

Enfermedades autoinmunes y el aporte de la citometría de flujo a su diagnóstico

Autoras: Laura María Bautista Narváz y Ana María Correa Vivas

Monografía



Asesora interna: Claudia Andrea Cruz Baquero

Asesora externa: Yovana María Pacheco Nieva

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, DC



ENFERMEDADES AUTOINMUNES



3 a 5 %



Artritis reumatoide

Lupus eritematoso sistémico

Tiroiditis de Hashimoto

Diagnóstico

PRUEBAS CONFIRMATORIAS

1. Medidas cualitativas y cuantitativas
2. Perfil más completo del paciente
3. Tratamiento oportuno

Núm. de paciente	Enfermedad autoinmunitaria	Total de pacientes	Porcentaje	Prevalencia 100,000 pacientes
1	Artritis reumatoide	404	27.6	105
2	Psoriasis	158	10.8	41
3	Enfermedad de Graves	149	10.2	39
4	Púrpura trombocitopénica	128	8.8	33
5	Lupus eritematoso sistémico	102	7.0	26
6	Diabetes mellitus tipo 1	75	5.1	19
7	Vitíligo	64	4.4	17
8	Síndrome de Guillain-Barré	55	3.8	14
9	Tiroiditis de Hashimoto	50	3.4	13
10	Síndrome de Sjögren	45	3.1	12

Tomado de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662018000400003&lng=es&nrm=iso



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

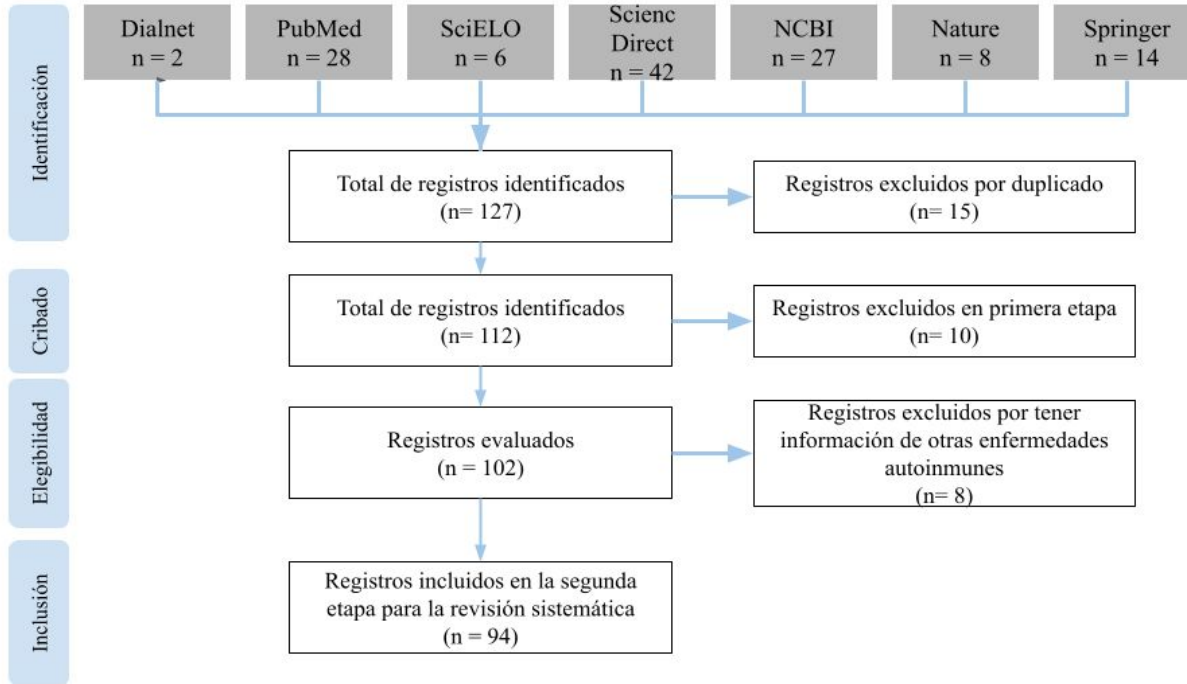
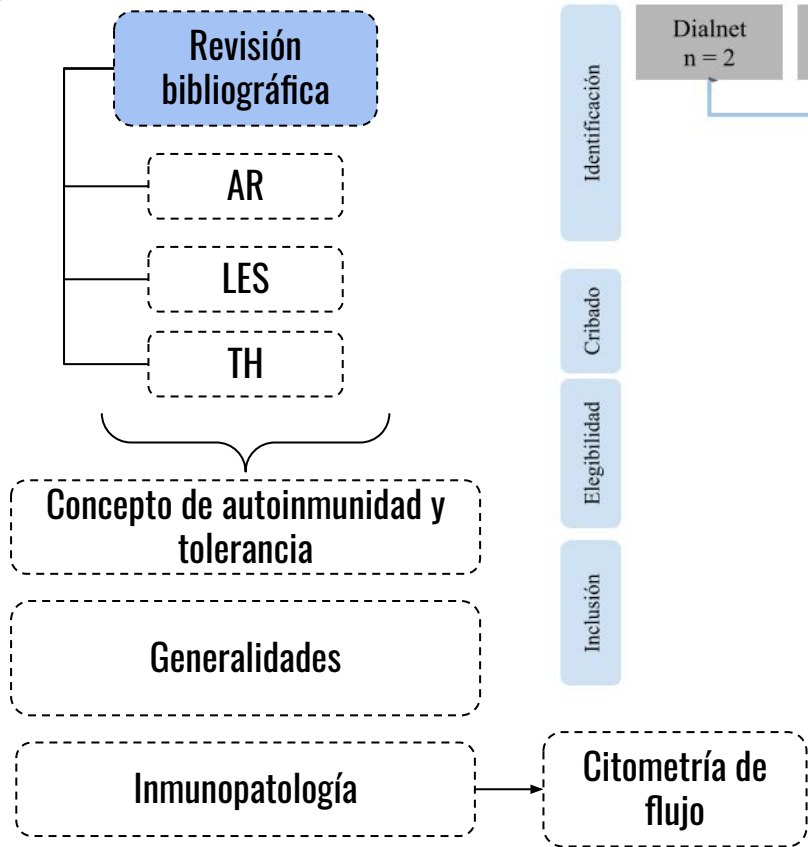
Establecer el papel de la citometría de flujo como apoyo diagnóstico de la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la tiroiditis de Hashimoto.

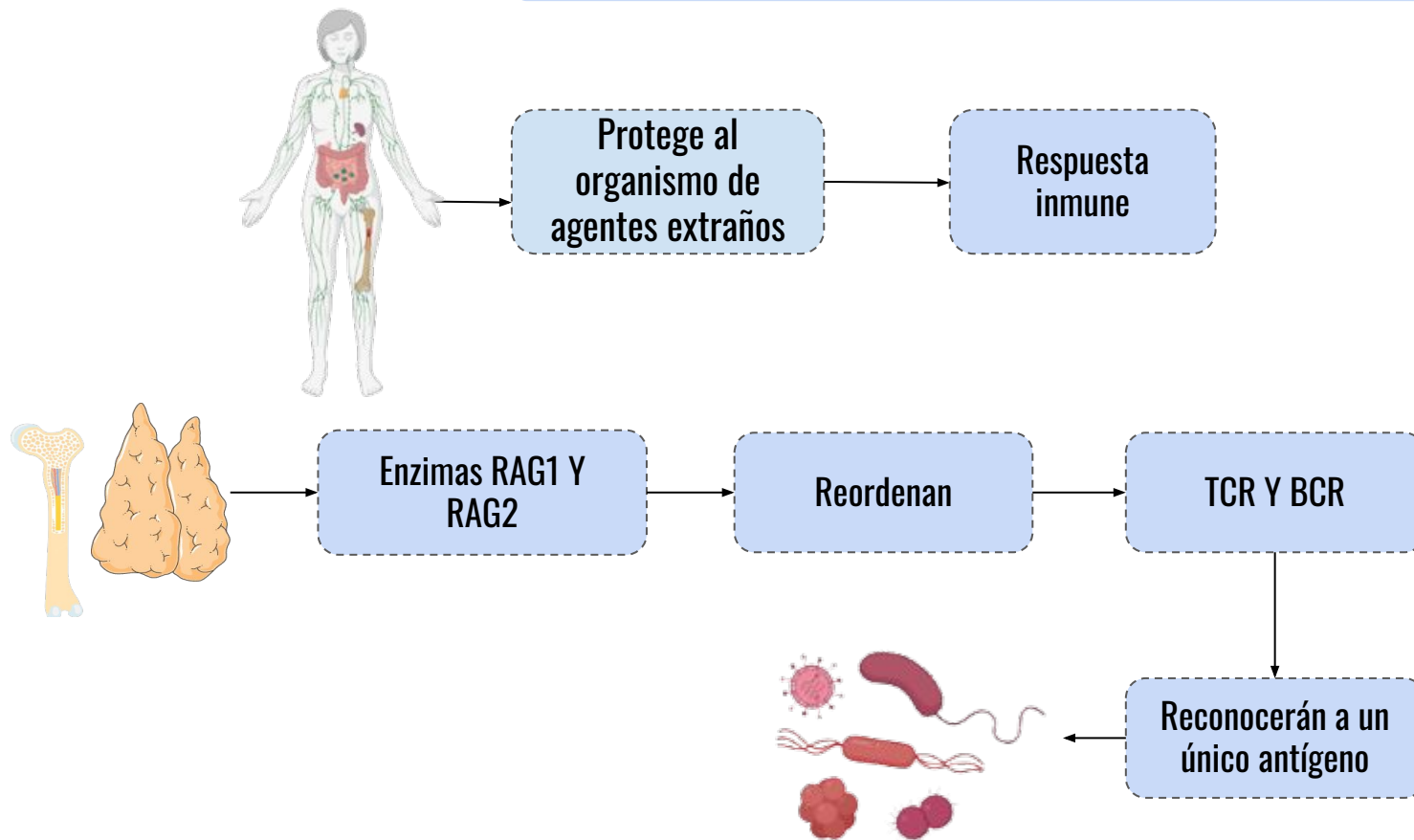
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar las características más importantes de la autoinmunidad y su relevancia en la salud pública.

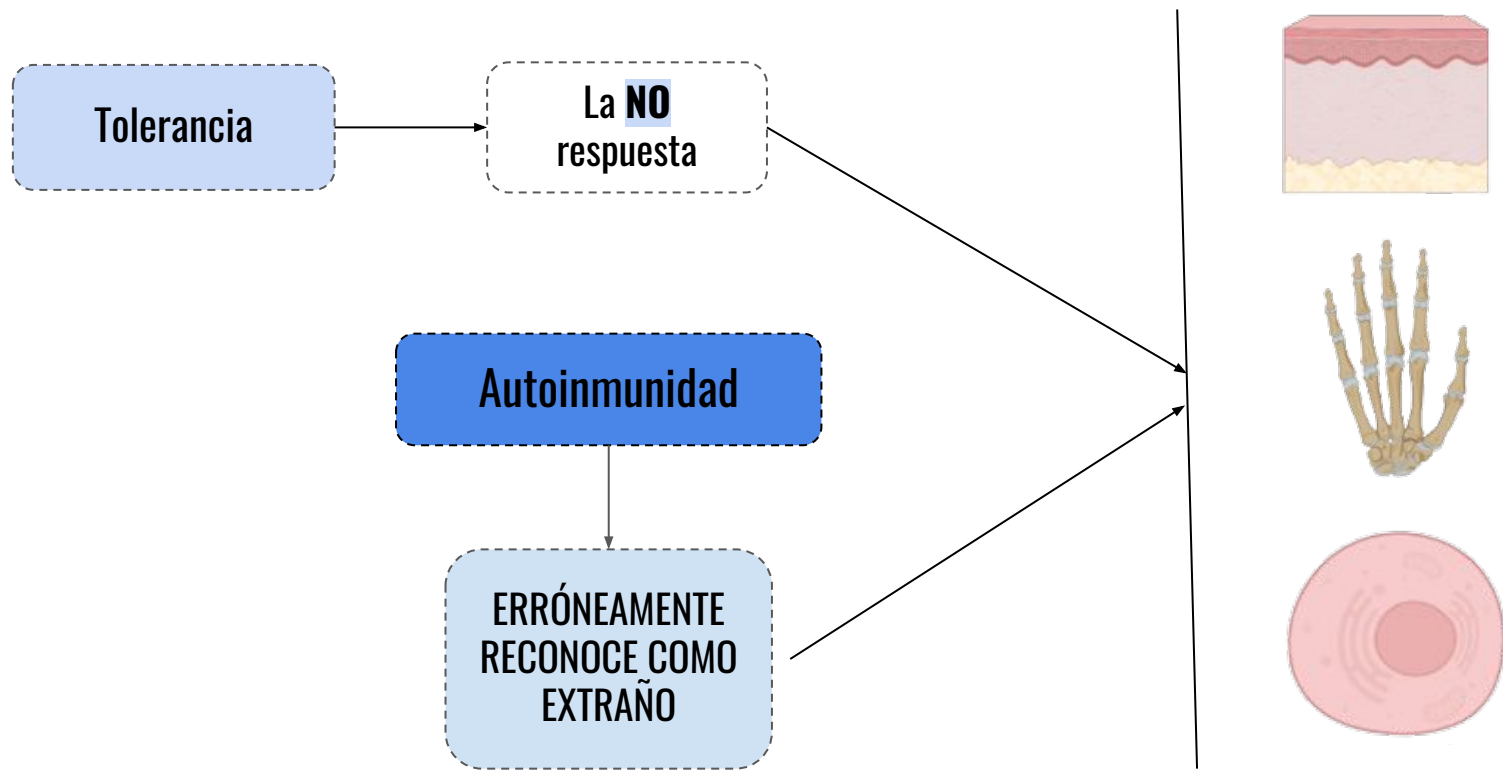
Describir los aspectos más importantes de la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la tiroiditis de Hashimoto.

Determinar el aporte de la citometría de flujo en la detección de las enfermedades autoinmunes para obtener un diagnóstico más amplio.





Figuras tomadas de: <https://biorender.com/>



Figuras tomadas de: <https://biorender.com/>



Se consigue eliminando los precursores autorreactivos y permitiendo que se desarrollen células que reconozcan antígenos extraños



Existen mecanismos que suprimen la respuesta inmune frente a aquello que ya se conoce

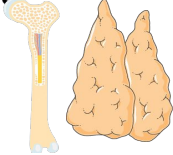

Tolerancia	Mecanismo
<p>Central</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ● Apoptosis ● Regulación ● Edición o modificación del receptor
<p>Periférica</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ● Delección clonal ● Anergia ● Ignorancia inmunológica

Tabla 1. Mecanismos de autotolerancia



ARTRITIS REUMATOIDE

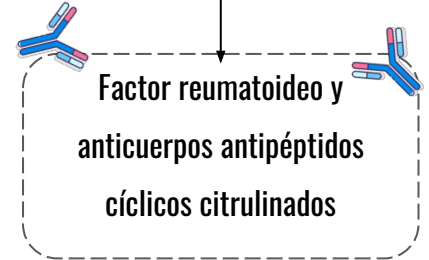


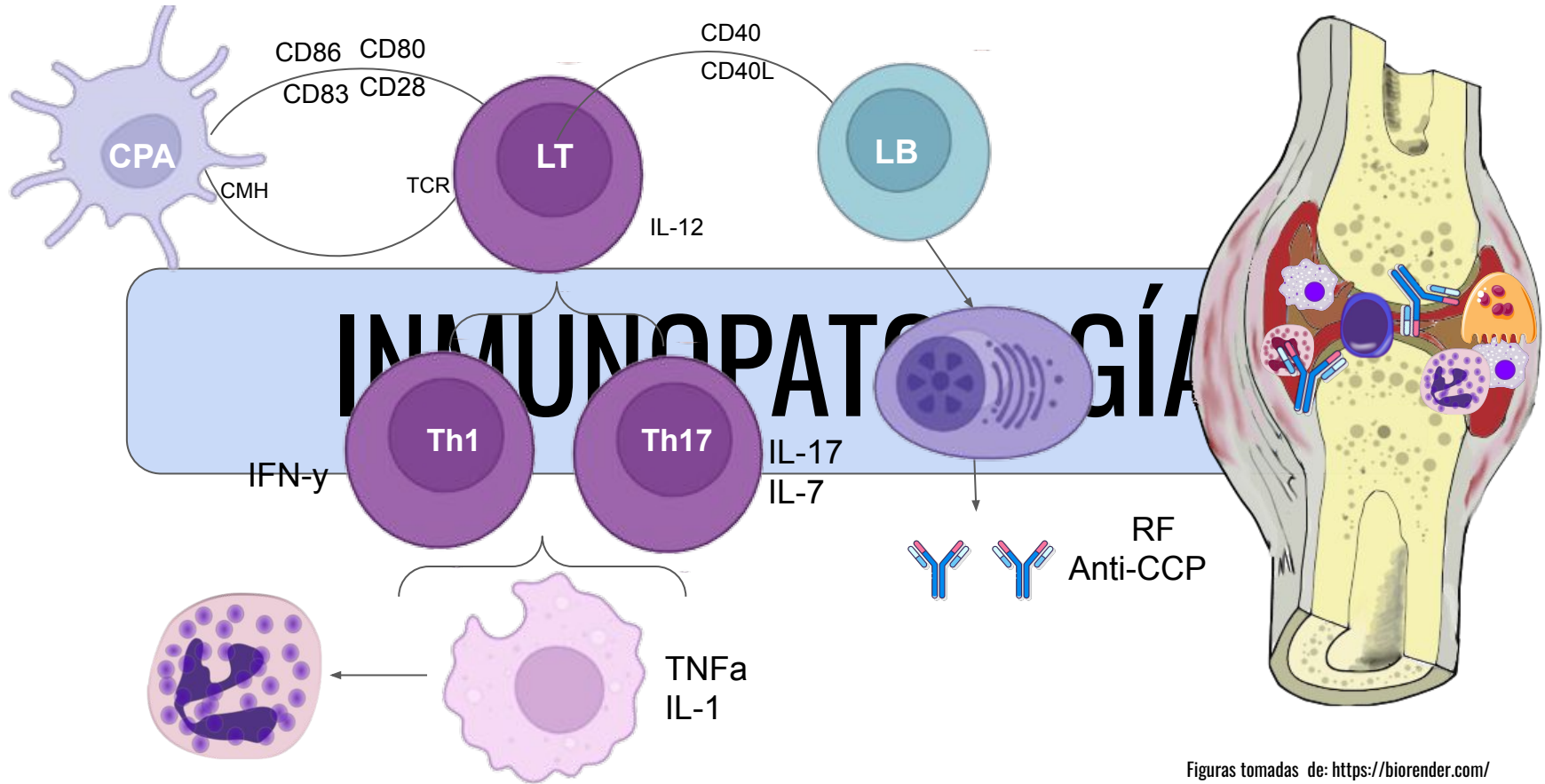
Afectación simétrica e inflamatoria de múltiples articulaciones

- Infecciones
- Hábitos
- HLA (DR1 y DR4)
- Más frecuente en mujeres 7:1

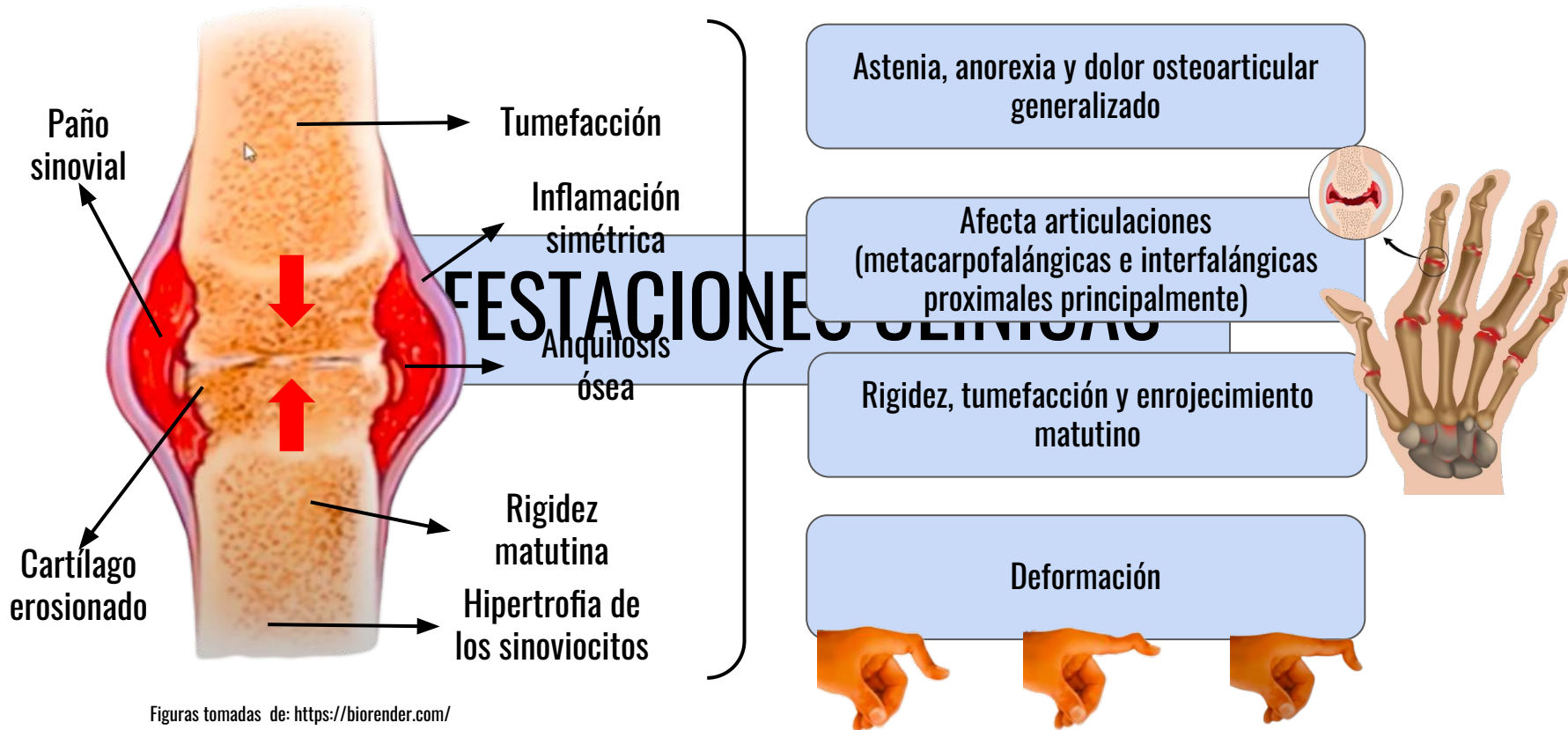


Autoanticuerpos





Figuras tomadas de: <https://biorender.com/>





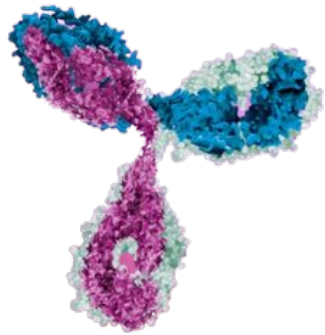
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO



Se forman varios inmunocomplejos que se depositan en múltiples órganos y tejidos

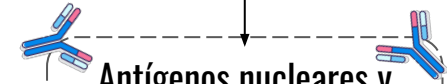


Tomado de: <https://images.app.goo.gl/t8P4EJpZi9s2VdyH6>



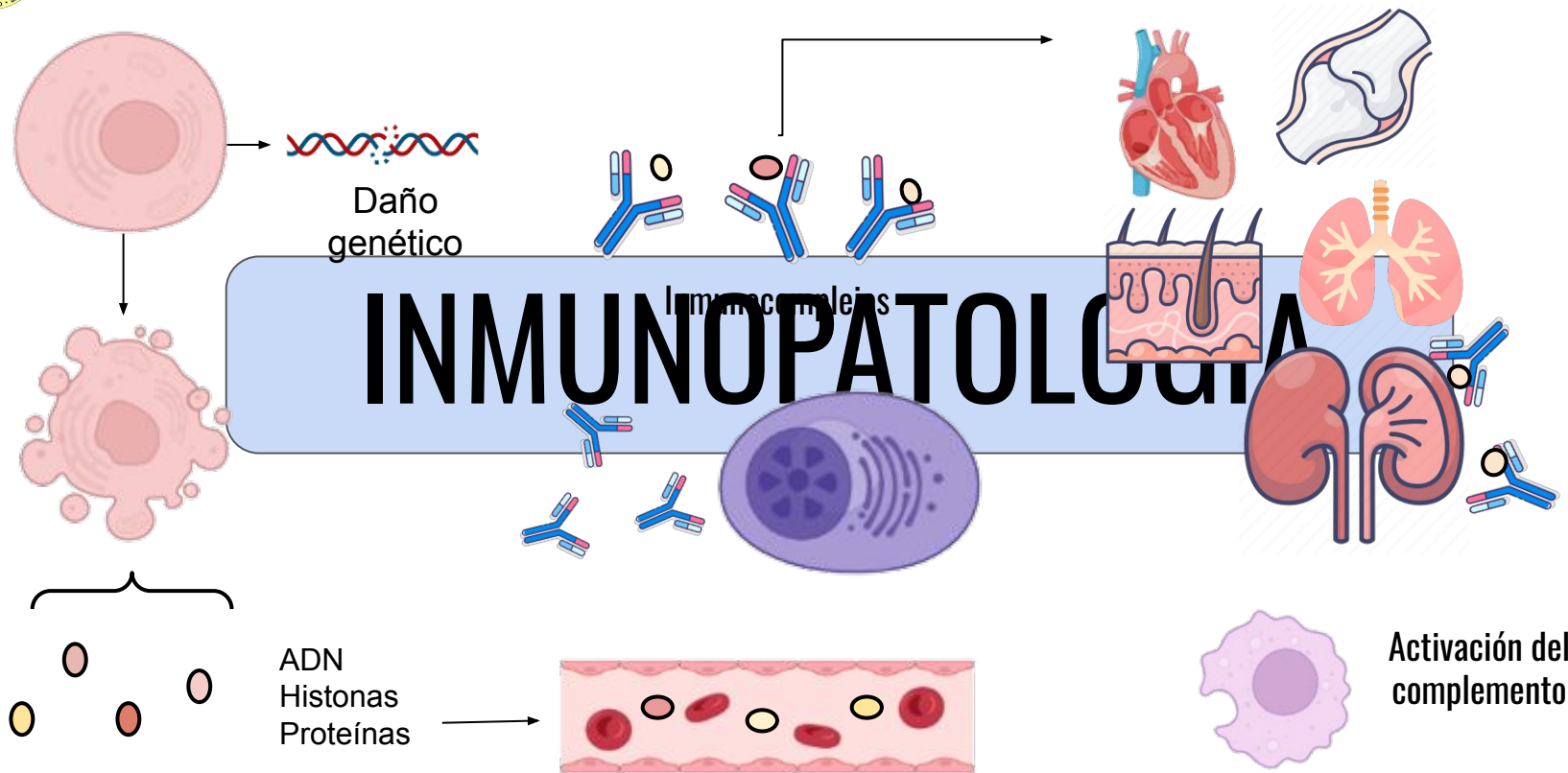
- Infecciones
- Factores ambientales
- Medicamentos
- HLA-DRB1*08 y DRB1*15)
- Más frecuente en mujeres 9:1

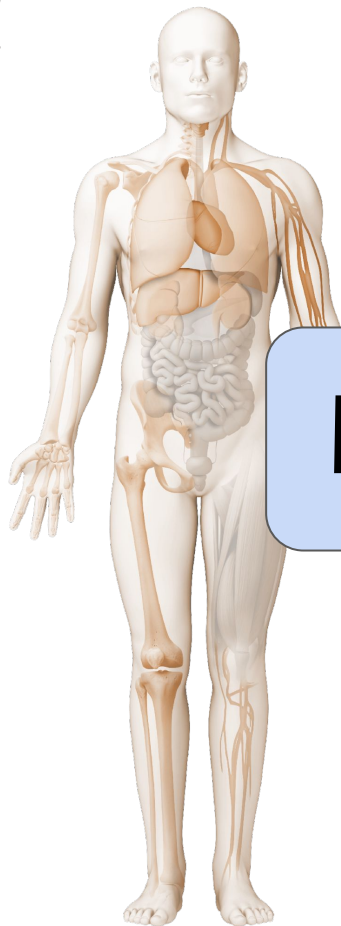
Autoanticuerpos



Antígenos nucleares y citoplasmáticos

Figuras tomadas de: <https://biorender.com/>



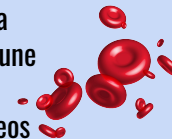


MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Eritema malar
Eritema en alas de mariposa
Urticaria
Lupus discoide
Alopecia



Trombocitopenia
Hemólisis autoinmune
Leucopenia
Nódulos subcutáneos



Fiebre
Cefalea



Insuficiencia renal
Hematuria
Proteinuria
Glomerulonefritis
Nefropatía lúpica

Hepatitis
Obstrucción intestinal



Pleuritis
Neumonitis
Embolia pulmonar
Pericarditis
Derrame pleural o pericárdico



Dolores musculares
Dolores articulares





TIROIDITIS DE HASHIMOTO



El sistema
inmune
desconoce la
glándula
tiroides

Ac. antitiroglobulina
Ac. antitiroperoxidasa

Daño en la
función
hormonal

↓ T3 ↓ T4 ↑ TSH

Compensación

Síntomas no visibles

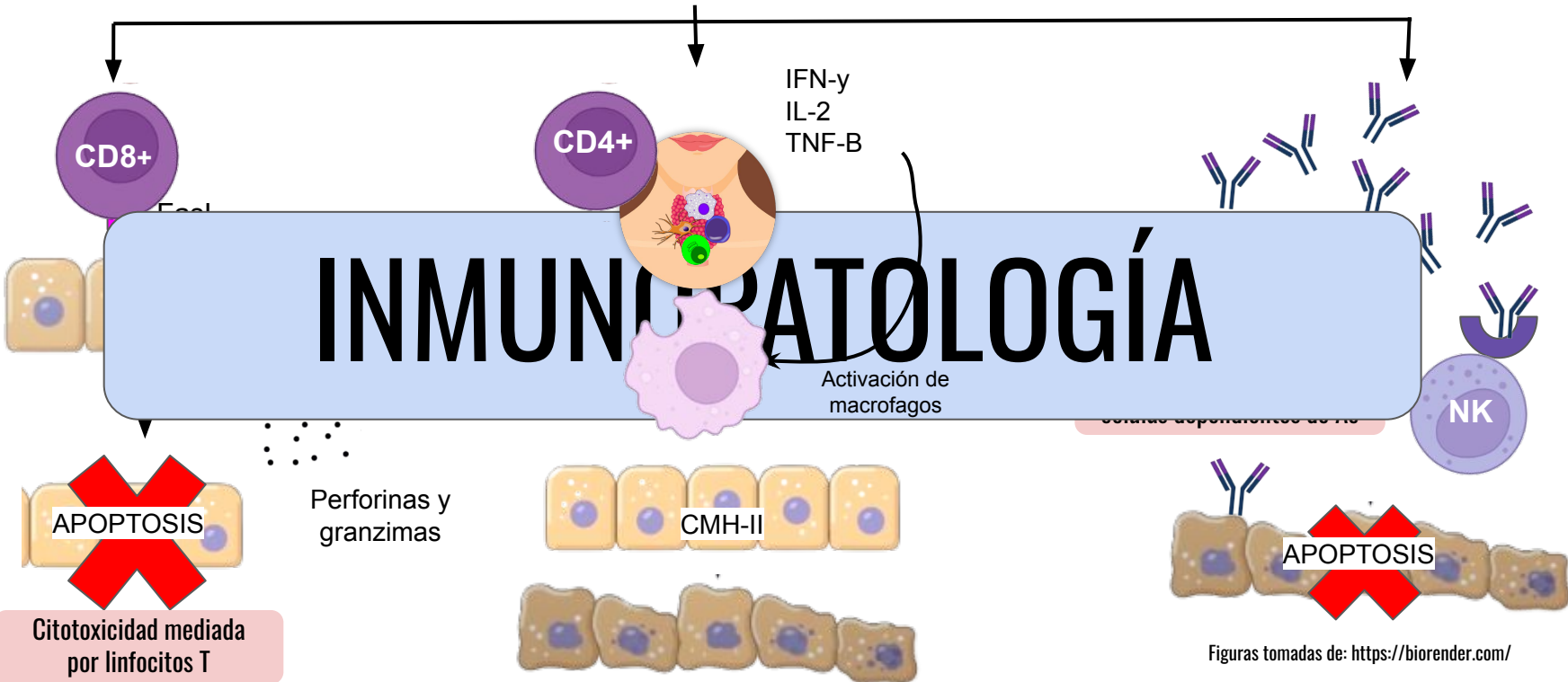
Hipotiroidismo gradual

Lenta evolución

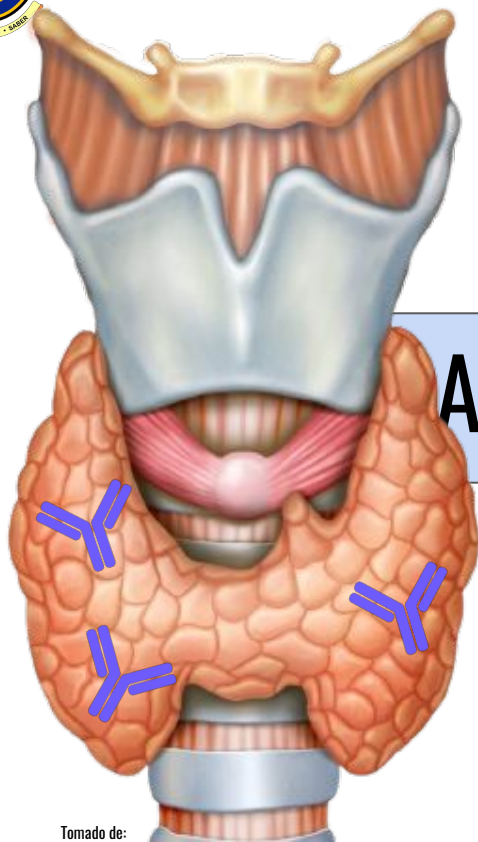
Factores predisponentes:
Ingesta o exposición a altas
concentraciones de yodo
Radiaciones ultravioleta
HLA-DR5 y DRw 53
Infecciones



Antígenos HLA clase II



Figuras tomadas de: <https://biorender.com/>



Tomado de:
<https://images.app.goo.gl/hDAD7SN>
AcpeGAXcQ6

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

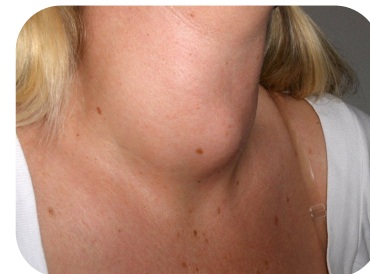
Bocio

Piel fría, seca y amarillenta; uñas quebradizas, mixedema

Aumento de peso
Fatiga
Dolores musculares

Intolerancia al frío

Estreñimiento
Colesterol elevado



Tomado de:
<https://images.app.goo.gl/UY6V1zkbV4xZfss>
H6



Métodos de diagnóstico

AR

LES

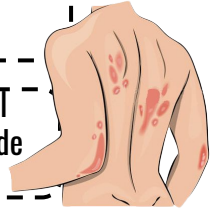
TH

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

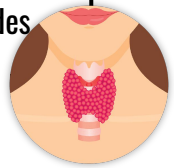
- Número de articulaciones afectadas
- Serología (reumatoide y anti péptido citrulinado)
- Reactantes de fase aguda (VSG y/o PCR)
- Duración de la sintomatología



- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS Anticuerpos antinucleares
- Factor reumatoide
- Reactantes de fase aguda (VSG y/o PCR)
- Pruebas de función renal (creatinina, BUN, parcial de orina)

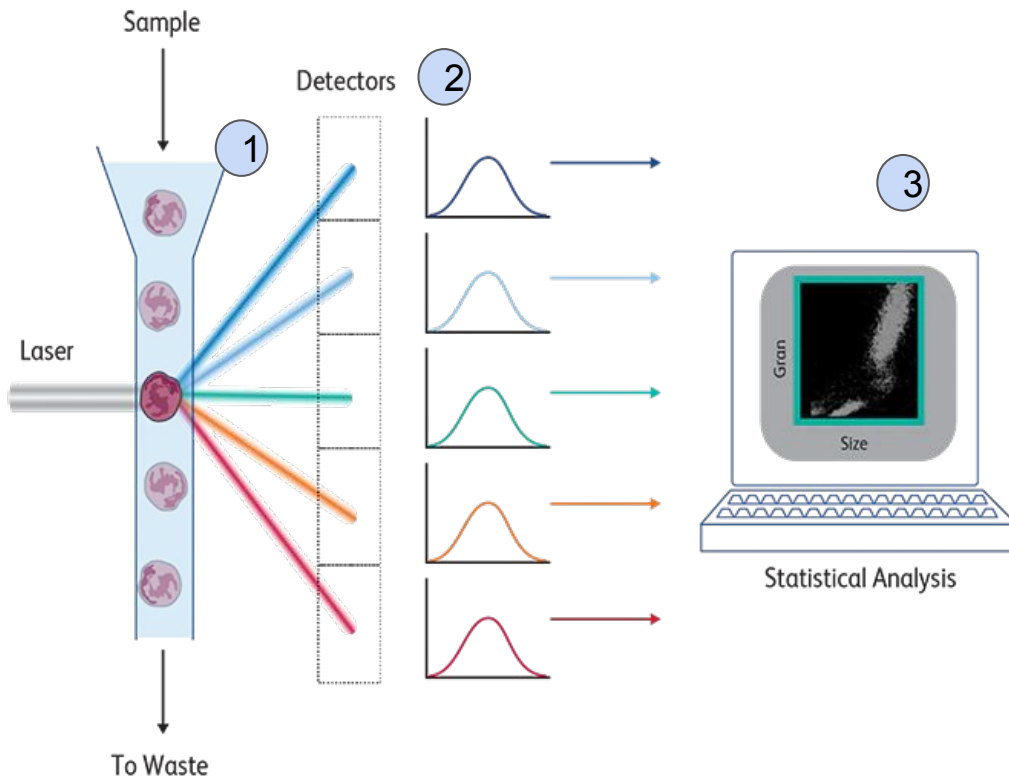


- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS tiroglobulina tiorperoxidasa
- Perfil hormonal (TSH, T3, T4)
- Palpación de la tiroides



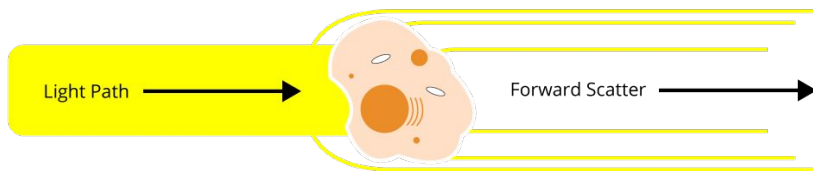


La citometría de flujo

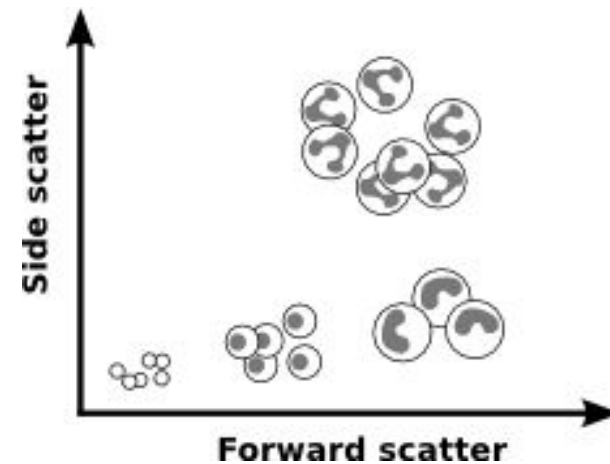
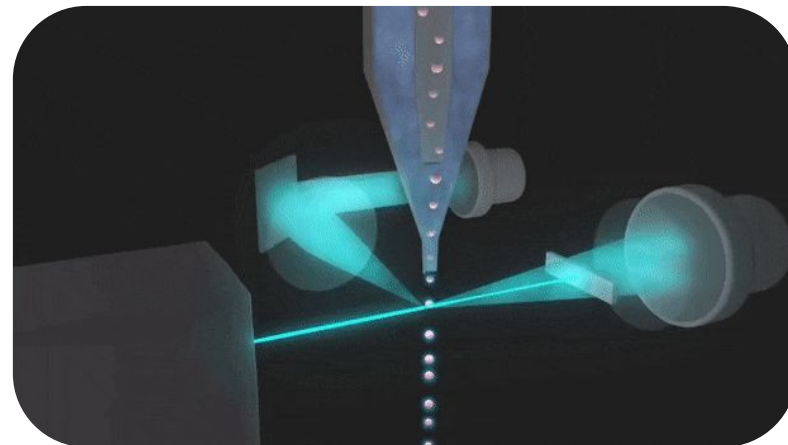
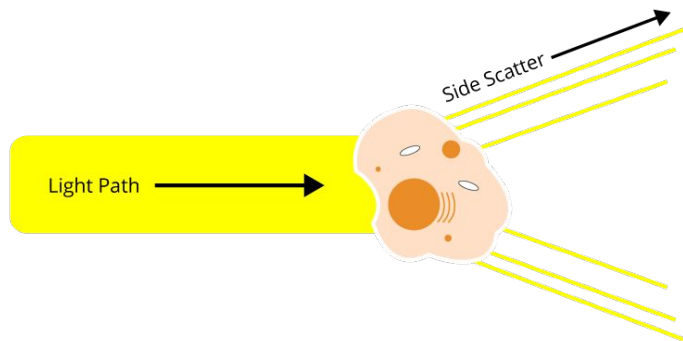


Tamaño, la complejidad y los marcadores moleculares que presenten

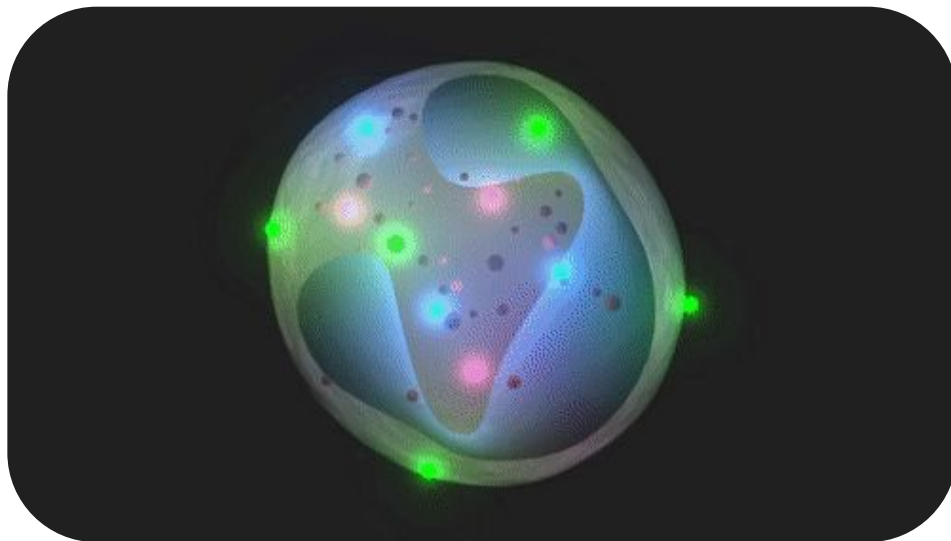
FORWARD SCATTER



SIDE SCATTER

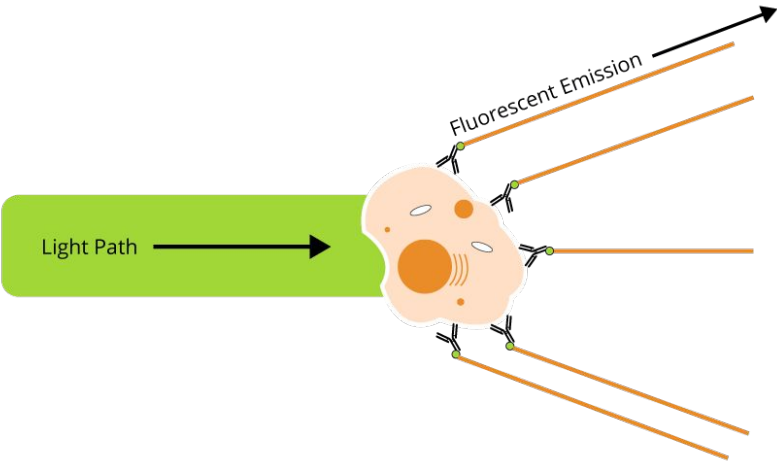


Tomado de:
<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/flow-cytometry-principle>



FLUOROCROMO

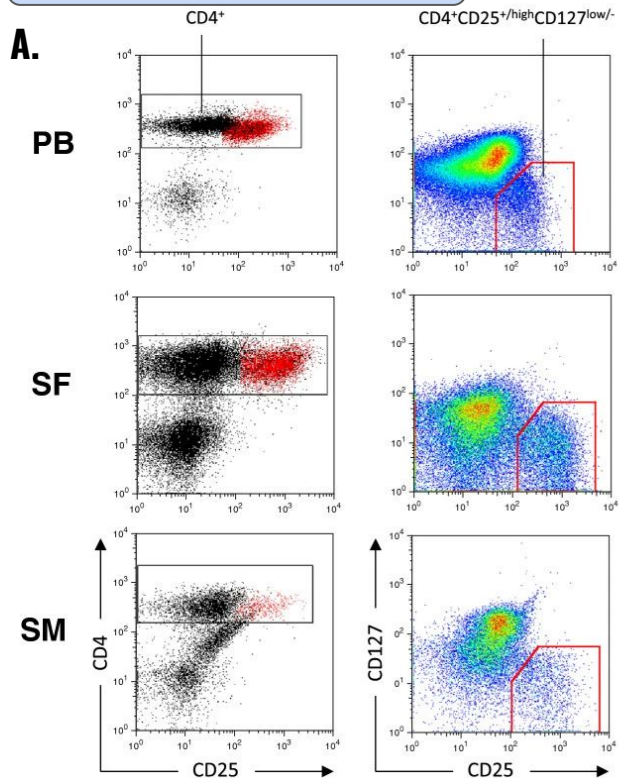
LONGITUD DE ONDA



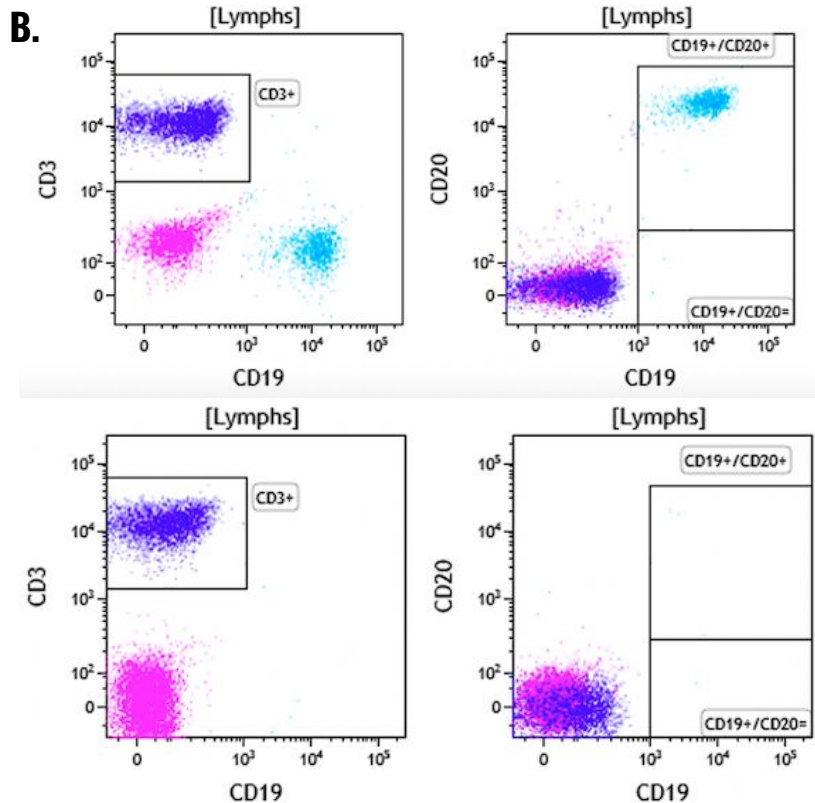
Tomado de:
<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/flow-cytometry-principle>



Artritis reumatoide



Moradi et al, 2014



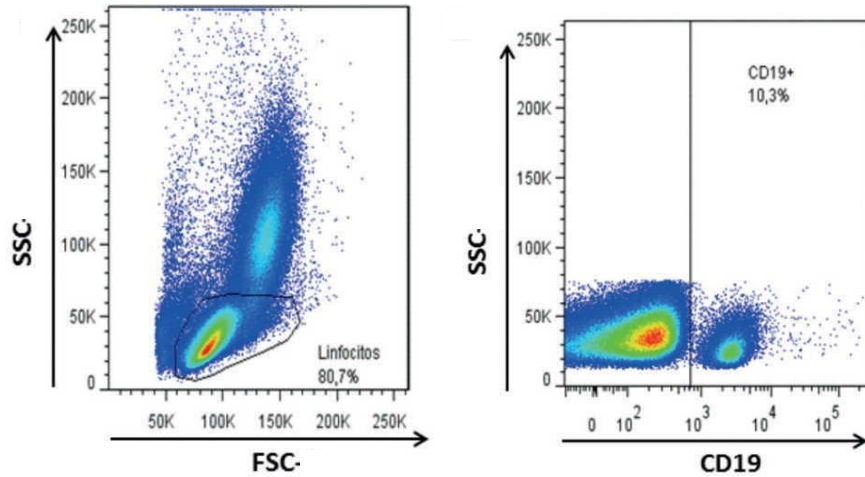
Paciente con AR activa

Tratamiento con Rituximab

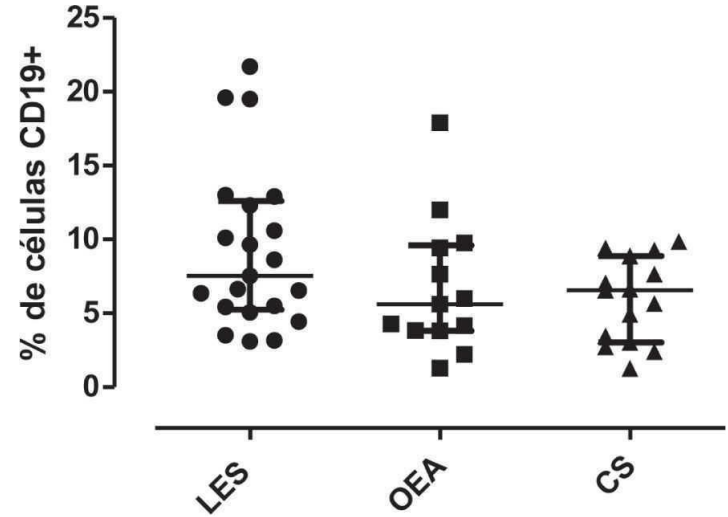
Tomado de: <https://www.cytometry.org/web/index.php>

Lupus eritematoso sistémico

A.



B.

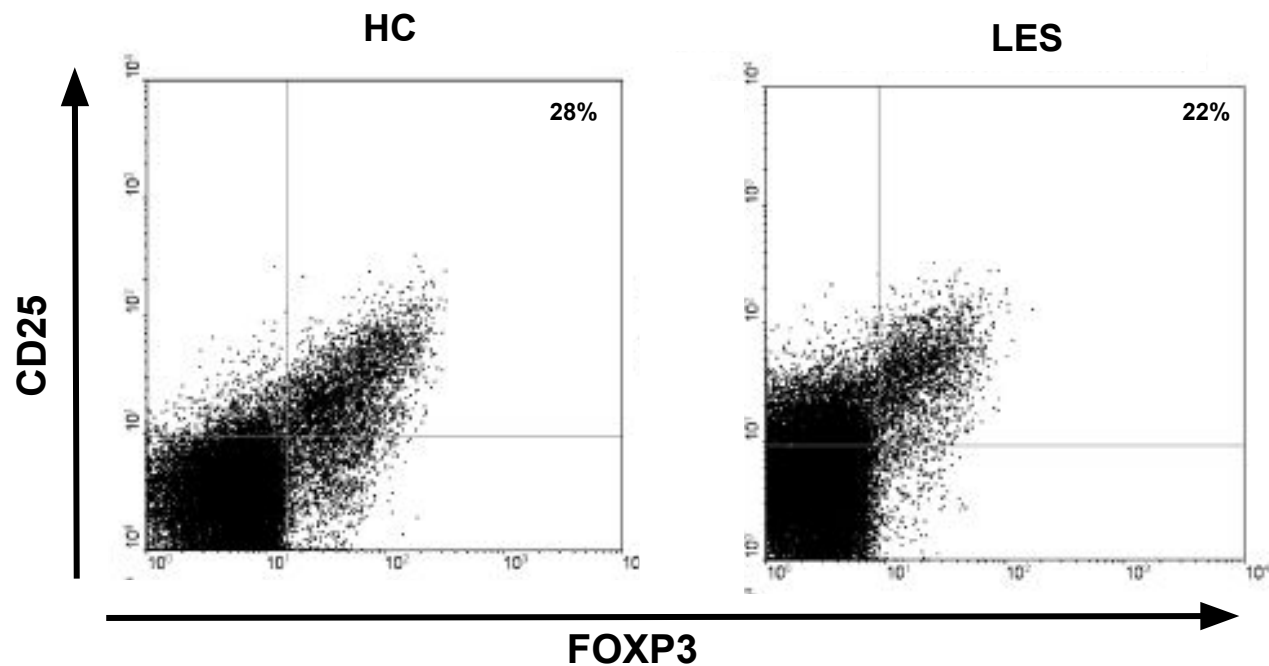


Rev Colomb Reumatol. 2013;20:218-27

Parra et al, 2014



Lupus eritematoso sistémico

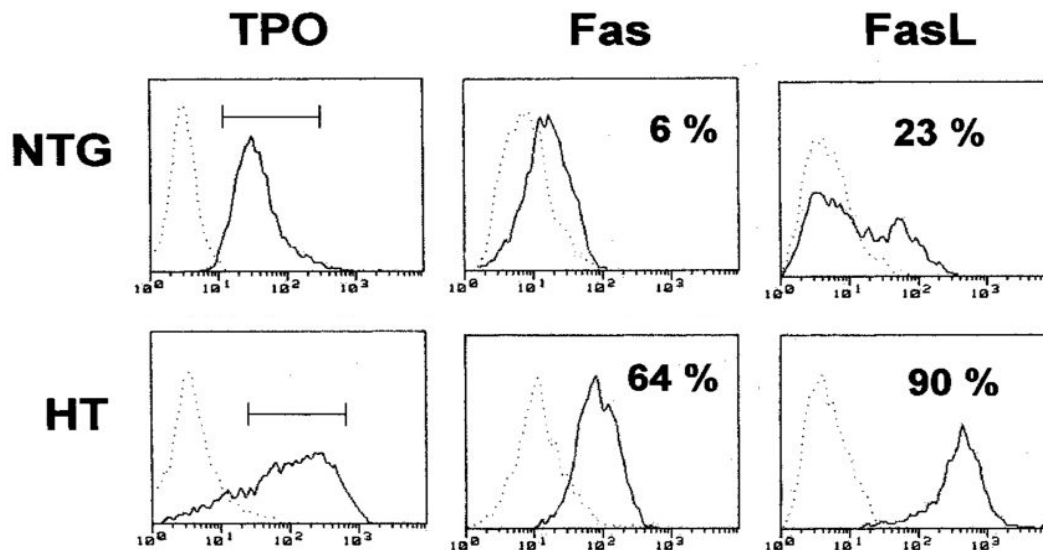


Lin et al, 2007



Tiroiditis de Hashimoto

A.

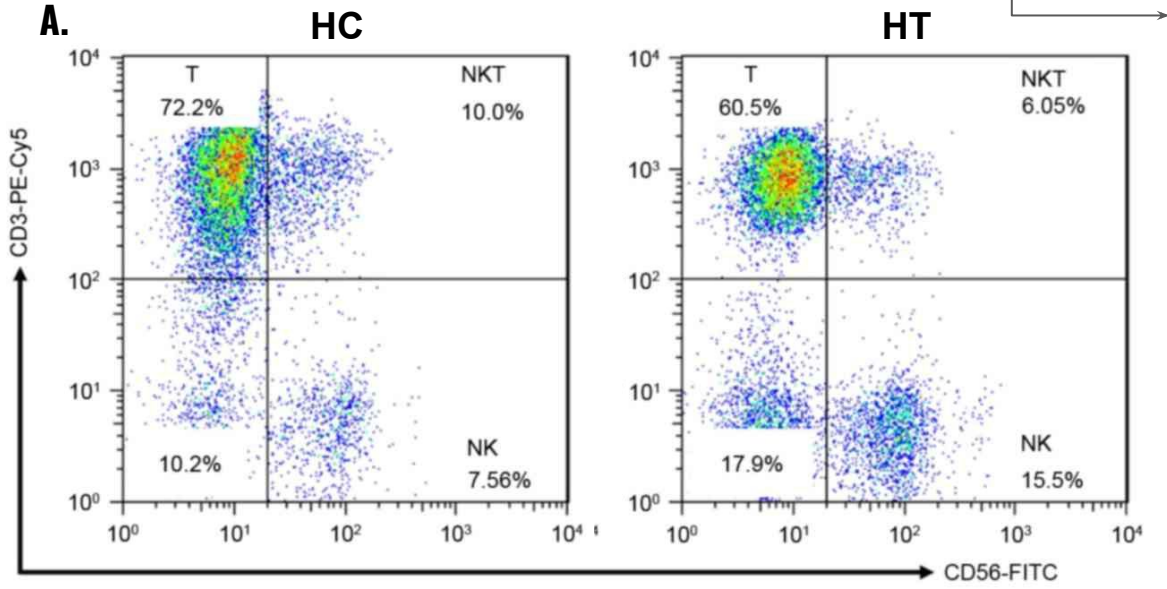


Giordano et al, 2001



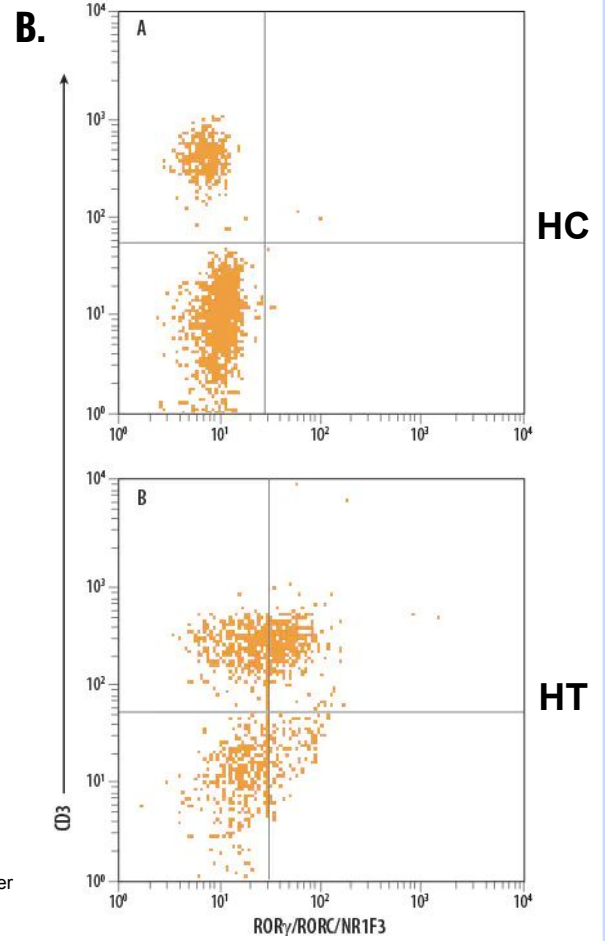
Tiroiditis de Hashimoto

Tomado de:
https://www.mdsystems.com/products/human-rorgamma-rorc-nr1f3-percp-conjugated-antibody-600214_ic6109c



Wang et al, 2017

Tomado de:
https://www.mdsystems.com/products/human-rorgamma-rorc-nr1f3-percp-conjugated-antibody-600214_ic6109c





VENTAJAS DE LA GMF

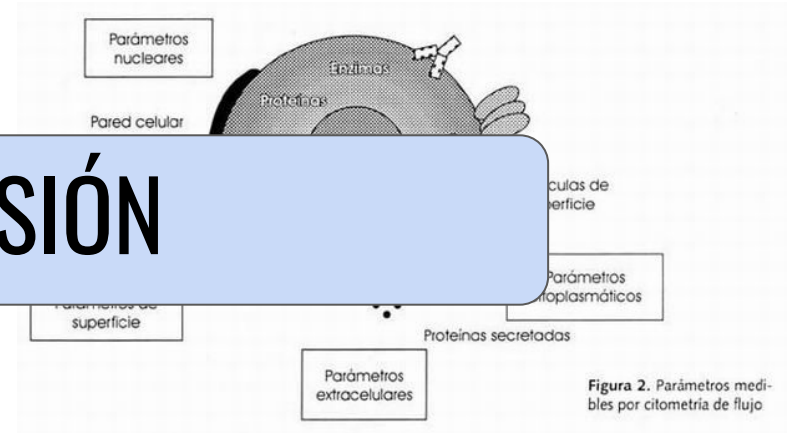
Análisis estructural y funcional de las células

Elevada sensibilidad, especificidad y objetividad

DISCUSIÓN

Posibilidad de realizar mediciones simultáneas

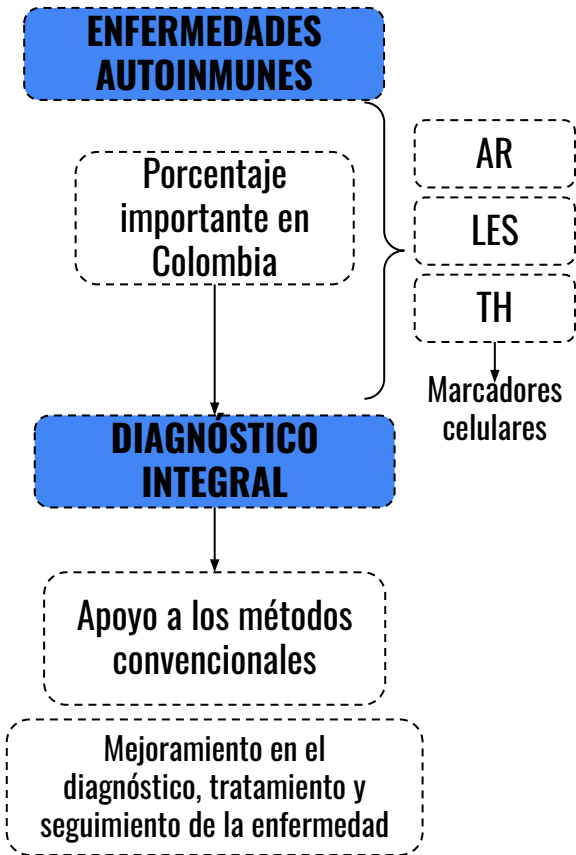
Separación celular (Sorting)



Tomado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000100007



Distribución de las enfermedades autoinmunitarias y su respectiva prevalencia en Colombia



	Artritis reumatoide	Lupus eritematoso sistémico	Tiroiditis de Hashimoto
Linfocitos B	Aumentados	Aumentados	Aumentados
Linfocitos T reguladores	Aumentados	Disminuidos	Aumentados
Natural killer	Disminuidos	Disminuidos	Aumentados

Bautista LM, Correa AM, 2022.

GRACIAS



Referencias bibliográficas

1. Moradi B, Schnatzer P, Hagmann S, Rosshirt N, Gotterbarm T, Kretzer J, et al. CD4+CD25+/highCD127low/- regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints—analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis Research & Therapy* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 9];16(2):R97. Available in: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4545/figures/1>
2. International Clinical Cytometry Society [Internet]. *Cytometry.org*. 2022 [cited 2022 Jun 9]. Available in: <https://www.cytometry.org/web/index.php>
3. Sánchez Parra CC, López MR, Yassin LM, Vásquez Duque GM. Subpoblaciones de linfocitos B y su expresión de CD1d en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Revista Colombiana de Reumatología* [Internet]. 2013 Dec [cited 2022 Jun 9];20(4):218–27. Available in: <https://www.elsevier.es/pt-revista-revista-colombiana-reumatologia-374-articulo-subpoblaciones-linfocitos-b-su-expresion-S0121812313701361>
4. Lin S-C., Chen K-H., Lin C-H., Kuo C-C., Ling Q-D., Chan C-H. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *European Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2007 Dec [cited 2022 Jun 9];37(12):987–96. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2362.2007.01882.x>

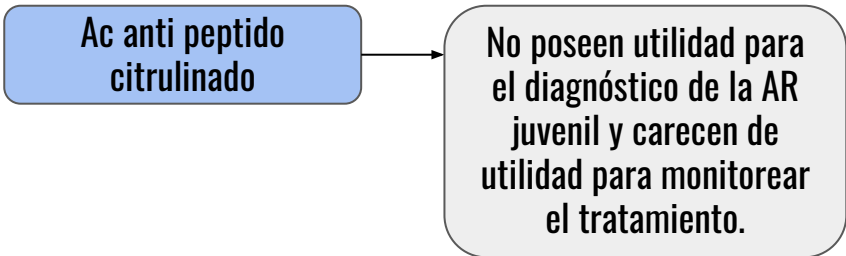
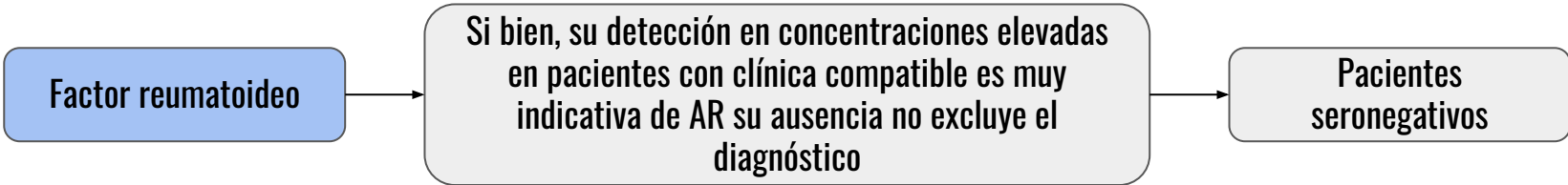


Referencias bibliográficas

5. Giordano C, Pierina Richiusa, Bagnasco M, Galluzzo A. Differential Regulation of Fas-Mediated Apoptosis in Both Thyrocyte and Lymphocyte Cellular Compartments... [Internet]. ResearchGate. Mary Ann Liebert; 2001 [cited 2022 Jun 9]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/12007944_Differential_Regulation_of_Fas-Mediated_Apoptosis_in_Both_Thyrocyte_and_Lymphocyte_Cellular_Compartments_Correlates_with_Opposite_Phenotypic_Manifestations_of_Autoimmune_Thyroid_Disease
6. Wang Y, Sun J, Gao W, Song B, Shao Q, Zhao L, et al. Preoperative Tim-3 expression on peripheral NK cells is correlated with pathologic TNM staging in colorectal cancer. Molecular Medicine Reports [Internet]. 2017 Apr 19 [cited 2022 Jun 9];15(6):3810–8. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.6482>
7. Human ROR gamma /RORC/NR1F3 PerCP-conjugated Antibody [Internet]. www.rndsystems.com. R&D Systems; 2017 [cited 2022 Jun 9]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-rorgamma-rorc-nr1f3-percp-conjugated-antibody-600214_ic6109c



ARTRITIS REUMATOIDE



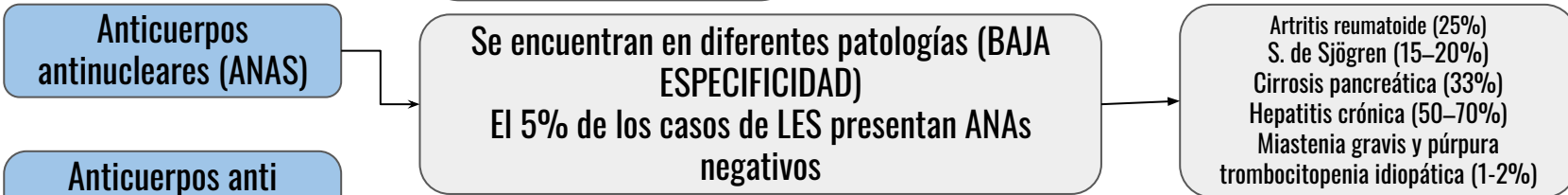
PLoS One, 2018; 13(4): e0195550. PMID: PMC5889180
 Published online 2018 Apr 6. doi: [10.1371/journal.pone.0195550](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195550) PMID: 29624625

Clinical management of seronegative and seropositive rheumatoid arthritis: A comparative study

Sang-Tae Choi, Data curation, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing^{1*} and Kwang-Hoon Lee, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing²

Takuma Kato, Editor

LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO





DESVENTAJAS DE LAS PRUEBAS UTILIZADAS

FACTOR REUMATOIDEO

- 5-10% falsos positivos
- Elevado en ancianos
- Otras enfermedades: S. de Sjögren, infecciones, cáncer, enf. pulmonar, hepática o renal

ANTI-CCP

- Discrepancias con el FR
- Otras enfermedades: S. de Sjögren, enf. de Graves, LES, tuberculosis
- Monitoreo del tratamiento

ANAs

- Positividad con medicamentos
- Un resultado positivo no indica EA
 - ANAs en pacientes sanos
- Otras enfermedades

ANAs y ENAs

- Positividad con medicamentos
- Un resultado positivo no indica EA
 - ANAs en pacientes sanos
- Otras enfermedades

ANTI-TIROGLOBULINA Y ANTI-PEROXIDASA

- No están positivos en todos los casos de TH
- Otras enfermedades: cáncer de tiroides, DM1, AR, anemia perniciosa



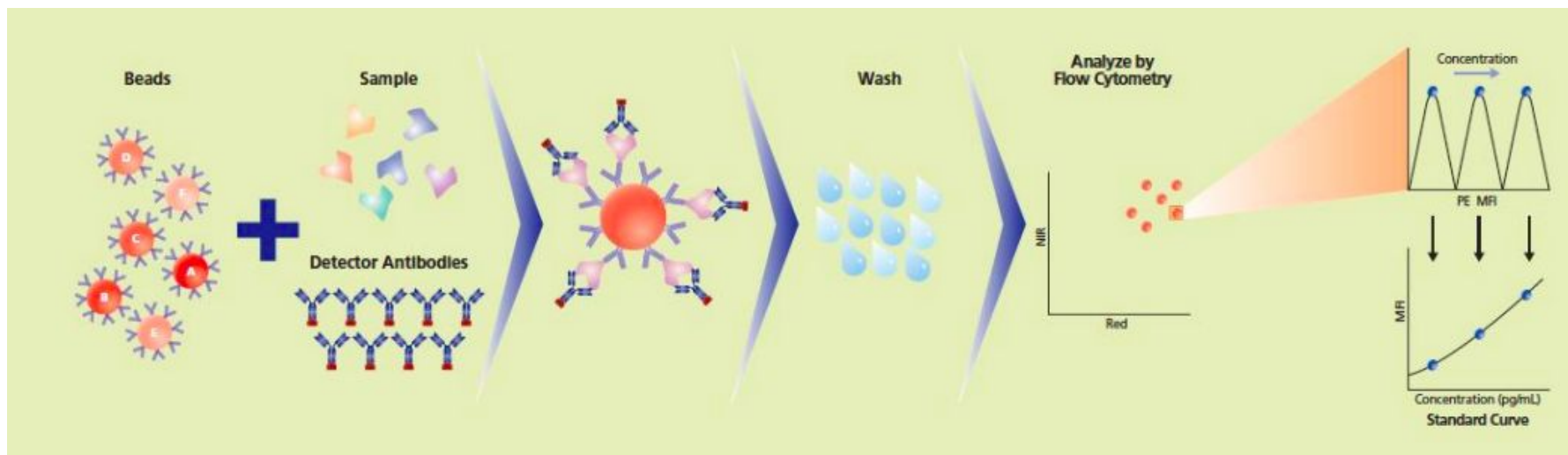
CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS, PROTEÍNAS
DE SEÑALIZACIÓN CELULAR, PROTEÍNAS
SOLUBLES E INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE
INMUNOENSAYO MULTIPARAMÉTRICO POR
CITOMETRÍA DE FLUJO. MÉTODO CBA.

Unidad Científico-Técnica: Laboratorios de Investigación
Área de Citometría y Microscopia

www.ibsgranada.es



CBA





¿Por qué las células T reguladoras en el LES no son efectivas?

Los linfocitos T en el LES producen muy poca cantidad de IL-2, indispensable para la supervivencia y función de las Treg

La IL-6 puede inducir a la resistencia de las células T a las acciones de las Treg

En el LES, las células Treg tienen que regular una gran cantidad de células B y T autorreactivas y la proporción T autorreactivas/Treg es alta

En el LES los LT, las CD y los monocitos producen IL-21 e IL-6 que promueven la diferenciación de las células Th17 y suprimen la función de las Treg.

Las células dendríticas en el LES producen grandes cantidades de IL-6 e IFN- α que son capaces de inhibir la función supresora de las células Treg.

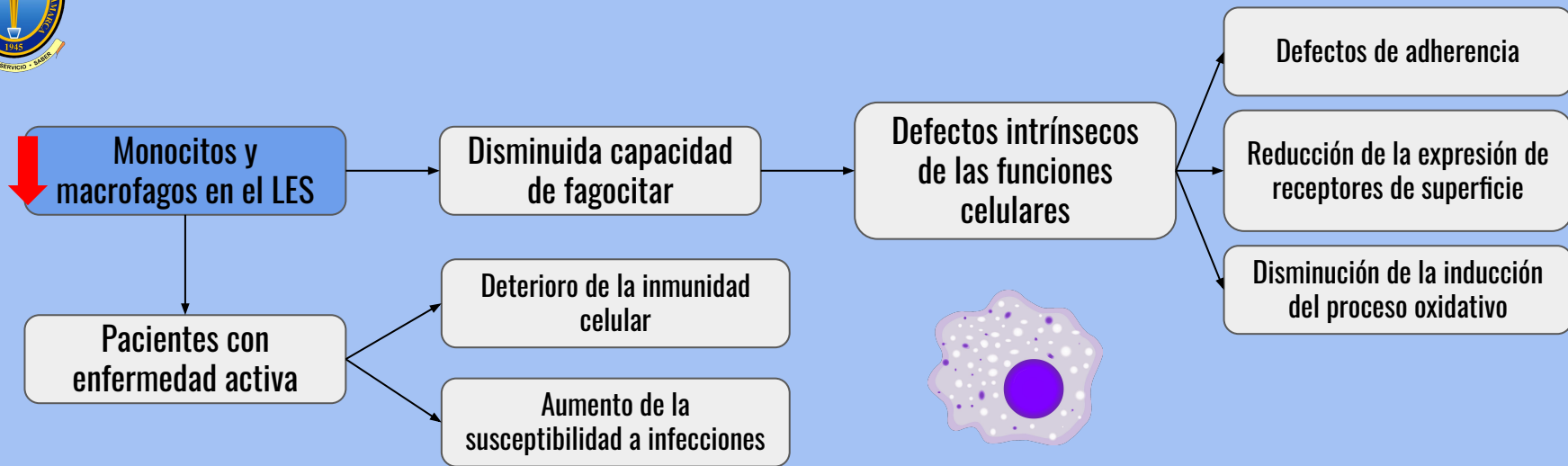
Los pacientes con LES producen menos TGF- β útil para inducir y estabilizar la expresión de FoxP3 por parte de las Treg y para suprimir la proliferación de linfocitos

Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus

Kim Ohl ¹, Klaus Tenbrock

Affiliations + expand

PMID: 25378177 DOI: [10.1002/eji.201344280](https://doi.org/10.1002/eji.201344280)



REVISIÓN - OPINIÓN

Lupus eritematoso sistémico: implicaciones de la inmunidad innata

Mónica Saucedo-Ulloa,^{***} Martha Gabriela Contreras-Moreno,^{****}
Juan Manuel Saldaña-Anguiano,^{****} Fabiola Idaly Casillas-Iglesias,^{***}
Arturo Rincón-Sánchez,^{****} Andrea Verónica Lujano-Benítez,^{****}
Esther Guadalupe Corona-Sánchez,^{**} Erika Aurora Martínez-García^{**}

> *J Rheumatol.* Jan-Feb 1981;8(1):62-8.

Decreased numbers of monocytes in inflammatory exudates in systemic lupus erythematosus

F C Passero, A R Myers

PMID: 7012342

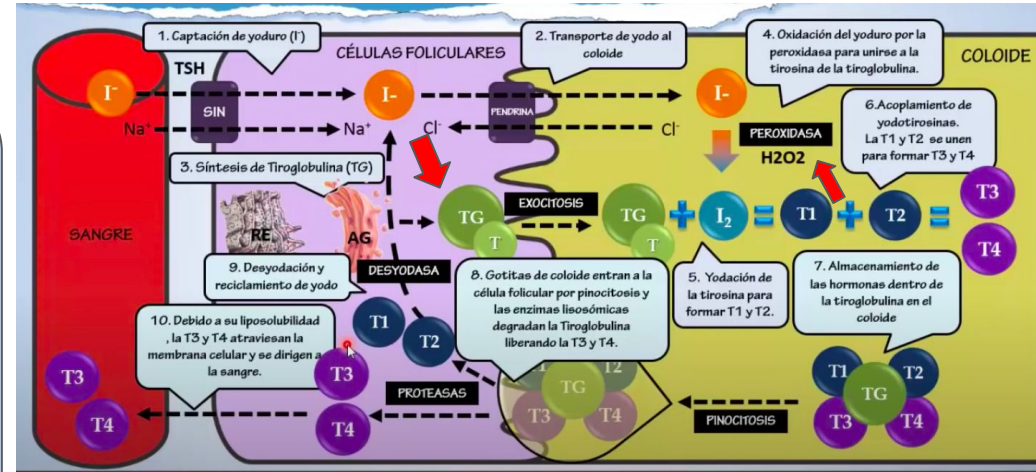
Autoanticuerpos implicados en la TH

Tiroglobulina

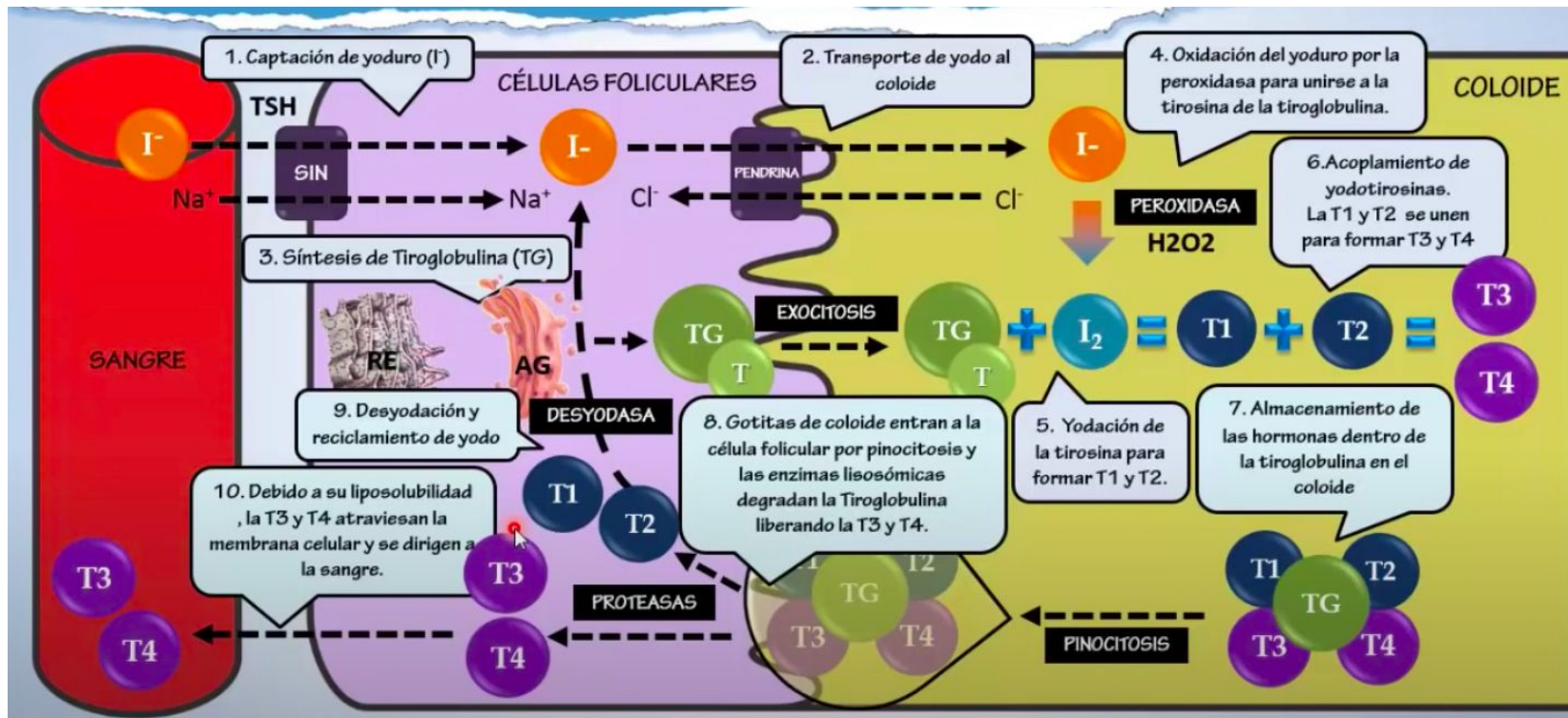
Proteína sintetizada por la tiroides ante el estímulo de la TSH. Está formada por alrededor de 70 moléculas del aminoácido tirosina

Peroxidasa

Enzima encargada, junto con el peróxido de hidrógeno, de la oxidación del yoduro (I^-) a yodo molecular (I_2) en el coloide de la tiroides para permitir su unión con la tirosina de la tiroglobulina.



Tomado de: <https://www.udocx.com/apuntes/107302/sintesis-de-hormonas-tiroideas>

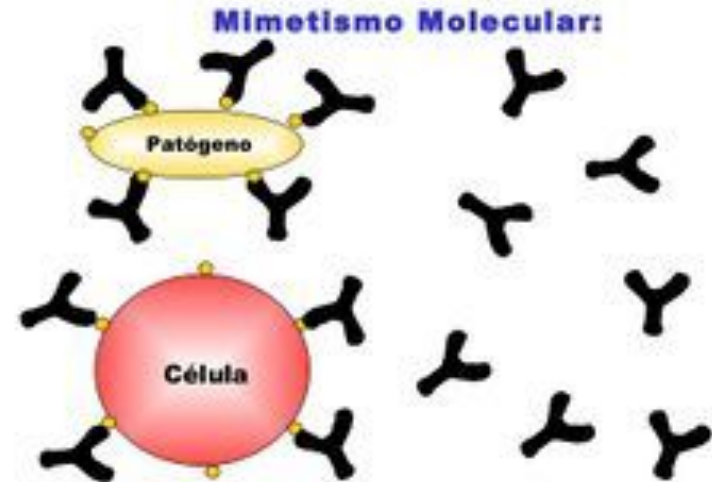


EA y microorganismos

Un microambiente inflamatorio incrementa la presentación de antígenos propios producto del daño tisular y expresión de moléculas coestimuladoras

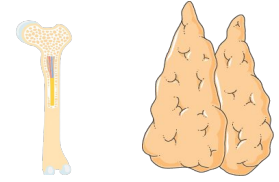
Epítopes compartidos

Mimetismo molecular



Mecanismos de tolerancia central

En médula ósea
y timo



Apoptosis

Es la muerte celular programada de linfocitos autorreactivos e inmaduros que reconocen con alta afinidad un antígeno propio, de esta manera se impide que maduren y salgan a circulación.

Regulación

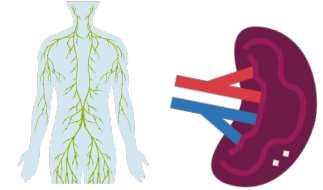
Células T que expresan Foxp3 para convertirse en un linfocito T regulador, de esta manera en la tolerancia central estos linfocitos pueden regular a las células T autorreactivas

Edificación o modificación del receptor

Reemplazar su BCR autorreactivo por otro que solo reconozca antígenos extraños por medio de la recombinación genética gracias a las enzimas RAG1 y RAG2

Mecanismos de tolerancia periférica

Ganglios linfáticos,
bazo y tejidos linfoides
asociados a piel



Delección clonal

Las células T autorreactivas expresan Fas-L sobre ellas mismas cuando reconocen autoantígenos en los tejidos periféricos dando lugar a la apoptosis al unirse con el Fas que co-expresan

Anergia

El linfocito entra en un estado inactivo hasta que recibe una estimulación adecuada, en el caso de los linfocitos T el efecto es una falta de producción de citoquinas y en los linfocitos B una falta de producción de anticuerpos

Supresión mediada por linfocitos T

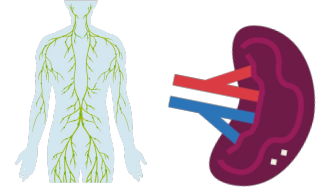
Reemplazar su BCR autorreactivo por otro que solo reconozca antígenos extraños por medio de la recombinación genética gracias a las enzimas RAG1 y RAG2

Regulación

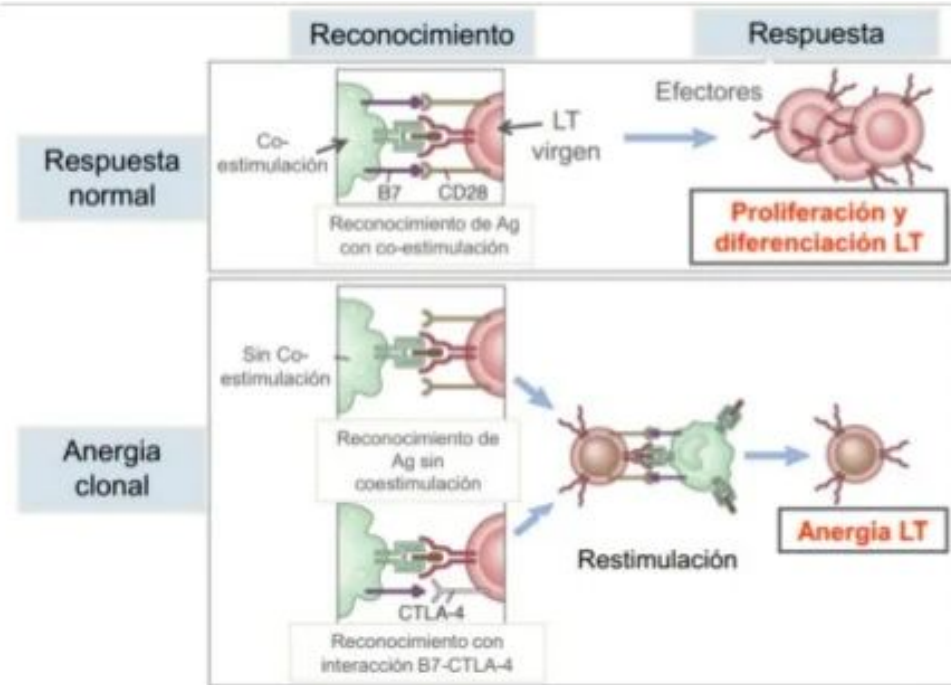
Su objetivo es prevenir y regular las respuestas inmunes autoagresivas en el sistema inmune mediante la secreción de citoquinas (TGF-BETA e IL-10)

Mecanismos de tolerancia periférica

Ganglios linfáticos,
bazo y tejidos linfoides
asociados a piel

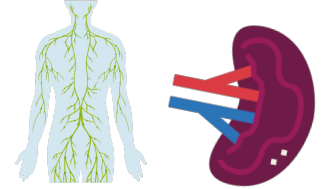


Anergia

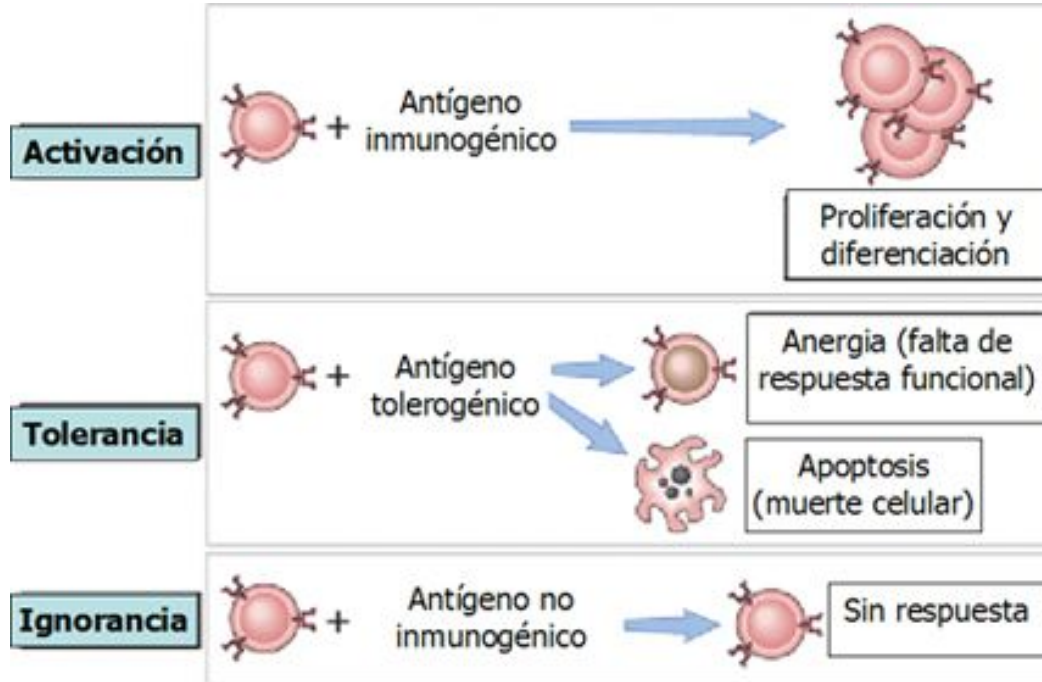


Mecanismos de tolerancia periférica

Ganglios linfáticos,
bazo y tejidos linfoides
asociados a piel

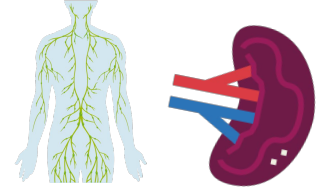


Ignorancia
inmunológica



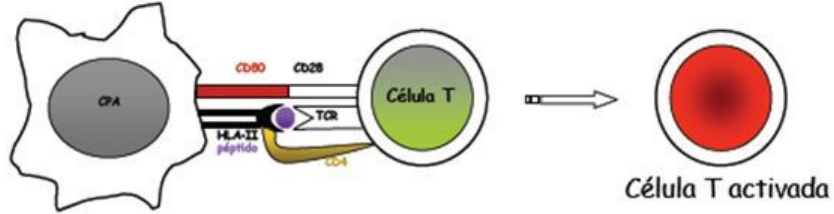
Mecanismos de tolerancia periférica

Ganglios linfáticos,
bazo y tejidos linfoides
asociados a piel

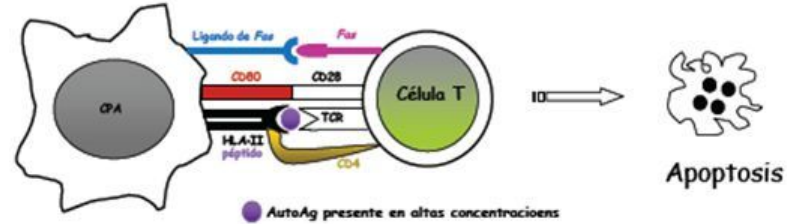


Delección clonal

RESPUESTA T
NORMAL



DELECIÓN
CLONAL T





Factores hormonales

Existe evidencia que muestra que la población más afectada involucra a las mujeres en edad fértil

Cuadros de reactivación clínica en etapas de cambios hormonales como la menarquía, el embarazo, la lactancia y el uso de anticonceptivos.

La elevada incidencia en el sexo femenino sugiere que las hormonas sexuales juegan un papel etiopatogénico preponderante, modulando la expresión de autoinmunidad.

Esto ha sido comprobado en modelos murinos, en los cuales la administración de andrógenos exógenos, tienden a suprimir la enfermedad, mientras que los estrógenos la exacerban.

En humanos de ambos sexos con LES, han sido demostradas alteraciones del metabolismo estrogénico, las cuales presentan una marcada hidroxilación del estradiol con una acentuada actividad estrogénica periférica.

Posiblemente, los estrógenos se unen a los linfocitos T supresores, inhibiendo su función permitiendo una mayor producción de anticuerpos por las células B.



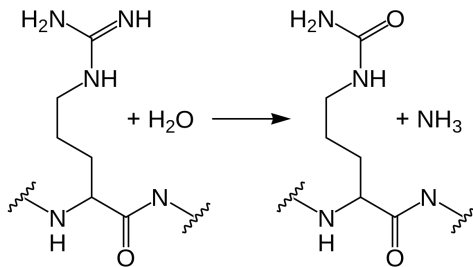
Modificaciones postraduccionales

Cambios químicos que sufren las proteínas después de ser sintetizadas

Cambio en el aminoácido
Modificación en el punto isoelectrico
Se pierde la carga positiva
Se ve afectado la interacción con otras proteínas

La citrulinación

Es la conversión del residuo de arginina a citrulina



Expresa neutrófilo y eosinófilos

Activa la respuesta inmune

Isotipo 4

Proteínas citrulinadas en artritis reumatoide

Citrullinated proteins in Rheumatoid Arthritis

Elizabeth Olivares Martínez, Diego F. Hernández Ramírez, Carlos A. Núñez-Álvarez, Javier Cabiedes²²

Laboratorio de Inmunología, Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México



Recombinación somática

La organización de los genes que codifican las inmunoglobulinas y los TCR es la encargada de generar la gran diversidad de anticuerpos y receptores de células T capaces de responder a cualquier antígeno

La codificación de las regiones variables de los receptores de linfocitos tiene múltiples versiones y los precursores de linfocitos pueden escoger por azar una de esas versiones

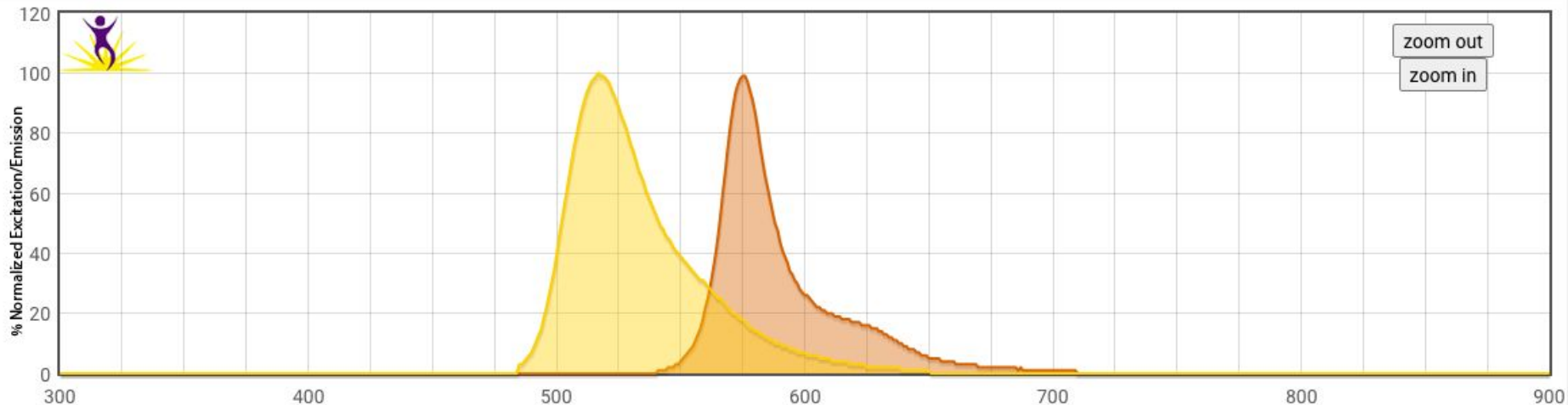
Un linfocito T
expresa un único
TCR

Un linfocito B
expresa un único
BCR

Consiste en reordenar el ADN de tal manera que solo una versión final de las múltiples posibles sea expresada

Las enzimas **RAG1** y **RAG2** (recombinasas) solo se expresan en el desarrollo de los linfocitos inmaduros

Un vez estos hayan madurado y salgan a periferia el TCR y BCR no volverá a cambiar porque las enzimas **RAG1** y **RAG2** son inhibidas



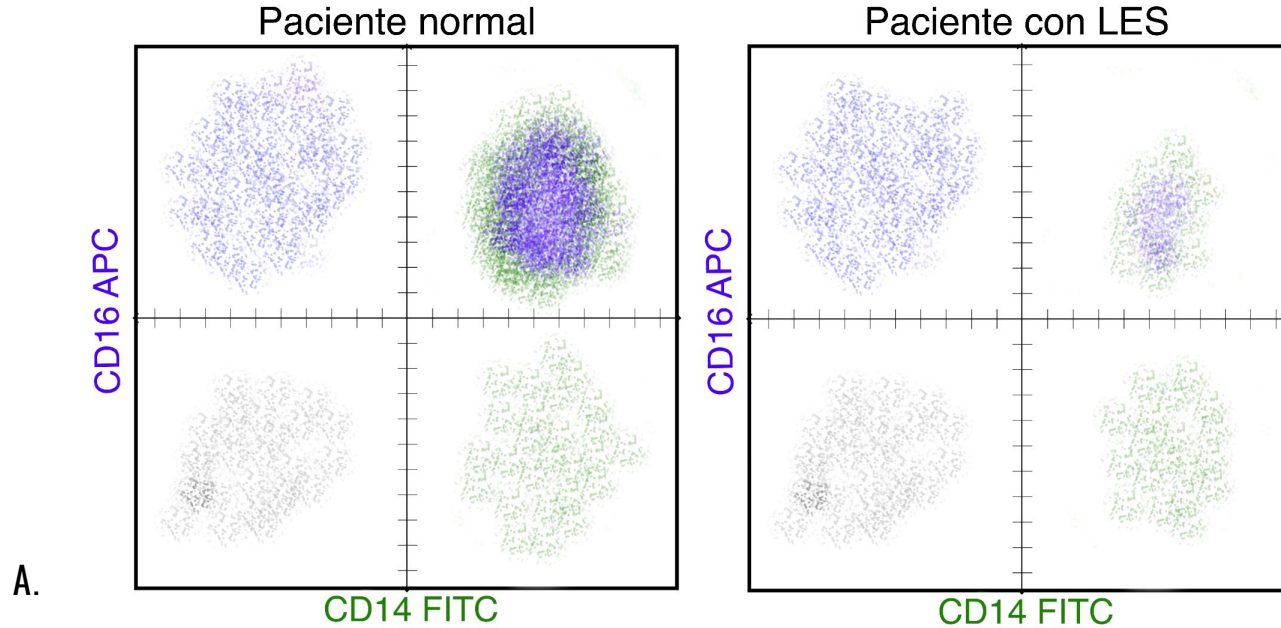
zoom out

zoom in

Ex Em		Ex Em Laser		Filter/Bandpass	
PE	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Select Fluorophore	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	325	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
FITC	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	Select Fluorophore	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	355	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
				Line(nm)	
				Position: 440(nm), 37%	
				<input checked="" type="checkbox"/> Enable tooltip	

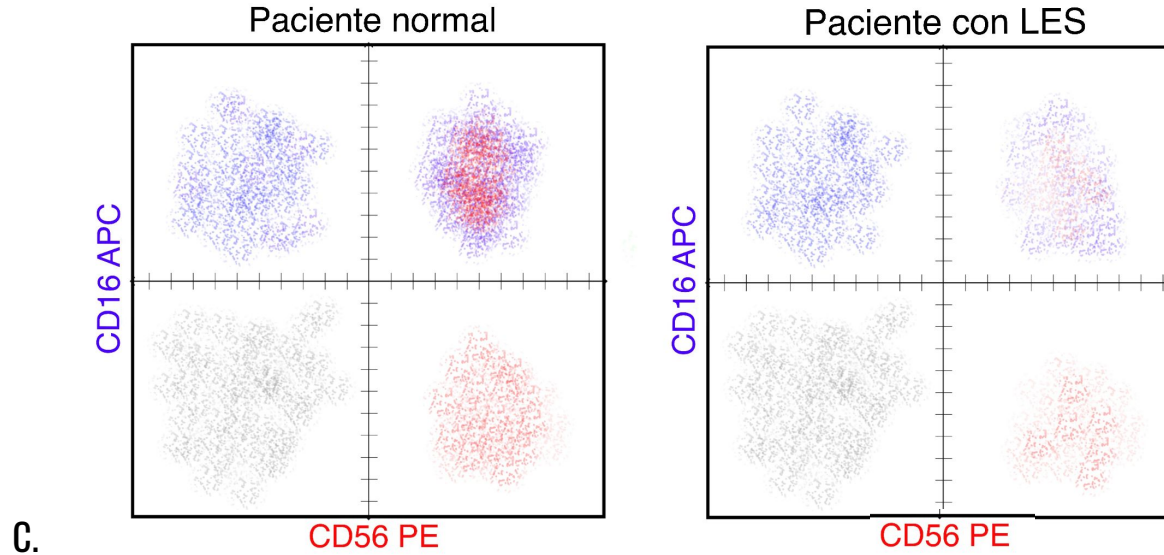


Lupus eritematoso sistémico



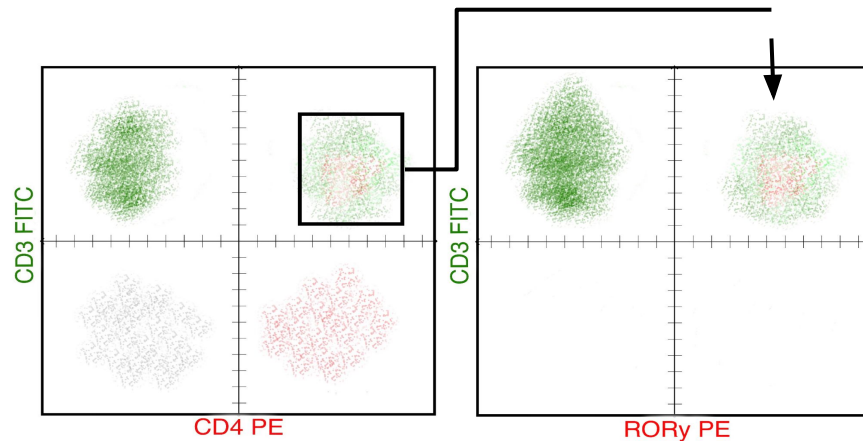
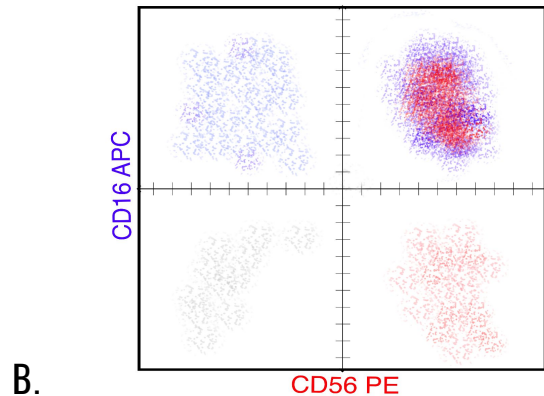
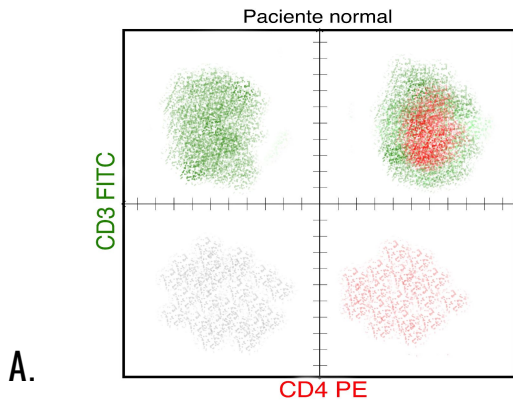


Lupus eritematoso sistémico





Tiroiditis de Hashimoto



Bautista LM, Correa AM, 2022.