

Alta tecnología en urología

Inmunología

Emilio GÓMEZ DE LA CONCHA y Miguel FERNÁNDEZ ARQUERO

Servicio de Inmunología.

Hospital Universitario San Carlos. Madrid

La Inmunología estudia el sistema de defensa por excelencia del organismo frente a cualquier ataque desde el exterior: el sistema inmunológico. Este funciona mediante células y sustancias solubles que se caracterizan por su gran especificidad, es decir, por su gran capacidad para reconocer y diferenciar unas sustancias de otras; las células con esa capacidad de reconocimiento son los linfocitos y las sustancias solubles los anticuerpos. Por todo ello el sistema inmunológico es considerado fundamentalmente un sistema de reconocimiento.

Esa capacidad para reconocer sustancias y microorganismos es también utilizada en Medicina para el diagnóstico de todo tipo de procesos, a veces «in vivo», casi siempre en el laboratorio. Se utilizan anticuerpos capaces de reconocer antígenos específicos, que pueden encontrarse en el plasma o en cualquier otro fluido del organismo, o formar parte de nuestras células y tejidos, sanos o enfermos; o que pueden servir para localizar microorganismos o cualquier agente o sustancia que ha penetrado desde el exterior. En ocasiones también se emplean antígenos, propios o extraños (fundamentalmente de microorganismos), para detectar la existencia de una respuesta del sistema inmunológico frente a ellos.

Los anticuerpos utilizados en las técnicas inmunológicas son habitualmente producidos en animales, inmunizándolos con el antígeno apropiado. En los últimos años se utilizan cada vez con mayor profusión los anticuerpos monoclonales producidos en el laboratorio mediante la fusión de dos células de ratón (una célula tumoral de mieloma y un linfocito B productor de anticuerpos con la especificidad apropiada). Esta fusión da lugar a hibridomas (clones celulares de crecimiento indefinido «in vitro» y productores de un anticuerpo con una especificidad definida y constante), que han de ser clona-

dos y a continuación testados para seleccionar aquel que produzca el anticuerpo que se adecue más a las características requeridas (Figura 1).

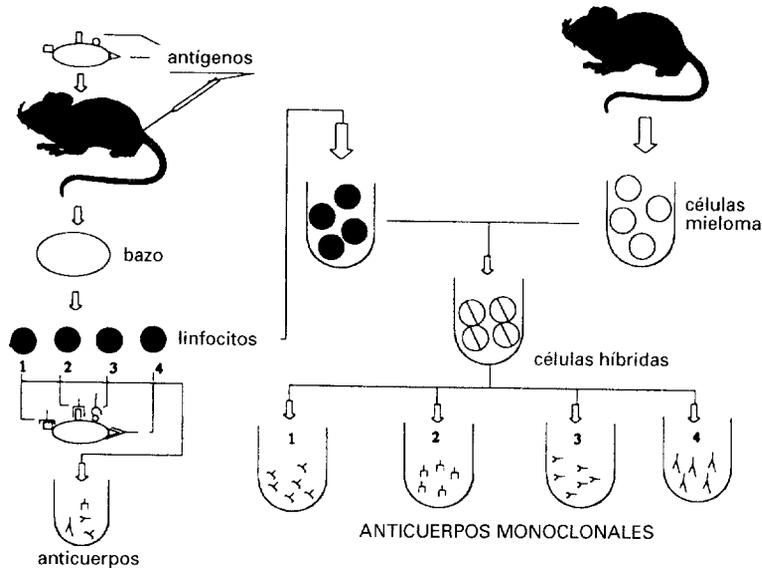


Fig. 1.—Obtención de anticuerpos monoclonales.

Se inmuniza un ratón con el antígeno para el cual se desean producir los anticuerpos monoclonales. Posteriormente se toman los linfocitos B del bazo que en buen número estarán produciendo anticuerpos contra los diferentes determinantes antigénicos del antígeno utilizado en la inmunización. Estos linfocitos son puestos en contacto en un tubo de ensayo con células de mieloma también de ratón en las condiciones necesarias para que las células se fusionen dando lugar a células híbridas que conservan la capacidad de producir anticuerpos con la especificidad de los linfocitos que las han originado y la capacidad de crecer indefinidamente que tenían las células de mieloma. Las distintas células híbridas formadas son separadas y clonadas dando lugar cada una de ellas a un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal y con la capacidad de crecer indefinidamente. De todos estos hibridomas se selecciona aquel o aquellos que tienen la especificidad y afinidad deseada.

Las técnicas inmunológicas propiamente dichas, técnicas por tanto que utilizan para el reconocimiento de sustancias la especificidad de la reacción entre antígenos y anticuerpos, son utilizadas no sólo en Inmunología, sino en otras disciplinas de laboratorio como la Microbiología, la Hematología, la Medicina Nuclear o la Bioquímica.

La tecnología empleada en los laboratorios de Inmunología va encaminada al estudio de los diferentes componentes que participan en la respuesta inmunitaria: solubles (antígenos, anticuerpos, componentes del sistema del complemento y citocinas), celulares (linfocitos, polimorfonucleares, macrófagos) y genes que codifican para moléculas importantes del sistema inmuno-

logico (fundamentalmente genes HLA y aquellos que codifican para los receptores para antígeno en la superficie de los linfocitos).

La mayoría de las técnicas empleadas en los laboratorios de Inmunología son técnicas de la propia especialidad, basadas en la especificidad de la reacción entre antígeno y anticuerpo, pero algunas corresponden a otras ciencias biológicas como los métodos bioquímicos usados para aislar antígenos y anticuerpos o toda la tecnología de biología molecular empleada para conocer la estructura de las moléculas importantes para la respuesta inmunitaria y los genes que las codifican.

VALORACIÓN DE ANTÍGENOS

Los antígenos estudiados mediante técnicas inmunológicas pueden ser propios o extraños. Entre los primeros está cualquier componente del propio organismo, especialmente proteínas que participan de la respuesta inmunitaria: componentes y factores del sistema de complemento, inmunoglobulinas, citocinas...

También se determinan antígenos celulares, de la membrana o del citoplasma, específicos para una determinada estirpe celular. En el laboratorio de inmunología son especialmente importantes los antígenos de diferenciación presentes en la membrana de las diferentes subpoblaciones de linfocitos y que permiten su reconocimiento por citometría de flujo.

Entre los antígenos extraños al organismo, los más importantes para su reconocimiento son los antígenos microbianos, reflejo de la presencia de una infección; los alergenos, que provocan en individuos sensibilizados respuestas del sistema inmunitario que causan enfermedades alérgicas, y los aloantígenos, presentes en los tejidos y órganos de individuos de la misma especie que se desean utilizar para el trasplante.

VALORACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

También aquí pueden ser divididos en anticuerpos dirigidos contra antígenos propios o extraños. Entre estos últimos es muy importante la detección de anticuerpos contra microorganismos (indicadores de la existencia de una infección que ha provocado una respuesta inmunitaria frente a ella); la detección de anticuerpos frente a alergenos que indica la presencia de un proceso alérgico y ayuda a caracterizar el alérgeno causante; y los anticuerpos frente a aloantígenos que de estar presentes en un receptor potencial hacen totalmente desaconsejable el trasplante de un órgano portador de esas especificidades alogénicas.

También tiene gran importancia la determinación de anticuerpos contra numerosos antígenos propios que ayudan en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. Estos, denominados autoanticuerpos, pueden estar dirigi-

dos frente a antígenos específicos de órgano (anticuerpos antitiroideos, anti-isletos pancreáticos, etc.) o presentes en todas las células (anticuerpos antinucleares, antimitocondriales, etc.). Muchos de ellos o la combinación de varios son característicos de determinadas enfermedades autoinmunes y facilitan su diagnóstico.

ESTUDIOS DE INMUNOGLOBULINAS

Util sobre todo en el diagnóstico de inmunodeficiencias humorales, puede también ayudar en el diagnóstico de otras enfermedades a las que se asocian algunos patrones característicos en sangre o en otros fluidos (líquido cefalorraquídeo en esclerosis múltiple).

También son importantes para detectar la aparición de inmunoglobulinas monoclonales en el mieloma y otros procesos linfoproliferativos.

ESTUDIOS DE COMPLEMENTO

Los niveles de los diversos factores y componentes que participan en el llamado Sistema del Complemento pueden aparecer aumentados o disminuidos en numerosas enfermedades, siendo su cuantificación de utilidad para el diagnóstico o el seguimiento de la evolución.

Niveles aumentados de ciertos componentes aparecen en procesos inflamatorios ya que algunas de estas proteínas se comportan como reactantes de fase aguda y su síntesis aumenta bruscamente en esas situaciones.

Sin embargo mucho más importante resulta el detectar la disminución de los niveles séricos o la ausencia en determinados procesos. Esta última, consecuencia de una deficiencia genética aparece raramente. Los descensos en los niveles séricos de algunos componentes debido a un excesivo consumo son frecuentes en todo tipo de enfermedades mediadas por mecanismos inmunitarios en las que la unión entre antígenos y anticuerpos activa el sistema del complemento.

ESTUDIOS CELULARES

El estudio fenotípico de las células, fundamentalmente de las células de los órganos linfoides que son las implicadas en las respuestas inmunitarias, se realizan con la ayuda anticuerpos monoclonales que son capaces de reconocer determinantes antigénicos característicos de poblaciones o subpoblaciones celulares y/o estadios de diferenciación. Los antígenos presentes en la superficie de los linfocitos y que sirven como marcadores han sido clasificados con todo detalle bajo la denominación de CD (grupo de diferenciación) más un número. Así CD19 y CD20 son marcadores característicos de los lin-

focitos B y CD3, CD4 y CD8 de linfocitos T y de sus dos principales subpoblaciones. Estos estudios se realizan en células en suspensión procedentes fundamentalmente de sangre periférica, y también en tejido mediante estudios inmunohistoquímicos.

También pueden ser reconocidos mediante anticuerpos monoclonales antígenos tumorales que ayudan a caracterizar tumores de muy diversas estirpes.

Los estudios de linfocitos no se limitan a reconocer su estirpe y estadio de diferenciación (estudios fenotípicos), sino que también se realizan estudios funcionales valorando «in vitro» en cultivos de corta duración la capacidad funcional o de respuesta frente a estímulos de diverso tipo de las diferentes poblaciones.

METODOLOGÍA EMPLEADA

La mayoría de las técnicas utilizan la capacidad de unirse específicamente entre sí que poseen los antígenos y los anticuerpos. Así, mediante un anticuerpo de especificidad conocida, podemos detectar la presencia del antígeno correspondiente y mediante un antígeno conocido podemos investigar la existencia de anticuerpos frente al mismo.

Precipitación en geles: Para detectar la existencia de la unión entre el antígeno y el anticuerpo se han utilizado diversos métodos. Los más antiguos dependen de la capacidad que tienen los complejos entre antígeno y anticuerpo para precipitar después de haberse formado. Esto ha servido para detectar en geles después de dejarlos difundir en ellos (técnicas de inmunodifusión doble) o tras el paso de una corriente eléctrica que los separe por sus cargas (inmunoelectroforesis).

Las técnicas de precipitación en geles pueden servir no sólo para detectar el antígeno o el anticuerpo sino para cuantificarlos en función del tamaño, localización y características del complejo precipitado (inmunodifusión radial). Hoy día estas técnicas en geles tienden a ser sustituidas por técnicas en fase líquida en las que antígeno y anticuerpo al combinarse forman una turbidez que pueden ser medida por la dispersión de una fuente luminosa incidente. Esta medición se realiza en un nefelómetro y tiene la ventaja de poder ser automatizada.

Inmunofluorescencia: Los colorantes fluorescentes como la rodamina y la fluoresceína pueden ser acoplados con facilidad a anticuerpos sin que estos pierdan su especificidad. Haciéndolos reaccionar sobre células o tejidos se puede detectar fácilmente en ellos la presencia del antígeno.

En muchas ocasiones lo que se quiere conocer es la especificidad de autoanticuerpos presentes en el suero de enfermos. En esos casos se utilizan técnicas llamadas de inmunofluorescencia indirecta en las que el suero del enfermo se pone en contacto con cortes de tejido, a los que se uniran los anticuerpos presentes en el suero y que tengan especificidad para antígenos presentes en dichos tejidos (antinucleares, antiislotes pancreáticos, etc.). Pos-

teriormente, y después de lavar, se incuba el tejido con anticuerpos contra inmunoglobulinas humanas marcados con el colorante fluorescente que irán a unirse a los anticuerpos que hayan encontrado su antígeno en el corte de tejido. La visualización posterior con un microscopio de fluorescencia permite conocer si existían anticuerpos en el suero y su especificidad por la localización del lugar de unión en el tejido.

En células que permanecen vivas y en suspensión en un medio líquido los anticuerpos no pueden atravesar su membrana, y por tanto sólo pueden quedar unidos a antígenos presentes en ella. Este método, utilizando anticuerpos monoclonales marcados con colorantes fluorescentes dirigidos contra los antígenos de membrana que caracterizan a las diversas subpoblaciones de linfocitos y sus estadios de diferenciación, es utilizado para reconocer el fenotipo de estas células en sangre periférica o en cualquier otro fluido. Aunque la lectura puede hacerse en microscopio, habitualmente se realiza en un citómetro de flujo que permite por un lado una mayor rapidez y un importante grado de automatización y por otra la determinación del tamaño y características de las células así como una cuantificación de la fluorescencia presente en su membrana.

El citómetro de flujo permite también la separación de subpoblaciones celulares que posean en su superficie un antígeno de diferenciación, mediante el reconocimiento de este por la unión de un anticuerpo monoclonal. El aparato logra fraccionar la corriente de líquido en muy pequeñas gotas, cada una de ellas conteniendo una sola célula. Si esta está coloreada por el anticuerpo fluorescente, la gota se carga y posteriormente se desvía por la acción de un campo eléctrico. Esta acción repetida con cada célula marcada a enorme velocidad permite la purificación de grandes cantidades de células de una misma subpoblación en tiempos relativamente cortos (Figura 2).

En los estudios histoquímicos para la localización de antígenos tisulares, los anticuerpos específicos son con frecuencia marcados por otros colorantes: unas veces se emplea biotina para acoplar al antisuero y posteriormente esta se revela con avidina fluorescente. En otras ocasiones son enzimas (peroxidasa, fosfatasa...) los que se acoplan al antisuero y posteriormente se visualizan por métodos inmunohistoquímicos convencionales.

Radioinmunoensayo y enzimoimmunoensayo. Las técnicas de RIA y ELISA se utilizan para la detección de antígenos y anticuerpos en fase líquida. Emplean para ello el anticuerpo o el antígeno específico para aquello que va a ser detectado marcado respectivamente con isótopos radioactivos o con enzimas. Son técnicas muy empleadas por su exquisita sensibilidad y por utilizar muy pequeñas cantidades de reactivos. El ELISA tiene la ventaja de no utilizar productos radioactivos por lo que va sustituyendo cada vez más a las técnicas de RIA.

Inmunotransferencia sobre membranas (Immunoblotting). En ocasiones, si el antígeno no está purificado, la única forma de conocer la especificidad de un anticuerpo es haciéndolo reaccionar con el antígeno después de que éste ha sido separado con el empleo de electroforesis en geles y transferido a membranas (Figura 3).

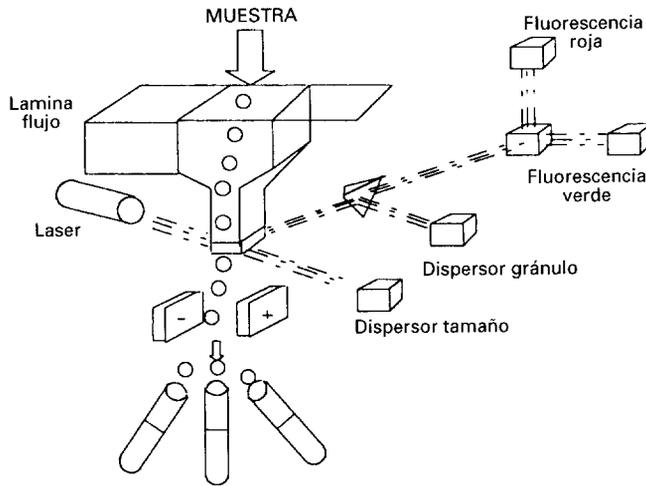


Fig. 2.—Citómetro de flujo.

Las células tras ponerse en contacto con antisueros monoclonales fluorescentes dirigidos contra antígenos específicos de la superficie celular pasan a la cámara de flujo donde de una en una son iluminadas con un rayo láser para medir en cada una su granulosidad y su tamaño y la presencia de fluorescencia roja y/o verde. Las diferentes poblaciones celulares pueden ser separadas mediante cargas positivas o negativas dependiendo de su tinción con los antisueros monoclonales.

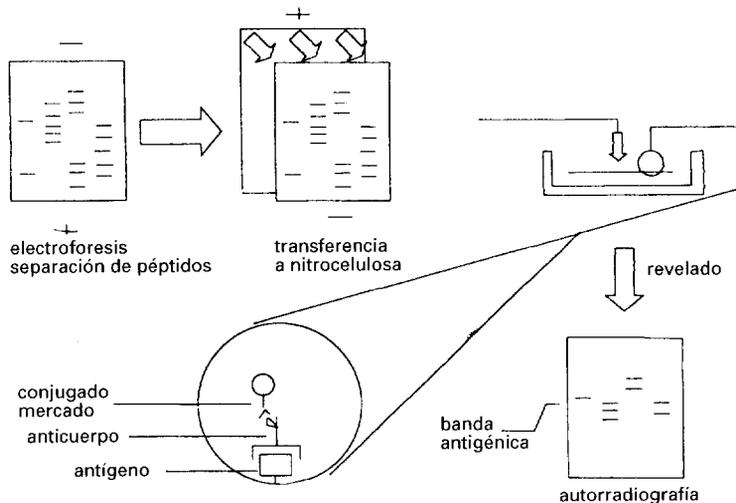


Fig. 3.—Inmunotransferencia sobre membranas.

Los diferentes péptidos del antígeno son separados por carga mediante electroforesis en un gel, y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa. En tercer lugar se añade el anticuerpo y después de lavar, un antisuero marcado para poner de relieve donde se ha unido el anticuerpo. Finalmente se revela mediante autorradiografía o visualizando las bandas por métodos enzimáticos.

Técnicas de biología molecular. El reconocimiento con un elevado grado de precisión de productos importantes en la respuesta inmunitaria y de su producción por determinadas células puede ser realizado ventajosamente mediante el reconocimiento de los genes que lo codifican. Así estudio de ADN o de mRNA son cada día más empleados en los laboratorios de inmunología para el tipaje HLA para el trasplante, por su asociación a numerosas enfermedades y para conocer la producción de citocinas por determinadas células.

Son fundamentalmente técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de estudio del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) las más empleadas. La PCR permite la amplificación de pequeños fragmentos de ADN a partir de mínimas cantidades de muestra, sin necesidad de aislarlos previamente (se logran amplificaciones de hasta un millón de veces en pocas horas), pudiéndose así detectarlos fácilmente siempre que se conozca su secuencia (Figura 4).

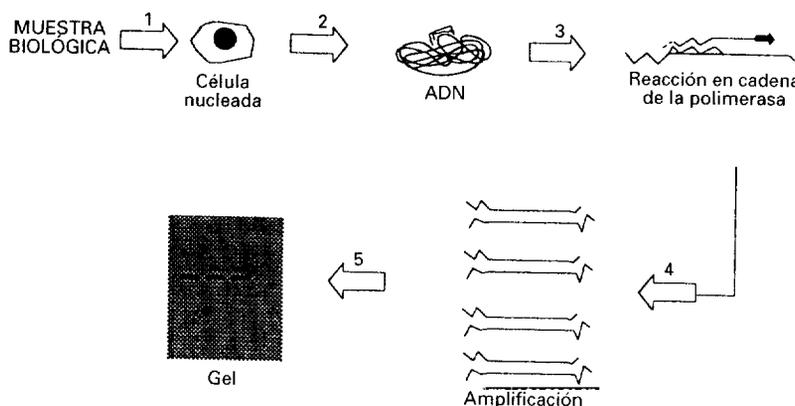


Fig. 4.—Reacción en cadena de la polimerasa.

Los dos primeros pasos permiten el aislamiento del ADN de las células nucleadas de cualquier tipo de muestra biológica (sangre, tejido...). A partir de mínimas cantidades de muestra de este ADN y conociendo la secuencia del fragmento que se quiere estudiar, se amplifica este mediante una reacción en cadena del enzima Taq polimerasa. La comprobación de la existencia de la secuencia buscada se realiza bien corriendo el producto obtenido en un gel y viendo la aparición de un fragmento amplificado del tamaño adecuado (en el caso de que la reacción se haya realizado con cebadores o «primers» específicos para la secuencia buscada), o bien mediante sondas que hibridan específicamente con el fragmento en cuestión.

Los estudios de RFLP permiten también la localización de genes o secuencias relacionadas, a partir de cantidades pequeñas de ADN que son primero cortadas con enzimas de restricción, posteriormente corridas en gels, y finalmente hibridadas con sondas que permiten dicha localización (Figura 5).

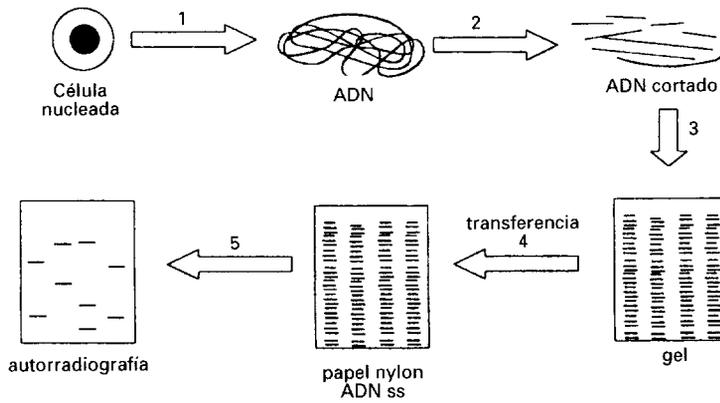


Fig. 5.—Estudio del polimorfismo de fragmentos de restricción.

En un primer paso se extrae el ADN de la muestra biológica. A continuación se fragmenta con la ayuda de enzimas de restricción que cortan el ADN por lugares precisos con una secuencia determinada. En tercer lugar se separan esos fragmentos mediante electroforesis en un gel. Posteriormente se transfieren a una membrana y se fijan a ella. Finalmente se incuban con una sonda marcada que hibrida con una secuencia precisa y se revela mediante autorradiografía para ver la longitud del fragmento/s en los que ha hibridado. El patrón de longitud de estos fragmentos permite deducir la presencia o no de un gen o una mutación en alguna zona en sus proximidades.