

CASOS CLÍNICOS TPNº4
SEPARACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE SUERO HUMANO

CASO CLÍNICO Nº4

Paciente de 78 años que ingresa con mialgias, fiebre, compromiso del estado general, baja de peso de 4 kg, alteraciones del sensorio, con desorientación temporo-espacial, tos y expectoración mucosa de 2 semanas de evolución por lo que recibió tratamiento con cefuroxime y azitromicina, sin observarse respuesta. En su historia clínica consta resección transuretral de próstata por adenoma prostático e infiltración linfocítica a nivel de microvasculatura. **Laboratorio:** Hematocrito 34,9%, leucocitos 9.600 células/ μ L, neutrófilos 5.088 células/ μ L, linfocitos 2.496/ células/ μ L, monocitos 2.016/ células/ μ L, plaquetas 215.000 células/ μ L, VHS 107 mm/h, proteína C reactiva 10,95 (valor normal <1 U/dL), láctico deshidrogenasa (LDH) 861 U/L (valor normal <618 U/L), Antígeno prostático específico 1,89 (valor normal <4 ng/mL). Se revisó la biopsia de próstata tomada 8 meses antes y se observó un infiltrado intravascular linfoide, CD45+, CD20+ estableciéndose el diagnóstico de linfoma intravascular de células grandes. El paciente inició quimioterapia CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) sin mejorías y con evidencia de actividad tumoral: fiebre, aumento de VHS, aumento de LDH y alteración de su estado de conciencia, se administró rituximab (anticuerpos monoclonales anti-CD20, Mabthera Roche). El paciente entró en remisión clínica de sus síntomas, normalización de LDH, normalización de su estado mental y desaparición de la tos, manteniéndose en remisión clínica completa con 24 meses de seguimiento.

Describe:

a. ¿Qué es el rituximab?

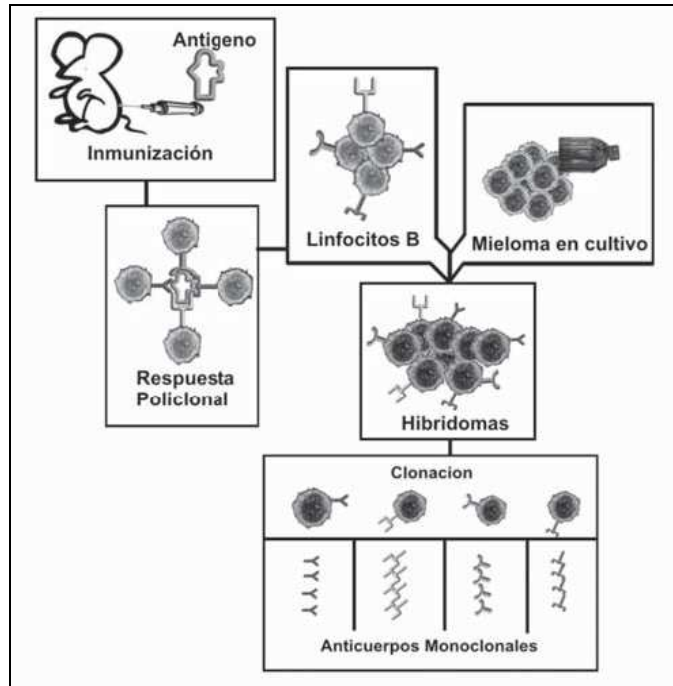
Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano, obtenido por ingeniería genética que representa una inmunoglobulina glucosilada con las regiones constantes de la IgG1 humana y las secuencias de la región variable de las cadenas ligeras y cadenas pesadas murinas. Este anticuerpo se produce a partir de un cultivo de células de mamífero en suspensión (ovario de hámster chino) y se purifica mediante cromatografía de afinidad e intercambio iónico, incluyendo inactivaciones virales específicas y procedimientos de eliminación.

Se une específicamente al antígeno CD20, una fosfoproteína transmembrana no glucosilada, expresada en los linfocitos pre-B y B maduros. El antígeno se expresa en más del 95 % de todos los linfomas no-Hodgkin de células B. CD20 se expresa tanto en células B normales como en tumorales, pero no en células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales ni en otros tejidos normales. Este antígeno no se internaliza tras la unión del anticuerpo ni se elimina de la superficie celular. CD20 no circula en plasma como antígeno libre, y, por esta razón, no compete por la unión con los anticuerpos.

El dominio Fab de rituximab se une al antígeno CD20 en la superficie de los linfocitos B, mientras que el dominio Fc puede reclutar efectores de la respuesta inmune para mediar la lisis de las células B. Los mecanismos posibles de la lisis celular mediada por efector incluyen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) como resultado de la unión de C1q, y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por uno o más receptores Fcy de la superficie de los granulocitos, macrófagos y células NK (natural killer). También se ha demostrado que la unión del rituximab al antígeno CD20 de los linfocitos B induce la muerte celular por apoptosis.

b. ¿Cómo se obtienen y purifican los anticuerpos monoclonales?

La producción de anticuerpos monoclonales se estableció con la tecnología creada en 1975 por Georges Köhler y César Milstein, que consistía en la generación de una línea celular estable, secretora de un isotipo determinado de inmunoglobulina contra un antígeno específico, fruto de la fusión de dos células diferentes por medios físicos y químicos (polietilenglicol-centrifugación).



La primera célula involucrada es un linfocito B de un animal previamente inmunizado con el antígeno de interés, que aporta la memoria inmune y la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno específico. La segunda es una célula tumoral de mieloma no secretora de anticuerpos, deficiente en la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT), útil en el proceso de selección posterior de los hibridomas, que aporta su capacidad de división ilimitada (inmortalidad). De esta unión surge un tipo de célula inmortal con la capacidad virtualmente ilimitada de producción de anticuerpos monoclonales, llamada hibridoma.

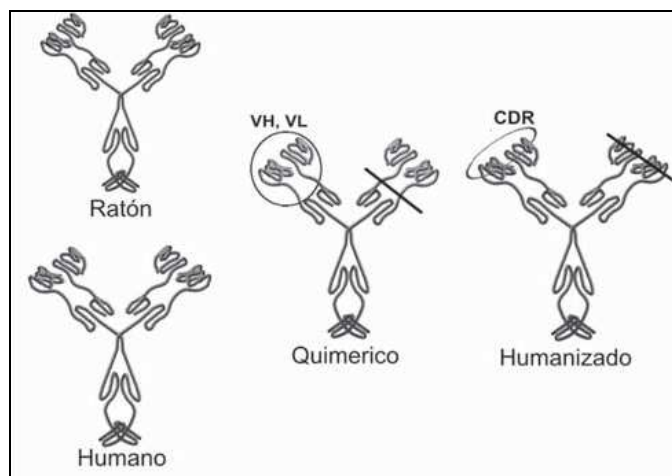
Dos características de la hibridación de estas células somáticas son de extremo valor: 1) es uno de los métodos básicos de producción de anticuerpos monoclonales contra un determinante antigénico conocido, y 2) se puede utilizar para identificar antígenos desconocidos presentes en una mezcla, puesto que cada hibridoma es específico para un solo determinante antigénico. En la actualidad se han incorporado técnicas de biología molecular e ingeniería genética que han ampliado el horizonte de la generación de los anticuerpos monoclonales y sus usos. Desde que se introdujo el primer anticuerpo monoclonal producido por la tecnología del hibridoma para uso clínico, en pacientes con rechazo primario de trasplantes, se observó que estos anticuerpos monoclonales, por ser de origen de ratón, generaban intensas respuestas de hiperreactividad en los pacientes. Consecuente con ello, se han desarrollado diferentes técnicas para minimizar los componentes generadores de esta respuesta. Igualmente, han permitido el desarrollo de métodos in vitro de generación de anticuerpos monoclonales en bacterias mediante transgénesis con las secuencias de interés.

c. ¿Cómo se obtiene un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado?

En 1985 se crearon los primeros anticuerpos quiméricos humanos a partir de ratones, con la tecnología del ADN recombinante, en la cual los genes que codifican la región variable de las Ig de ratón se unen con genes que codifican la región constante humana para, luego, ser insertados en células de mieloma, donde producirán nuevas moléculas de anticuerpo que tendrán una parte humana pero que tienen la unión específica del antígeno (Fab) generada en ratones.

Una de las limitaciones presentadas con la quimerización de anticuerpos monoclonales de ratón es la baja frecuencia de transformantes que produzcan el anticuerpo quimérico. Aunque los anticuerpos monoclonales quiméricos son menos inmunogénicos que los anticuerpos monoclonales de ratón, se han observado respuestas importantes de tipo anticuerpo-antiquiméricos en el 40% de los productos que se han usado en humanos. En 1986 se incorporó la técnica de humanización de anticuerpos con el objetivo de minimizar los componentes del anticuerpo de ratón, generadores de la respuesta inmune. La construcción de anticuerpos monoclonales humanizados se da gracias a la ingeniería de proteínas. En este proceso se transfieren los CDR provenientes de las Ig de ratón a estructuras de las regiones variables de cadenas pesadas o ligeras de una Ig proveniente de una especie diferente, en este caso, la humana. Sin embargo, algunos estudios han reportado que esta transferencia puede generar una afinidad variable hacia el antígeno; estos tipos de anticuerpos los han hecho diferentes grupos de investigación y se han obtenido anticuerpos que mantienen la afinidad antigénica y anticuerpos que la han disminuido. Este proceso debe llevar consigo la conservación de la afinidad nativa para lo cual se ha implementado el modelo molecular de las regiones receptoras y donantes.

Conceptualmente, los Ac quiméricos poseen en su estructura un 30 % de parte animal y el 70 % restante es humano; mientras que los humanizados poseen un 90 % de origen humano.



CASO CLÍNICO N°5

Paciente femenina de 11 años de edad que fue mordida en pie derecho y mano izquierda por un cachorro con rabia confirmada. A los 8 días del incidente se inició esquema de vacunación antirrábica (vacuna extraída de cerebro de ratón lactante).

Treinta y nueve días después, habiendo recibido 8 dosis de vacuna, acudió al servicio de emergencias por presentar un cuadro de 5 días de evolución caracterizado por cefalea, debilidad y parestesias, estas últimas se iniciaron en antebrazo y ascendieron progresivamente hasta la región cervical. Se decide su internación. En el segundo día de internación presentó sialorrea

espesa, taquicardia, taquipnea, hiporreflexia y rigidez de cuello, además convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Se realiza punción lumbar: líquido cefalorraquídeo cristal de roca con 21 células por campo a predominio polimorfonuclear, proteinorraquia normal y glucorraquia de 63 mg/dL. Falleció 7 días después de su internación por falla cardiaca. Se realizó biopsia cerebral (hipocampo) para inmunofluorescencia que fue positiva para rabia, confirmándose el diagnóstico.

a. Considera correcto la utilización de la vacuna. Justifique.

No, porque debe efectuarse en forma inmediata al accidente o exposición al virus.

El tratamiento inmediato después de la exposición al virus de la rabia (ej. mordedura) impide el desarrollo de los síntomas, los cuales en ausencia de tratamiento conducirían irremediablemente a la muerte. Es recomendable lavar con agua y jabón, cuidadosamente y sin raspar la herida, ya que de este modo se ayuda a eliminar el virus, y acudir de inmediato a un centro hospitalario para recibir atención especializada. Está contemplada la aplicación de la vacuna antirrábica solamente (esquema reducido 10 dosis) o aplicación de vacuna antirrábica + suero antirrábico (esquema clásico 14 dosis más suero) y dicho esquema depende del tipo de exposición y de la condición del animal agresor.

Métodos diagnósticos y tratamientos posibles

Métodos diagnósticos: in vivo y post mortem

Diagnóstico postmortem de rabia

Se realiza por inmunofluorescencia en improntas de tejido cerebral. Las porciones de la médula, cerebelo e hipocampo deben refrigerarse.

Métodos diagnósticos in vivo

a) Detección de antígeno:

1) Técnica de inmunofluorescencia directa

El anticuerpo marcado con un fluorocromo reacciona con el antígeno específico (nucleocápside del virus) cuya presencia se quiere determinar y se observa el resultado de la reacción con un microscopio de fluorescencia.

2) Ensayo biológico por inoculación en ratones

La inoculación de ratones es el método más sensible para detectar rabia. Todas las cepas de ratones parecen ser susceptibles a rabia. Sin embargo, el ratón gris no debe usarse debido a su dificultad de manejo y contención. La inoculación intracerebral de ratones albinos suizos con virus rábico produce infección típica. Los ratones inoculados con las cepas salvajes usualmente enferman entre los 7 y 15 días, y una vez que muestran signos de enfermedad, puede detectarse el antígeno rábico.

A pesar que los ratones lactantes (3 días o menos) son los más sensibles, se observan muertes inespecíficas causadas por trauma de inoculación, toxicidad del inoculo y canibalismo, en cuyo caso deberá repetirse la prueba. Las muertes que ocurran dentro del período de incubación para rabia deben ser confirmadas por otras pruebas.

b) Detección de anticuerpos:

1) Prueba de neutralización en ratones para la determinación de anticuerpos

El ensayo de neutralización (SN) es un procedimiento de serología básica, y su alto grado de especificidad lo convierte en el estándar con el cual otros métodos serológicos son usualmente evaluados.

Su determinación es de gran utilidad para conocer el estado inmune tanto del hombre como de los animales, para establecer el diagnóstico de la enfermedad y para realizar estudios sero-epidemiológicos.

Con el ensayo de SN, la falta de anticuerpos es evidenciada por muerte o enfermedad del huésped.

En este tipo de ensayo, una cantidad de virus estándar, se enfrenta con varias diluciones de suero. Los resultados son expresados en términos de un título de suero, que es definido como "la máxima dilución de suero que neutraliza una cantidad estándar de virus".

La prueba de seroneutralización tiene el inconveniente de la demora en la obtención de los resultados definitivos, además de exigir la utilización y manutención de ratones, con lo que esto conlleva.

2) *Método Rápido de inhibición de focos fluorescentes (RIFFT)*

Consiste en incubar diluciones sucesivas de los sueros a titular y un suero de referencia cuyo título en UI/mL es conocido, con una dosis constante de virus. A continuación se agrega una suspensión de células sensibles (BHK o BSR). Después de 24 hs. de incubación se podrá apreciar la diferencia en el número de focos de infección entre las celdillas que recibieron el suero de referencia y aquellas que han recibido los sueros desconocidos. La disminución del título infeccioso permite calcular el título de los sueros desconocidos por comparación con el suero de referencia.

Es el método más usado en los países desarrollados y permite obtener resultados en 26 hs. teniendo una sensibilidad equivalente al test de la seroneutralización.

3) *Método inmunoenzimático (ELISA)*

La técnica inmunoenzimática permite la detección de anticuerpos antiglicoproteína del virus rábico en suero o plasma del hombre y algunas especies animales como perros, conejos, monos y cobayos. Las muestras de suero son depositadas en celdillas de una fase sólida sensibilizada con la glicoproteína y la presencia de anticuerpos se revela con el agregado de un conjugado enzimático. La titulación en paralelo de un suero de referencia cuyo título en UI/mL es conocido permite, por comparación de densidades ópticas, apreciar la concentración de anticuerpos de cada muestra desconocida.

Esta prueba presenta numerosas ventajas: puede ser utilizada con un equipo (kit) muy simple, es práctica para el estudio de grandes series de sueros y permite la obtención de resultados en un tiempo muy breve: 4 hs. Se puede eventualmente usar para otras especies reemplazando el conjugado del kit por una Ig anti-especie-peroxidasa.

4) *Técnica de contrainmunolectroforesis*

La prueba de contrainmunolectroforesis (CIE) se basa en la unión de los anticuerpos antirrábicos presentes en diluciones variables de un suero problema con una cantidad constante de antígeno (virus rábico inactivado). La reacción se pone en evidencia mediante una corrida electroforética simultánea de las mezclas antígeno-anticuerpo y de un suero antirrábico hiperinmune (suero indicador), corriendo virus rábico (con carga negativa) hacia el polo positivo. La presencia de bandas de precipitación indica que no hay anticuerpos antirrábicos en el suero problema, por lo cual el antígeno libre reacciona con el suero indicador. Resultados variables y poco precisos.

Tratamientos posibles:

1. Aseo local de la herida con agua y jabón; posteriormente se puede emplear cloruro de benzalconio al 1%, soluciones yodadas al 5% o alcohol del 40 al 70%.
2. La sutura de la herida debe diferirse; en caso contrario, deberá infiltrarse la herida con gammaglobulina humana antirrábica o suero.
3. La administración de antibióticos y toxoide tetánico debe valorarse en cada caso particular.
4. Inmunoprofilaxia. Suero hiperinmune o gammaglobulina y vacuna antirrábica.

Actividades anexas:

El animal (perro o gato) debe ser capturado y mantenido en observación por un veterinario durante los próximos diez días.

En caso de que el animal sea sacrificado debe tenerse especial cuidado con la preservación adecuada del cerebro, con la finalidad de poder establecer el diagnóstico definitivo de rabia.

¿Cómo se obtiene el suero antirrábico?

Se obtiene a partir de un proceso de inmunización aplicado en equinos, en el cual se desarrolla un esquema de inmunización. Luego se aplica un proceso de precipitación con sales, y purificación mediante diálisis y digestión enzimática.

Sería a su criterio de utilidad obtenerlo en gallinas. Justifique.

Si bien existen reportes de métodos de obtención de Igs (ej. IgA) en yema de huevo y con costos reducidos en comparación con el modelo equino, en este caso en particular no sería de utilidad considerándose que se obtiene sólo en concentraciones moderadas a bajas.

CASO CLÍNICO N°6

Las infecciones por Rotavirus son la causa más común de diarrea en niños menores de 5 años ocasionando un gran número de muertes al año. Un diagnóstico rápido permitiría instaurar un tratamiento adecuado y evitar el uso innecesario de antibióticos, como implantar medidas preventivas que eviten su transmisión en la comunidad y en el nosocomio. Con este objeto queremos desarrollar un método que permita la detección precoz de antígenos de la cápside viral en heces utilizando un anticuerpo específico obtenido en el laboratorio.

Determine:

¿Cómo podría obtener el anticuerpo específico? ¿Monoclonal o policlonal? Justifique.

Es necesario obtener Acs monoclonales, considerándose la elevada especificidad que estos poseen frente a los policlonales y al tipo de muestra.

¿Es importante purificar? Justifique.

Si bien siempre se requiere purificación, estos Ac no son para uso terapéutico por lo tanto no sería necesario.

¿Realizaría fraccionamiento enzimático? Justifique.

Sí, porque debemos considerar que la forma de revelado del test a desarrollar puede ser influenciado por la fijación inespecífica de estos Ac a través de su fracción Fc.

Las células que se encuentran en el extendido de materia fecal o fluido biológico para búsqueda directa pueden fijar inespecíficamente y generar resultados falsos positivos o negativos, dependiendo del diseño del test.

BIBLIOGRAFÍA

_ Nina, P.M, Germán; A.T, John, C.C. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. Infection 2006; 10(3): 186-197

_ Hernández-Rivera, G; Aguayo-González, A.; Castellanos, RC; Loarca-Piña, LM. Actualidades terapéuticas en el tratamiento de linfoma No Hodgkin. Gac Méd Méx. Vol. 144 no. 3, 2008.

_ Manual de Normas y Procedimientos para Vigilancia, Prevención y Control de Rabia. OPS- Ministerio de Salud de la Nación. Cap 4. 2008.

_ http://es.wikipedia.org/anticuerpo_monoclonal

_ http://es.wikipedia.org/rabia_tratamiento

_ http://geosalud.com/enfermedades_infecciosas/rabia.htm

_ http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00044.htm