



# *Hacia la evaluación global de la respuesta inmunológica*

## *Towards a Global Evaluation of the Immune Response*

■ M.<sup>a</sup> Aránzazu Rodríguez Caballero

### Resumen

Los diferentes elementos celulares y solubles que componen el sistema inmunológico actúan de forma coordinada en la defensa del organismo. Las citocinas son proteínas que ponen en comunicación las células de este sistema entre sí y con otras células, contribuyendo directamente a la coordinación global de la respuesta inmunológica. Para evaluar su estado funcional hemos desarrollado un método rápido y sensible que permite identificar y caracterizar las células secretoras de citocinas y, simultáneamente, cuantificar los niveles de múltiples citocinas producidas por dichas células, en forma soluble, sin apenas alterar el microambiente celular.

### Palabras clave

Sistema inmunológico. TNF- $\alpha$ . Citocinas. Citometría de flujo.

### Abstract

The multiple cellular and soluble elements that compose the immune system respond as a whole in a coordinate manner for the defence of the organism. Cytokines are proteins that promote the communication amongst immune cells themselves or amongst immune cells and other cells, contributing to coordinate the global response of the immune system. To ascertain its functional status we have developed a rapid and sensitive method for the simultaneous identification and characterization of cytokine-secreting cells and quantitation of the soluble cytokines produced by those cells, without an appreciable alteration of cellular microenvironment.

### Key Words

Immune system. TNF- $\alpha$ . Cytokines. Flow Cytometry.

---

La autora es Licenciada en Ciencias Químicas y desarrolla su trabajo en el Centro de Investigaciones del Cáncer de Salamanca, bajo la dirección del Dr. Alberto Orfao. El método que describe ha sido desarrollado en colaboración con el Dr. Andrés García Montero y ha sido premiado con el "Exceptional Student Award" en el XXI Congreso de la International Society for Analytical Cytology (ISAC), celebrado el pasado mes de mayo en San Diego (California, EE.UU.).

■ Ante cualquier agente extraño que entre en contacto con el organismo, ya sea de origen interno (por ejemplo, células tumorales) o externo (agentes infecciosos), el sistema inmunológico pone en marcha una respuesta basada en el reconocimiento previo de ese agente extraño. El mantenimiento de esta defensa activa implica múltiples tipos celulares y distintos componentes solubles, que deben actuar de forma coordinada para que la respuesta producida sea efectiva y adecuada. Ha de planearse la atracción de las células necesarias al lugar de la alteración y regular la duración y amplitud de la respuesta inmunológica, encauzándola de manera que no sea una respuesta escasa y, por tanto, deficiente, ni desmesurada, que podría resultar lesiva para el propio organismo como ocurre en las enfermedades alérgicas y autoinmunes.

En el control de estos procesos intervienen múltiples moléculas solubles con acción inmunomoduladora, entre las que las citocinas y quimiocinas juegan un papel destacado formando junto a sus receptores, solubles y celulares, una compleja red de comunicación intercelular.

Por tanto, para una evaluación global y eficaz del estado funcional del sistema inmunológico es importante conocer, por un lado, qué células están respondiendo y, por otro, qué señales están transmitiendo a otras células para que la respuesta sea coordinada y efectiva.

El patrón de producción de citocinas se ha utilizado frecuentemente para evaluar el estado funcional del sistema inmunológico. Para su determinación se ha analizado desde la expresión del ARN mensajero hasta las tasas séricas. Para conocer qué células producen estas citocinas, en los últimos años, se han desarrollado técnicas de citometría de flujo que detectan la expresión de las citocinas en el citoplasma, o en una matriz artificial creada sobre la membrana de células individuales; alternativamente, se pueden emplear técnicas de ELISPOT. Sin embargo todas estas técnicas, al inhibir o limitar la secreción de las citocinas, alteran la red de comunicación celular, distorsionando la imagen que captamos del funcionamiento del sistema inmunológico.

Con el fin de poder disponer en un momento concreto de información sobre la respuesta inmunológica, frente a estímulos específicos o inespecíficos y con la mínima distorsión, hemos desarrollado un nuevo método para evaluarla. Éste proporciona información sobre las células respondedoras y, simultáneamente, permite determinar cuantitativamente la respuesta de éstas en relación con las tasas secretadas de múltiples citocinas u otras proteínas solubles.

Para poder identificar específicamente aquellas células que activamente secretan citocinas, nos decidimos por evaluar la expresión de TNF- $\alpha$  como el marcador específico universal, ya que es una de las citocinas más ubicuas (expresada en múltiples tipos celulares incluidas las células del sistema inmunológico productoras de citocinas) y de liberación más temprana tras la activación celular. Esta citocina se expresa como proteína transmembrana, siendo necesaria para su liberación la acción proteolítica de una metaloproteasa de membrana, TACE (TNF- $\alpha$  *converting enzyme*). Para la detección de las células productoras de TNF- $\alpha$  indujimos

una inhibición específica de la acción de este enzima, lo que ocasiona la acumulación progresiva de TNF- $\alpha$  en la membrana plasmática. El inhibidor sintético utilizado no afecta a la liberación del resto de citocinas y la dosis empleada aún permite que la secreción varíe entre un 5% y un 10% del total de TNF- $\alpha$  producido por las células estimuladas. Este hecho, unido a que los análisis pueden realizarse en muestras de sangre total —conservando los componentes autólogos celulares y séricos—, permite mantener la red natural de interacciones entre células y citocinas, a la vez que dota a este método de gran sencillez y rapidez.

Para identificar las células que expresan TNF- $\alpha$  se utiliza un anticuerpo monoclonal específico frente al mismo, conjugado con un fluorocromo muy sensible (ficoeritrina), que será detectado mediante citometría de flujo. Esta técnica, junto con la utilización de anticuerpos monoclonales específicos que permiten la identificación de distintas subpoblaciones celulares, facilita la creación de espacios multidimensionales donde distintos tipos celulares ocupen diferentes posiciones, lo que permite identificar y caracterizar individualmente los subtipos celulares exactos que secretan activamente citocinas. Al mismo tiempo, y en la misma medición, podemos cuantificar las citocinas secretadas mediante un novedoso sistema de inmunoensayo en suspensión. Esta técnica de inmunoensayo utiliza como sustrato de captura específico para cada citocina una población diferente de microesferas fluorescentes, diferenciables entre sí por su emisión de luz roja. Las características de emisión de luz de estas microesferas, en otra longitud de onda (FL2), varían según la cantidad de citocina capturada e identificada por un conjunto de segundos anticuerpos —técnica de sándwich— que incluye reactivos específicos de cada citocina conjugados con un mismo fluorocromo-ficoeritrina. Mediante comparación con curvas de calibrado basadas en la medición de cantidades conocidas de cada citocina en forma soluble podemos determinar su concentración exacta. Al ser los distintos tipos de microesferas, específicas para cada citocina, perfectamente distinguibles entre sí (en función de la fluorescencia roja intrínseca de cada una) y de las células (por su tamaño) podemos realizar el análisis simultáneo de las subpoblaciones celulares que producen citocinas, y la cuantificación de múltiples citocinas secretadas al medio en una única medición.

La especificidad y sensibilidad de este sistema de análisis se ha probado en muestras de volumen pequeño —tan sólo 10-25  $\mu$ l— de sangre periférica, activadas *in vitro* con diferentes estímulos, observándose patrones diferentes de activación celular y secreción de citocinas según el estímulo utilizado. El lipopolisacárido, una endotoxina bacteriana, provoca la secreción de citocinas de patrón inflamatorio por parte de los monocitos, con concentraciones superiores a 3.000 pg/ml, tanto de interleucina (IL)1 $\beta$  como para la IL8 e IL6. Por otra parte, un estímulo genérico de linfocitos T (PMA e ionomicina), nos permitió cuantificar el número absoluto de linfocitos T activados y detectar un patrón de secreción predominante de tipo Th1: Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL2. Ambos estímulos, muy genéricos, provocaban activaciones superiores a un 50% de todas las células, ya fueran monocitos o linfocitos T, asociados a la secreción de grandes cantidades de citocinas. Al emplear estímulos más específicos de una

subpoblación celular concreta, como lisados de citomegalovirus, comprobamos que en individuos seropositivos (que han estado en contacto con el virus en algún momento de su vida) en los que existen linfocitos T circulantes de memoria específicos de citomegalovirus, en muy baja frecuencia (<1%), esta nueva técnica permitía detectar el pequeño porcentaje de células activadas a la vez que cuantificar la producción de IFN- $\gamma$  e IL6. La respuesta observada en individuos con serología para CMV positiva fue constantemente superior a la encontrada en individuos seronegativos, en los que el sistema inmunológico no ha contactado o respondido nunca frente a tal virus. Estos hallazgos corroboran la alta sensibilidad y especificidad del método.

Las aplicaciones que este nuevo método de evaluación funcional de la respuesta inmunológica pueda tener en un futuro es muy amplia. Comprende entre otras la posibilidad de evaluar la respuesta inmunológica específica frente a agentes infecciosos, células tumorales y alérgenos concretos. Actualmente, se está investigando su posible utilidad en la monitorización de la respuesta inmunológica frente a vacunas tanto en modelos animales (ratones) como en estudios piloto de vacunación antitumoral.

## **Bibliografía recomendada**

- Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, and Yokota, T. Cytokines coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem.*1990; 59:783-836.
- Debets R, Savelkoul HF. Cytokine antagonists and their potential therapeutic use. *Immunol Today*, 1994; 15:455-8.
- Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods.* 1995;188:117-28.
- Manz R, Assenmacher M, Pflüger E, Miltenyi S, and Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92:1921-5.
- Rodríguez Caballero A, García Montero AC, Bueno C, Almeida J, Orfao A. Simultaneous identification of activated cells and the quantitative evaluation of proteins released during activation. *Cytometry*, 2002;(suplemento 11):39.