

4.3 Assessing cellular immunity in the lab

4.3 Evaluando la inmunidad celular en el laboratorio

Hola. Aunque no sea un tema estrictamente de virología, vamos a repasar brevemente el complejo proceso por el que se desarrollan las respuestas inmunitarias adquiridas cuando hay una infección vírica. Los linfocitos T, activados tras reconocer al antígeno vírico en la membrana de las células, van a proliferar y a diferenciarse en dos poblaciones diferentes: linfocitos T colaboradores o Th, que cooperan con otras células para que progresen las respuestas inmunitarias, y linfocitos T citotóxicos o Tc, que destruyen a las células infectadas. Según transcurren estos procesos, los linfocitos secretan unas moléculas, denominadas citocinas, que sirven de comunicación entre las células inmunitarias y las incitan a responder o a ejercer su función.

Pues bien, para comprobar si la respuesta celular al virus es correcta se pueden analizar diferentes puntos, tales como la multiplicación celular tras el estímulo antigénico; la destrucción de las células infectadas, por una prueba que evalúa la citotoxicidad por linfocitos Tc; y la secreción de citoquinas, utilizando por ejemplo el ELISA que vimos en el video anterior. En este video vamos a ver cómo se determina la multiplicación de los linfocitos, o linfoproliferación.

La linfoproliferación es una técnica que mide la proliferación de linfocitos T colaboradores en respuesta a antígenos víricos presentados por células presentadoras de antígeno, lo que ocurre sólo si el paciente ha sido expuesto previamente a ese virus, es decir, si se ha recuperado de una infección o si ha sido vacunado, siempre con ese mismo virus.

Lo primero es aislar los linfocitos. Lo más fáciles de obtener son los de sangre periférica, recolectada con anticoagulante. Se diluye con medio de cultivo y se deposita cuidadosamente sobre una sustancia densa llamada Ficoll. Al centrifugar, los eritrocitos y granulocitos atraviesan el Ficoll y se depositan al fondo del tubo, pero los linfocitos y algunos monocitos se quedan en la interfase entre el Ficoll y el plasma y medio de cultivo. Los recogeremos cuidadosamente y contaremos en el microscopio. Llamaremos a estas células PBMCs.

Depositamos 100.000 PBMCs en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y añadimos una suspensión de virus o de antígenos víricos en cada pocillo, y dejamos incubar a 37°C durante 4 a 6 días. Durante este tiempo, las APCs procesarán el virus y se lo presentarán a los linfocitos T. Si el paciente se ha expuesto a ese mismo virus previamente, habrá linfocitos T que reconocerán el virus y proliferarán.

Para determinar cuánto han proliferado, se añade timidina, que ya sabes que es un nucleótido que forma parte del ADN, marcada con tritio, que es hidrógeno radiactivo y se incuba otras 6 horas más. Esta timidina tritiada se incorpora al ADN de las nuevas células, de forma que, cuando recogemos las células y medimos la cantidad de radiactividad en un contador de centelleo, indicará el grado de multiplicación celular. Como siempre, hay que guardar precauciones, como es hacer cada muestra por triplicado y añadir PBMCs de un individuo normal sin infectar, así como los PBMCs del paciente sin estimular con virus, para utilizarlos como control.

Los resultados se pueden expresar como **índice de estimulación**, que es el cociente de dividir la radiactividad medida en los cultivos estimulados y controles sin estimular del mismo individuo.

La proliferación de los linfocitos también se puede valorar mediante kits que no necesitan radiactividad. Miden la cantidad de ATP citoplasmático en células metabólicamente activas. Por

tanto, a mayor cantidad de células, mayores niveles de ATP. El ATP se emplea para una reacción de luminiscencia que se puede detectar con un luminómetro.

Ya ves que hay distintas técnicas para detectar la respuesta inmunitaria celular tras la infección vírica. Sólo te hemos mencionado unas pocas, pero hay muchas más, y además se están desarrollando otras. Que disfrutes descubriéndolas. Gracias por tu atención.