

- DuPont, H.L., Levine, M.M., Hornick, R.B. y Formal, S.B. (1989) Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* **159**, 1126-1128.
- Islam, D. y Lindberg, A.A. (1992) Detection of *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri* in feces by immunomagnetic isolation and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2801-2806.
- Lindberg, A.A., Cam, P.D. y Chan, N. (1991) Shigellosis in Vietnam. *Rev. Infect. Dis.* **13**, (Suppl. 4): S231-237.
- Lindberg, A.A., Kärnell, A. y Weintraub, A. (1991) The lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor. *Rev. Infect. Dis.* **13** (Suppl. 4): S 279-284.
- Lindberg, A.A. y Pál, T. (1993) Strategies for development of potential candidate *Shigella* vaccines. *Vaccine* **11**, 168-179.
- Mata, L. y Rosero, L (1988) *National health and social development in Costa Rica: A case study of intersectoral action*. PAHO Tech. paper N° 13.
- Sansonetti, P.J. (1992). *Pathogenesis of Shigellosis*. Current topics in Microbiology and Immunology **180**, 1-143.
- Saulnier, P. y Andremont, A. (1992) Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2080-2083.
- Institute of Medicine (1986) In: *New vaccine development: establishing priorities* (Vol.2). Washington DC, National Academy Press, 329-337.

**LAS CITOKINAS, ELEMENTOS
CENTRALES PARA LA
COMPRESION Y MANIPULACION
TERAPEUTICA DEL SISTEMA
INMUNE (Parte II).**

Bruno Lomonte, MQC, PhD
Instituto Clodomiro Picado, Cátedra de
Inmunología, Facultad de Microbiología,
Universidad de Costa Rica.

Como se mencionó en la primera parte de este artículo (*Gaceta Patol. Clín.* **1**, 44-47), las citokinas están interrelacionadas en una red funcional, la cual está finamente regulada. El balance en la producción de estas proteínas va a jugar un papel determinante en dirigir al sistema inmune hacia un determinado tipo de respuesta, y va a tener consecuencias profundas en la homeostasia general del organismo. Existen varios tipos de mecanismos por los cuales se regula la producción y la acción de las citokinas *in vivo*. Su estudio provee fascinantes posibilidades para manipular las respuestas inmunes en nuestro beneficio.

En primer lugar, las citokinas son producidas durante lapsos breves, transitorios, y no se almacenan en las células, sino que se secretan una vez sintetizadas. La vida media de los ARNm responsables de su síntesis es muy corta. Existe una serie de factores que regulan la transcripción de los genes de las citokinas en el núcleo, uniéndose a determinadas regiones del ADN. Todo esto forma parte de un sistema de regulación dentro de las células, que, posiblemente, podría ser más difícil de someter a intervención. Sin embargo, una vez fuera de las células, existen otros mecanismos reguladores para las citokinas. Se ha encontrado que para muchas de ellas, existen receptores solubles que las pueden bloquear. Es decir, los mismos receptores que están normalmente anclados en la membrana de las células "blanco", pueden ser liberados al medio circundante, compitiendo así por la unión con una determinada citokina. Ejemplos de esto son los receptores solubles de la IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IFN γ y TNF α . Salta a la vista la posibilidad de producir estos receptores solubles por métodos biotecnológicos, a través del clonaje de sus genes, eliminación de sus segmentos transmembrana y citoplásmicos, y finalmente, expresión en diversos sistemas,

para obtener la proteína recombinante. Existen ya algunos de ellos producidos por ingeniería genética, y sus efectos moduladores sobre las respuestas inmunes en distintas patologías están siendo estudiados experimentalmente.

Otro mecanismo de regulación de las citocinas se descubrió en el caso de la IL-1, al encontrarse un antagonista natural del receptor (IL-1ra, de "*receptor antagonist*"). En este mecanismo, el regulador no actúa sobre la citokina directamente, sino que se une a su receptor celular normal, pero sin causar la estimulación. La administración de IL-1ra humano recombinante fue capaz de reducir significativamente la mortalidad en ratones sometidos a una inyección letal de lipopolisacárido (LPS), lo que hace pensar que esta proteína podría ser de utilidad terapéutica en procesos patológicos que involucran la participación de la IL-1 (ej. en sepsis por bacterias gram-negativas).

Extracelularmente, es posible bloquear la acción de una citokina utilizando anticuerpos (por ej. monoclonales) neutralizantes. Aunque esta alternativa es teóricamente simple, y muy útil en modelos de experimentación animal, no es la más atractiva desde el punto de vista clínico, dado el origen heterólogo de los anticuerpos y los problemas que, por ende, se van a originar por su uso prolongado en humanos. Una solución a esto consiste en "humanizar" los anticuerpos monoclonales heterólogos, sustituyendo los genes para las cadenas pesadas de ratón (o rata) por los correspondientes genes humanos. Aunque este proceso se ha logrado realizar, aún no están superados todos los obstáculos, ya que incluso las regiones variables heterólogas pueden despertar respuestas inmunes inconvenientes. De ahí el enorme interés que existe en utilizar los inhibidores naturales que existen en el humano (antagonistas, receptores solubles, etc.) como agentes moduladores. Claramente, el

futuro apunta hacia la manipulación de la red de citocinas para modificar el curso y desenlace de una amplia variedad de enfermedades.

Otro aspecto fascinante en el estudio de las citocinas es el hallazgo de que algunos virus (de la familia de los Poxvirus y otras) contienen genes que codifican para proteínas similares a las porciones externas de los receptores de varias citocinas, por ejemplo, TNF, IL-1 β , IFN γ e IFN α/β . Al carecer de las porciones transmembrana y citoplásmicas, estas proteínas son secretadas, se unen específicamente a una citokina, e interfieren con su actividad al impedir su interacción con los receptores celulares. ¡Tal parece que la idea de adquirir y aprovechar los genes para receptores solubles de las citocinas fue descubierta por los virus algunos millones de años antes que por nosotros! Este es un campo en el que queda muchísimo por descubrir, para comprender la patogénesis de enfermedades infecciosas y la forma en que los agentes evaden y manipulan las respuestas inmunes. Por ejemplo, el virus Epstein-Barr (EBV) contiene un gen que codifica para una proteína homóloga a la citokina IL-10, la cual suprime algunos componentes de la respuesta inmune celular.

¿Cómo se detectan y cuantifican las citocinas en el laboratorio? ¿Cómo se estudian sus complejas acciones *in vivo*? Estas son dos áreas que experimentan importantes avances.

La cuantificación de citocinas en diversos fluidos, desde sobrenadantes de cultivos celulares hasta suero, secreciones, y otras muestras clínicas, se puede realizar fundamentalmente a través de dos clases de técnicas: los inmunoensayos (inmunoenzimáticos, radioinmunes, etc.) y los bioensayos. Los primeros tienen la ventaja de ser muy específicos, reproducibles, estandarizables, y sencillos, con la desventaja (inherente a todo

inmunoensayo) de no distinguir la calidad funcional del antígeno. Su costo a nivel comercial es mayor que el de los segundos. Por otra parte, los bioensayos se basan en la respuesta funcional hacia una citokina, para su cuantificación (ej. la proliferación de una línea celular que es estrictamente dependiente de una citokina). Los bioensayos tienen como ventaja principal una altísima sensibilidad (entendiéndose esta como el límite inferior de detección de la citokina), y un costo sensiblemente menor que los inmunoensayos comerciales. Sin embargo, sus desventajas incluyen una menor especificidad, reproducibilidad, difícil estandarización, y mayor complejidad. En la Fig.1 se muestra una comparación de dos técnicas para cuantificar IL-6, para ilustrar las diferentes sensibilidades que pueden obtenerse.

A nivel de la producción celular, es posible detectar algunas citokinas en cortes histológicos mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, dado que estas proteínas se secretan, es más conveniente detectar el ARNm en las células que las producen, utilizando sondas genéticas marcadas, en técnicas de hibridación *in situ*, sobre tejidos o células fijadas. También es posible hacer un recuento de células (en suspensión) que producen una determinada citokina, aplicando variantes del método conocido como ELISPOT, o cuantificar ARNm específico de estas células mediante amplificación por PCR reversa. La citometría de flujo con anticuerpos monoclonales fluorescentes es útil en la detección de receptores para citokinas, en células en suspensión. Existen también inmunoensayos para cuantificar receptores solubles de las citokinas en fluidos biológicos.

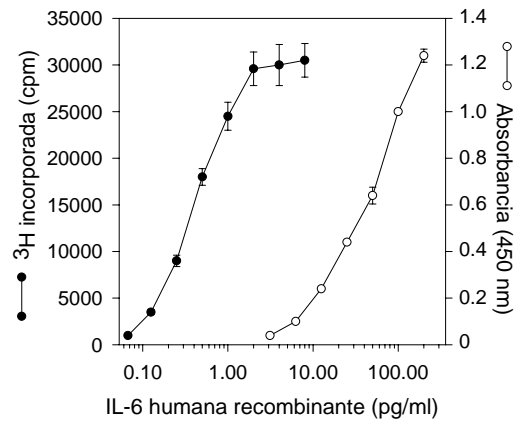


Fig.1: Cuantificación de IL-6 mediante un bioensayo (●) y un ELISA (○). El bioensayo está basado en la proliferación del hibridoma B9 (una línea celular dependiente de IL-6 para su división) y subsiguiente incorporación de timidina tritiada, en cuentas por minuto (cpm). El ELISA corresponde a un juego de reactivos comercial (Genzyme), basado en la captura de IL-6 con un anticuerpo monoclonal y posterior detección con anticuerpos policlonales conjugados con peroxidasa. Las curvas se realizaron utilizando IL-6 recombinante como estándar. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de triplicados.

Es *in vivo* en donde se hace más difícil el estudio de las citokinas, dada la complejidad de sus acciones, referida anteriormente. Las principales estrategias utilizadas han sido, hasta años recientes, la administración de citokinas recombinantes, así como el uso de anticuerpos monoclonales, o de receptores solubles, para bloquear una determinada citokina. Esta estrategia ha permitido esclarecer parcialmente el papel que juegan determinadas citokinas en situaciones fisiopatológicas diversas. Al aparecer las técnicas para la obtención de animales transgénicos, se dio un enorme salto en el estudio y caracterización del rol de las citokinas *in vivo*, al poder contar con ratones que sobre-expresan una determinada citokina, o por el contrario, a los cuales se les ha eliminado el gen para una citokina

("knock-out"), para así observar cuáles son las consecuencias en la evolución y desenlace de trasplantes, enfermedades infecciosas, autoinmunes, neoplásicas, y muchas más. Todo esto nos hace pensar que, en un futuro no muy lejano, tendremos grandes y agradables sorpresas en el campo de la Salud, provenientes del estudio de las citokinas.

Referencias

- Alcamí, A. y Smith, G.L. (1995) Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol. Today* **16**, 474-478.
- Balkwill, F.R. (1991) *Cytokines*, 349 pp. Oxford, IRL Press.
- Clemens, M.J., Morris, A.G. y Gearing, A.J.H. (1987) *Lymphokines and Interferons*, 376 pp. Oxford, IRL Press.

III.FORO

LOS LABORATORIOS CLINICOS COMO EQUIPO DE APOYO A LOS E.B.A.I.S.

Dr. José Luis Salas Oviedo
CENDEISS, CCSS

Recientemente en las Regiones Programáticas se observa un creciente aumento en los servicios de Laboratorio Clínico. Algunos de los factores son:

1. Concepto de Medicina de Laboratorio, esto es, la necesidad que siente el Médico del apoyo que le presta en el diagnóstico;
2. Desarrollo de nuevas técnicas y procedimientos, utilizando cada día procesos más rápidos y más confiables;
3. Mayor disponibilidad y cobertura de los

servicios médicos; 4. Exigencia mayor del usuario.

La necesidad de contar con laboratorios clínicos más oportunos y confiables, que debe darse en todos los niveles de atención, debe ser una de las prioridades de la modernización de la CCSS. Por brindar un servicio de apoyo al diagnóstico y tratamiento médico, forman parte de un Sistema Nacional de Salud, coordinados entre sí, para lograr un objetivo común: la atención integral a las personas.

Dentro de la Estructura Programática de Salud, están orientados en alguno de los siguientes componentes: 1. Salud a las personas; 2. Salud ambiental; 3. Participación en Salud de la Comunidad.

Para afrontar estas demandas, un Sistema Regional de Laboratorios es ideal, ajustándonos así a los seis tipos diferentes de laboratorios clínicos, según su complejidad, y de acuerdo con nuestra ley. Todo este sistema se evalúa a través de un Departamento de Laboratorios Clínicos a nivel central, dependiente de la Dirección Técnica de Servicios de Salud. Las Direcciones Regionales, a su vez, cuentan con un Asesor/Supervisor Regional de Laboratorios Clínicos, el cual ejerce planeación, coordinación, supervisión, control, evaluación y asesoría de los laboratorios de la región.

El Laboratorio en el Sistema de Salud

En general, las pruebas de laboratorio están entre las principales ayudas diagnósticas de que puede disponer el Médico para la prevención, tratamiento y curación de las diferentes enfermedades. De ahí la necesidad de desarrollar una serie de procedimientos analíticos diversos. Como en todos los laboratorios se realiza una gran cantidad de pruebas, es necesario disponer de controles para poder garantizar que los resultados sean confiables.