

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA

PRUEBAS INMUNOLOGICAS E INMUNOHISTOQUIMICAS EN MEDICINA BUCAL. PARTE II.

por

H. VIÑALS* M. M. SABATER** R. CABALLERO***

BARCELONA

RESUMEN: En este segundo artículo sobre las pruebas inmunológicas e inmunohistoquímicas utilizadas en Medicina Bucal, se revisan los métodos de detección de antígenos o anticuerpos específicos de diversas enfermedades no necesariamente autoinmunes, también las técnicas de identificación de linfocitos T o B, los análisis de las funciones efectoras de los linfocitos, las pruebas de inmunofluorescencia y algunos tests diagnósticos específicos.

PALABRAS CLAVE: Técnicas de laboratorio, inmunología, inmunohistoquímica, Medicina oral.

ABSTRACT: In this second article about the immunological and immunohistochemistry techniques in Oral Medicine, we review the methods for the detection of the specific antigens or antibodies in several diseases that are not always related to autoimmunity, the identification techniques of T or B lymphocytes and the analysis of its functions, the immunofluorescence tests and several specific diagnostic tests.

KEY WORDS: Laboratory techniques, immunology, immunohistochemistry, Oral Medicine.

METODOS PARA LA DETECCION Y ESTIMACION DE Ag o Ac ESPECIFICOS

a) Tests serológicos

Se utilizan de forma específica en la detección de Ac, por ejemplo, los que se producen como respuesta a una infección. Este tipo de pruebas —más simplificadas—, se realizan rutinariamente en un considerable número de laboratorios ⁽¹⁾.

En las **reacciones de aglutinación** el Ag es parte de la superficie de algún material particulado como un eritrocito, una bacteria o una partícula inorgánica (por ejemplo, látex de poliestireno). El Ac añadido a una suspensión de estas partículas se combina con el Ag de superficie y las une para formar **agregados visibles o aglutinados** (Esquema 1). Mientras que el enlace cruzado de Ag proteicos multivalentes con Ac lleva a la preci-

pitación, el enlace cruzado de células o partículas voluminosas con Ac dirigidos contra Ag de superficie, lleva a la aglutinación ^(2,3,4,5,6).

En su forma más simple, las pruebas de aglutinación se realizan en tubos de ensayo de fondo redondo o en cubetas de plaquetas de plástico en pozos redondeados, realizándose diluciones de antisuero en los tubos (sin diluir, 1:2, 1:4, 1:8, etc...). Luego, se añade el Ag particulado dejándose incubar; la aglutinación se observa en el fondo de los tubos. El último tubo que muestra aglutinación visible, es el punto final de la prueba y la dilución del antisuero en este tubo se conoce como **título** del antisuero, y es una medida del número de unidades de Ac por unidad de volumen del suero; por ejemplo, si el punto final de una prueba ocurre en la dilución 1/256 del antisuero, el título es de 256 unidades de Ac por ml de suero ^(2,3,4,5).

La aglutinación es la técnica básica en la tipificación de los grupos sanguíneos A, B, AB y 0 de los eritrocitos. Las partículas inertes como el látex y los eritrocitos recubiertos con diversos Ag, se emplean en diversas

(*) Profesora Asociada de Medicina Bucal.

(**) Médico Estomatólogo. Centro de Asistencia Primaria de Santa Eulalia Sud. Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

(***) Profesor Titular de Odontología Integrada de Adultos

pruebas de diagnóstico hormonal; otra prueba de aglutinación de uso extenso es la reacción de Paul-Bunnell, para el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa. Cuando estas pruebas utilizan eritrocitos, la técnica se denomina *hemaglutinación* ⁽⁵⁾.

Algunas de estas pruebas se basan en la *inhibición de la aglutinación*, inducida por Ac de las partículas recubiertas, y agregando la muestra problema con la hormona que se estudia (Esquema 2). Ciertos virus, por ejemplo los mixovirus —que causan las paperas—, tienen la propiedad de producir hemaglutinación. La *inhibición de la hemaglutinación* por el Ac del suero del paciente, es un procedimiento habitual en el diagnóstico de otras enfermedades virales como influenza, parainfluenza, reovirus y muchos enterovirus. Estas pruebas son muy valiosas debido a su extrema especificidad y a la capacidad de distinguir Ac de varias subcepas y variantes del virus, las cuales no se distinguen en pruebas de Fijación de complemento, que comentaremos seguidamente ^(2,3,5).

La presencia de la globulina-Ac en un eritrocito, en muchas ocasiones no conduce a una aglutinación directa de las células. Sin embargo, es posible demostrar que los eritrocitos están recubiertos por el Ac usando un suero antiglobulina (Esquema 3). Esta es la base de la *prueba de Coombs*, de amplia utilización en las pruebas serológicas ^(5,7,8). El empleo de Ac del tipo Ig M con cinco lugares de enlace, hace que resulten más efectivos como agentes aglutinantes respecto a las Ig G con sólo dos posibilidades de enlace.

Las *pruebas de fijación del complemento* se basan en el hecho de que un Ac al combinarse con un Ag, es capaz de activar el sistema de complemento (C'). Con la mayor parte de los Ag, la reacción del sistema de C' con el complejo Ag-Ac, no causa por sí sola un efecto visible, y es necesario usar un indicador que consiste en eritrocitos de camero recubiertos con Ac-antieritrocitos. *El C' tiene la propiedad de lisar* las células recubiertas con Ac. En un análisis, primero se mezcla el Ac, el C' y el Ag, y tras un período de incubación, se agrega el indicador compuesto por eritrocitos de camero recubiertos de Ac. Sin embargo, como durante el período de incubación el C' es captado por el complejo Ag-Ac original, no está disponible para lisar a los eritrocitos. Por lo tanto, una *prueba* positiva de fijación de C' está indicada por la ausencia de lisis de los eritrocitos, en tanto que en una *negativa* —donde hay C' sin usar— se observará *hemolisis* ⁽⁵⁾ (Esquema 4). Así, la medición más simple consiste en determinar la concentración de suero que produce la lisis del 50% de una preparación estandarizada de eritrocitos sensibilizados con Ac; se lleva a cabo en tubos o micropocillos, mediante la técnica de hemolisis radial simple, similar a la inmunodifusión radial simple (7).

Esta prueba se emplea como una forma de demostrar la presencia de un Ac particular en un suero, por ejemplo el Ac de Wassermann en la sífilis; sin embargo, en el diagnóstico de esta enfermedad, esta técnica ha sido reemplazada en gran parte por el análisis del Ac-antitreponema fluorescente absorbido (FTA-ABS) que es muy específico y sensible, pudiendo detectar al Ac en todas las etapas de la infección sífilítica; el ELISA es útil para aplicaciones en gran escala en la serología luética. No obstante, la fijación del C' tiene un uso extenso en la identificación de Ag virales. Las pruebas de fijación del C' se emplean en estudios de rutina para detectar virus en

cultivos de tejido, que han sido inoculados con muestras de sangre, o de líquidos tisulares de seres humanos con infecciones virales probables. En ocasiones, se encuentran reacciones falsamente positivas en la lepra, la tuberculosis, la mononucleosis infecciosa y otras enfermedades febriles, así como en el lupus eritematoso diseminado y en la artritis reumatoide ^(5,9).

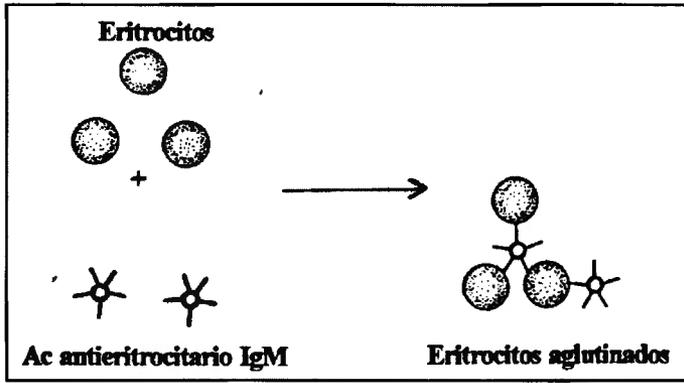
Los *componentes individuales del sistema de C'*, pueden medirse por separado para determinar su nivel total o funcional. Los niveles totales de C' suelen medirse por RIA o por ELISA. Los niveles funcionales se determinan en análisis ajustados para cada componente, preparándose mezclas de hematíes sensibilizados a los que se suman todos los componentes requeridos para su lisis, excepto el que se quiere investigar ^(7,9).

b) Citometría o citofluorografía de flujo

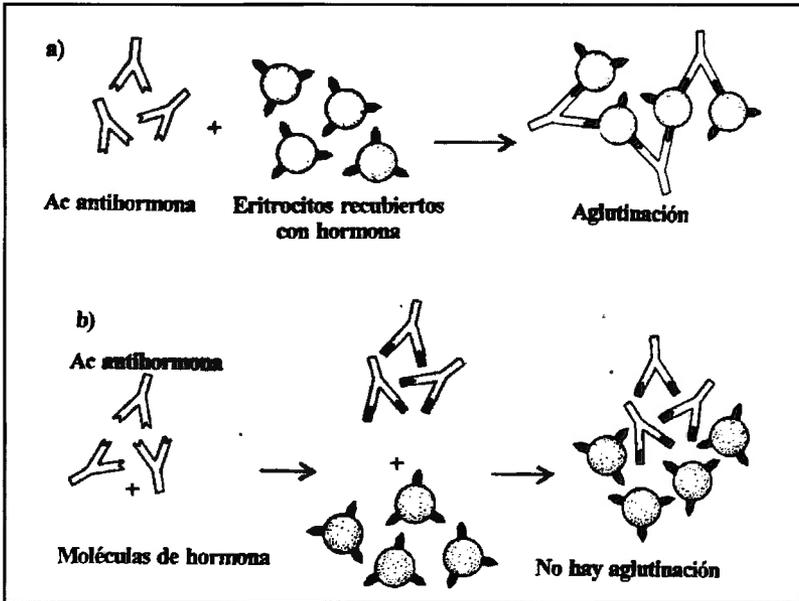
Se emplea para identificar Ag de determinadas células en suspensión. Es útil para la clasificación de células neoplásicas de los procesos linfoproliferativos ⁽¹⁰⁾, así como para el diagnóstico de inmunodeficiencias, tanto primarias como adquiridas, por ejemplo el SIDA. Las células de la muestra se incuban y tiñen con Ac fluorescentes específicos. Se hace pasar estas células incubadas por un haz de rayos láser. Un detector colocado perpendicularmente a este haz, recoge la intensidad de la señal, mientras otro registra el tamaño de las células por dispersión del rayo de luz. Puede medirse además del tamaño, la cantidad de cromatina nuclear y la reactividad de los receptores antigénicos de superficie con los Ac fluorescentes unidos a las células, mediante un sistema de contaje celular conectado a un computador ^(4,6,7,11).

Con la utilización de Ac monoclonales, esta técnica permite la detección de Ag presentes en las membranas celulares, que definen la estirpe celular y el estadio de diferenciación en que se hallan. Muchos Ag de células T pueden ser considerados como Ag de diferenciación. La nomenclatura que se emplea para ellos varía según el investigador y el suministrador comercial de los correspondientes antisueros. Se considera, en general, que varios de los Ag, definen subpoblaciones funcionales de linfocitos, por ejemplo, las células colaboradoras (T₄) o las supresoras (T₈). Es posible que algunos de estos Ag no sean tan funcionalmente distintos como en un principio se pensó, pero la relación entre células definidas por Ag colaboradores (T₄) y supresoras (T₈) ha probado su utilidad en la valoración de determinadas enfermedades, como es el caso del SIDA y el Lupus Eritematoso Diseminado (LED). Las células T₄ y T₈ pueden medirse marcando primero las células T con Ac monoclonales marcados con fluoresceína y contarlas después al microscopio, o con citometría de flujo. El recuento celular permite el análisis de sangre completa y de las células aisladas, además del de pequeñas poblaciones celulares, con mayor facilidad y precisión. También pueden utilizarse los Ac monoclonales en tejidos tras marcar dichos Ac con enzimas ⁽¹¹⁾.

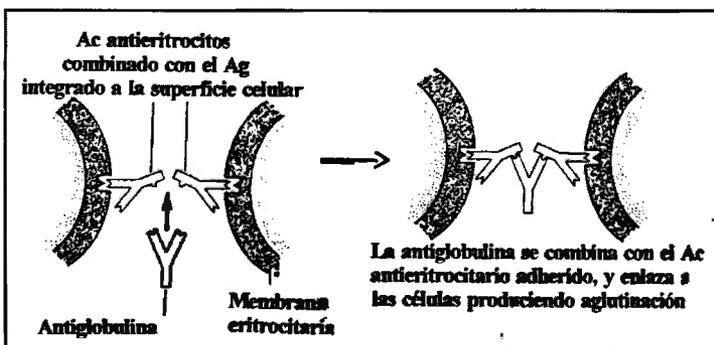
Según una ampliación reciente de la técnica de citofluorografía, las células ligeramente fijadas con glutaraldehído, se tornan permeables al Ac, de manera que los Ag intracelulares pueden ser captados por Ac fluorescentes. El advenimiento de la fluorescencia tricolor, permite visualizar una combinación de tres Ag superficiales y/o intracelulares distintos, individualmente en cada célula ⁽⁴⁾.



Esquema 1
Reacción de aglutinación



Esquema 2
Inhibición de la aglutinación



Esquema 3
Prueba de Coombs

IDENTIFICACION DE LINFOCITOS T o B

Estas pruebas dependen de las características inmunológicas y de las diferencias ultraestructurales entre los dos tipos de linfocitos (Esquema 5) ^{2,3,12}. A menudo estos tests utilizan células previamente sensibilizadas, por ejemplo, linfocitos T previamente sensibilizados a los Ag de superficie de los eritrocitos ⁽¹⁾. Actualmente, se dispone de métodos para separar un gran número de linfocitos y las subpoblaciones específicas de éstos como es la separación por gradiente de densidades, la formación de rosetas y la recolección de placas.

La *separación por gradiente de densidades* se basa en la diferencia de densidades de los linfocitos, en comparación con otras poblaciones celulares y se emplea para aislar la mayoría de los linfocitos de la sangre. La *formación de rosetas* y la *recolección en placas* se usan para aislar subpoblaciones linfocitarias. Un método para preparar linfocitos se basa en la elaboración de líneas antígenoespecíficas de células T, que pueden propagarse durante un largo período ⁽⁷⁾.

ANALISIS DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LOS LINFOCITOS

Las principales funciones efectoras de los linfocitos comprenden la producción de Ac, la estimulación linfocitaria, la producción de linfocinas, la citotoxicidad y, mediante las células T, la cooperación y la supresión. Como análisis in vivo de la función, puede utilizarse las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada.

a) Células productoras de Ac (linfocitos B)

Se miden por *análisis celular de formación de placas*. Se valoran las células productoras de Ac al mezclar la población problema, —en la que supuestamente existen tales células— con hematíes sensibilizados con el Ag específico. Tras la incubación, los hematíes que rodean a las células secretoras de Ac, quedan revestidas de Ac y pueden ser lisadas al añadir complemento. Con una modificación de esta misma técnica, es posible identificar separadamente a las células productoras de IgG e IgM específicas para un antígeno, así como averiguar el número total de células productoras de Ac. Es posible también la identificación de células productoras de Ac mediante su siembra en una placa revestida de Ag, que luego se procesa como para un ELISA. Las células productoras de Ac depositan éste a su alrededor sobre las placas, pudiéndose visualizar como un pequeño punto coloreado, por la adición de cromógeno (análisis de micropuntos) ⁽⁷⁾.

b) Tests de transformación linfocítica o blástica (TLT) (linfocitos T)

En ellos se valora in vitro la capacidad funcional o de respuesta de los linfocitos de un individuo, midiendo la transformación de linfocitos T sensibilizados a linfoblastos o inmunoblastos T, al estimularlos con Ag específicos, mediante técnicas fáciles. La más utilizada es la respuesta a las lectinas vegetales, como la fitohemaglutinina (PHA); se cultivan linfocitos con diversas concentraciones de PHA, valorándose la proliferación de los mismos a los 3 y 7 días, contando la transformación de células T en células blásticas por observación morfológica en un microscopio o midiendo la captación de Timidina radiactiva (aminoácido que puede ser incorporado en el núcleo celular durante la mitosis) por estas células blásticas ^(5,8,9,11,12). El núcleo de las células transformadas, se vuelve radiactivo y puede ser detectado por el uso de una emulsión fotográfica depositada en la

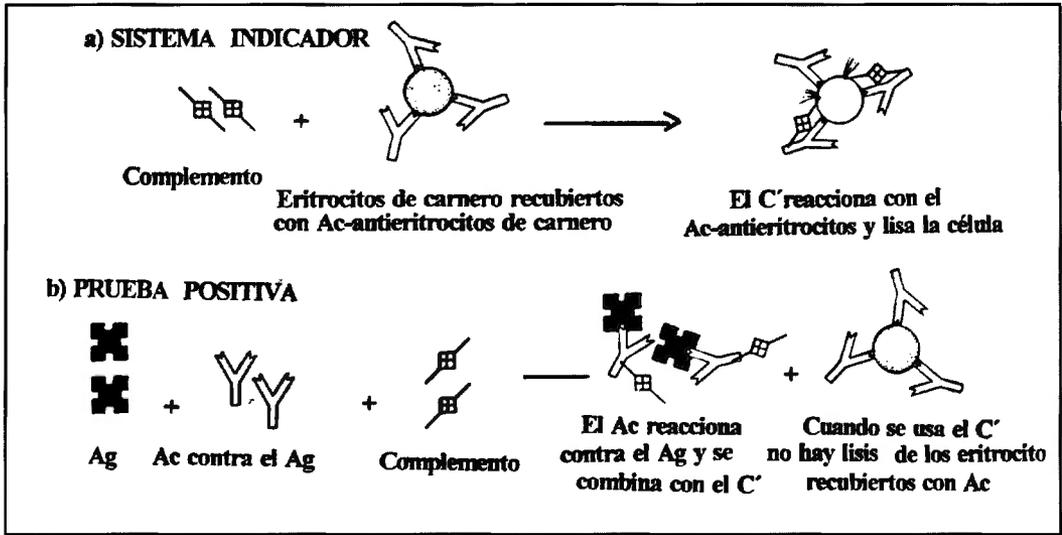
preparación del microscopio o recolectando las células sobre un disco de filtro, en una cámara líquida contadora de escintilación ⁽¹⁴⁾. Se calcula lo adecuado de la respuesta de los linfocitos del paciente comparándola con la obtenida de los linfocitos de una población normal (Esquema 6). En otras situaciones puede hacerse una prueba de transformación con Ag específicos a los que se piensa que el individuo está sensibilizado. En los resultados del test, una transformación escasa de linfocitos, indica una alteración de la inmunidad —primaria o secundaria— mediada por células, en tanto que en ciertos estados de hipersensibilidad, puede haber un aumento de la transformación, en presencia del Ag específico, por ejemplo, en las alergias medicamentosas ⁽⁵⁾.

Los resultados de esta prueba se deben interpretar con precaución, debido a que puede mostrar una considerable variación de un día a otro y estar sujeta a artefactos técnicos. Una respuesta pobre a mitógenos, puede ser inespecífica y aparecer transitoriamente en cualquier enfermedad, o tras una intervención, traumatismo, embarazo o en ciertos estados inflamatorios crónicos. Una falta de respuesta a un Ag específico también puede deberse a que el paciente no ha estado expuesto al Ag. Sin embargo, en pacientes con déficit celular inmunitario clínico, manifestado por una respuesta pobre frente a uno o más agentes infecciosos, el TLT frente a Ag específicos, puede constituir un indicador muy sensible, lográndose resultados consistentes ⁽⁹⁾.

c) Detección de linfocinas (linfocitos T)

Las linfocinas son moléculas (proteínas o glicoproteínas de bajo Pm) distintas de los Ac producidas por los linfocitos ⁽⁴⁾. Se liberan durante la transformación linfoblástica. Cuando una suspensión de linfocitos obtenidos de un paciente que ha desarrollado una inmunidad mediada por células contra un Ag determinado se incuba con éste Ag, los linfocitos específicamente preparados sintetizan DNA y se transforman en inmunoblastos. Durante este proceso el medio de cultivo adquiere unas propiedades que indican la secreción de unos factores solubles: son las linfocinas ⁽¹⁾.

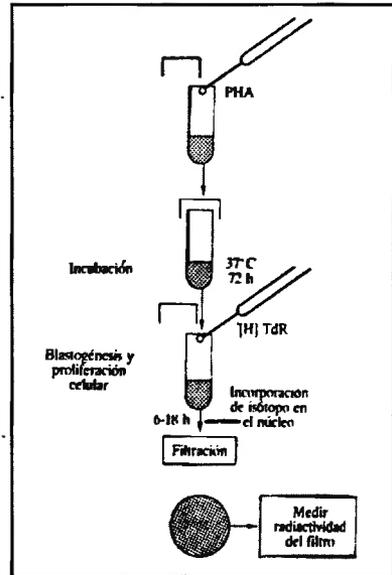
Conocemos distintos tipos de linfocinas, como el factor quimiotáctico de monocitos o de macrófagos, el factor inmovilizador de macrófagos, el factor activador de los macrófagos, etc., pero sólo algunas tienen utilidad en el laboratorio clínico. Una de ellas es el *Factor de*



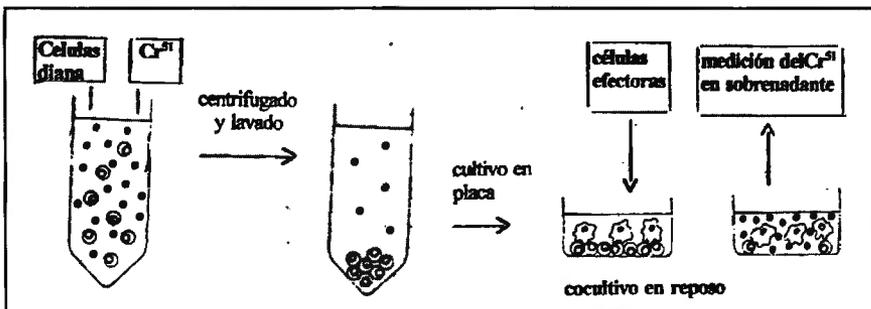
Esquema 4
Prueba de fijación del complemento

- LINFOCITOS**
- Ig de superficie
 - Receptores para el fragmento Fc de la Ig
 - Receptores C3b del C'
- LINFOCITOS T**
- Receptores para los eritrocitos de carnero (Test de las rosetas)
- RESPUESTA A MITOGENOS**
- Endotoxinas bacterianas (linfos B)
 - Mitógeno de Pokeweed (PWM) (linfos TyB)
 - Fitohemaglutinina (PHA) (linfos T)
 - Concanavalina A (con- A) (linfos T) (CD8)
 - Aglutinina de lenteja (LCA) (linfos T)

Esquema 5
Identificación de linfocitos T o B



Esquema 6
Test de transformación linfocítica



Esquema 7
Citotoxicidad

inhibición de la migración (FIE). Se efectúa un sencillo análisis del FIE colocando células mononucleares en un tubo capilar, que a continuación se sitúa sobre una placa de Petri con agar. Las células emigran normalmente del tubo capilar y forman un halo alrededor del extremo abierto del tubo. Si el paciente ha sido sensibilizado frente al antígeno y se añade éste al medio de cultivo, los linfocitos producen FIE y se inhibe la migración de los macrófagos. Si se añade FIE exógeno, también se retrasa la emigración. La reducción de tamaño del halo es directamente proporcional a la actividad del FIE. Esta prueba es menos común que la de transformación linfocítica ^(1,5,12).

La mayoría de funciones conocidas de las linfocinas

ficado de tales sustancias en las enfermedades infecciosas, inmunológicas, neoplásicas y de otros tipos, está aún en estudio ⁽¹¹⁾.

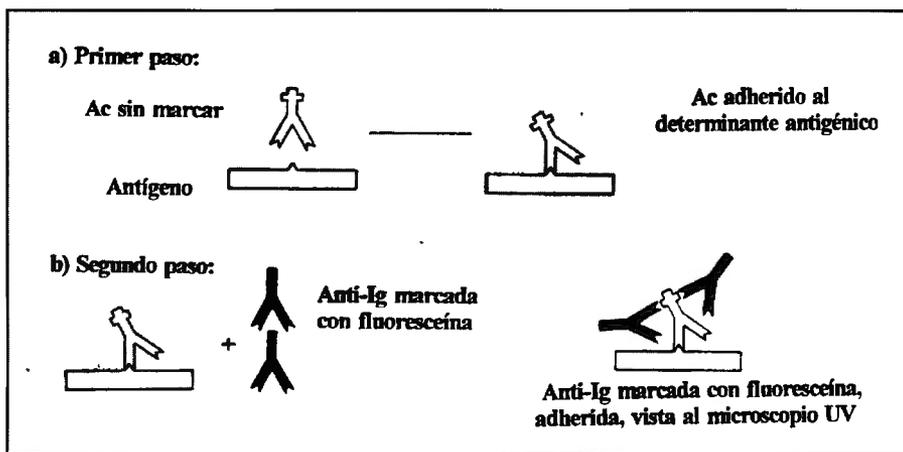
d) Citotoxicidad (linfocitos T)

Los linfocitos T citotóxicos son células efectoras cuya principal misión es proteger al organismo frente a las infecciones virales y bacterianas, así como participar en la eliminación de células tumorales ⁽¹²⁾. Las células T citotóxicas suelen detectarse por su capacidad de lisar a las células diana, lisis que se determina en un análisis de liberación de cromo radiactivo ^(4,7) (Esquema 7).

Todas las células citotóxicas que poseen receptores



Esquema 8
Inmunofluorescencia directa (ID)



Esquema 9
Inmunofluorescencia indirecta (II)

se han encontrado a nivel de experiencias «in vitro», en las cuales se hace interaccionar una determinada linfocina con uno o varios tipos de células. Sin embargo, «in vivo» la secuencia de acontecimientos puede ser totalmente distinta, por cuanto actúa simultáneamente sobre una célula determinada una gran cantidad de señales reguladoras, unas debidas a las linfocinas y otras producidas como consecuencia de las interacciones celulares; además deberemos tener en cuenta que estas linfocinas pueden actuar secuencialmente, induciendo una la producción de otra, que también actuará a nivel celular; a ello añadiremos que las linfocinas pueden actuar entre ellas de forma aditiva sinérgica o antagónica, por lo que los efectos finales a nivel celular forman parte de un extremadamente complicado mecanismo de regulación ⁽¹²⁾.

Los análisis biológicos para la detección de linfocinas son numerosos pero difíciles de realizar. El signi-

ficado de tales sustancias en las enfermedades infecciosas, inmunológicas, neoplásicas y de otros tipos, está aún en estudio ⁽¹¹⁾.

e) Cooperación y supresión

Se valora mediante los análisis descritos anteriormente. La capacidad supresora puede determinarse, por ejemplo, a través de la capacidad para reducir el número de células formadoras de placas, en un determinado sistema de cultivo ^(4,7).

ORGANO-ESPECIFICOS

Anemia hemolítica autoinmune: «Ac tibios y fríos» (Test de Coombs)

Tiroiditis: Auto Ac cél. tiroideas (inmunofluorescencia indir = I.I., hemaglutinación pasiva, inmunodifusión)

Enfermedad de Addison: Ac suprarrenales (I.I.)

Anemia Perniciosa: Ac anti cel parietales gástricas (I.I.)

Síndrome de Sjögren: Ac anti- cel. ducto salivar (I.I.)

Diabetes insulino-dep.: Auto Ac-contra las cél. de los islotes (I.I.)

Miastenia gravis: Ac frente a los receptores de acetilcolina (I.I.)

Enfermedad de Bechet

Enfermedades cutáneas bullosas: Ac frente a elementos de la epidermis: (I.D. de biopsia cutánea)

- Penfigoide bulloso: Ac anti-membrana basal epidérmica
- Pénfigo vulgar: Ac Ac anti-sustancia intercelular epidérmica

NO ORGANO-ESPECIFICOS

Artritis Reumatoide: • ARF

- ANF • Ac anti-dsDNA (II, RIA, ELISA)
- Ac anti-ssDNA (40%) (ELISA)
- Ac anti-histona (20%) (I.I.)

Lupus Eritematoso Diseminado • ANF (95% de casos) (I.I., patrón homogéneo):

- Acanti-dsDNA (70%) (I.I., RIA, ELISA) / Acanti-ssDNA (>90%, ELISA)
- Ac anti-ribonucleoproteína (50%) (ELISA, electrofor. contra corr = cc)
- Ac anti-Sm (30%) (ELISA, cc)
- Ac anti-histona (90% del LES inducido por fármacos) (I.I.)
- Ac anti Ro/SS-A (40%) (cc, ELISA)
- Ac anti-La/SS-B (15%) (cc, ELISA)
- Ac anti-cardiolipina (40%) (ELISA)
- cél. LE, ARF, Ac linfocitotóxicos, Inmunocomplejos circulantes

Lupus Eritematoso Discoide: ANF, ARF, Ac linfocitotóxicos, Inmunocomplejos circulantes

Enfermedad celíaca, Enf. de Crohn, colitis ulcerosa: Ac anti-membrana basal (30-50%)

Enfermedad mixta del tej. conectivo: ANF (I.I., patrón moteado)

Esclerodemia: ANF: Ac anti-RNA (I.I., patrón nucleolar) / Ac anti-Scl70 (30%) (cc, ELISA)

Síndrome de CREST: ANF: Ac anti-Ag del centrómero (70%) (I.I., patrón centrómero)

- Ac anti-ribonucleoproteína (95%) (cc, ELISA)

Granulomatosis de Wegener: Ac anti-citoplasma de leucocitos neutrófilos

Síndrome de Sjögren: ANF: Ac anti-Ro/SS-A (30%) (cc, ELISA) / Ac anti- La/SS-B (50%) (cc, ELISA cél LE, ARF

Polimiositis: ANF: Jo-1 (30%) (cc, ELISA)

Cirrosis Biliar Primaria: Ac antimitocondriales (95% de casos) (I.I.)

Hepatitis Crónica activa: • Ac anti-actinmiosina del músculo liso (I.I.)

- Ac hígado-riñón microsómico o M3 (I.I.)
- ANF: Anti-dsDNA (títulos↓, I.I., RIA, ELISA) / Ac anti-ss DNA (40%, ELISA)
- inmunocomplejos circulantes (actividad anti- C', precipitación...)

Hepatitis infecciosa: Ac anti-actinmiosina (en ocasiones y de forma transitoria) (I.I.)

Infecciones víricas agudas (Hepatitis A, fiebre ganglionar): Ac anti-miosina músculo liso (títulos bajos)

Hemofilia: Ac anti-factor VIII

f) Pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada (linfocitos T)

Son métodos de uso habitual para la valoración clínica del estado de la respuesta celular inmune (reacción de tipo IV de Gell y Coombs). Consisten en la *inyección intradérmica* de determinados antígenos como la tuberculina o la candidina, frente a los cuales la mayoría de la población está sensibilizada; como resultado se produce una reacción anamnésica inflamatoria que empieza a aparecer hacia las 24 h. de la inyección y alcanza un máximo a las 48 h. La prueba está indicada en casos en los que se sospeche una inmunodeficiencia; en este sentido, diversas enfermedades deprimen la reacción de hipersensibilidad retardada, entre las que destacamos el linfoma de Hodgkin, el mieloma múltiple, la leucemia, el linfosarcoma, la sarcoidosis, la enfermedad de Crohn o algunas infecciones crónicas. La falta de reactividad a la prueba es un in-

dicador clínico útil de anergia o disminución de la hipersensibilidad retardada. Además la reacción se emplea en el diagnóstico de la tuberculosis y la lepra, mediante la inoculación de extractos de los microorganismos: tuberculina y lepromina, respectivamente ^(5,11,12).

Otras pruebas cutáneas para valorar estados de hipersensibilidad, aparte de la inyección intradérmica, son las pruebas de *escarificación* y *las de parche*. En las primeras, el material a analizar se coloca sobre la piel y con una aguja se practican escarificaciones. En las pruebas de parche, usadas para valorar dermatitis de contacto, el material es colocado sobre materias absorbentes y se aplica a la piel en forma de parche. Una hipersensibilidad al níquel, por ejemplo, se valoraría con este método ^(5,9). Estas pruebas de respuesta mediada por células frente a los Ag, puede ser reproducida exactamente *in vitro* mediante la prueba de transformación blástica frente al Ag en cuestión, prueba ya comentada en el apartado b).

INMUNOFLORESCENCIA

Es un método muy demostrativo basado en el uso de proteínas marcadas con fluoresceína, que actúan como marcadores fluorescentes. Sus aplicaciones incluyen ^(2,3,4,5,6,7,9):

a) La identificación de la procedencia de diversas proteínas componentes del suero, por ejemplo la producción de inmunoglobulinas por las células plasmáticas.

b) La demostración y localización en los tejidos o en el suero de Ac dirigidos contra Ad que se sabe están presentes en las muestras biópsicas o preparados celulares en varios trastornos inmunitarios, como por ejemplo Ac-antinucleares en el suero de individuos con Lupus eritematoso. Pueden emplearse cortes de tejidos —que contienen gran número de Ag— pudiendo identificar Ac contra varios Ag diferentes en una sola prueba. Los Ag se diferencian según los distintos patrones de tinción.

c) Estas pruebas pueden también emplearse para identificar Ag dentro de las células en suspensión, por ejemplo inmunofluorescencia de esputo/sedimento del LCR, en la investigación de *mycobacterium tuberculosis*.

d) Como auxiliar de diagnóstico es posible demostrar la mayor parte de los patógenos humanos, y el diagnóstico probable puede hacerse en un tiempo mucho menor que con el cultivo. En la actualidad, el método de fluorescencia se utiliza como un complemento, más que en sustitución de los análisis convencionales.

Los métodos de inmunofluorescencia son cada vez más específicos, gracias a la introducción gradual de reactivos estandarizados. Estas técnicas dependen de la combinación de Ac con fluoresceína, de su capacidad de retener la actividad inmunológica, y de la capacidad de fluorescencia de la fluoresceína bajo la luz ultravioleta (UV o luz de Wood) ⁽¹⁾. Son pruebas laboriosas, pero que ofrecen ventajas cuando es necesaria una medición cuantitativa de la concentración de Ac ⁽⁷⁾. Existen tres métodos básicos de inmunofluorescencia: la directa, la indirecta y la determinación sandwich, si bien las dos primeras son las más usuales.

a) **Inmunofluorescencia directa (ID):** En la ID se ponen en contacto Ac marcados con Ag fijados en un portaobjetos (por ejemplo en forma de un corte de tejido biopsiado, o de un frotis del material con el microorganismo), permitiéndoles reaccionar; posteriormente, el exceso de Ac se lava y la laminilla se observa con microscopio de luz UV ^(2,3,5,6,7,9) (Esquema nº 8). Ejemplos de esta prueba podrían ser la identificación en el Pénfigo de Ac específicos marcados con fluorescencia alrededor y entre la capa de células espinosas del epitelio; otro ejemplo podría ser la identificación en el Penfigoide de Ac marcados en la membrana basal de una muestra biópsica ⁽¹⁾.

b) **Inmunofluorescencia indirecta (II):** Este método puede usarse para detectar Ac específicos en el suero y otros líquidos tisulares, y también para identificar Ag. En muchas enfermedades, los Auto-Ac se detectan por II ^(5,9). La prueba consiste en hacer reaccionar el Ag con u Ac específico no marcado. Una vez realizada la reacción, se añade al sistema un segundo Ac anti-inmunoglobulina marcado con una sustancia fluorescente ^(2,3,4,6,7,9,12). Se podría ilustrar con un ejemplo: la investigación en el suero de Ac dirigidos contra los tejidos de las glándulas salivales, en pacientes sospechosos de Síndrome de Sjögren. En este caso, los tejidos de glándulas salivales normales —de pacientes sin enfermedad— se hacen reaccionar con el suero de pacientes sospechosos de poseerla. Los Ac del suero se fijarán con los Ag del tejido. Los Ac (IgG) se marcan añadiendo anti-IgG humana (de origen animal) con la fluoresceína. Se observan los complejos Ag-Ac en un microscopio de luz UV ⁽¹⁾ (Esquema nº 9). Existen técnicas de inmunofluorescencia amplificadas por el C'.

Esta técnica tiene varias ventajas. En primer lugar, la fluorescencia es más brillante que en la determinación directa, dado que varias anti-Ig fluorescentes se unen a cada una de las moléculas de Ac presentes en la primera capa. En segundo lugar, dado que el proceso de conjuga-

ción es largo, se ahorra tiempo cuando se estudian varios sueros para la determinación de Ac, ya que sólo es necesario preparar un sólo reactivo marcado, la anti-Ig. Por otra parte, el método presenta gran flexibilidad. Por ejemplo, al emplear conjugados de antisueros contra las cadenas pesadas de las Ig individuales puede determinarse la distribución de Ac entre las varias clases y subclases, al menos en forma semicuantitativa. También puede analizarse la fijación del complemento sobre un corte de tejido por el agregado de una mezcla del primer Ac con una fuente de C', seguido de un reactivo anti-C' fluorescente como segunda capa. Puede obtenerse mayor sensibilidad si se utiliza una tercera capa. Sin embargo, como sucede en la mayor parte de las técnicas inmunológicas, a medida que se incrementa la sensibilidad, se reduce progresivamente la especificidad y resultan esenciales los controles cuidadosos ^(4,7).

c) **Determinación sandwich:** Esta es una técnica de

OTROS METODOS CON Ac MARCADO

De forma análoga a los marcadores fluorescentes para la inmunofluorescencia, se han desarrollado otros métodos basados en el mismo principio, en los que enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa se acoplan con Ac y éstos pueden ser visualizados mediante métodos histoquímicos convencionales, con microscopio óptico o electrónico, para demostrar la ubicación de Ag celulares.

El uso de Ac conjugados con ferritina o con oro

doble capa, diseñada para visualizar Ac específicos. Si por ejemplo se quisiera definir cuántas células de un preparado de tejido linfoide están sintetizando Ac contra polisacárido neumocócico, primero se fijan las células con etanol para impedir que el Ac se elimine por lavado durante el estudio, y luego se tratan con una solución del Ag polisacárido. Tras el lavado se agrega un Ac anti-polisacárido marcado con fluoresceína para localizar las células que ligaron específicamente al Ag. El nombre de la determinación deriva de la observación de que el Ag se ubica entre el Ac presente en el sustrato de la célula y el agregado como segunda capa ⁽⁴⁾.

Estos métodos inmunológicos no son sencillos, son laboriosos y sólo se realizan en laboratorios altamente especializados. De todas formas, alguno de estos estudios pueden ser de gran importancia para asegurar el origen de algunas alteraciones de la mucosa oral ⁽¹⁾.

coloidal, han tenido una amplia difusión como inmunomarcadores opacos a los electrones para el microscopio electrónico. Una técnica nueva que utiliza fragmentos Fab ligados a cúmulos de undeca-oro, permite la localización espacial más exacta de los Ag, y por su pequeño tamaño es capaz de marcar sitios inaccesibles a los inmunomarcadores más grandes. Sin embargo, una clara visualización requiere un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución ^(4,5).

TESTS DIAGNOSTICOS ESPECIFICOS

Existen un determinado número de enfermedades cuyas proteínas específicas, pueden ser detectadas en el suero; aunque su papel —si lo tienen— en el proceso patológico aún no está claro, su presencia puede ser una guía útil, como auxiliar en el diagnóstico ⁽⁵⁾. Algunos de los test empleados en la detección de tales proteínas, se realizan sobre preparaciones microscópicas y se utilizan cantidades mínimas de suero y de reactivos. Entre ellos destacamos el Factor reumatoide, la Proteína C-reactiva, el Factor LE y el Factor antinuclear ⁽¹⁾.

a) El Factor reumatoide (ARF)

En la Artritis reumatoidea (AR) y en otras enfermedades reumáticas, se producen una serie de proteínas específicas en el suero. Estas proteínas se conocen con el nombre de Factor de la Artritis reumatoidea o Factor reumatoide, y están presentes precozmente en gran número de afectados por la enfermedad. Estos factores son auto-Ac anti-gammaglobulinas anormales (gM, IgM, IgA, IgD). Los ARF mayormente detectados son auto-Ac anti-Ig M, en un 90% de los pacientes ^(1,5,9,12).

El Test más usual para detectarlos es el test de aglutinación sobre partículas de látex. Se puede producir una reacción entre el suero del paciente y las inmuno-

globulinas Ig G (de conejo) colocadas sobre estas partículas: Es el *Test de Waaler-Rose*; este test es positivo en el 70% de pacientes, pero es muy específico; dispone de controles positivos y negativos. Un resultado positivo viene dado por el agrupamiento y aglutinación de las partículas de látex ⁽¹⁾. Puede también utilizarse Ig G humana, más sensible (95%), pero menos específica. El ARF es útil como marcador diagnóstico, pero de escaso valor para el control del tratamiento ⁽⁹⁾.

b) La Proteína C reactiva

La proteína C reactiva es una β -globulina cuya función es desconocida ⁽¹²⁾. Sabemos que aparece en el suero de pacientes con reacciones inflamatorias agudas (especialmente en la Fiebre reumática), en necrosis, en tumores y en algunas otras condiciones como la misma artritis reumatoidea ⁽¹⁾.

Los Test usados para demostrarla son similares a los usados para demostrar el Factor reumatoide. Se utiliza también una suspensión de partículas de látex que vienen envueltas —en este caso concreto— por una proteína antihumana C-reactiva (de origen animal). La aglutinación indica un resultado positivo. A menudo, se usa esta prueba para seguir el progreso del tratamiento

de una infección ^(1,5).

c) El Factor LE

En las enfermedades de base autoinmune podemos —en ocasiones— hallar auto-Ac específicos de algún órgano o tejido concreto o bien auto-Ac inespecíficos. Es habitual en el diagnóstico de estas entidades la solicitud de una seriada de test. A menudo un significativo número de estos Ac está asociado a una determinada enfermedad y la alta concentración de un Ac estará relacionada con la mayor afectación de un órgano ⁽¹⁾. En el Esquema nº 10 se resumen los Auto-Ac más importantes de cada entidad como las técnicas usuales para su detección.

El factor LE es un factor serológico órgano-inespecífico encontrado en numerosos casos de Lupus Eritematoso (LE). Es sólo uno entre un gran número de auto-Ac hallados en el suero de estos pacientes. El Factor LE es un *auto-Ac* dirigido *contra el DNA* de las propias células corporales. El test para detectarlo se basa en la aglutinación, pero en este caso, se usan a menudo eritrocitos sensibilizados como indicadores de la reacción ⁽¹⁾.

Este test se utiliza con frecuencia como screening antes de utilizar otras pruebas más completas como son las *células LE* (leucocitos característicos hallados en el

LE). Las células LE son polimorfonucleares que han fagocitado células por Ac anti-nucleares. Estos restos celulares son consecuencia de la acción de un Ac-anti-nuclear —anti-DNA histona— sobre el núcleo de una célula (generalmente un linfocito) a la que, como requisito previo, se le ha alterado la membrana nuclear. Las células LE contienen corpúsculos amorfos basofílicos específicos de esta enfermedad ^(1,13).

El factor LE también se encuentra en la linfogranulomatosis, en la macroglobulinemia de Waldenström, en la poliartritis y en la cirrosis.

d) Los Factores antinucleares o Ac anti-nucleares (ANT o AAN) y otros auto-Ac

El ANF es también uno de los numerosos anti-Ac que pueden hallarse en muchas enfermedades autoinmunes; puede estar presente, junto a otros auto-Ac, en una proporción variable de pacientes, en una serie de enfermedades inmunológicas con manifestaciones orales como el Lupus eritematoso sistémico, el Lupus discoide, el Síndrome de Sjögren, la artritis reumatoide, etc... *Auto-Ac* órgano-específicos pueden ser detectados en la enfermedad de Addison, en la anemia perniciosa, en el Síndrome de Sjögren, en la diabetes insulino-dependiente, etc... (Esquema nº 10) ^(1,5,7,9,14).

CONCLUSIONES

En el diagnóstico de las infecciones y los tumores, la producción de Ac monoclonales ha comportado un rápido progreso en la identificación de los mismos. Las pruebas de fijación de C', el ELISA, las pruebas de aglutinación, el RIA y la inmunofluorescencia son de uso común. Actualmente se están desarrollando métodos muy sencillos y sensibles en la identificación de ácidos nucleicos, aplicables al diagnóstico usando la hibridación y es probable que proporcione una ayuda adicional valiosa al diagnóstico por inmunoanálisis. Aunque lo descrito hasta ahora no se haya detallado con gran

exhaustividad, da una idea general aceptable sobre la realización de las distintas pruebas. Estas técnicas, forman la base de muchos experimentos cuando se usan de forma combinada, ya sea conjunta o secuencialmente. Muchas técnicas complicadas usadas en investigación, son a menudo simples modificaciones de estos sistemas básicos.

Correspondencia:
Dra. Helena Viñals Iglesias
Roger de Flor, 168-170
08013 Barcelona

BIBLIOGRAFIA

1. TYKDESLEY W. R. Immunological investigation. In: Oral Diagnosis. Pergamon Press Ltd, 2nd edition, Oxford 1978; pp: 24-30.
2. FIGUEREDO DELGADO M.A., MEDINA PEÑAFIEL M.T., BOIMORTO PEREZ R. y Cols. Antígenos y Anticuerpos. En: Medicine. Tratado de Medicina Interna 5ª ed., Noviembre de 1991, 97:3839-3842.
3. FIGUEREDO M.A., ALVAREZ R. Y PUCH C. Antígenos, anticuerpos y sus interacciones. En: Medicine. Tratado de Medicina Interna 4ª ed., Noviembre de 1987, 97:4090-4094.
4. ROITT I.M. Reconocimiento del antígeno. En: Inmunología. Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. 7ª ed. Madrid. 1994. pp: 88-105.
5. WEIR D. M. Inmunología. Editorial El Manual Moderno S.A., México, 1990. p: 260-95.
6. IUIS/WHO REPORT. Laboratory investigations in clinical immunology: methods, pitfalls and clinical indications. Clin Exp Immunol 1988; 74: 494-503.
7. ROITT I., BROSTOFF J., MALE D. Inmunología. Ed. Salvat. 2ª ed. Barcelona, 1991. pp: 25.1-25.13.
8. ANDERSON J.R. Patología. Compendio de Anatomía Patológica y Patología General. Ed. Espax. Barcelona 1977: 113-121-156.
9. BROSTOFF J., SCADDING GK, MALE D., ROITT I.M. Inmunología clínica. Mosby/Doyma libros, Barcelona, 1994. pp: 30.1-30.15.
10. BASCONES A., LLANES F. Medicina Bucal. Ediciones Avances Madrid 1991. pp: 206, 208.
11. LOCKEY R.F., BUKANTZ S.C. Fundamentos de inmunología y alergia. Interamericana. McGraw Hill. Madrid 1989. pp: 334-350.
12. BUENDIA GRACIA E. Inmunología. Pregrado. Ediciones Luzán 5, Madrid 1991; pp: 179-181, 214-5,224-8, 234-7, 456, 465.
13. LIENCE E. En: Reumatología. Medicina Interna. Ferreras Rozman Vol. 1, 12ª ed. Editorial Doyma, Barcelona, 1992. pp: 997.
14. HERRERO C., BIELSA I. Connective tissue diseases and the skin. Khamashta MA, Font J, Hughes GRV. Autoimmune Connective tissue diseases. cap. 19. pp: 205-219. Ediciones Doyma, S.A., 1993.