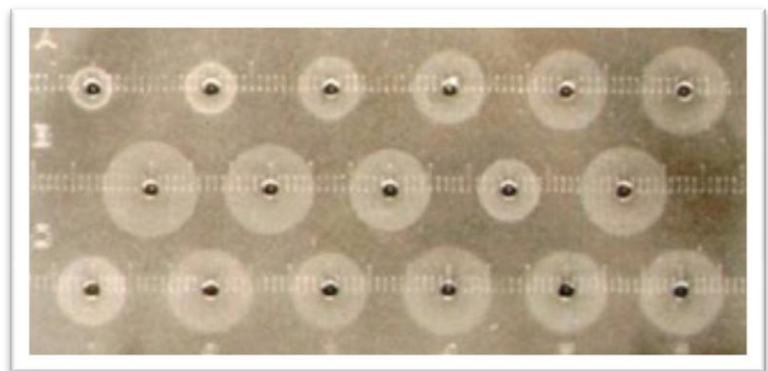


Algunos conceptos

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



Aglutinación

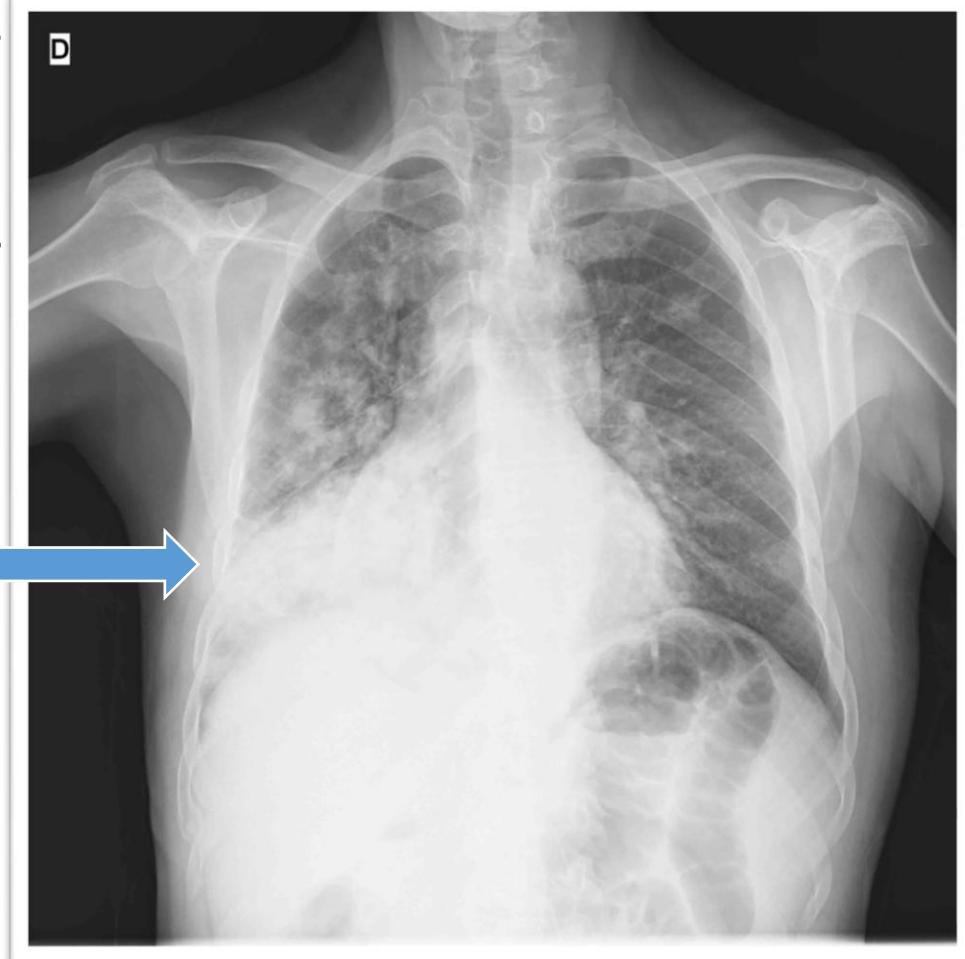


Precipitación

Caso 1

Enrique, de 71 años, consulta por presentar fiebre de 3 días de evolución (39.5°C), tos con expectoración purulenta y dolor punzante en la parrilla costal derecha. La radiografía muestra una imagen compatible con neumonia en base derercha.

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



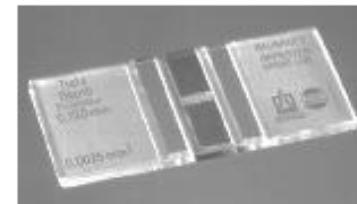
Hemograma y eritrosedimentación

Eritrosedimentación



Hemograma con recuento y fórmula leucocitaria

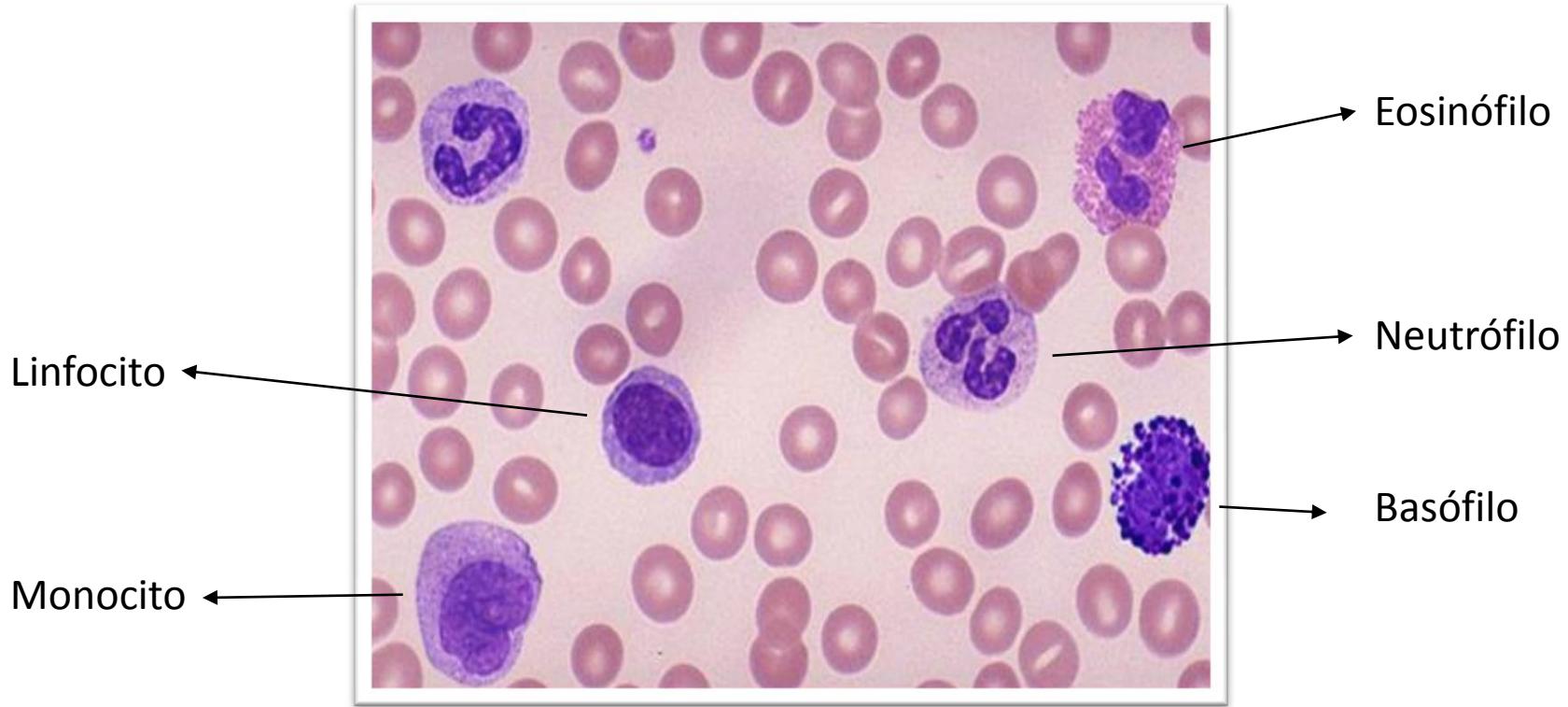
Recuento manual:
cámara de Neubauer



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 ³
Linfocitos	20 a 40 %	1.000 a 4.000 mil/mm ³
Monocitos	2 a 8 %	100 a 700 mil/mm ³
Eosinófilos	1 a 4 %	50 a 500 mil/mm ³
Basófilos	0 a 1 %	25 a 100 mil/mm ³

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 (IC 90%)	LRS (IC 90%)	Media ± DE	LRI (IC 90%)	LRS (IC 90%)	
CD3+ (linfocitos T)							
Recuento absoluto (10 ³ 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

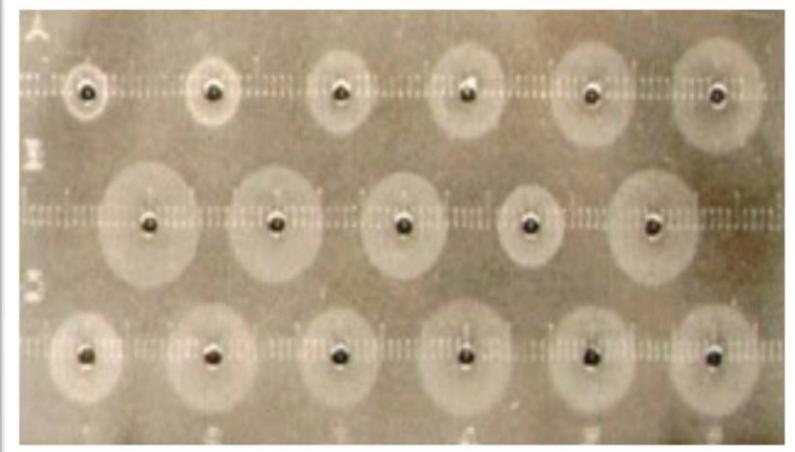
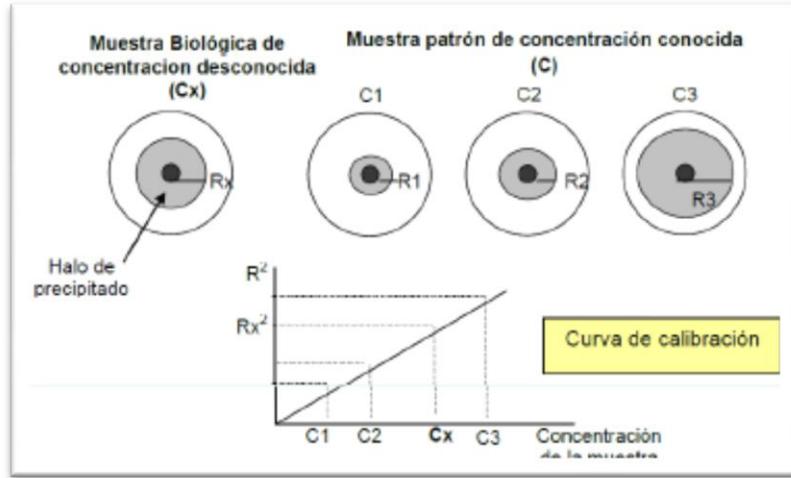
Nota: valores hallados por percentiles (intervalo del 95%) y sus intervalos de confianza (CLSI C28-A3) ⁽⁶⁾

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?

Immunodifusión 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.

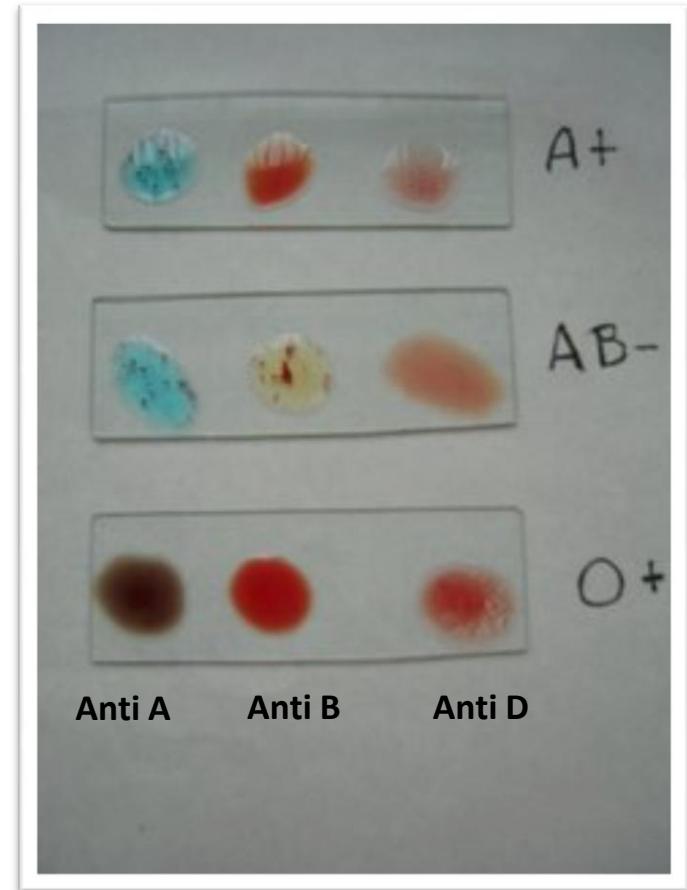
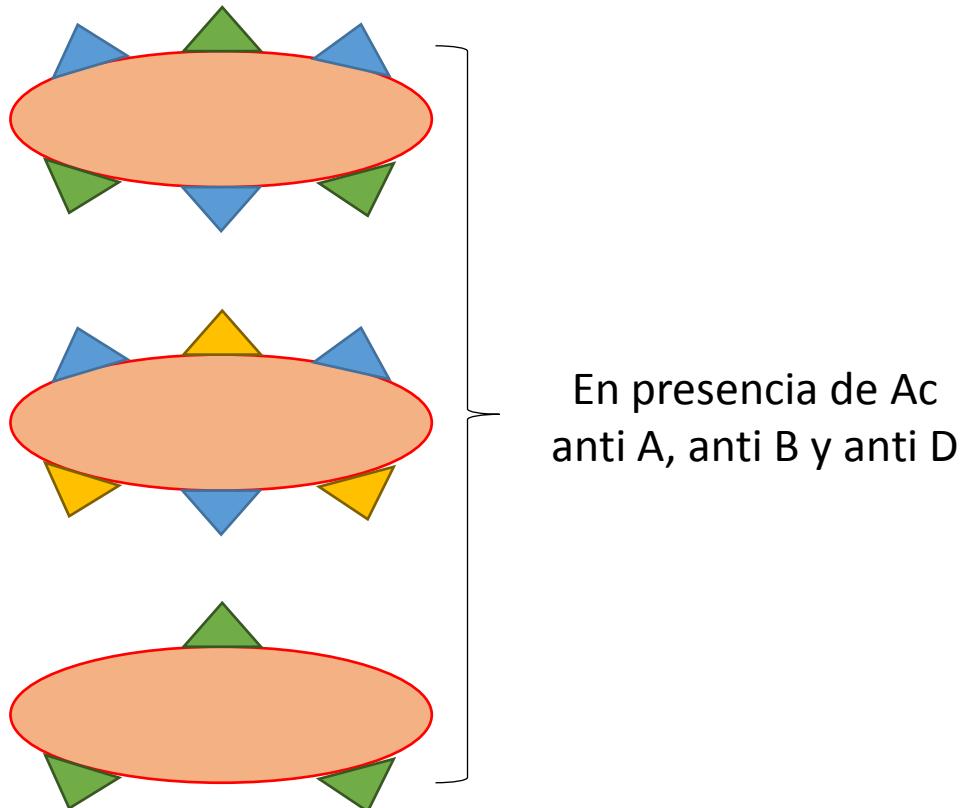
Caso 3

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

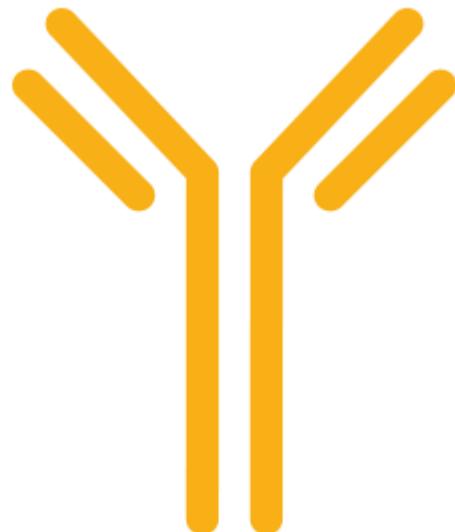
▲ Antígeno D ▲ Antígeno B ▲ Antígeno A



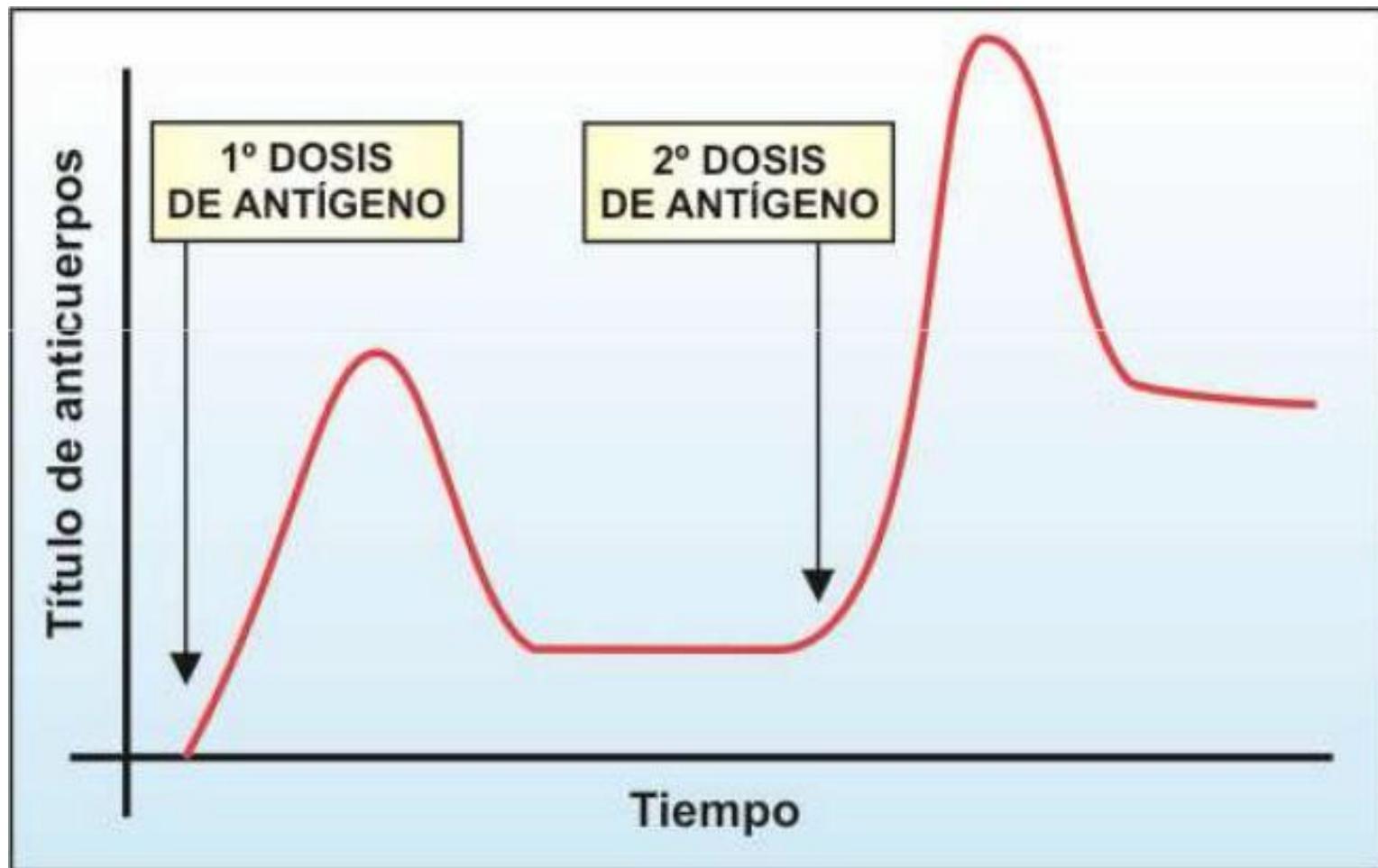
Técnica cualitativa

Técnica por aglutinación directa

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



Repaso – Respuesta B



Título de anticuerpos

1º DOSIS
DE ANTÍGENO

2º DOSIS
DE ANTÍGENO

IgG

IgM

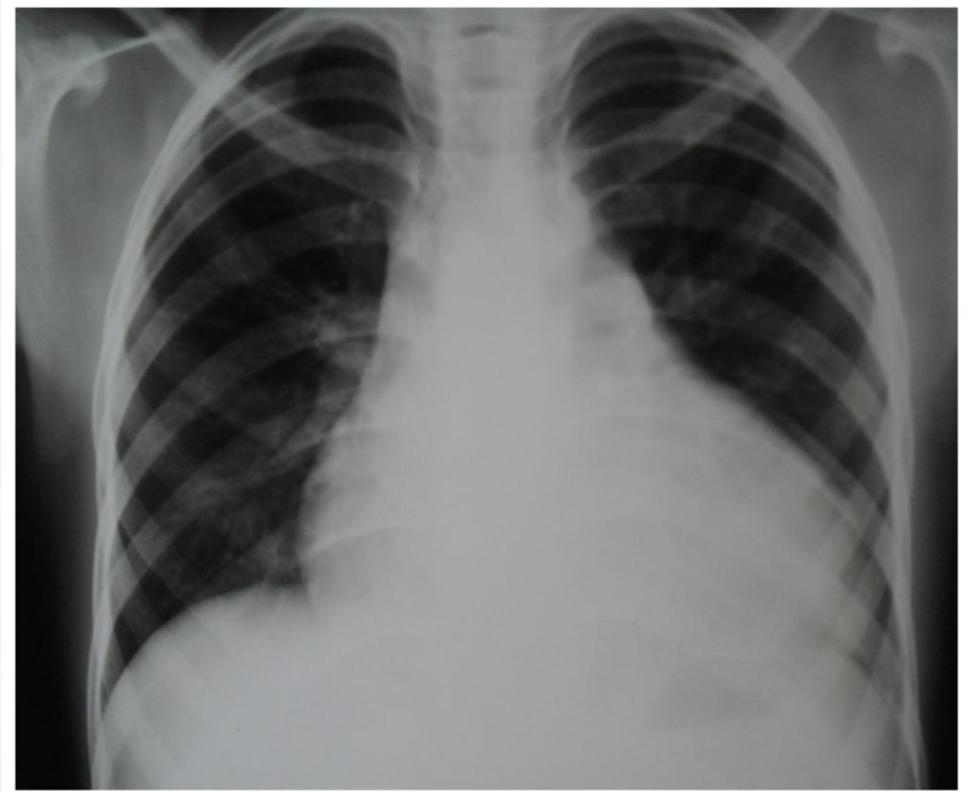
Tiempo

	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

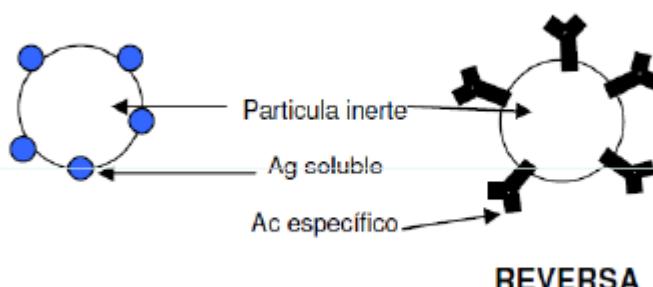
Paciente 1

Paciente 2

Paciente 3



Aglutinación pasiva o indirecta



Técnica por aglutinación indirecta

Técnica semi-cuantitativa

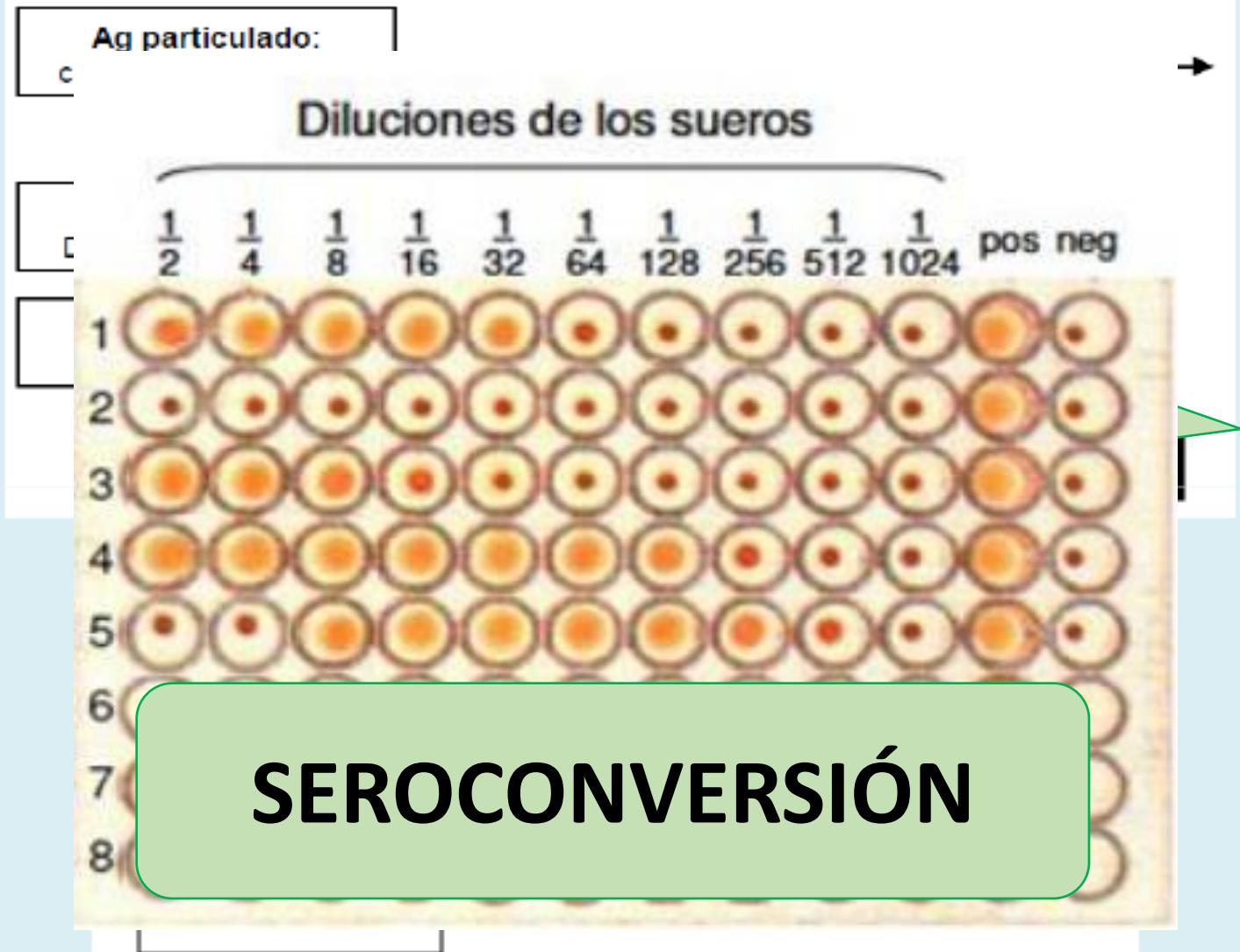
Título / Prozona

Caso 5

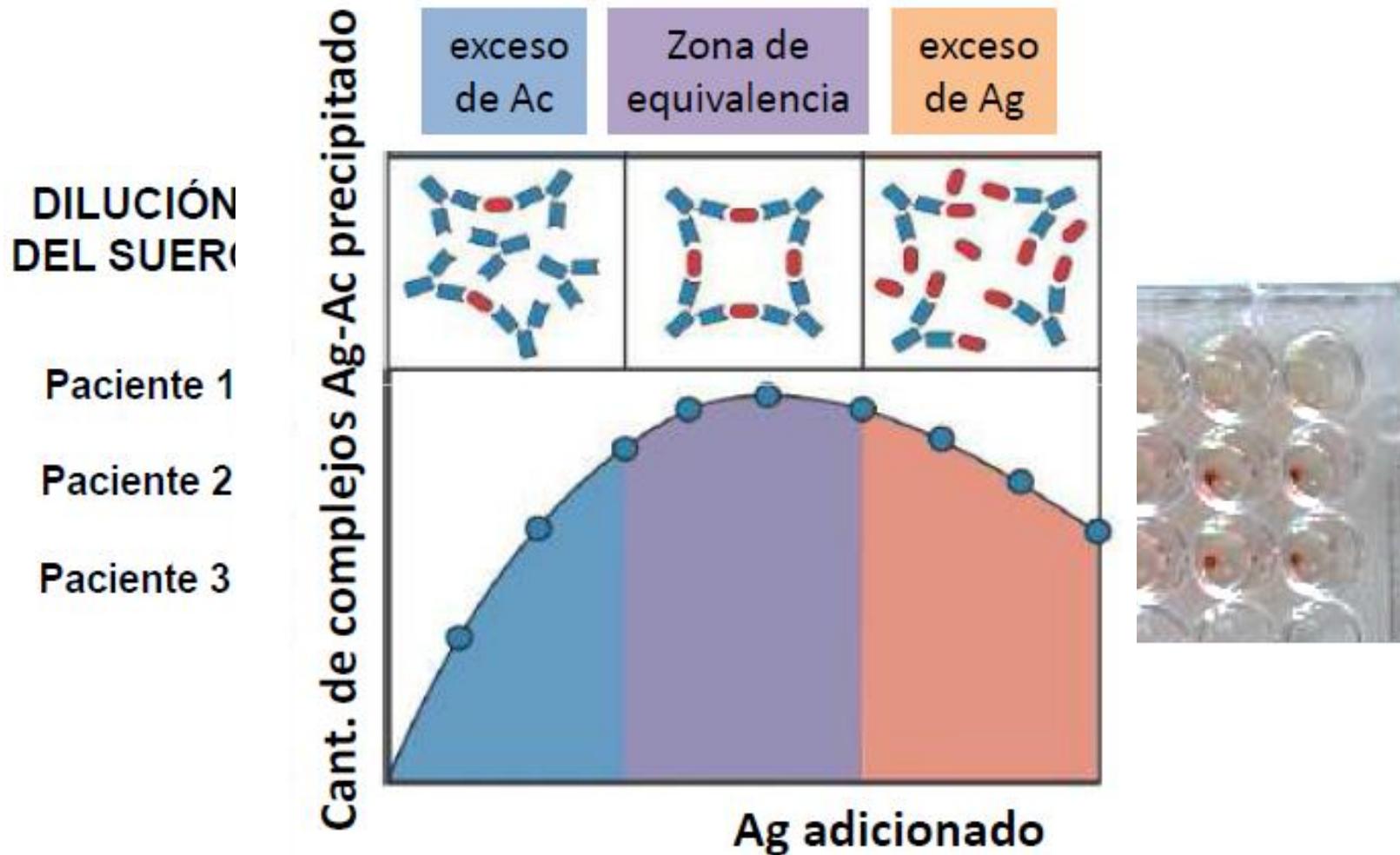
Joaquín, de 16 años, concurre a la consulta con su médico de cabecera por segunda vez. En la primera había expresado preocupación porque mantiene relaciones sexuales sin preservativo, y en el colegio le contaron que es posible contraer algunas enfermedades por esta vía. Usted solicitó en la pasada consulta 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

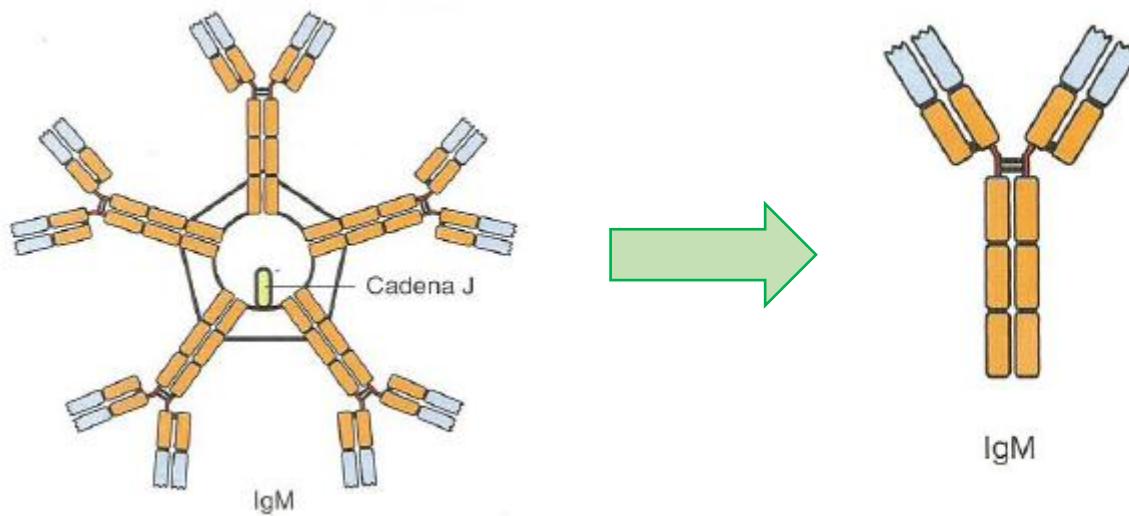
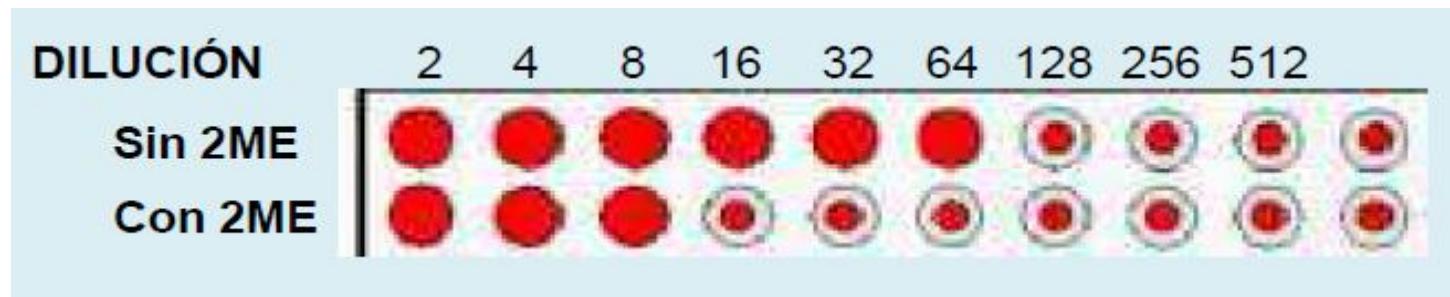


Fenómeno de prozona



Título IgG e IgM

Tratamiento con 2-mercaptoetanol (2ME)



Conceptos en práctica

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

¿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

ELISA "SANDWICH" DIRECTO



Detectar Antígenos

ELISA INDIRECTO



Detectar Anticuerpos

Técnica de interacción primaria

Técnica cualitativa o cuantitativa

Caso 7

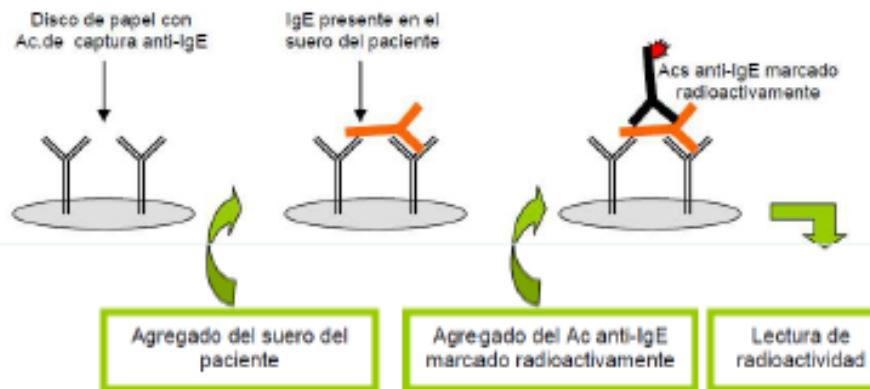
Sebastián, de 29 años, consulta por episodios repetidos de rinitis, sobre todo en primavera, y algunos episodios de dermatitis que se han agravado en los últimos meses. Usted sospecha que sus molestias podrían tener un origen alérgico.



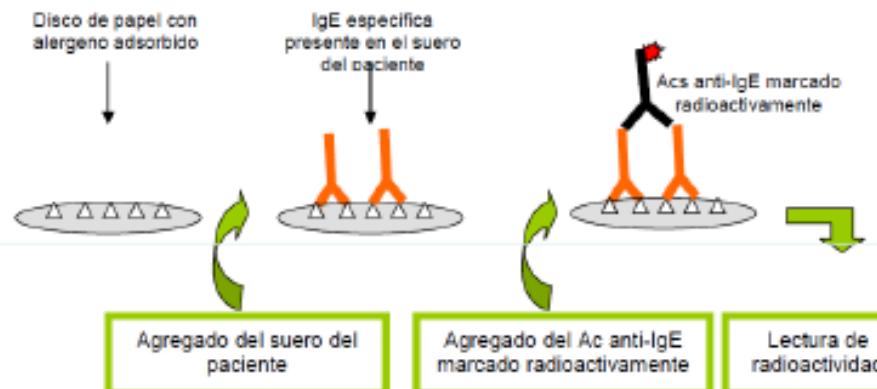
¿Qué le interesaría medir en el suero del paciente? ¿Usaría una técnica de interacción Ag-Ac primaria o secundaria? ¿Por qué?

Determinaciones de IgE

PRIST



RAST

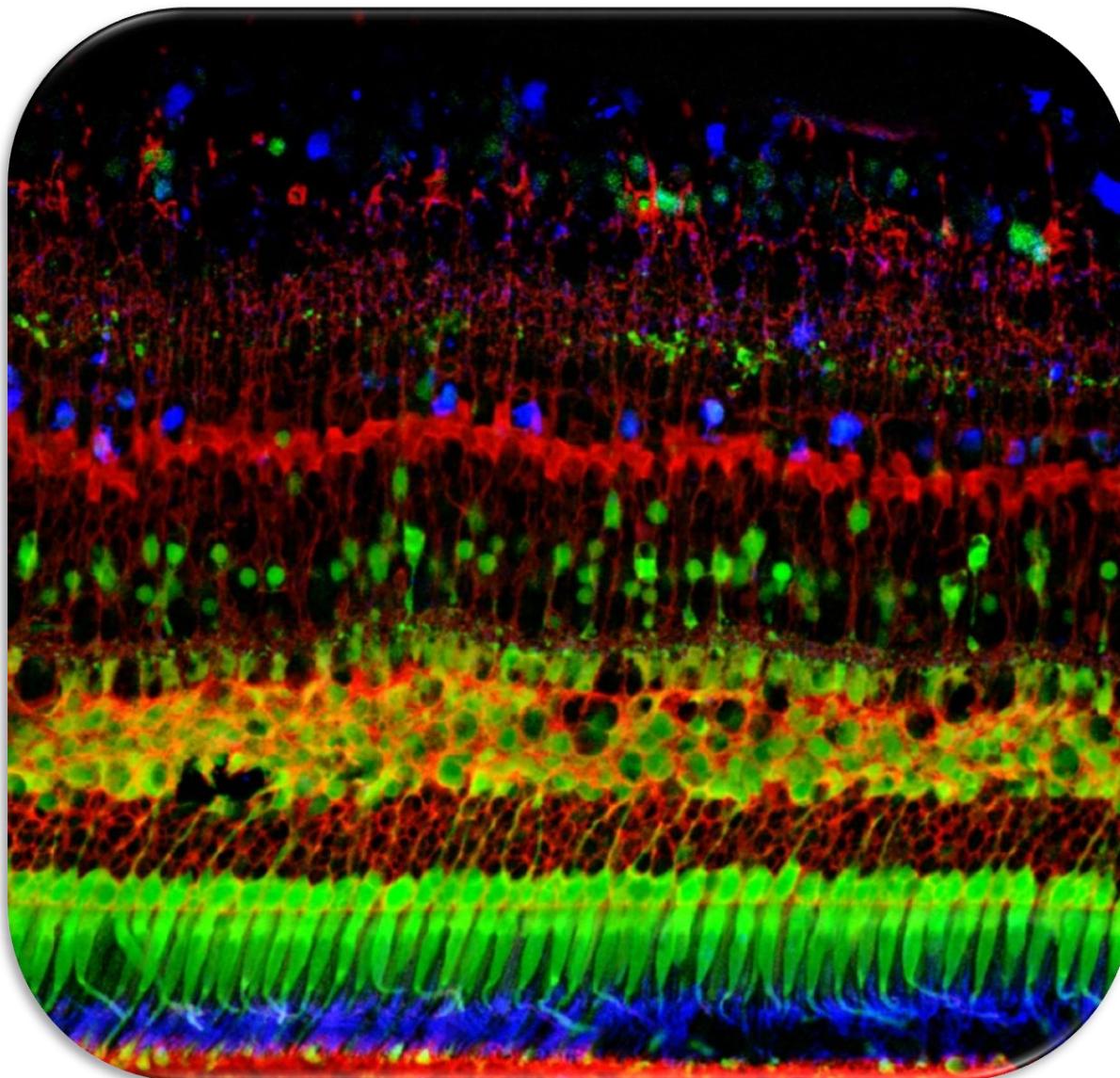


IgE total

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	3×10^{-5}

Immunomarcación



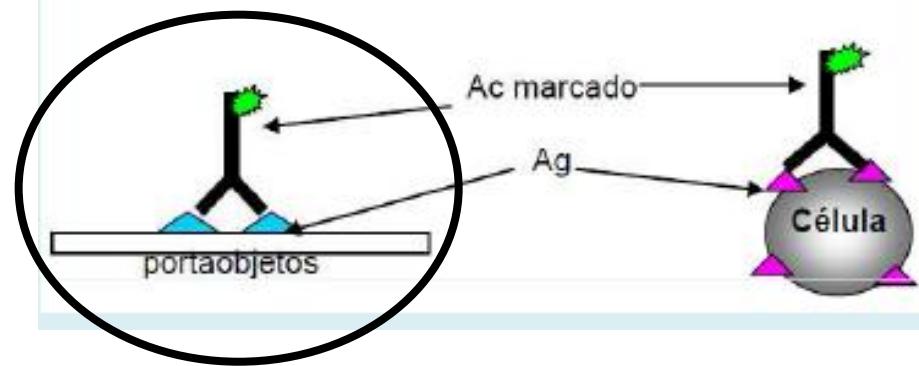
Caso 8

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.

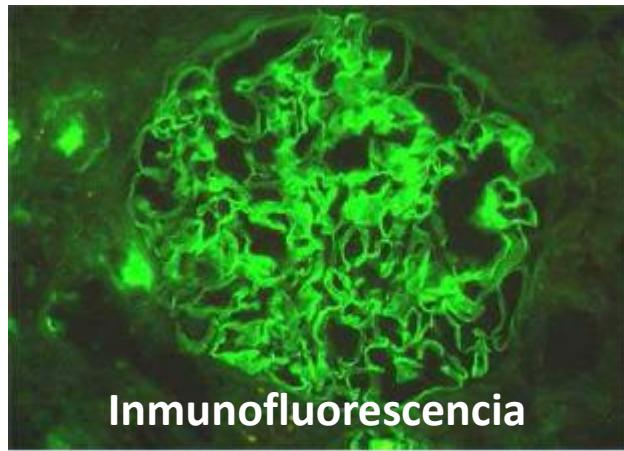
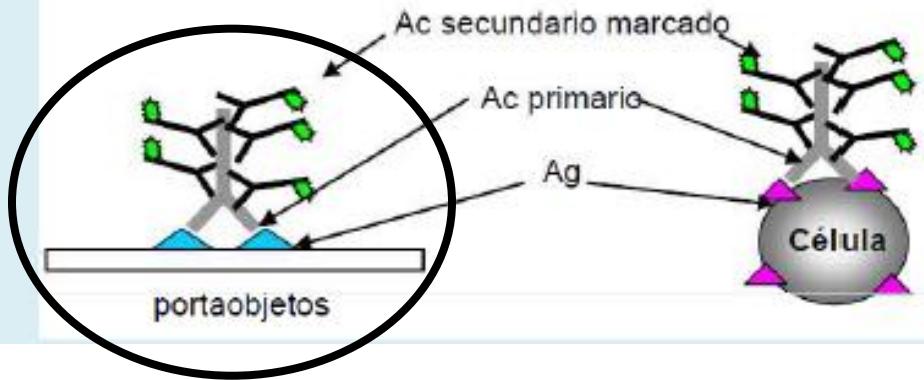
¿Qué tipo de muestra necesita? ¿Cómo evidenciaría la presencia de complejos inmunes?

Inmunomarcación en portaobjetos

INMUNOMARCACION DIRECTA



INMUNOMARCACION INDIRECTA



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

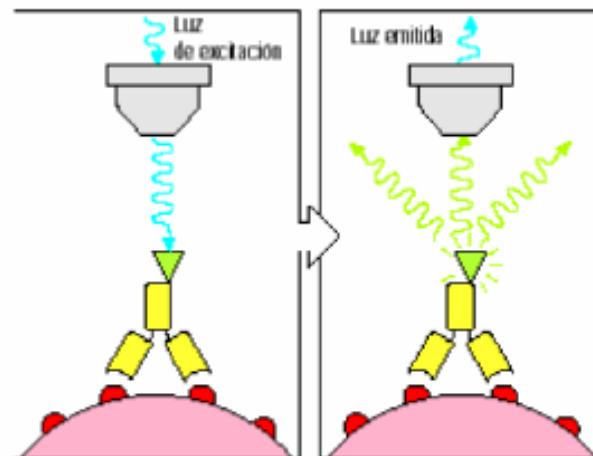
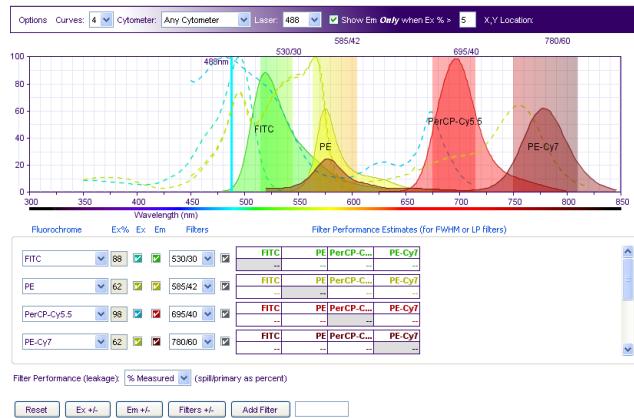
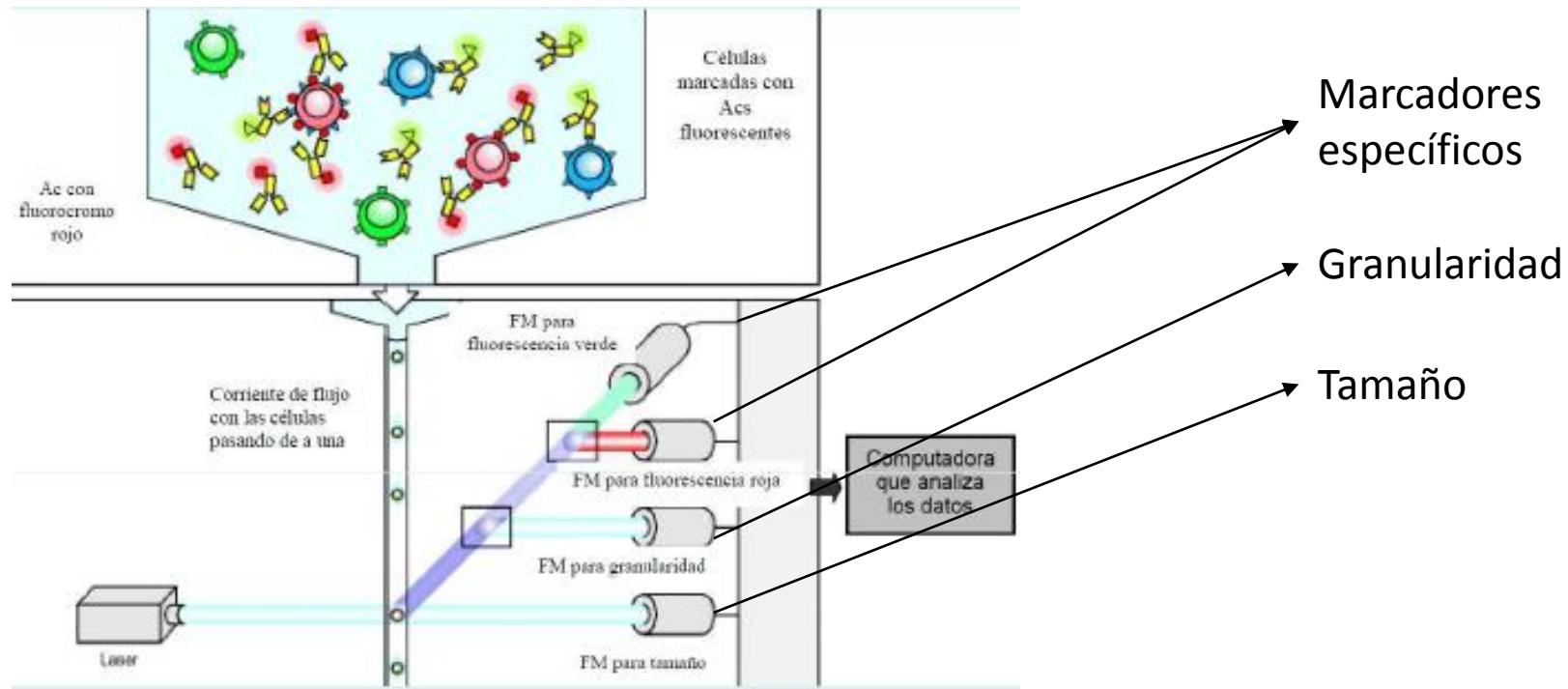
PROLIFERACIÓN CELULAR

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

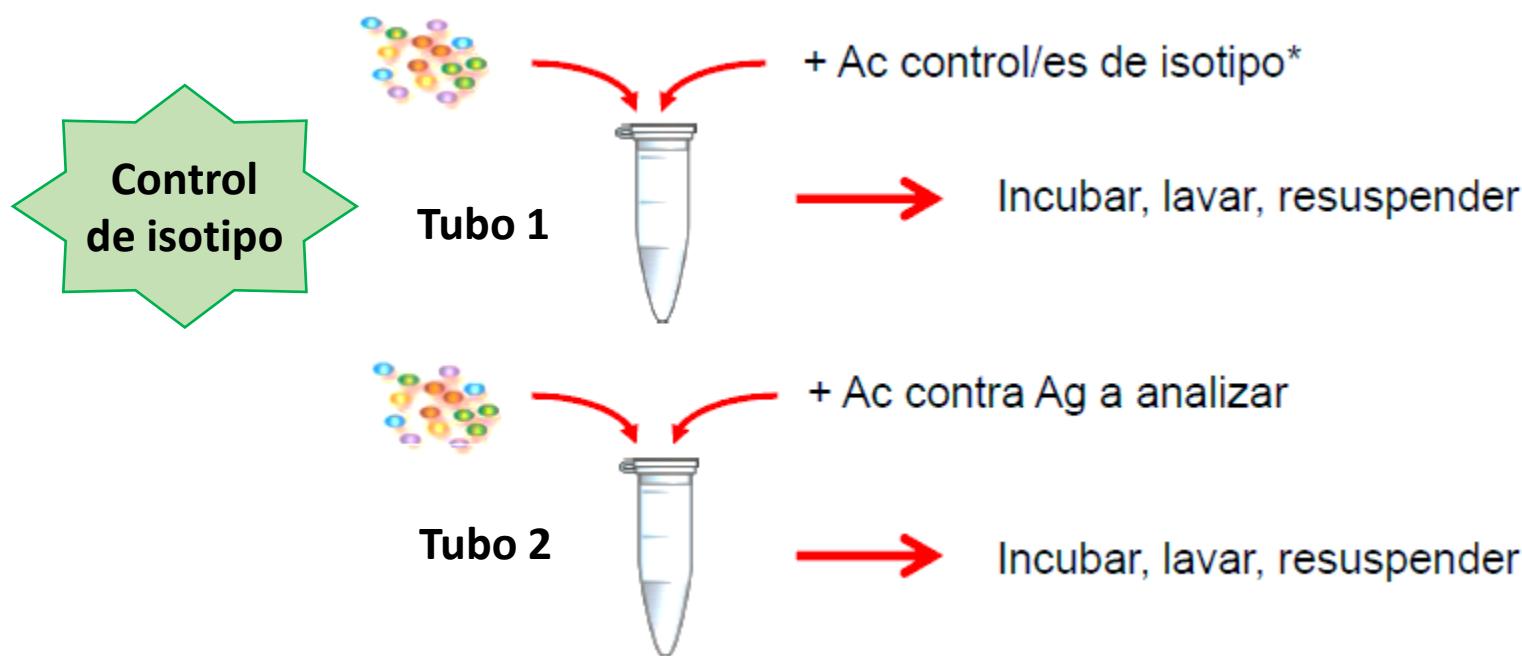
PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN



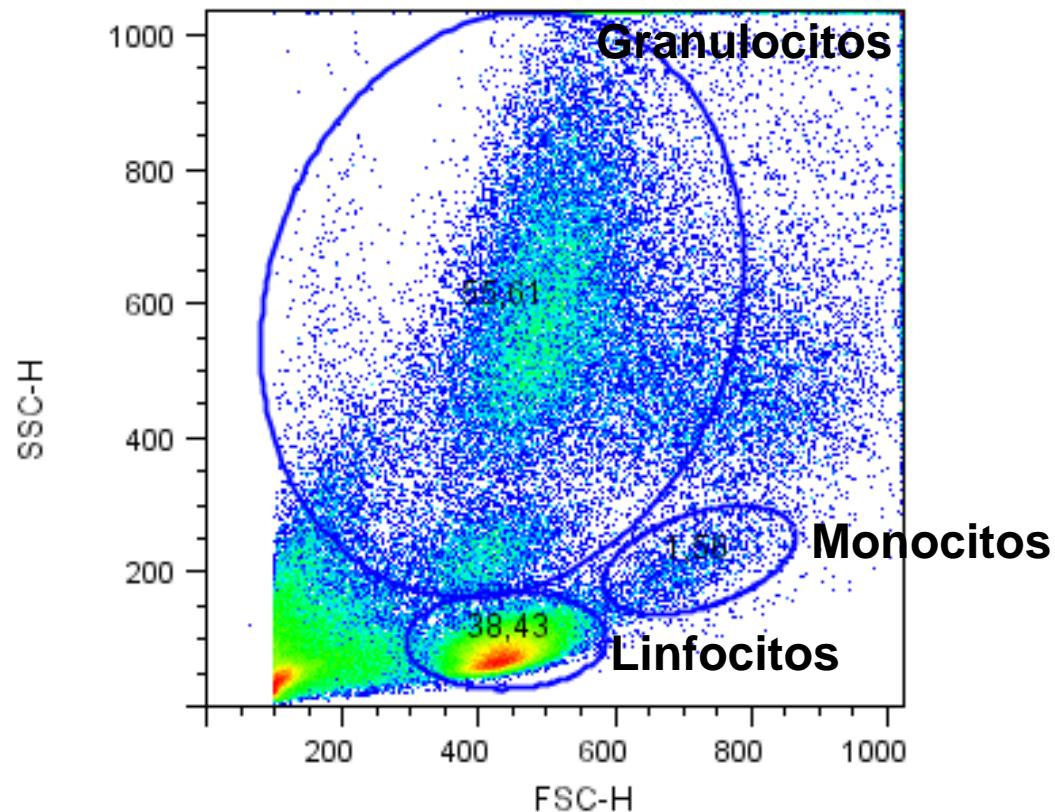
Citometría de flujo



Citometría de flujo - Protocolo



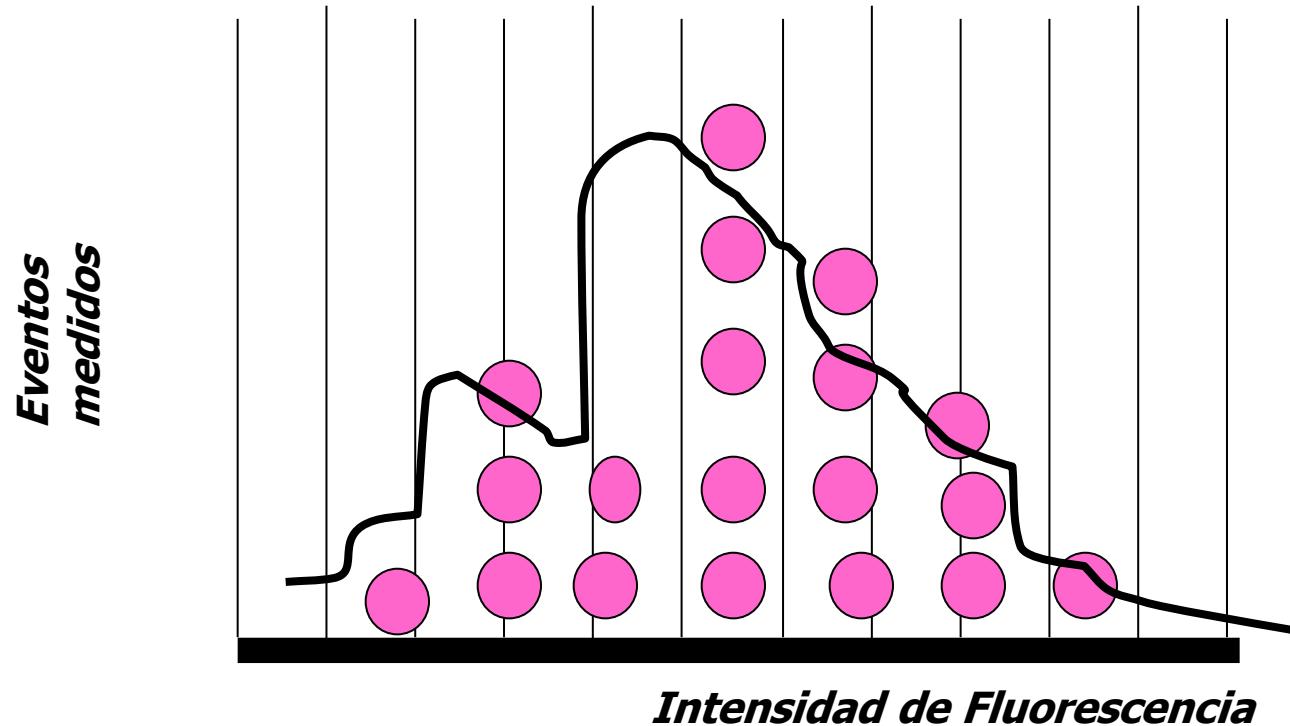
Análisis por tamaño y granularidad en leucocitos de sangre periférica



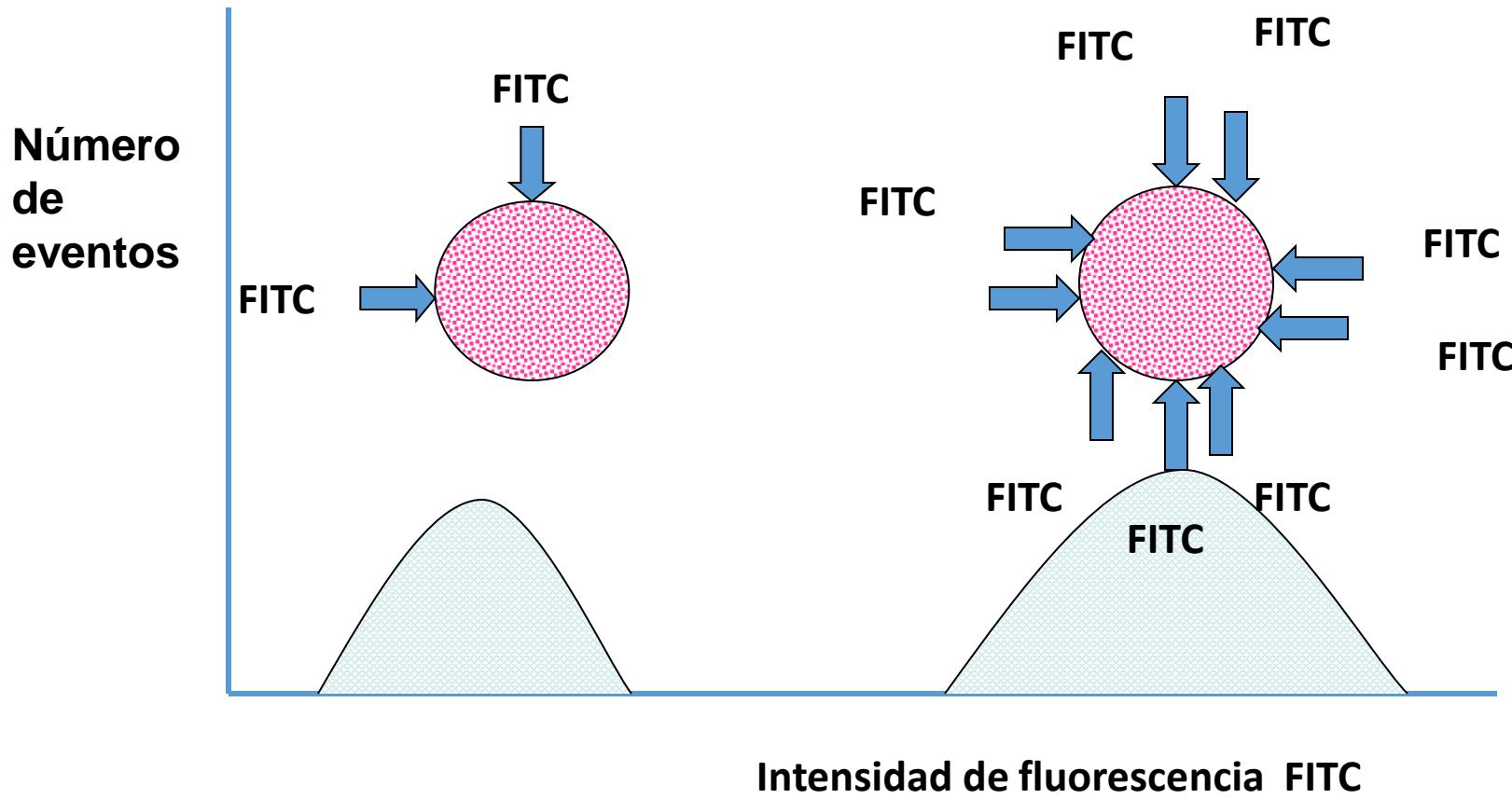
ANALISIS con marcaciones

Los datos colectados se pueden observar de 2 maneras:

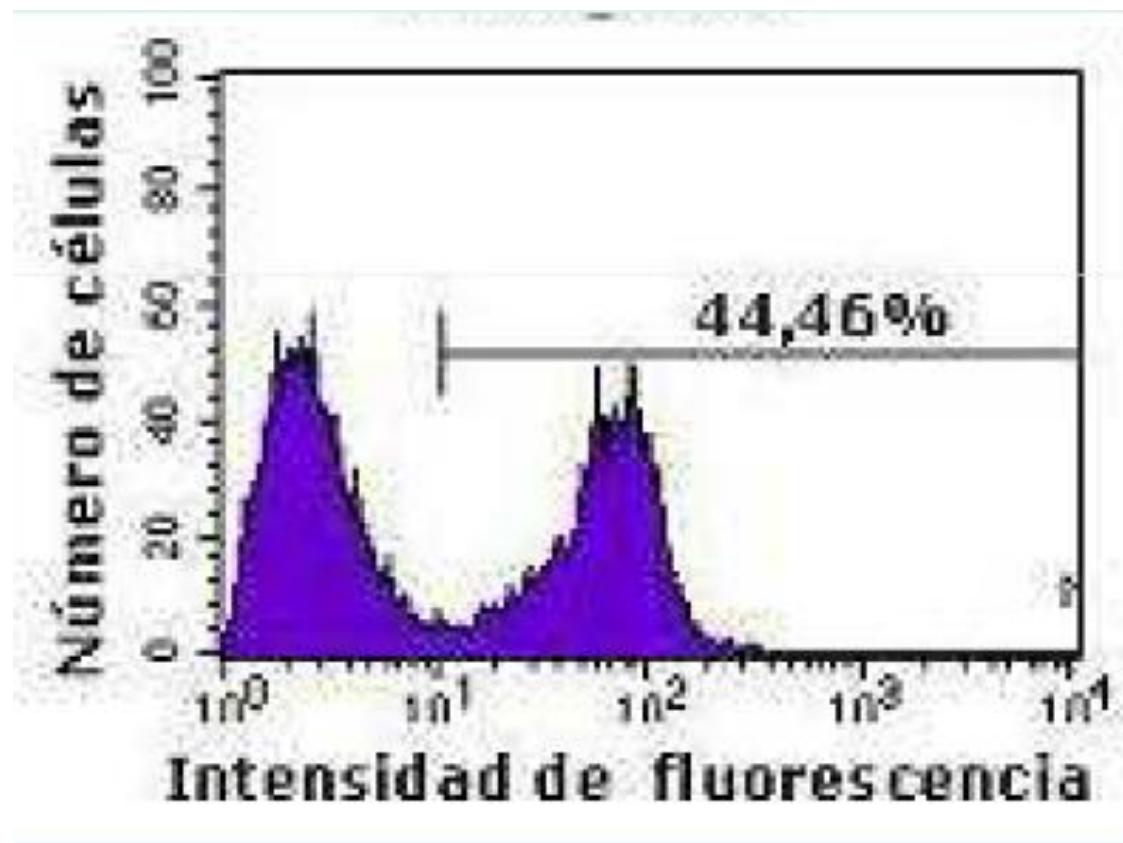
1) Histogramas



Intensidad de fluorescencia y sitios de unión



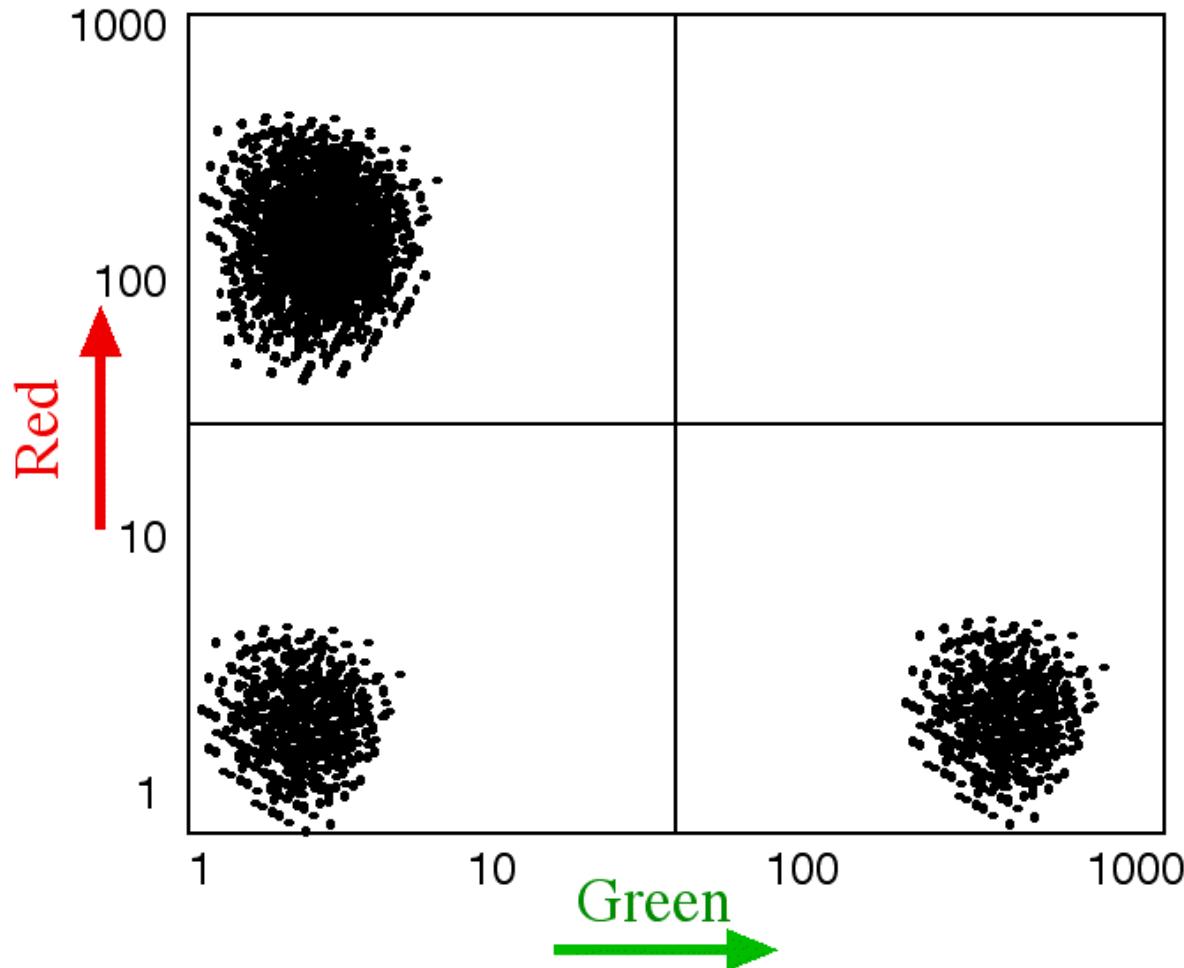
Histogramas de fluorescencia: analizo un solo marcador



Los datos colectados se pueden observar de 2 maneras:

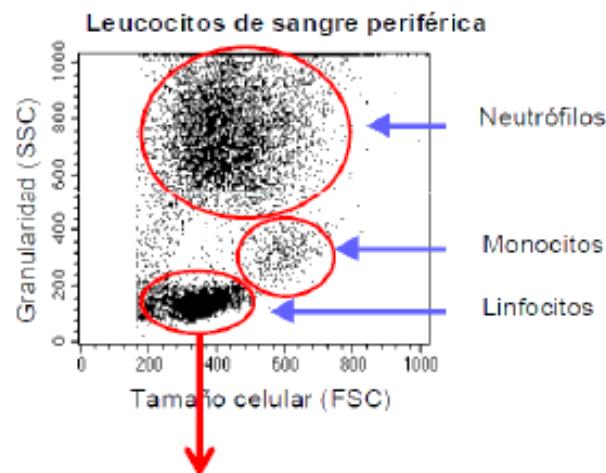
1) Histogramas

2) Gráficos Dot-plots



Analizo dos marcadores

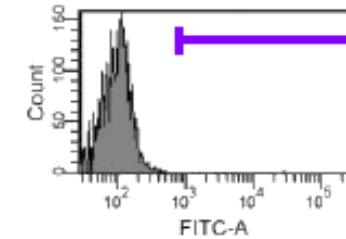
Citometría de flujo - Análisis



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

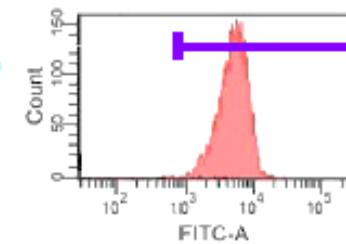
Control de isotipo

Elección de marcador

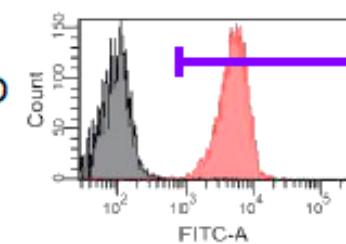


Seteo de posición basal del histograma

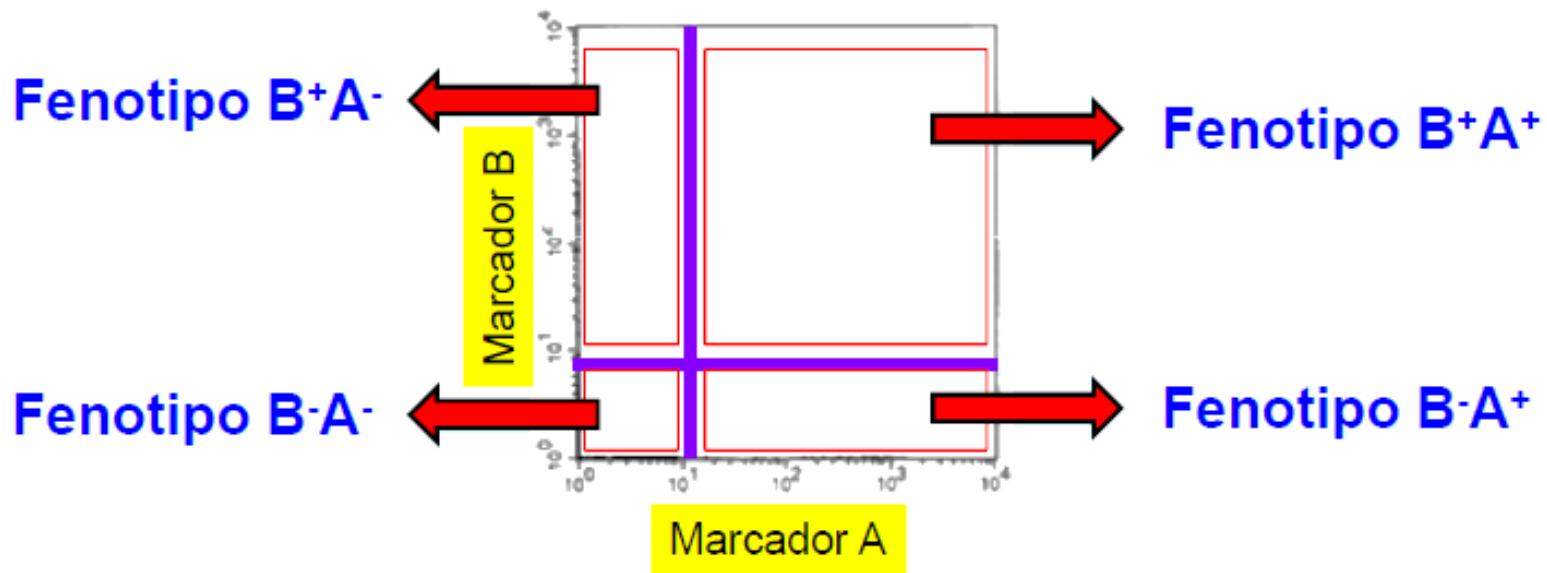
Ac específico



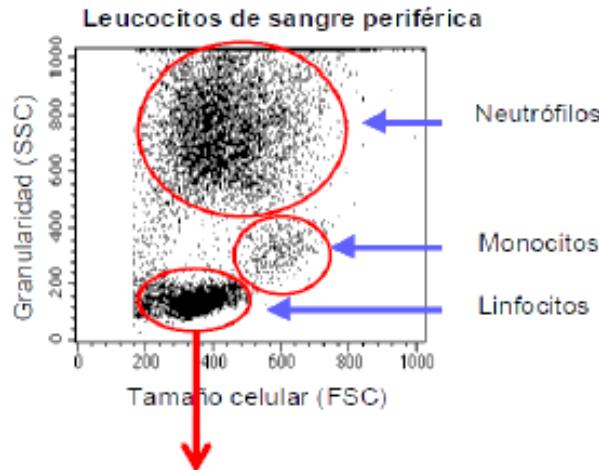
Solapamiento



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

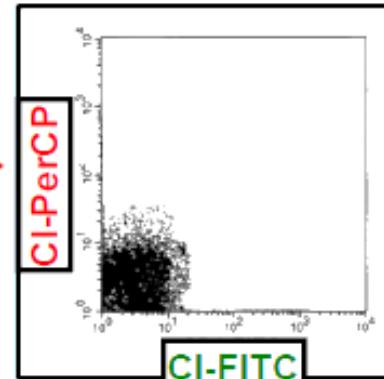


Citometría de flujo - Análisis



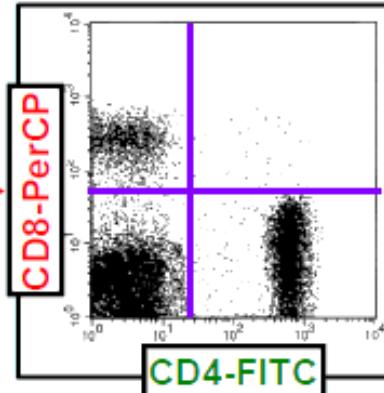
Selección de una población mediante la determinación de una región o “gate” para posterior análisis (*por ejemplo, células linfoides*).

Controles de isotipo



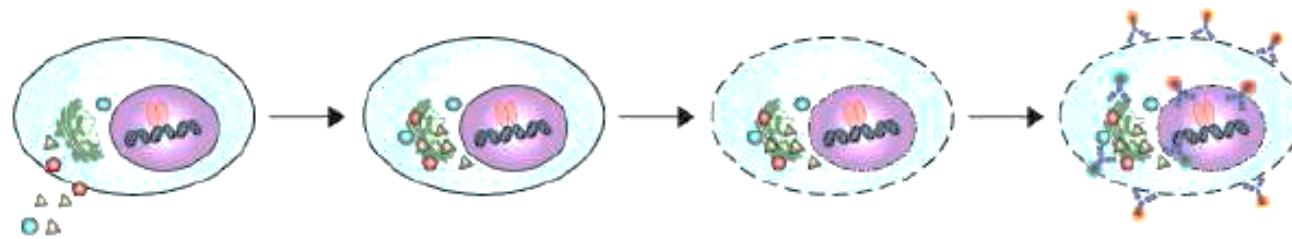
Seteo de cuadrantes

anti-CD4 y
anti-CD8



Determinación del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ simultáneamente en la misma muestra

Citometría de flujo – Ag intracelulares

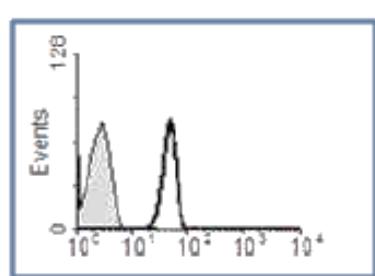


Tratar células con
inhibidor/es del
transporte intracelular

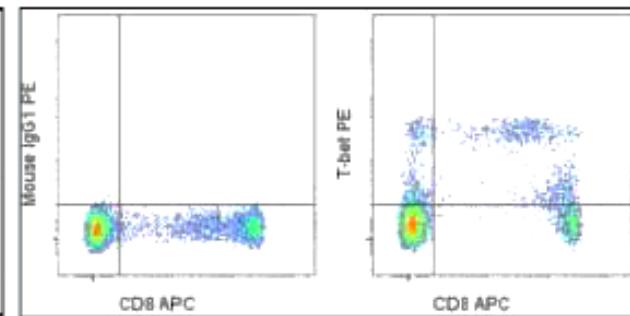
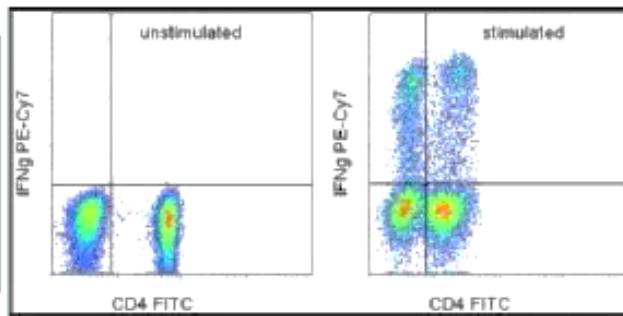
Fijar y permeabilizar
las células

Realizar la
inmunomarcación
(incluyendo el control
de isotipo)

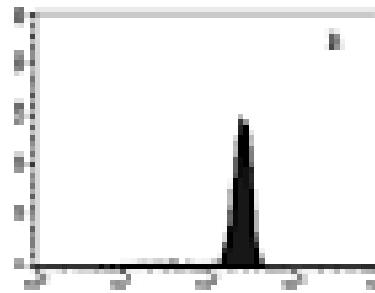
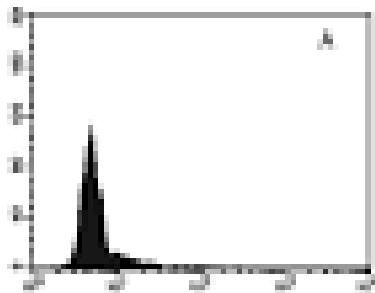
Analizar



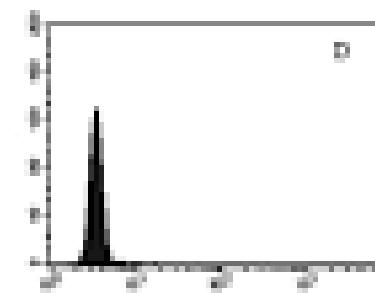
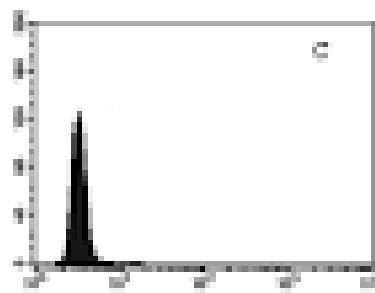
TLR3 en Células NK



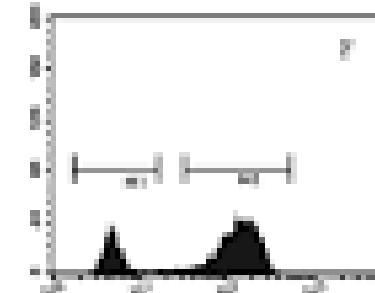
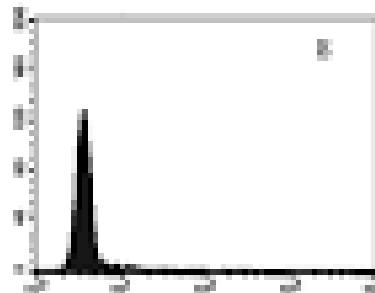
Diagnóstico de Enfermedad Granulomatosa Crónica y Mosaicismo (DHR)



Hermano sano del paciente

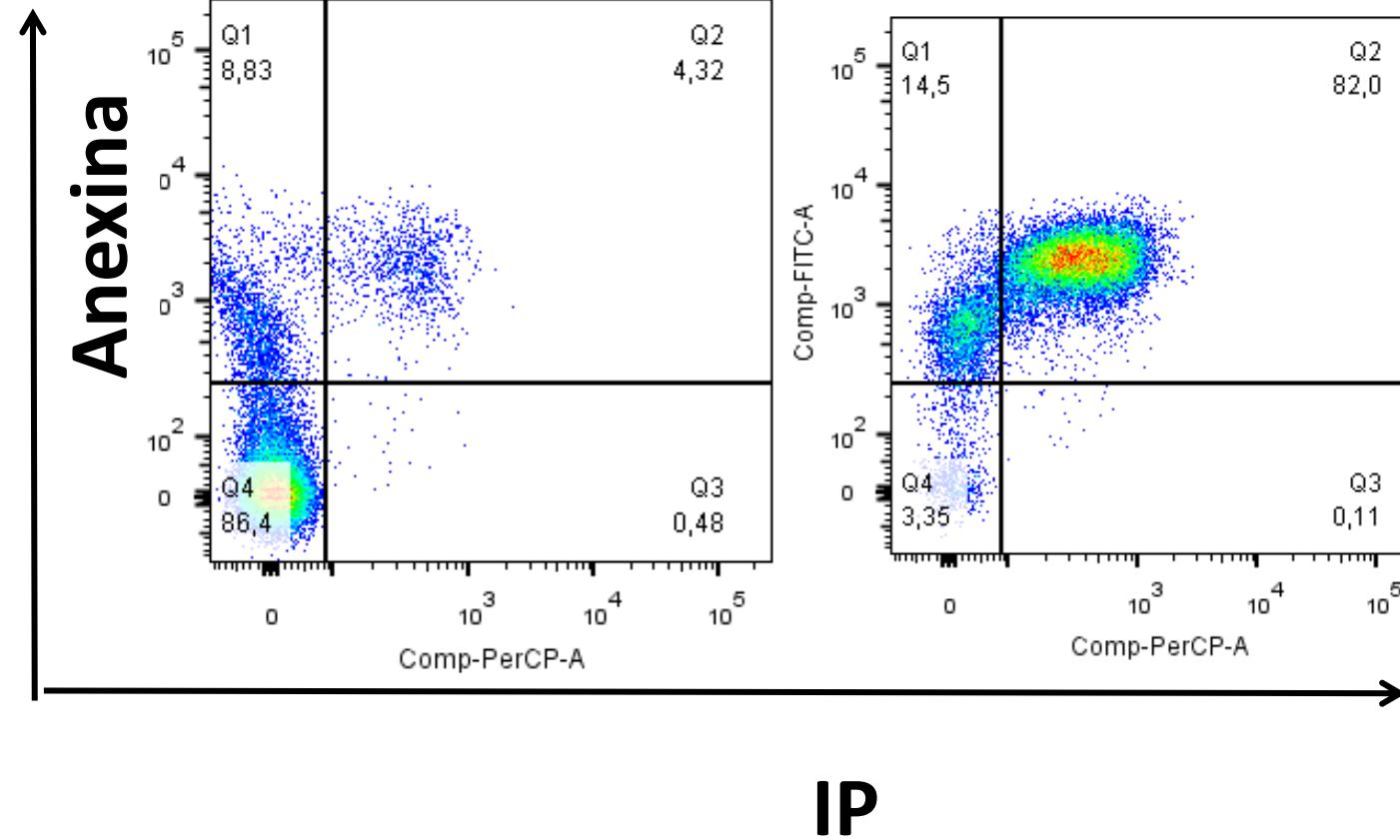


Paciente

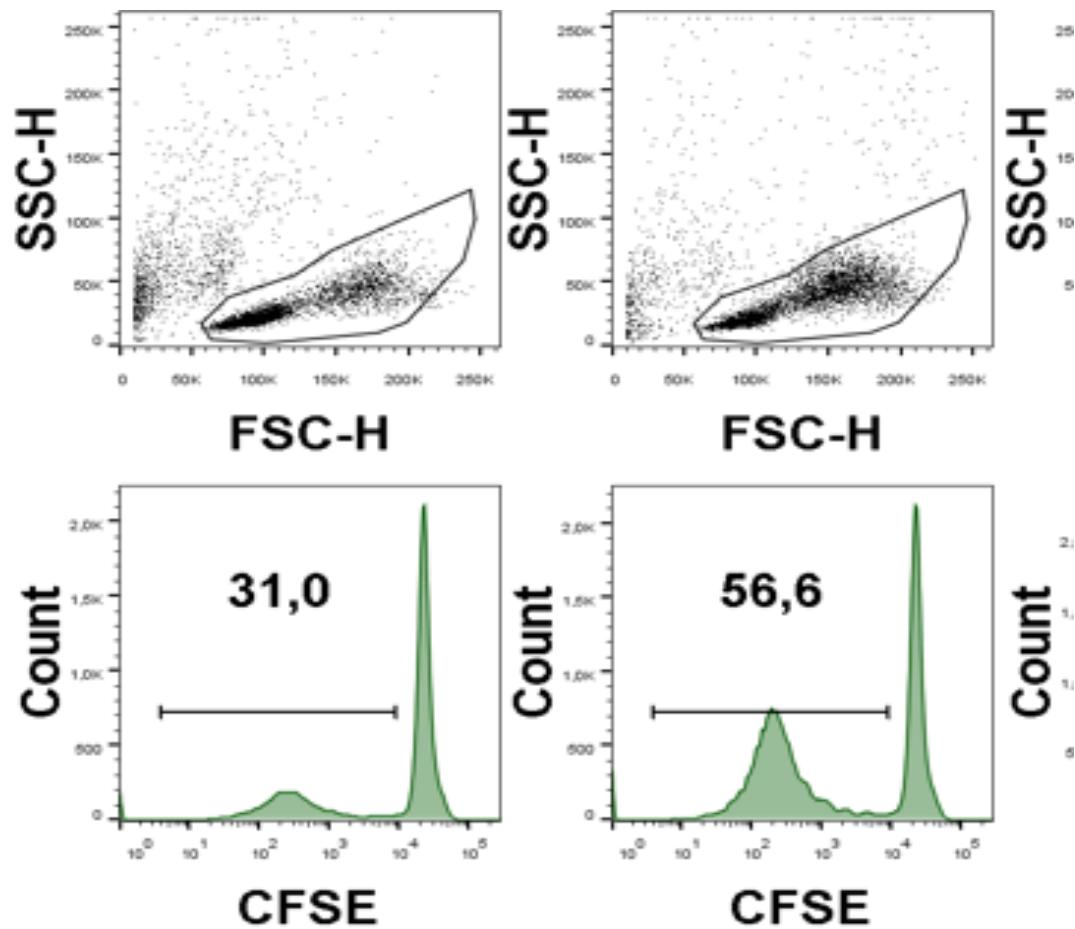


Madre

Evaluación de apoptosis y necrosis (Anexina/Propidio)



Evaluación de proliferación celular en células T (CFSE)

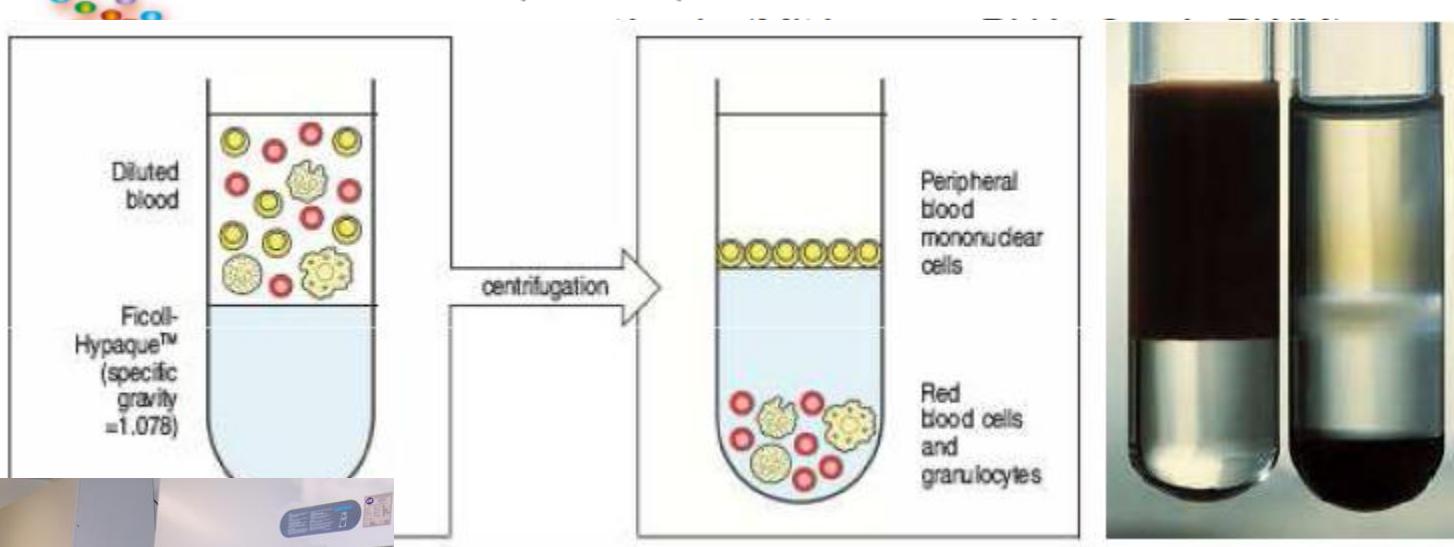


Pruebas funcionales



Estudio de capacidad proliferativa

Sembrar células (CMSPs)



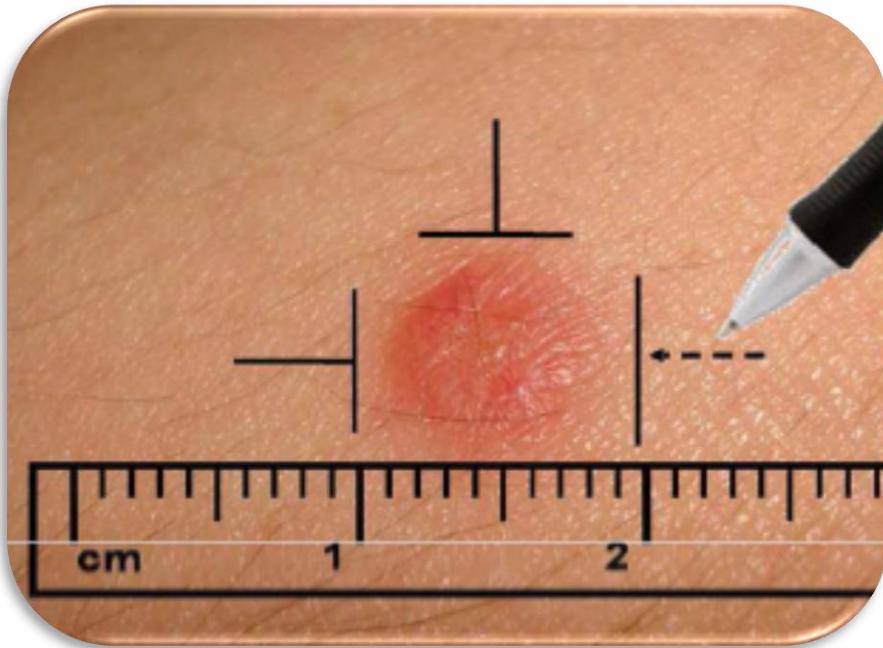
Cosechar y cuantificar cpm en contador beta

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

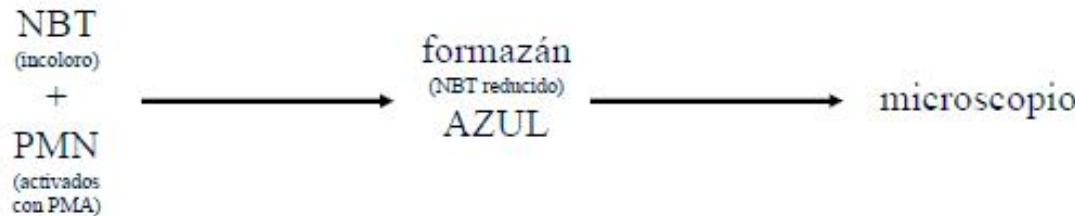
Ramiro, de 7 años, es internado en la sala de pediatría con diagnóstico de neumonía. Ha presentado desde los 2 años, múltiples episodios de dermatitis, y en ocasiones, abscesos en múltiples localizaciones, otitis, diarreas y adenomegalias. Después de descartar causas comunes de infecciones recurrentes, 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

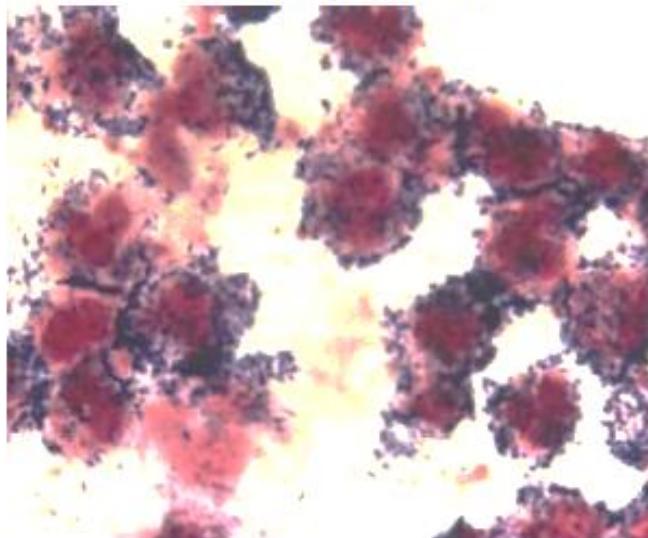
Reducción NBT



95% azules: SANO

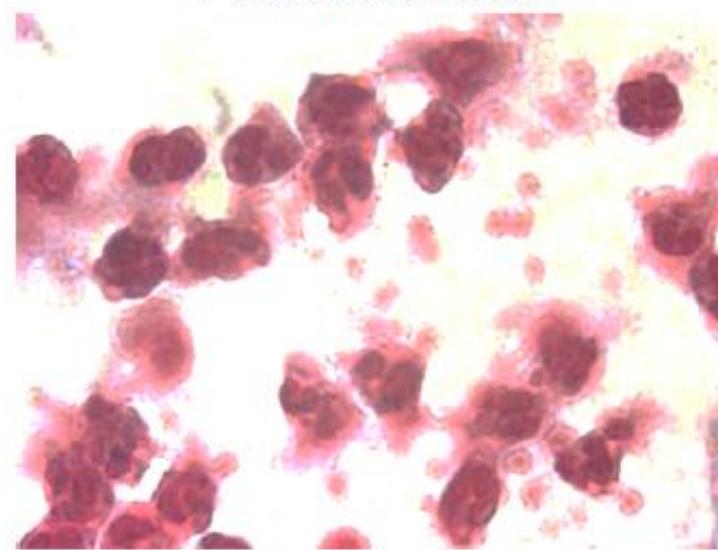
20-80% azules: Enf. Granul. Crónica

Individuo normal



Técnica cualitativa

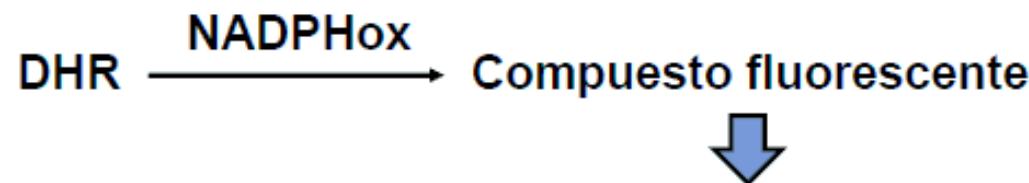
Paciente con EGC



Estudio funcional

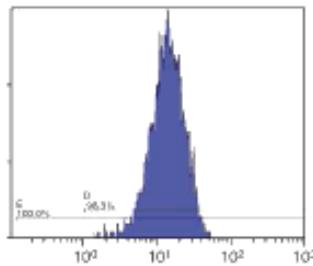
Evaluación del estallido respiratorio

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

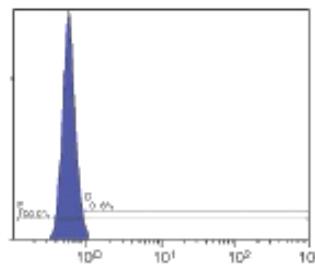


Análisis por citometría de flujo

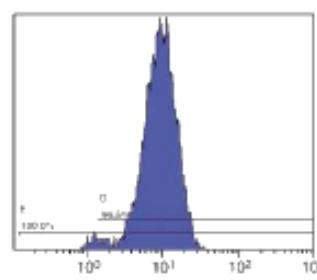
Normal



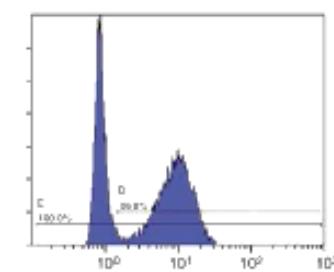
Paciente con EGC



Padre



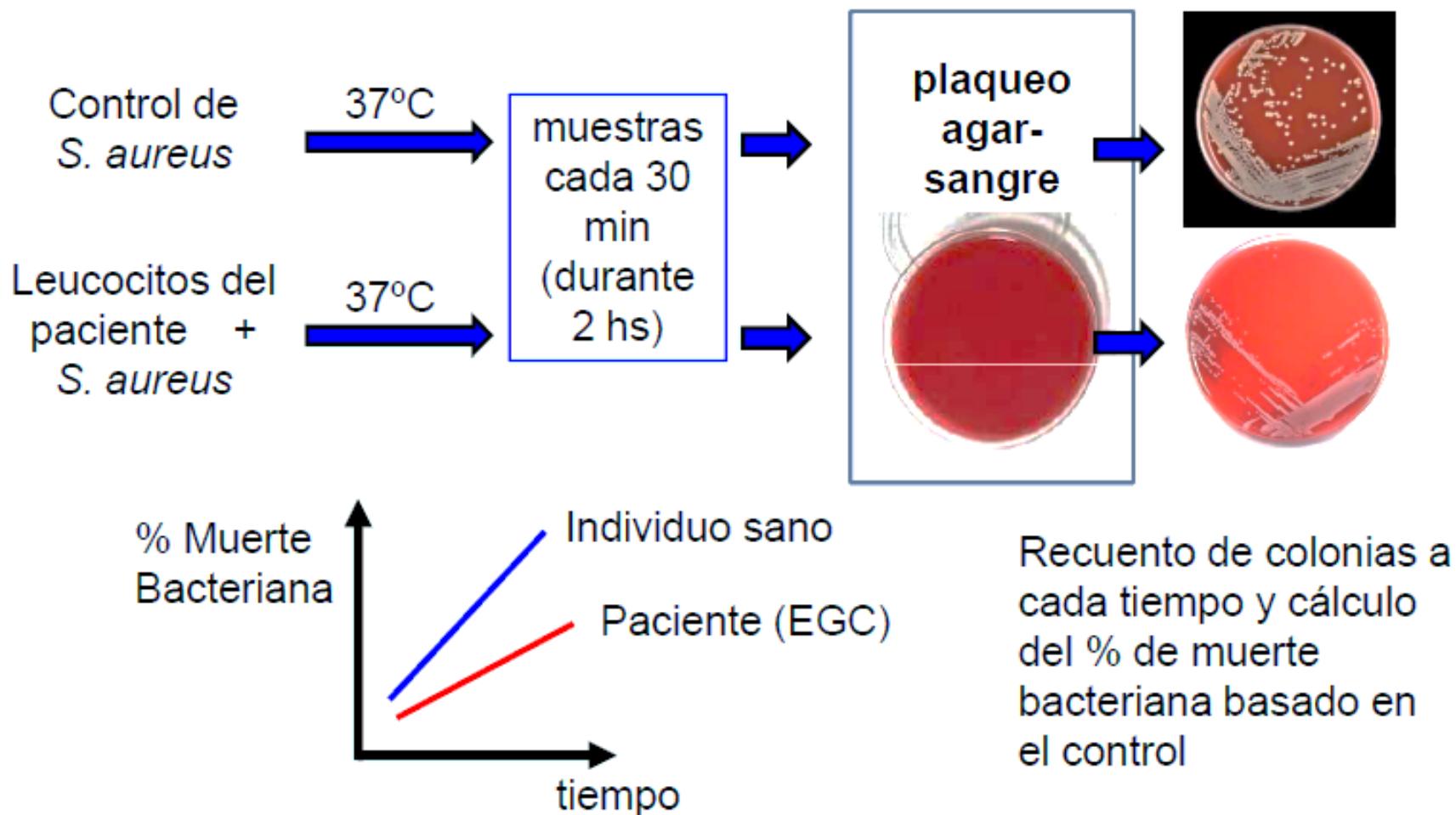
Madre



Técnica cuantitativa

Estudio funcional

Evaluación de actividad bactericida



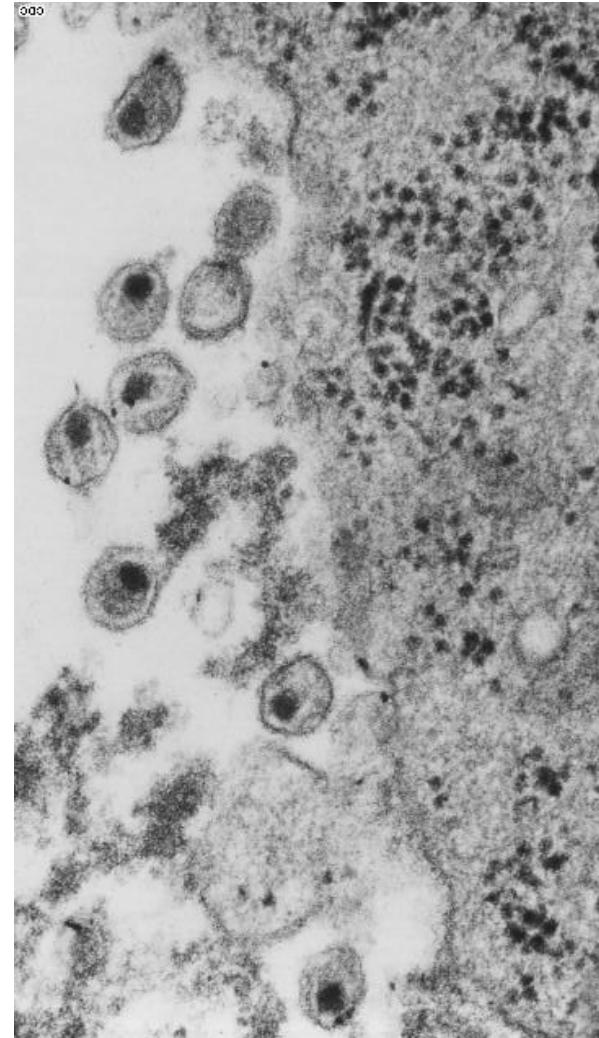
Técnica cuantitativa

Estudio funcional

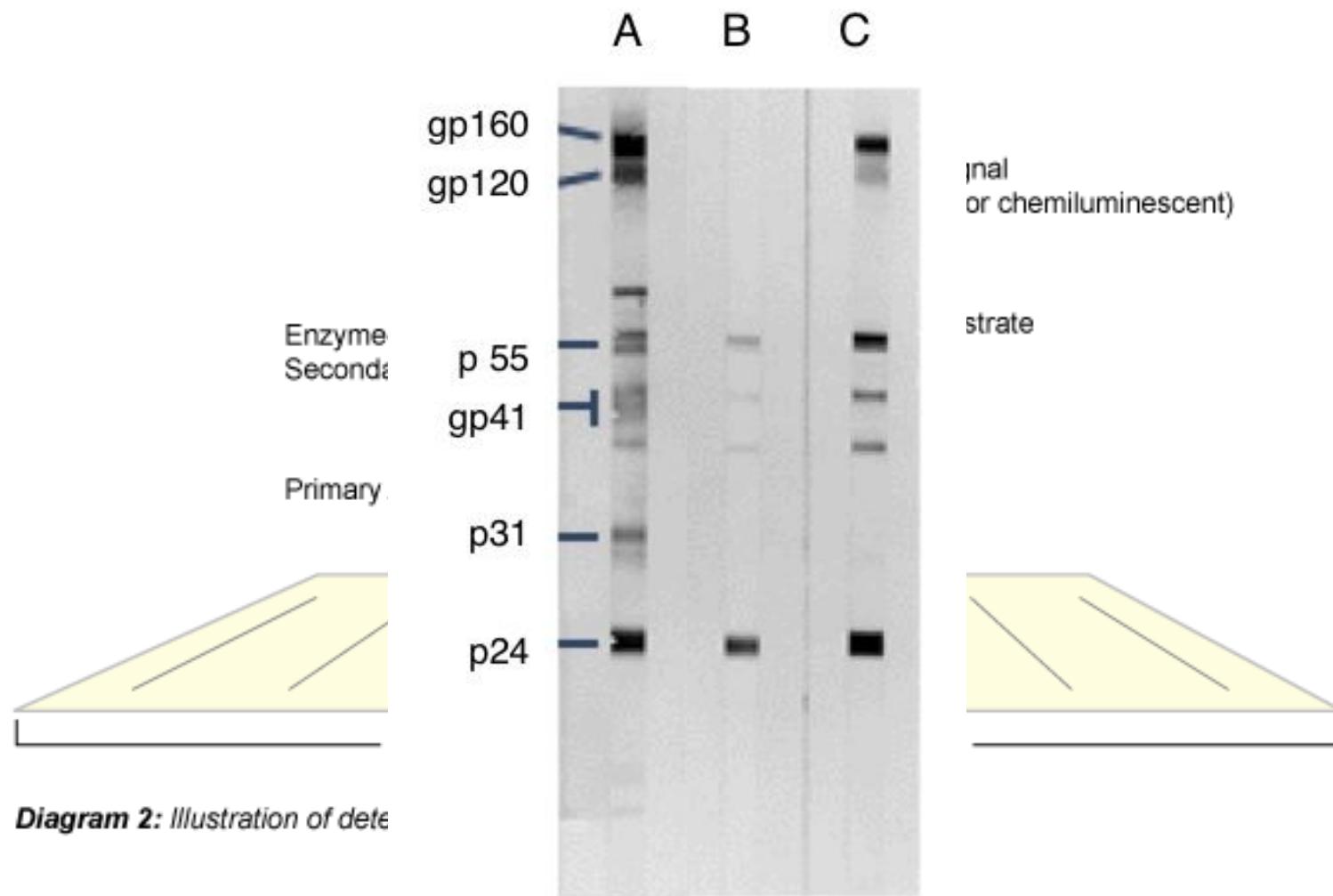
Caso 11

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.

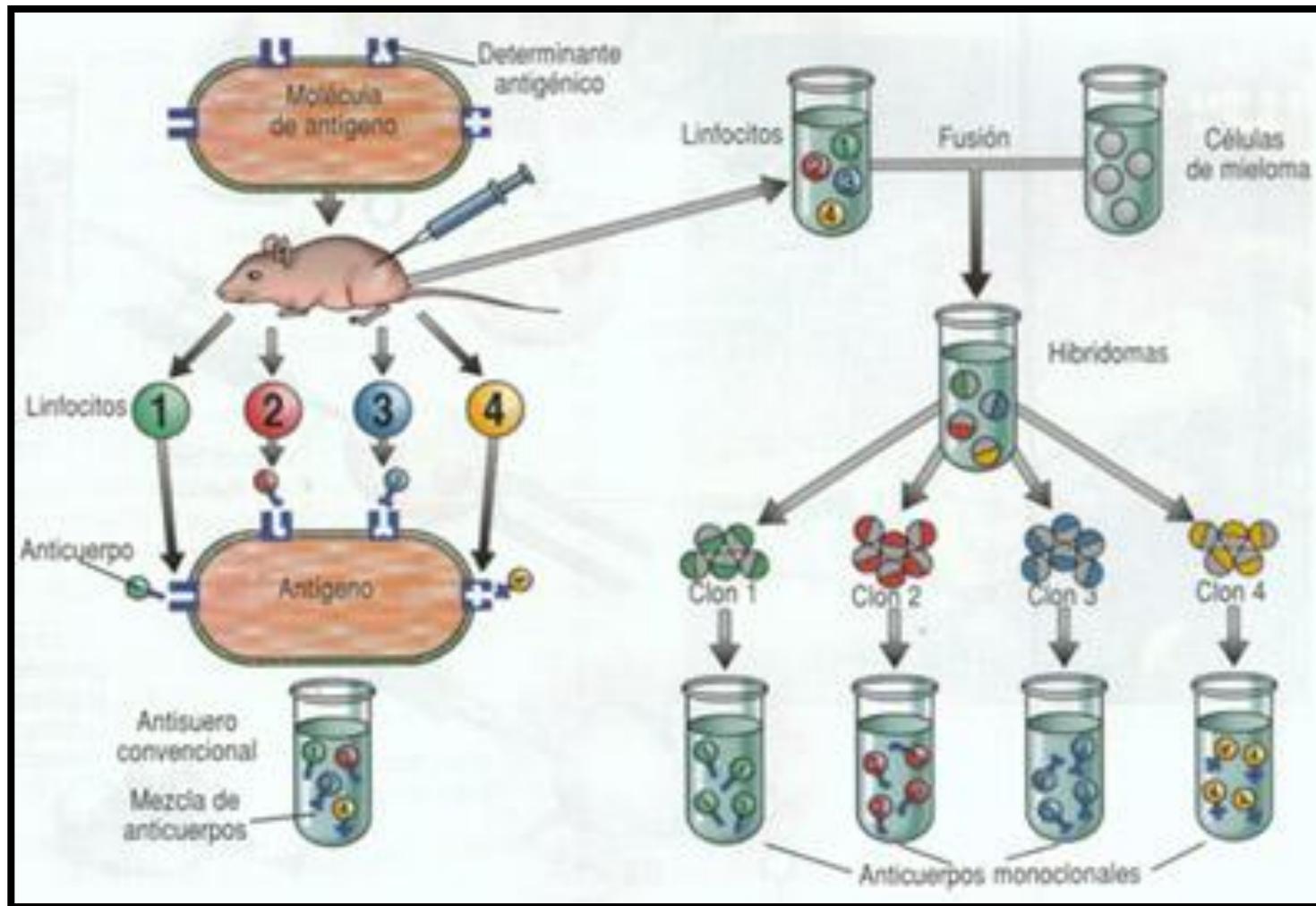
¿Qué otra técnica le permitiría detectar anticuerpos contra distintas proteínas del HIV?



Western Blot

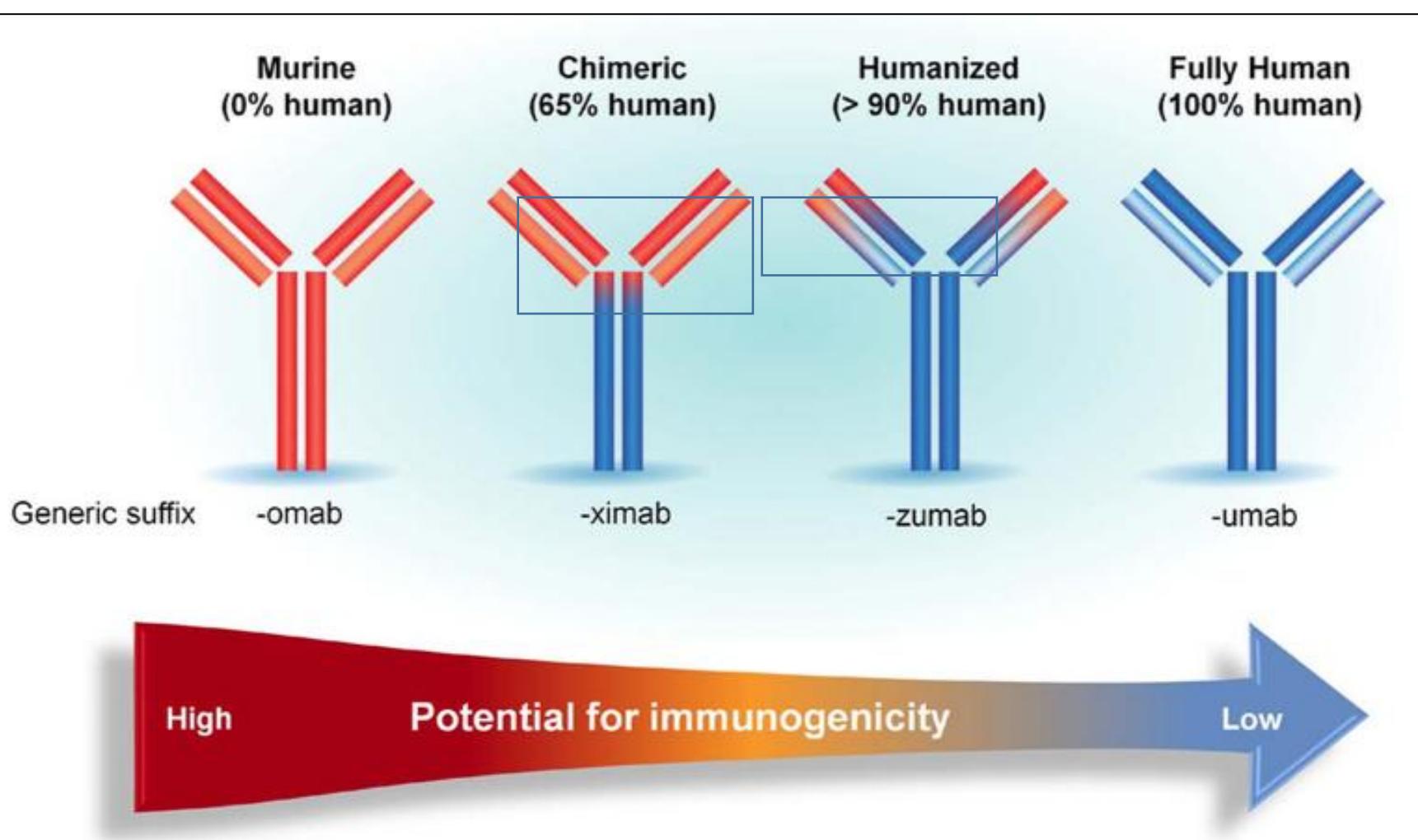


Anticuerpos monoclonales



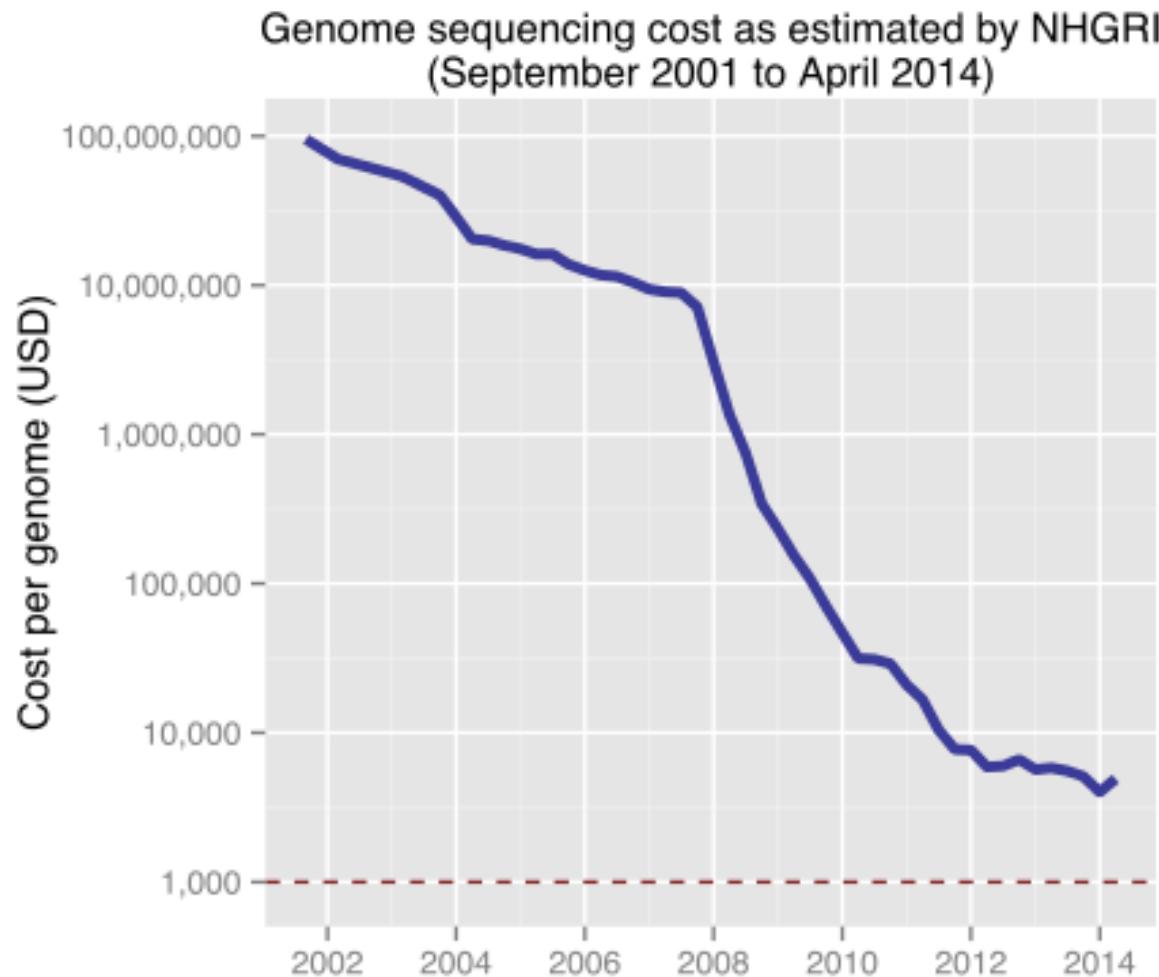
Anticuerpos monoclonales

- **Immortalización 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.**

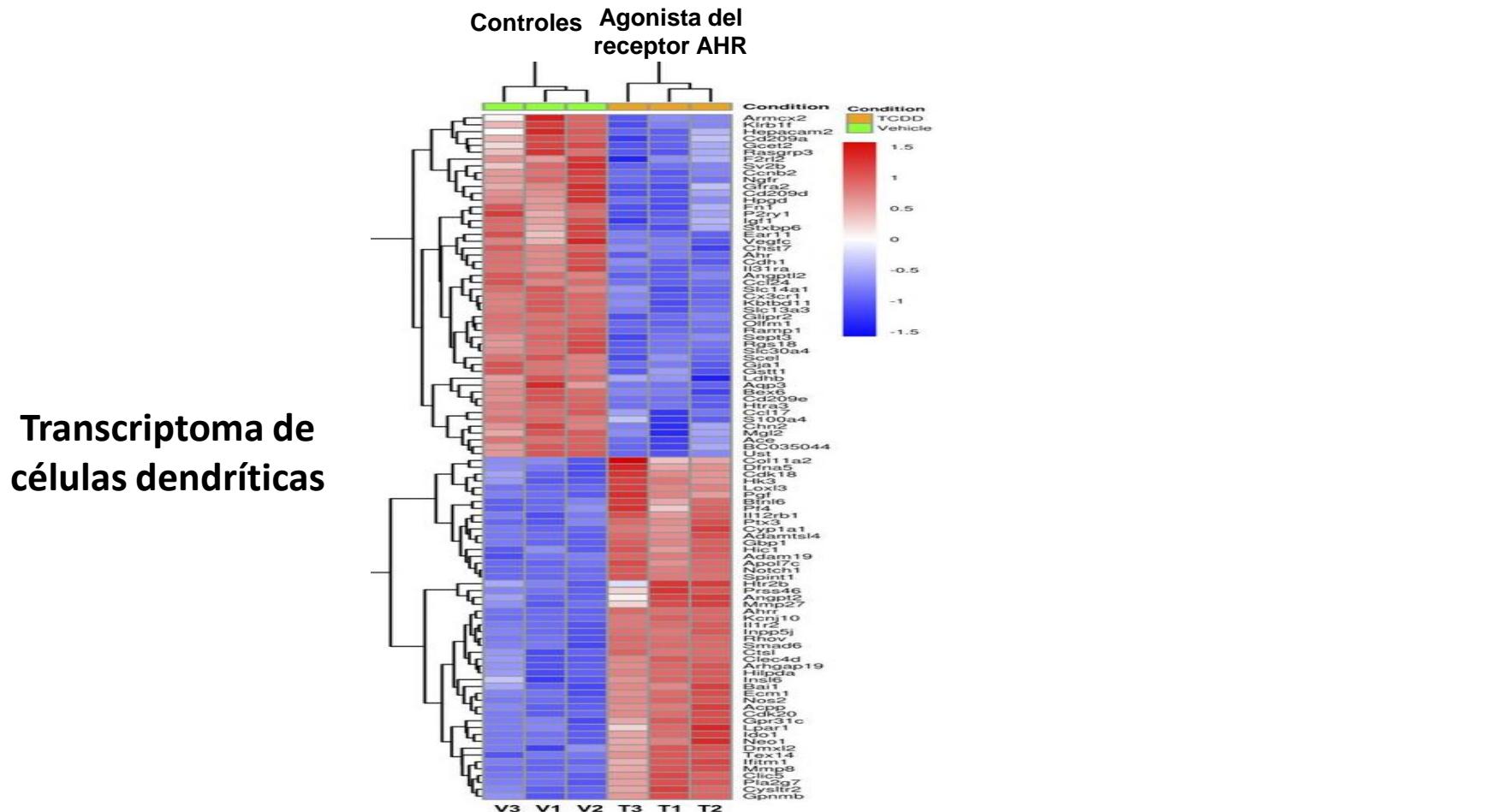


**Nuevas y complejas técnicas.....
cada vez más accesibles**

Secuenciación del genoma humano



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



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