

# Estrategias de diagnóstico novedosas para enfermedades vinculadas del sistema inmune

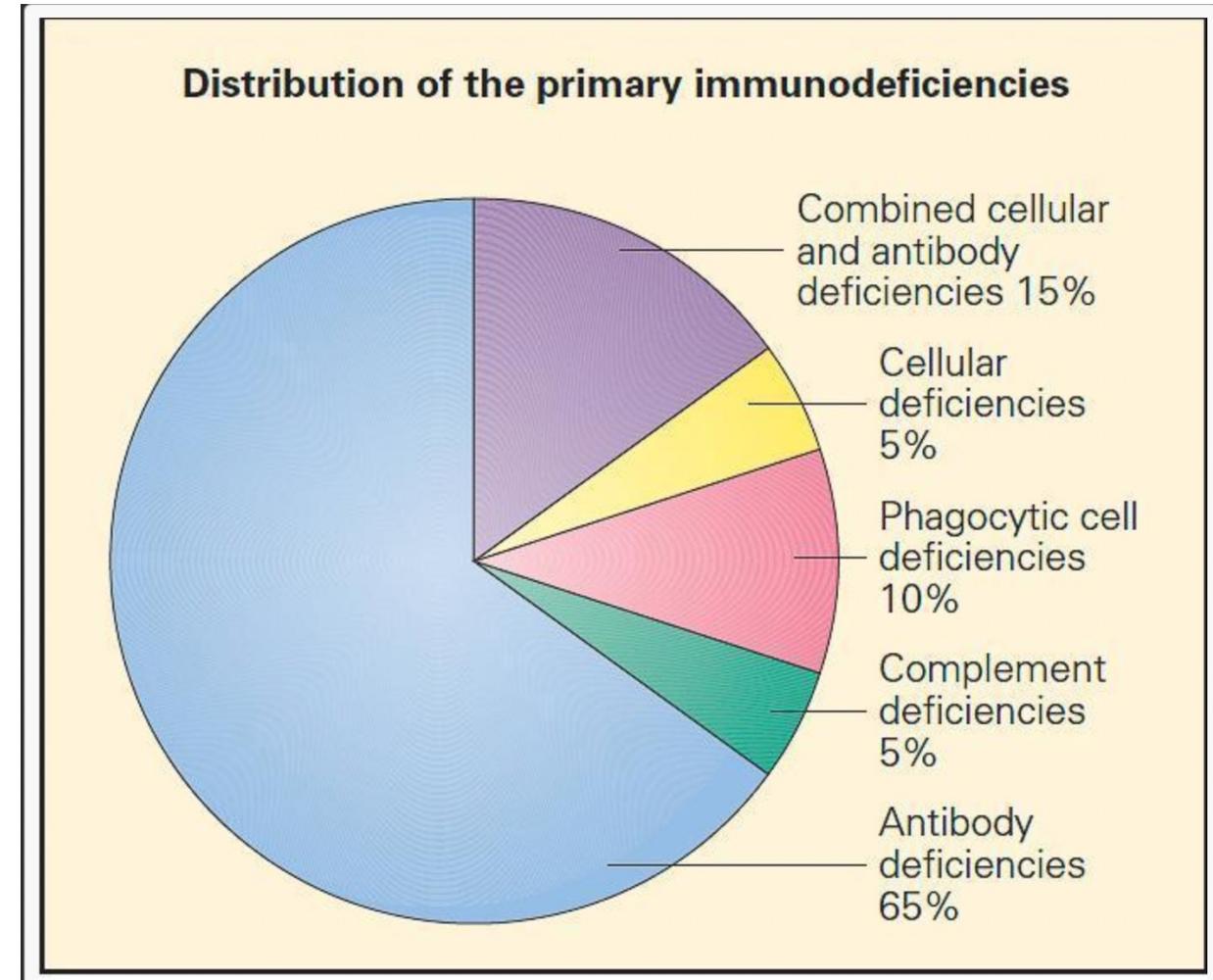
Diego Archila PhD

Septiembre 2023



# Las Inmunodeficiencias Primarias

- Las inmunodeficiencias primarias son un grupo heterogéneo de desórdenes del sistema inmune.
- Son desordenes difícil de diagnosticar y requieren de una evaluación integral del sistema inmune.

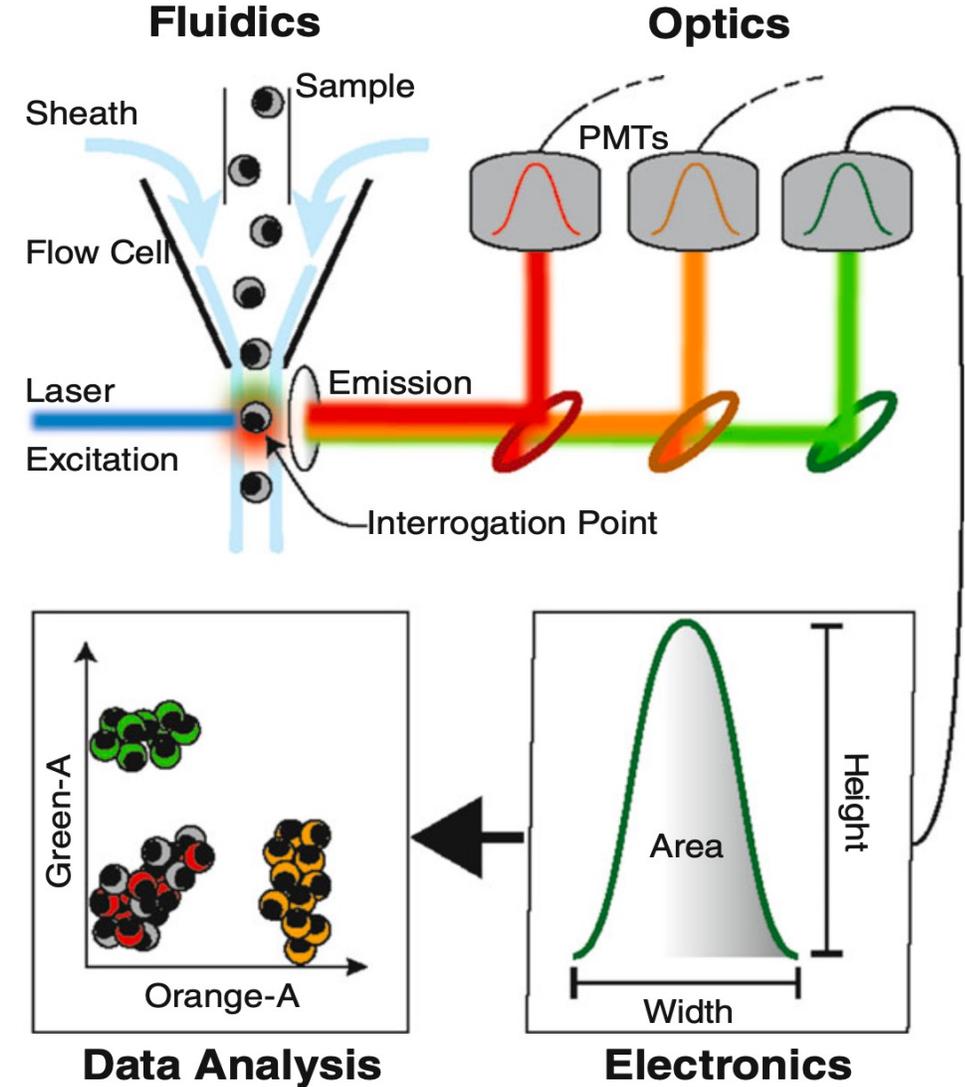


# Las Inmunodeficiencias Primarias en LATAM

Porcentaje (%)	Síndrome	Enfermedades principales
52	<b>Deficiencias de anticuerpos</b>	Agammaglobulinemia, XLA, CVID, Síndrome de Hiper IgM X, Hiper IgM autosómica recesiva, SIGAD, Deficiencia IgG
19	<b>Inmunodeficiencias bien definidas</b>	WASP, Síndrome DiGeorge
9	<b>Inmunodeficiencias combinadas</b>	SCID, Síndrome de Omern, Deficiencia CD40, Deficiencia de MHC Clase II, Ataxia Telangiectasia
6.2	<b>Desórdenes autoinflamatorios</b>	ALPS
3	<b>Deficiencias del complemento</b>	C5, C3, C4, Factor B...
1	<b>Deficiencias en la inmunidad innata</b>	Deficiencias de neutrófilos,
1	<b>Enfermedad de la desregulación del Sistema inmune</b>	XLP, IPEX, CMC, HIES, FHL

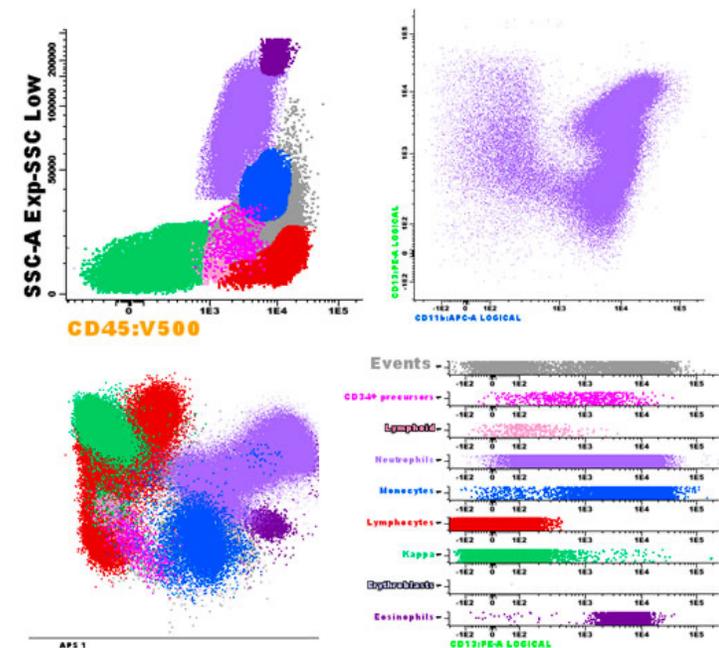
# La citometría de flujo

- La citometría de flujo es una herramienta útil para el estudio de células. Es un aparato que coloca a las células en suspensión y las interroga a través de láseres.
- Permite analizar múltiples parámetros en diferentes poblaciones celulares a la vez ya que colorea a las células con un tinte sensible a la luz, obteniendo información de millones de células en segundos.
- Los datos se adquieren rápido, son cuantitativos, los análisis son multiparamétricos, cada evento o célula puede ser analizada individualmente.



# Beneficios de la citometría de flujo en el diagnóstico

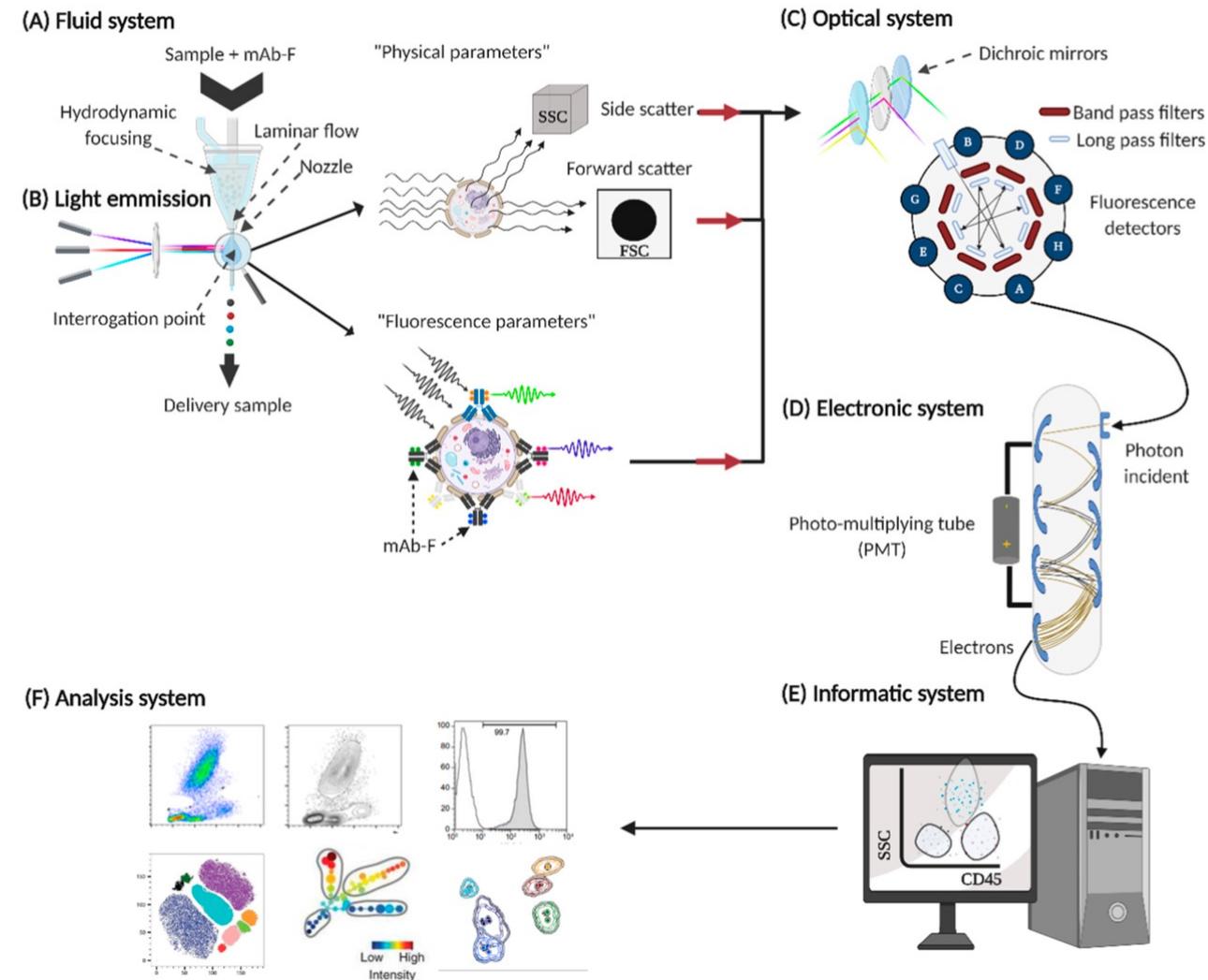
- La citometría de flujo permite conocer el problema de raíz, ya que podemos analizar las características de las células y cómo se comportan.
- Posibilita un diagnóstico mucho más precoz por lo que reduce costos y el número de diferentes pruebas.
- Una vez identificada la causa de la enfermedad nos permite dar seguimiento a los pacientes ante el tratamiento que se les ha brindado.



(Flores-Gonzalez, et al 2020)

# La citometría de flujo en el diagnóstico

- La citometría de flujo es una herramienta sensible e indispensable para la evaluación rápida del sistema inmune.
- Aplicaciones para el diagnóstico de inmunodeficiencias primarias, alergias, autoinmunidad y cáncer:
  1. El estudio de poblaciones específicas.
  2. Proteínas específicas de la membrana celular.
  3. Proteínas intracelulares e intranucleares.
  4. Anormalidades funcionales.

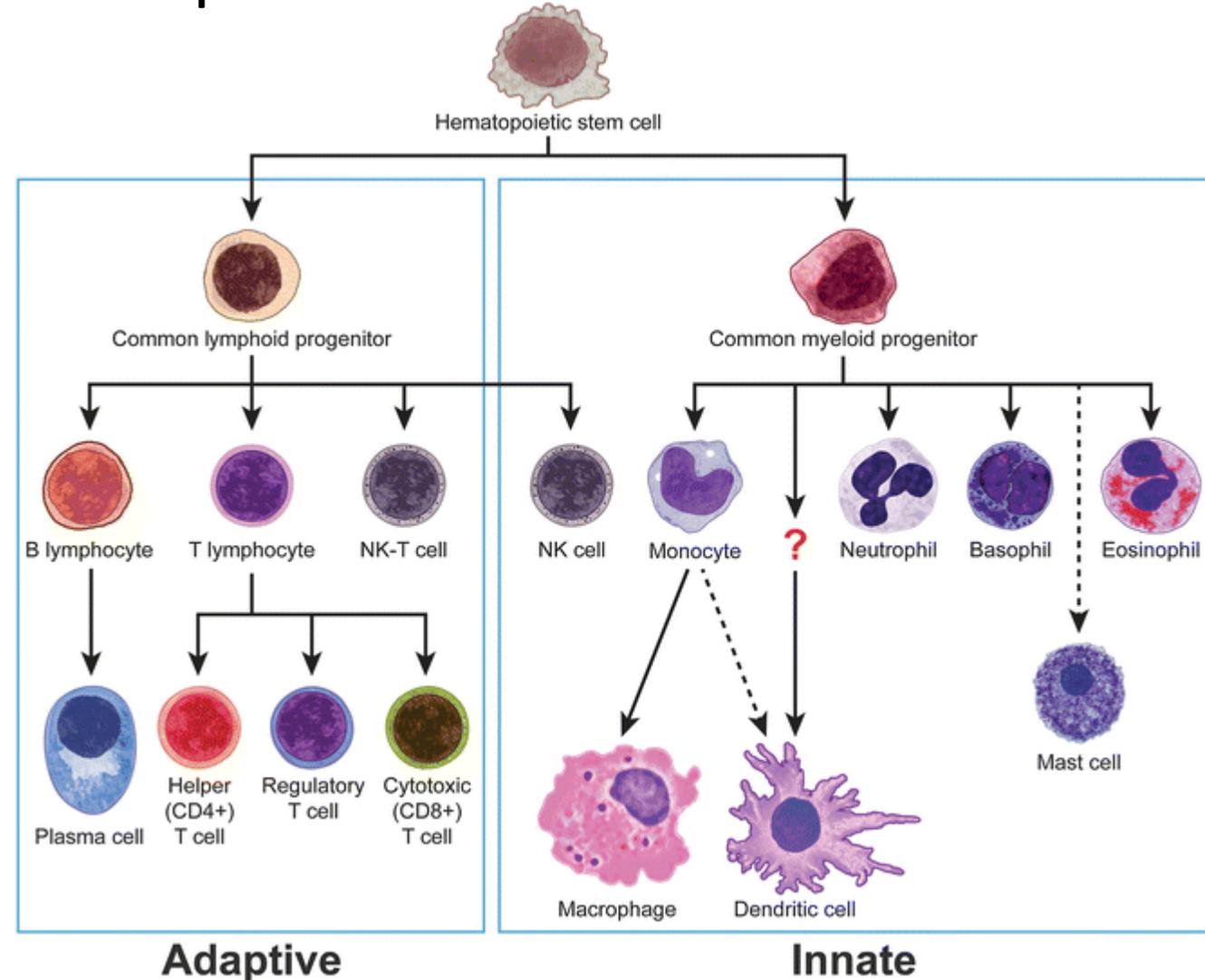


# Estudio de poblaciones específicas

- Para diagnosticar las inmunodeficiencias primarias estudiamos la presencia a bajos niveles y/o ausencia de poblaciones celulares totales.

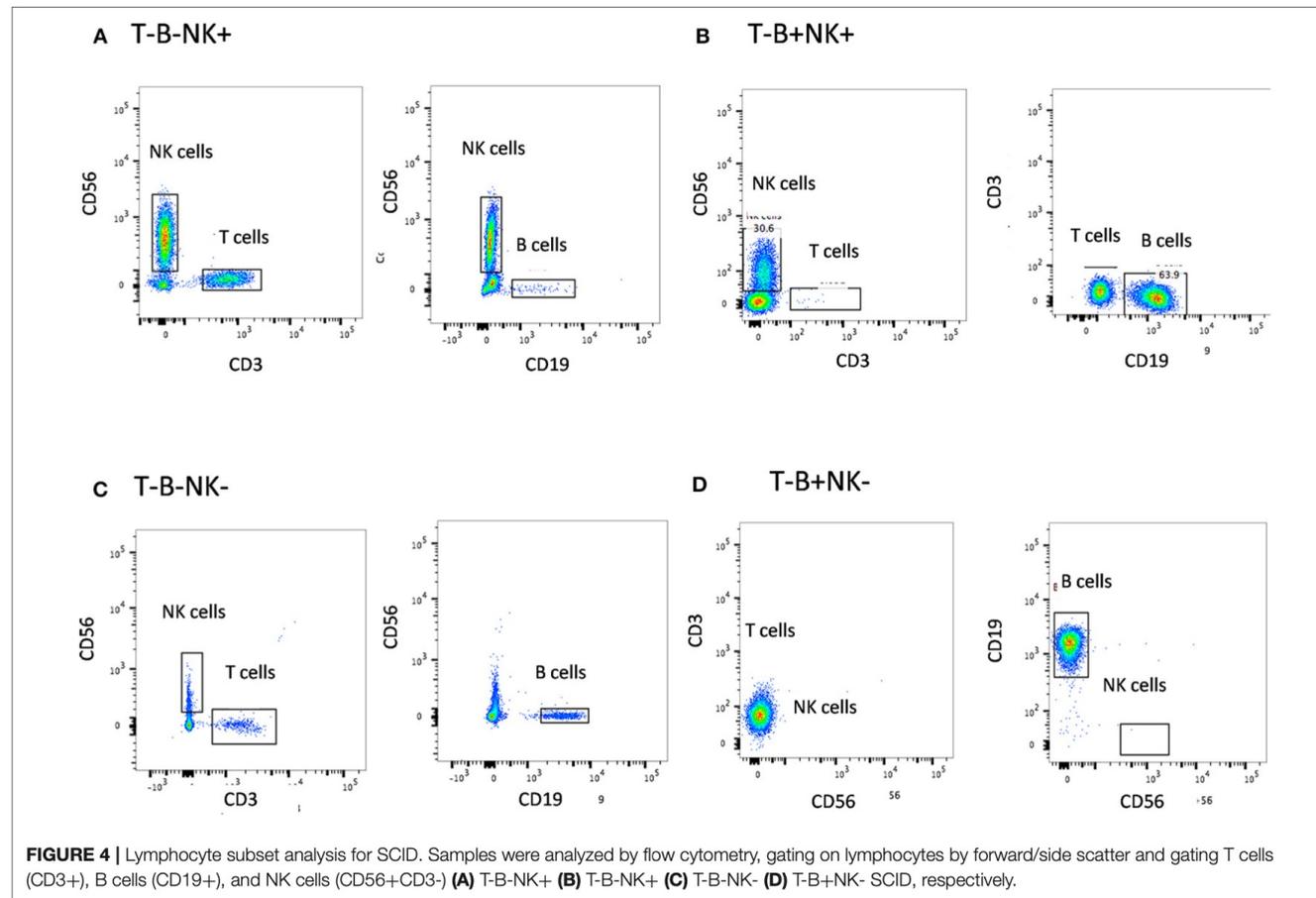
- Algunas poblaciones importantes:

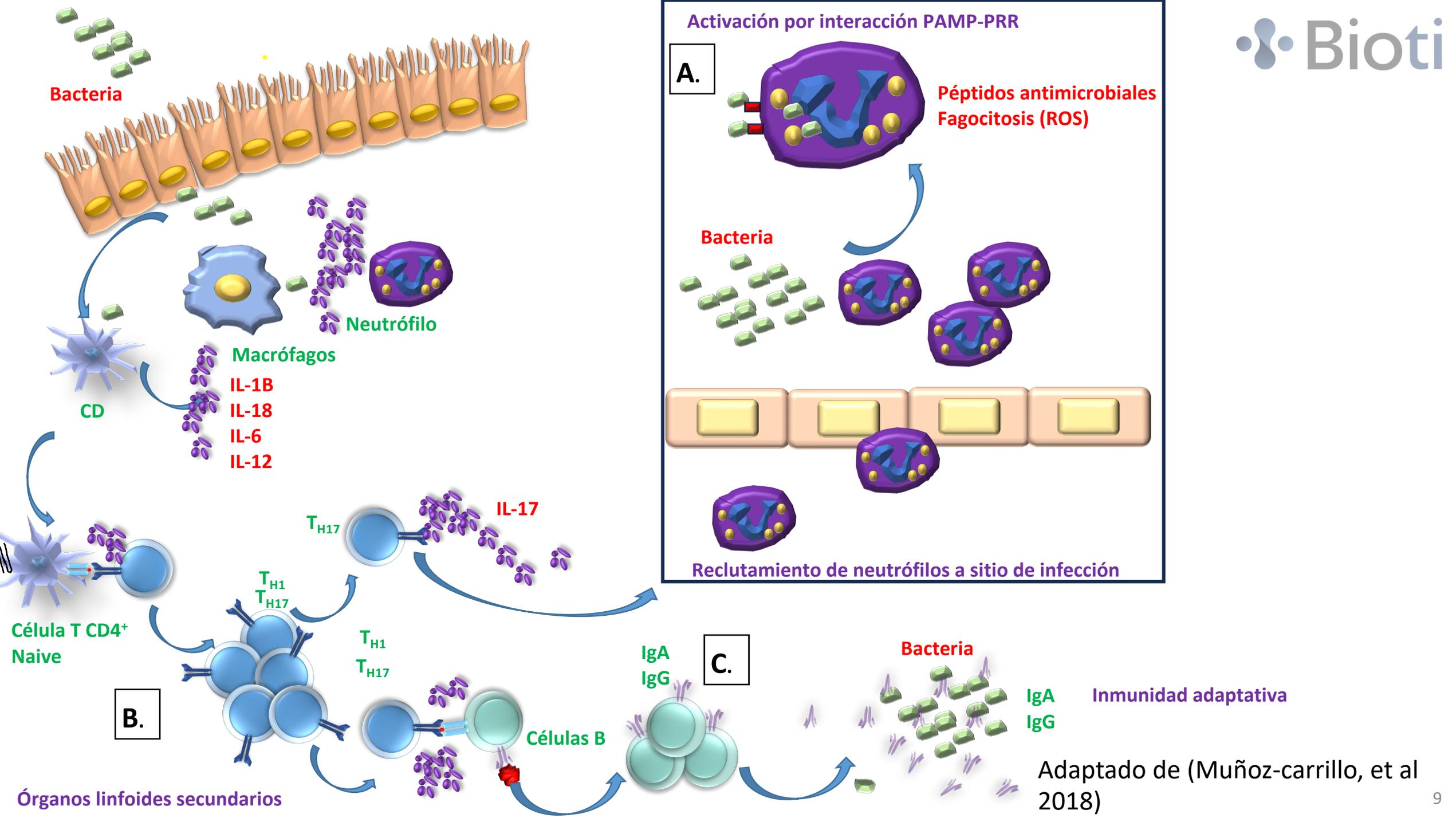
1. Granulocitos (Neutrófilos, Basófilos y Eosinófilos).
2. Poblaciones de células T y B (subpoblaciones).
3. Células Natural Killer.



# Estudio de poblaciones específicas

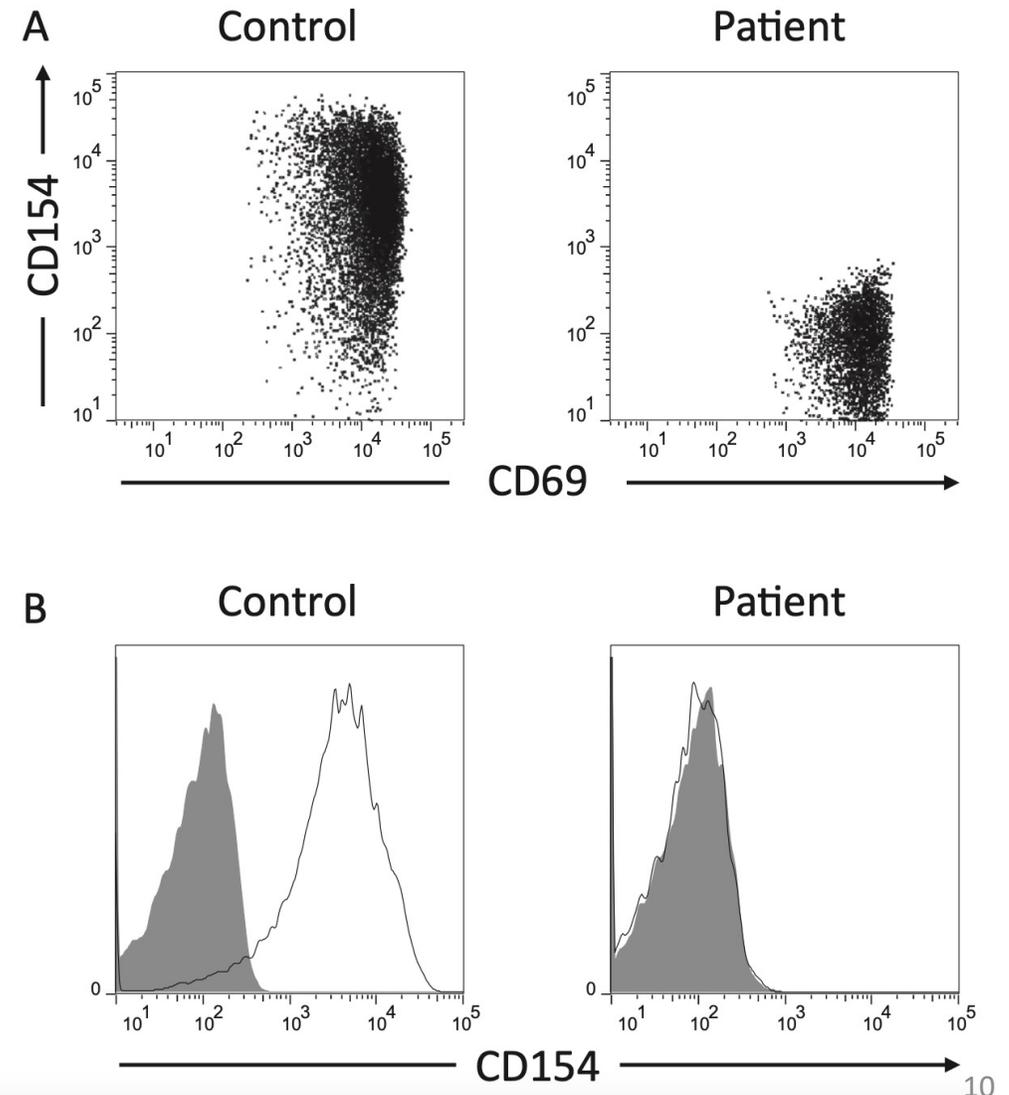
- Los pacientes con **inmunodeficiencias severas combinadas (SCID)** carecen de células T, el cual tiene un impacto directo en las células B v NK.



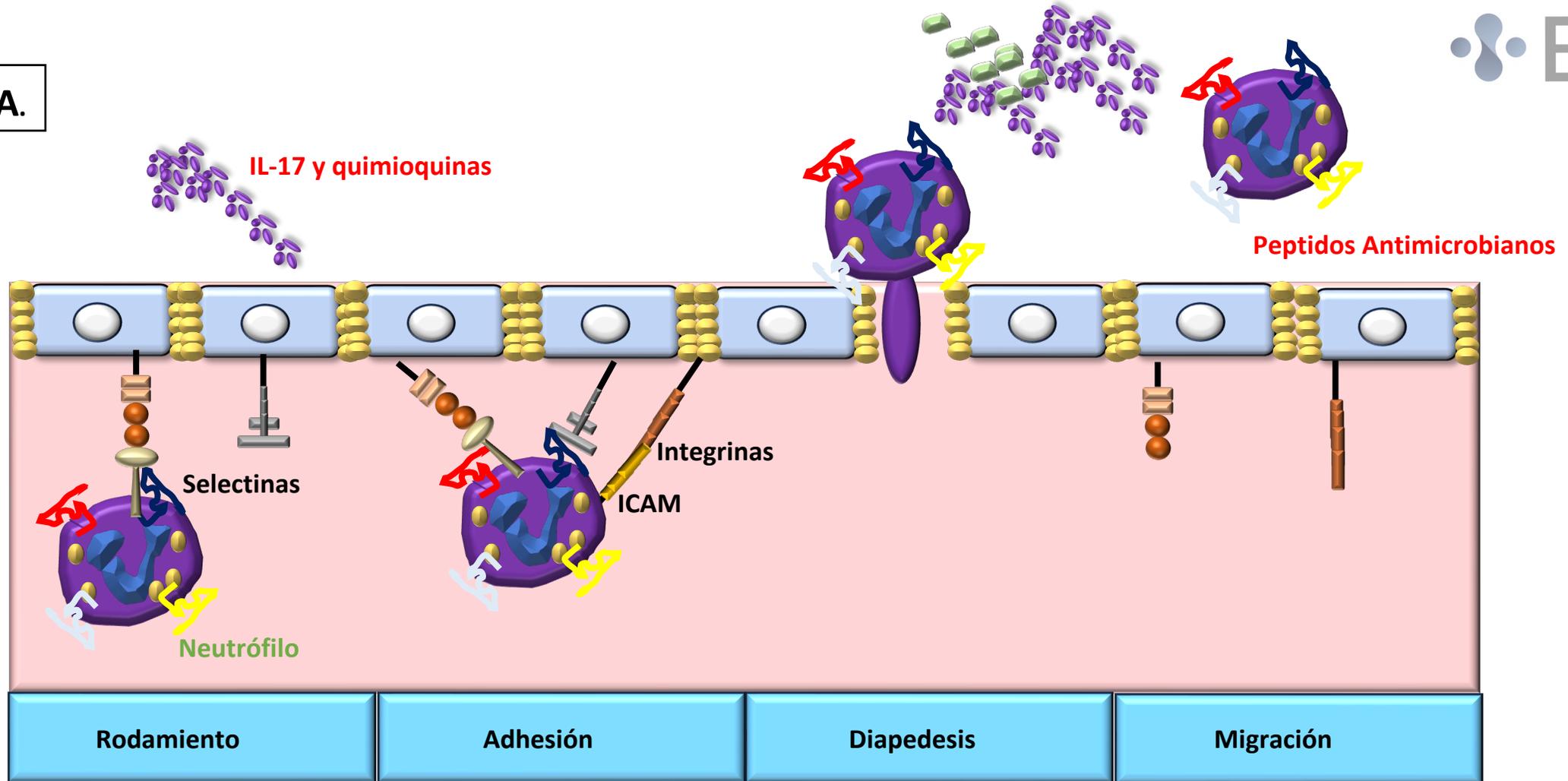


# Proteínas específicas de la membrana celular

- Algunas inmunodeficiencias primarias se caracterizan por la falta de receptores proteicos en la superficie de las poblaciones celulares.
- Los pacientes con **el síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X** fallan en expresar un receptor en la superficie de células T activadas y en algunos casos hay falla en la expresión de proteínas en células B.



A.



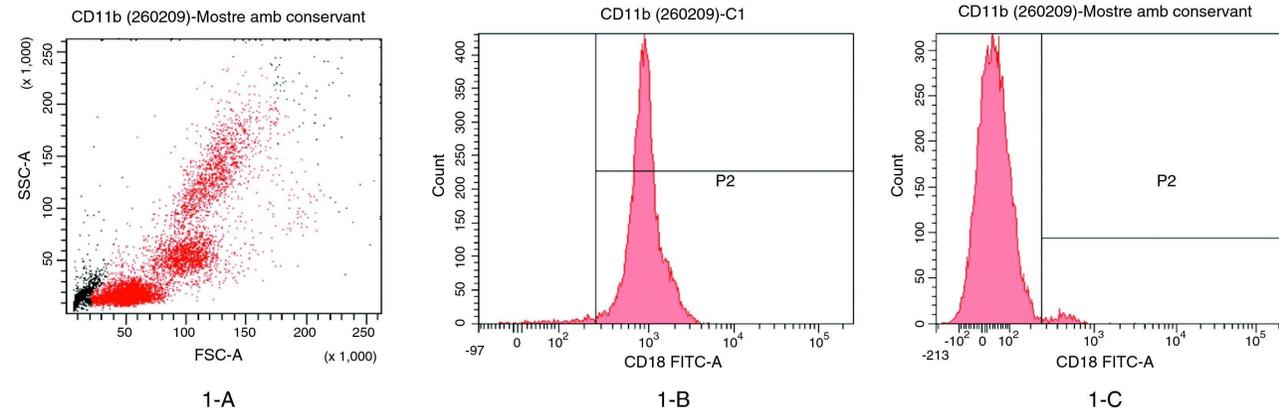
Deficiencia de adhesión leucocitaria:

Es una inmunodeficiencia en la que las células del sistema inmune fallan en adherirse a la pared de las vesículas sanguíneas. Las células no son capaces de llegar al sitio de inflamación/infección.

# Deficiencia de adhesión Leucocitaria (LAD)

- Infecciones bacterianas/fúngicas (principalmente en la piel y las mucosas).
  - Fallas en la reparación de heridas
  - Neutrofilia en la sangre (10,000-40,000/mm<sup>3</sup>) pero neutropenia en tejido.
- severas recurrentes

1-A: CD11B markers.  
 1-B: CD18 marker in leukocytes of normal individual. Control.  
 1-C: CD18 marker in leukocytes of the patient.



(García et al 2012)

# Proteínas específicas intracelulares

- Algunas inmunodeficiencias se caracterizan por la baja expresión de proteínas específicas intracelulares.
- Ejemplo Los pacientes con el **síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP)** tienen bajos niveles de expresión de la proteína WAS intracelular en linfocitos y células mieloides.

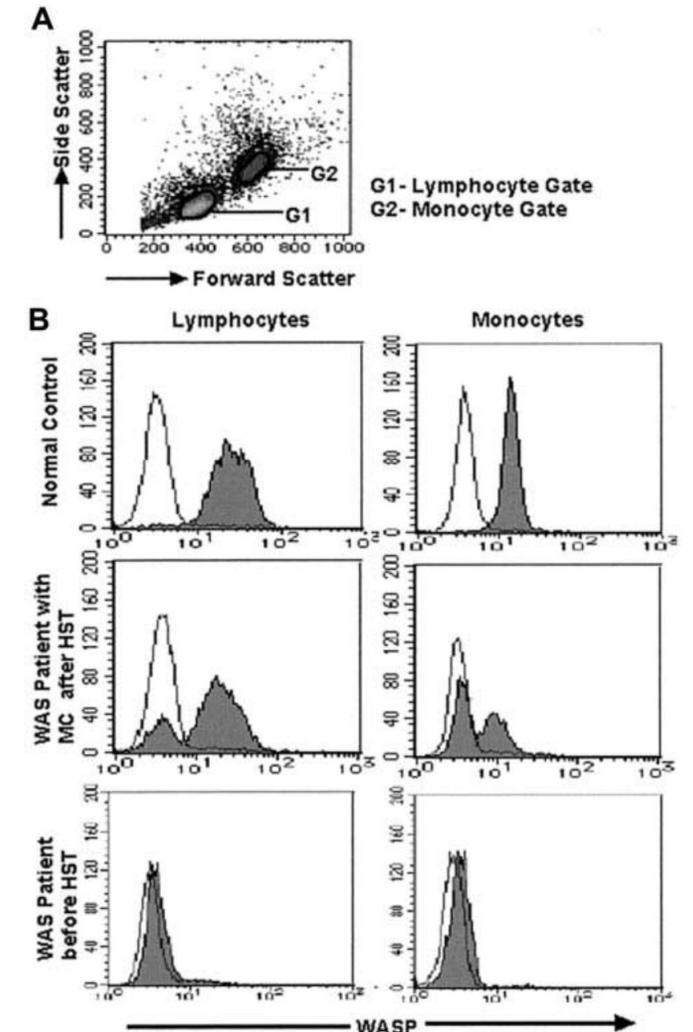
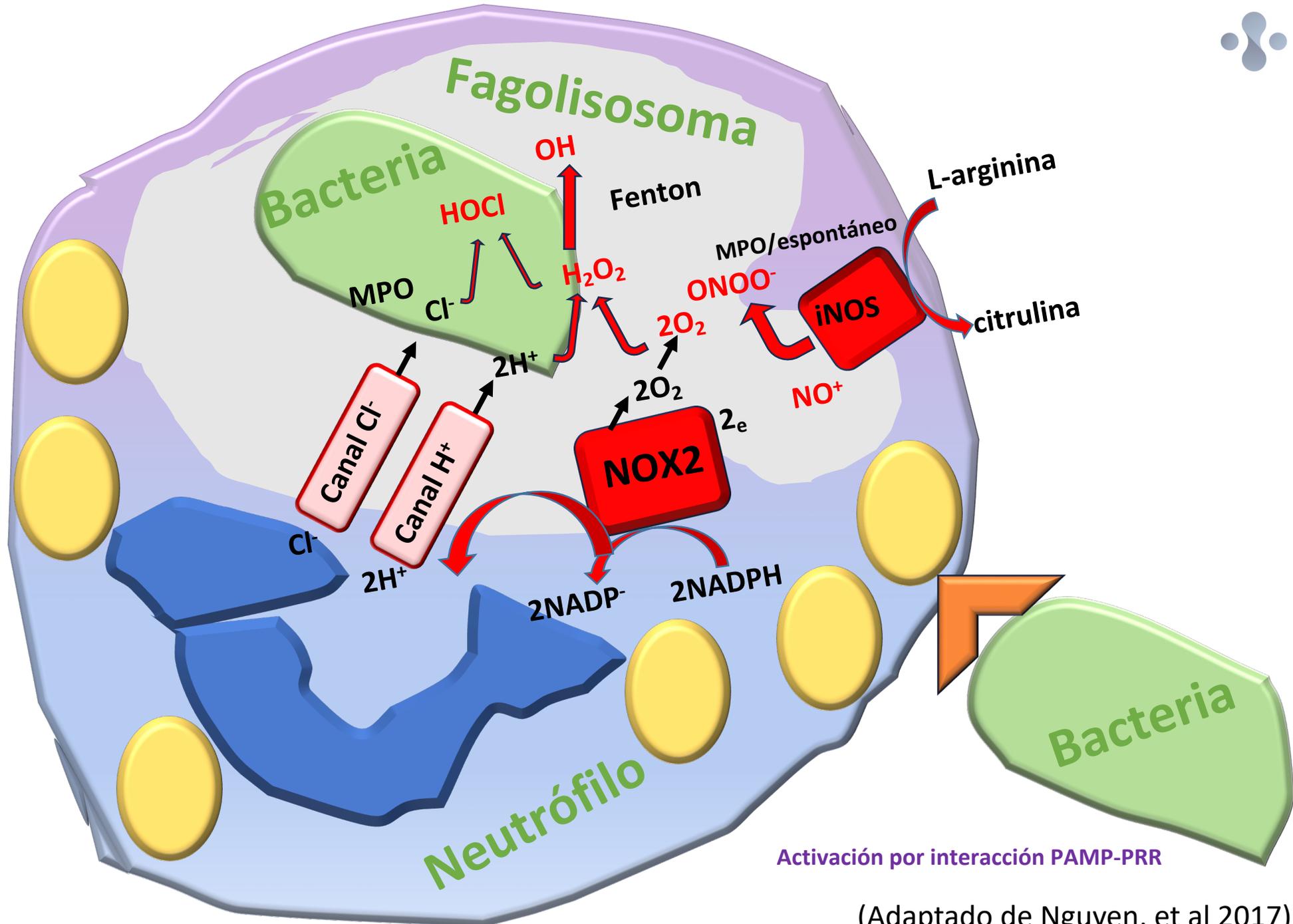
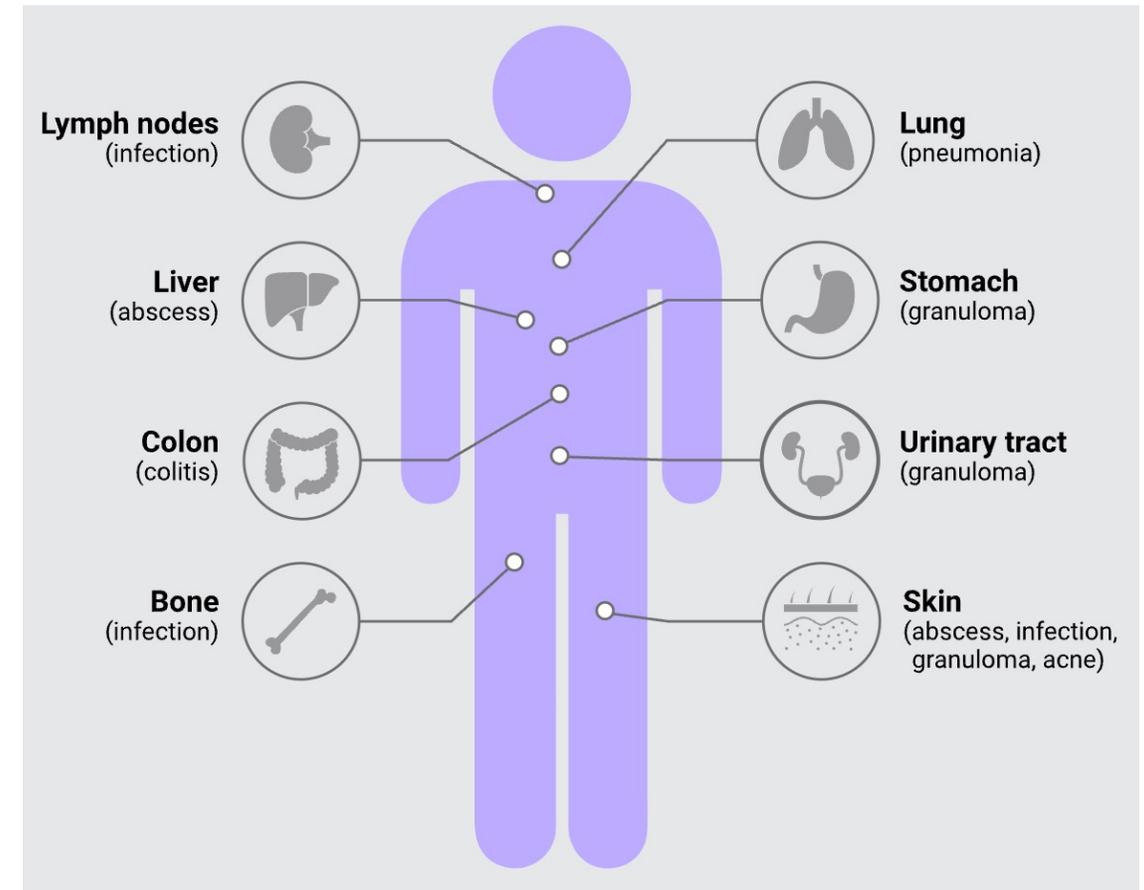


Figure 1. Results of FCM-WASP of lymphocytes and monocytes. (A) Density plot



# Enfermedad Crónica Granulomatosa (CGD)

- La enfermedad crónica granulomatosa es un desorden en el que un fagocito (célula que ayuda a eliminar infecciones) no funciona de manera adecuada.
- Los pacientes con CGD tienen infecciones en la piel, hígado, estómago, intestinos, cerebros y ojos. Entre estos están asociados a: fiebre, irritación en la piel, sistemas gastrointestinales, entre otros.
- Se forman granulomas, colección de células inmunes que se agrupan entre si cuando no pueden eliminar patógenos. Se forman alrededor de todo el cuerpo.



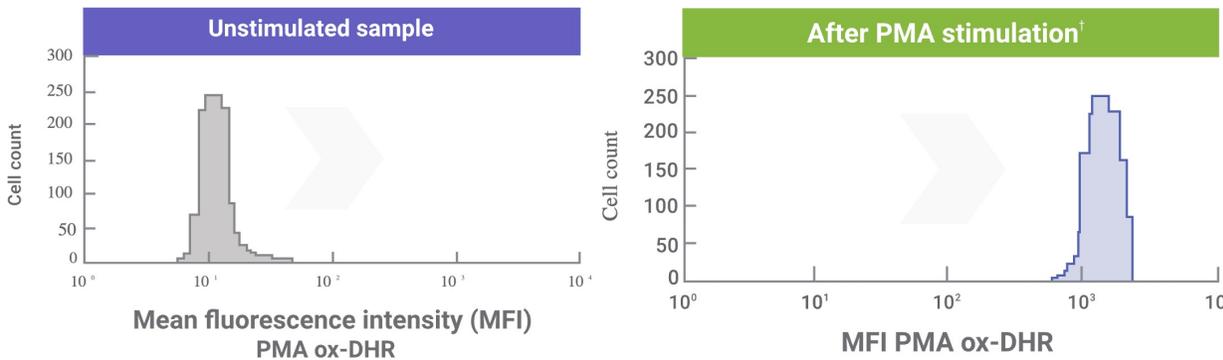
(Actimmune, Ultima visita Sep 2023)

# Prueba DHR

- La prueba DHR tiene la habilidad de evaluar la producción de superóxidos en los neutrófilos, el cual es un indicador de riesgo en infecciones serias.

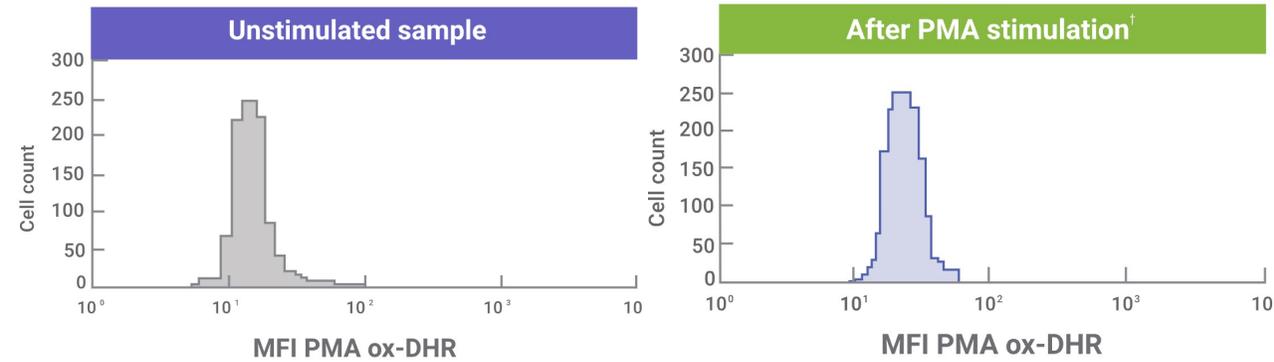
- La prueba DHR puede distinguir entre enfermedad crónica granulomatosa (CGD) autosómica recesiva y la vinculada al cromosoma X.

## Individuo Sano

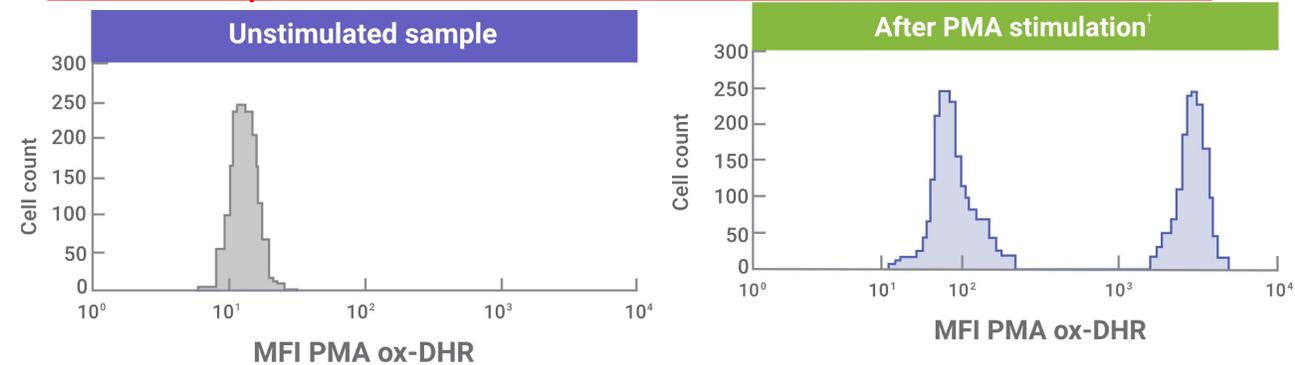


(Leidwig, et al 2013)

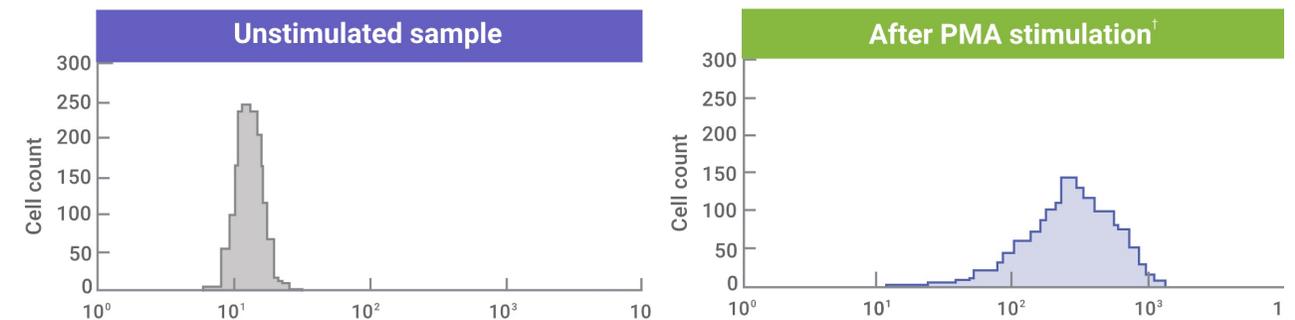
## Paciente con CGD vinculada al cromosoma X



## Paciente portadora de CGD vinculada al cromosoma X

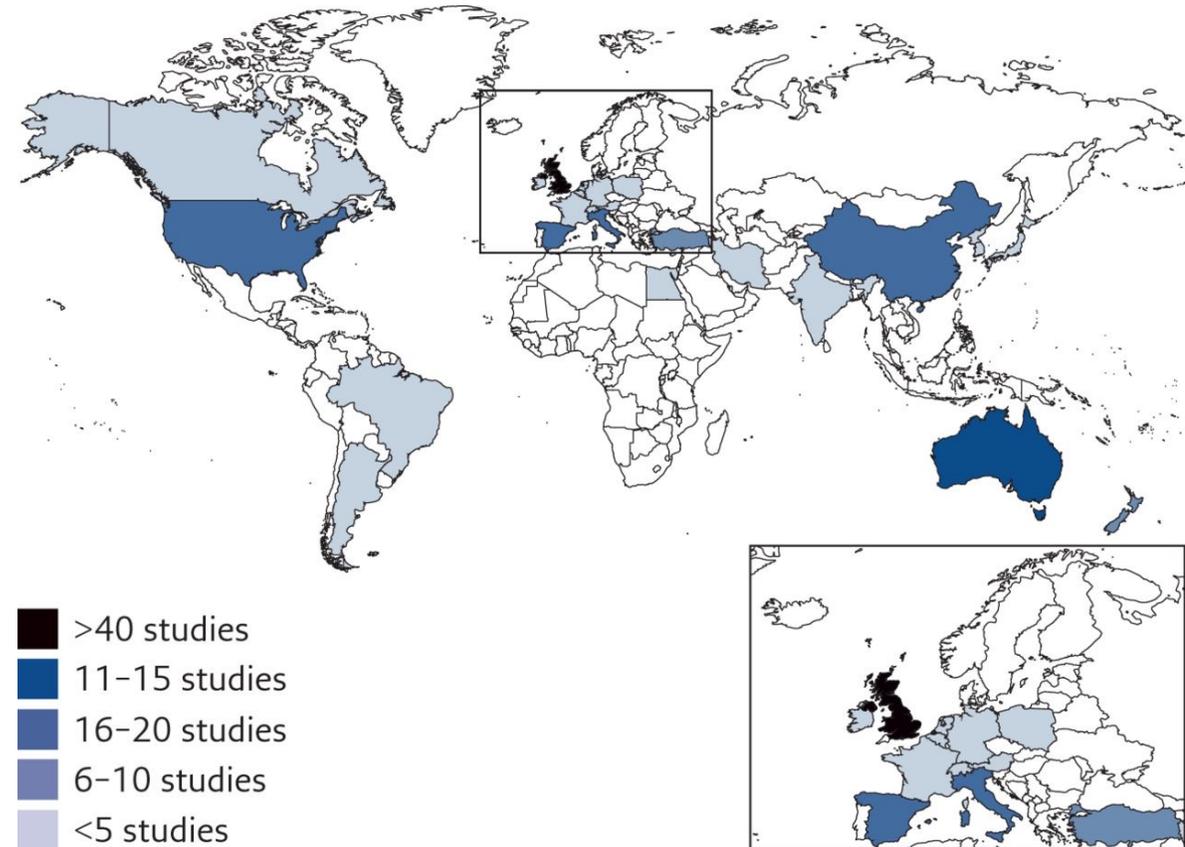


## Paciente con CGD autosómico recesivo



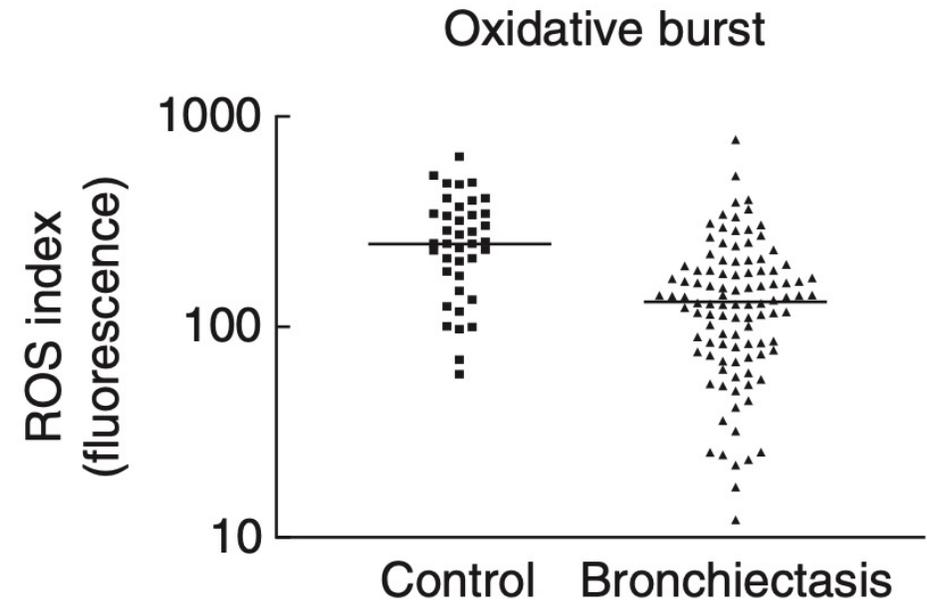
# Bronquiectasia

- Se define como una dilatación anormal de los bronquios y está caracterizada por infección crónica en el tracto respiratorio por bacterias.
- Entre los síntomas principales predominan tos crónica, producción de esputo, dificultad para respirar, sinusitis y fatiga.
- Las personas adultas con bronquiectasia tienen síntomas a largo plazo desde la niñez y recurrentes en el tracto respiratorio superior. **Esto sugiere que hay una disfunción inmune.** (La hipogammaglobulinemia se ha asociado con la bronquiectasia, específicamente en respuestas hacia *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* ).

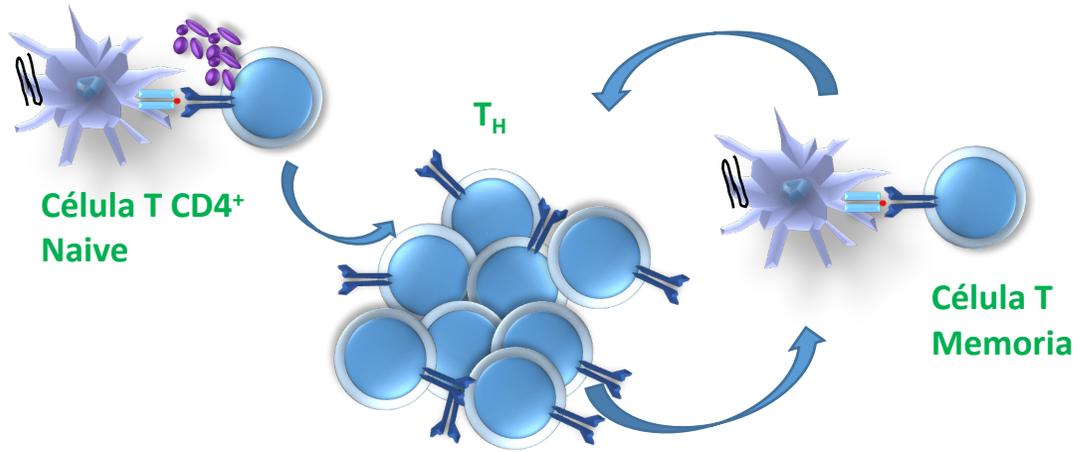


# Bronquiectasia

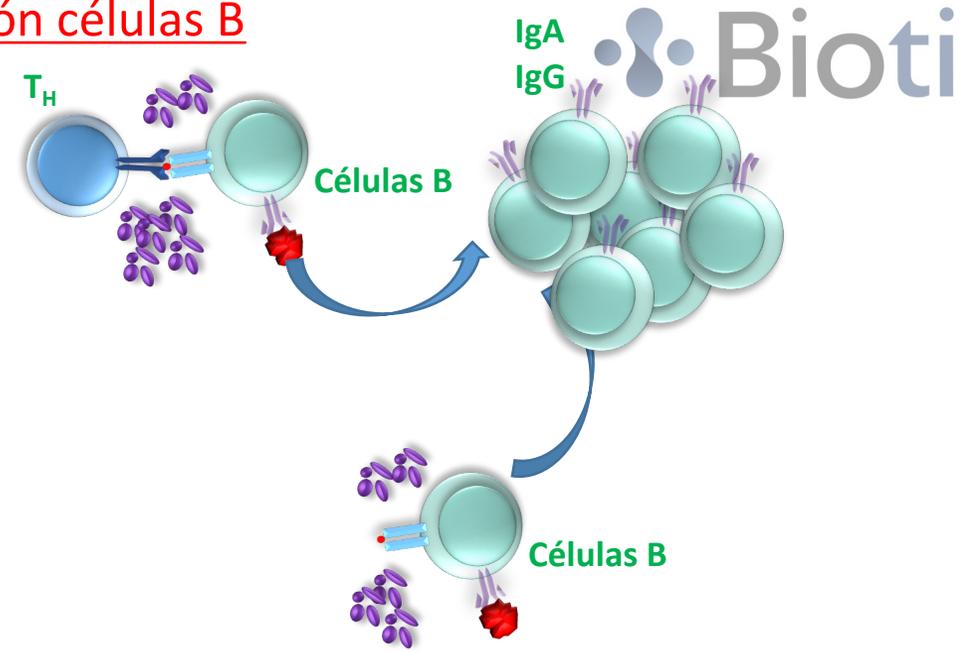
- King et al, realizaron un análisis de diferentes componentes del sistema inmune. Entre ellos examinaron las poblaciones celulares en la sangre (neutrófilos, eosinófilos, linfocitos) y las inmunoglobulinas.
- Posteriormente, se enfocaron en las diferentes subpoblaciones de linfocitos (T y B) y la función de neutrófilos (fagocitosis y explosión oxidativa) (diagnóstico común en la enfermedad granulomatosa crónica y/o cuando se observa la formación de granulos) estimulando con una preparación de *S. aureus*.



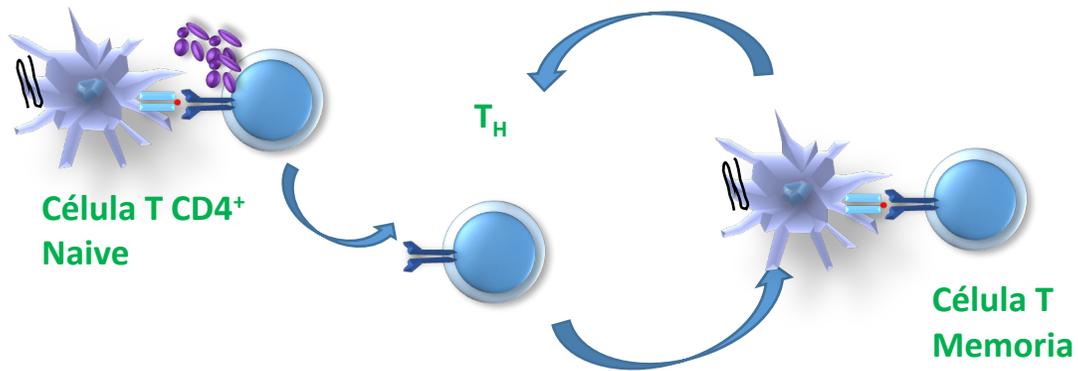
## Proliferación células T



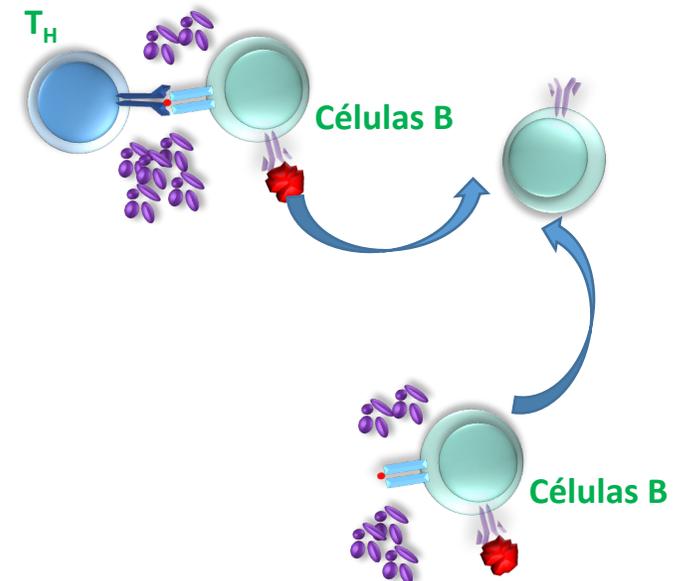
## Proliferación células B



## Falla en proliferación de célula T



## Falla en proliferación de célula B

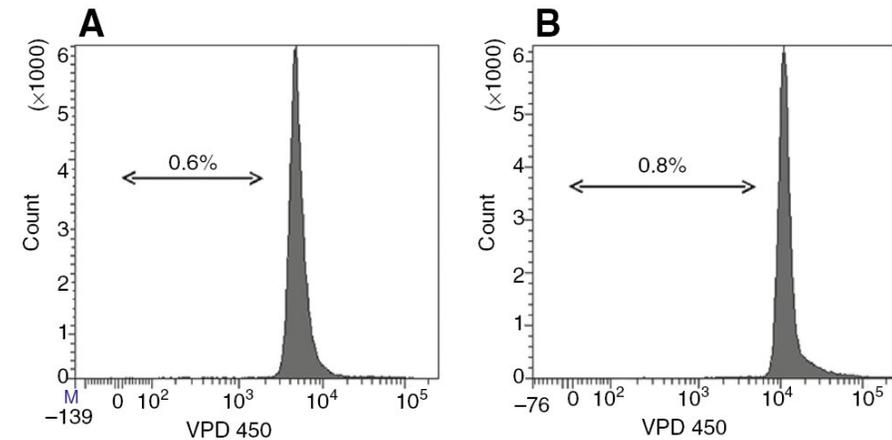


# Evaluación funcional celular

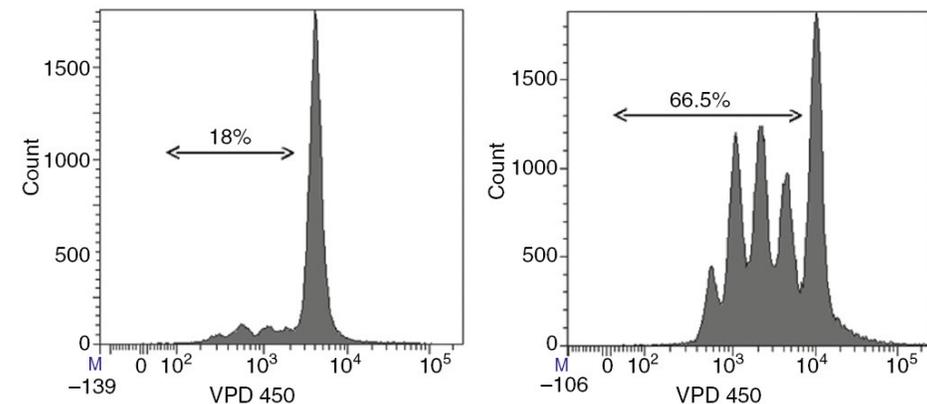
- Podemos evaluar de manera funcional las poblaciones celulares al exponerlas a un estímulo específico y estudiar su división celular.

- En el caso de **Ataxia telangiectasia** hay una baja proliferación de células T y B ante diferentes estímulos.

## Paciente con falla de proliferación celular



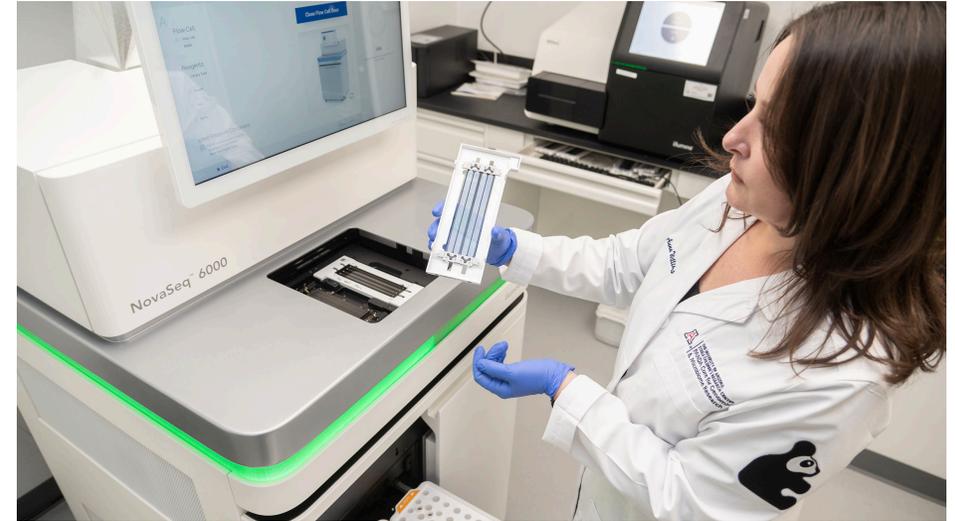
## Paciente Sano



(De Stefano, et al 2016)

# Diagnóstico genético

- La secuenciación del exoma, la parte codificante de proteínas del genoma se utiliza en la medicina clínica para diagnosticar enfermedades raras hereditarias, desordenes congénitos y cáncer.
- La secuenciación de exomas es útil para tener un diagnóstico preciso que puede influir en el tratamiento y asesoramiento genético. Puede detectar mutaciones, deleciones e inserciones.



(U of Arizona 2023)

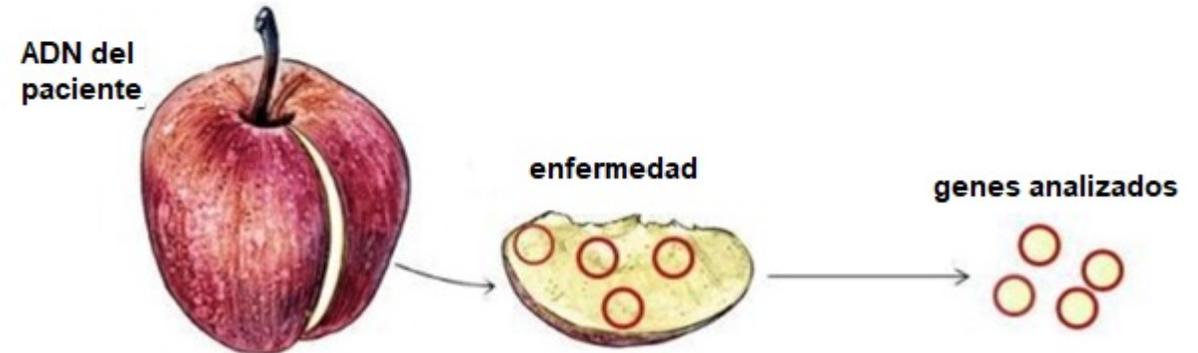
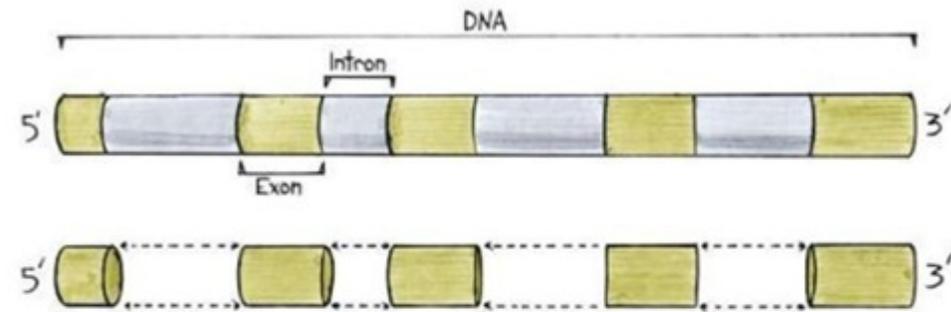


(Rabbani, et al 2014)

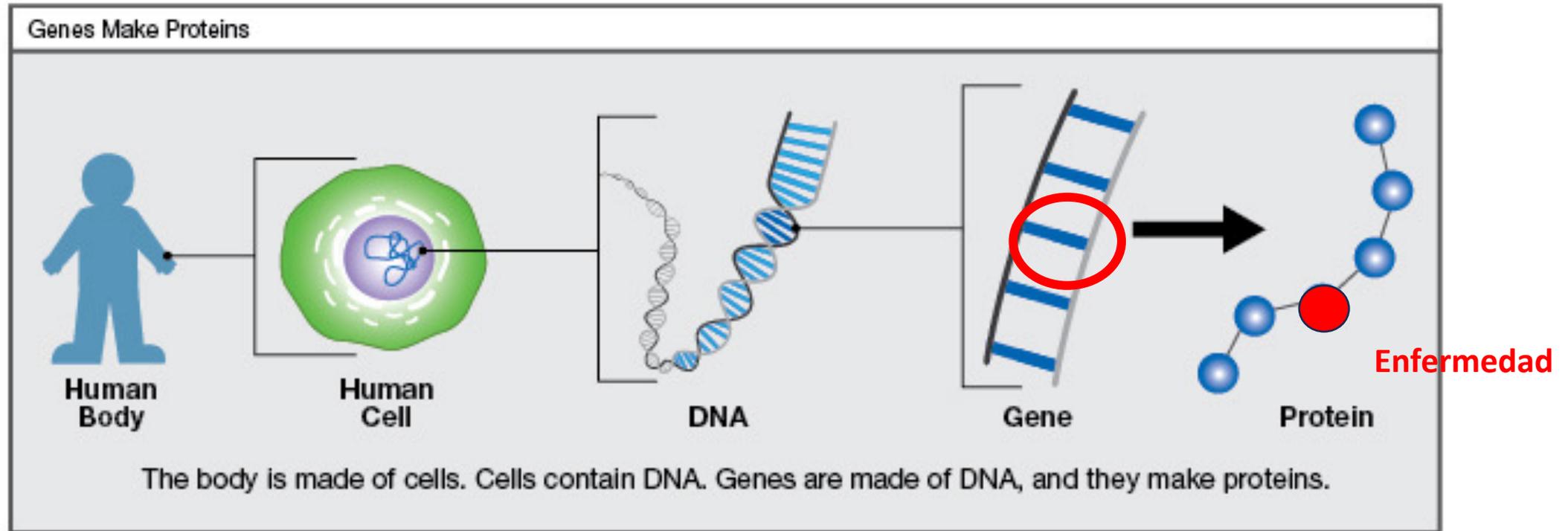
# Secuenciación de última generación (Exoma)

- Se analiza la totalidad de genes asociados a cada sospecha clínica (entre 1 a 21,000 genes).
- Cada gen se analiza en su totalidad (no mutaciones puntuales).
- No es necesario que el médico conozca los genes que se desean evaluar.
- El médico puede tener una sospecha clínica o desear que la prueba genética le brinde el diagnóstico.

## Secuenciación de última generación

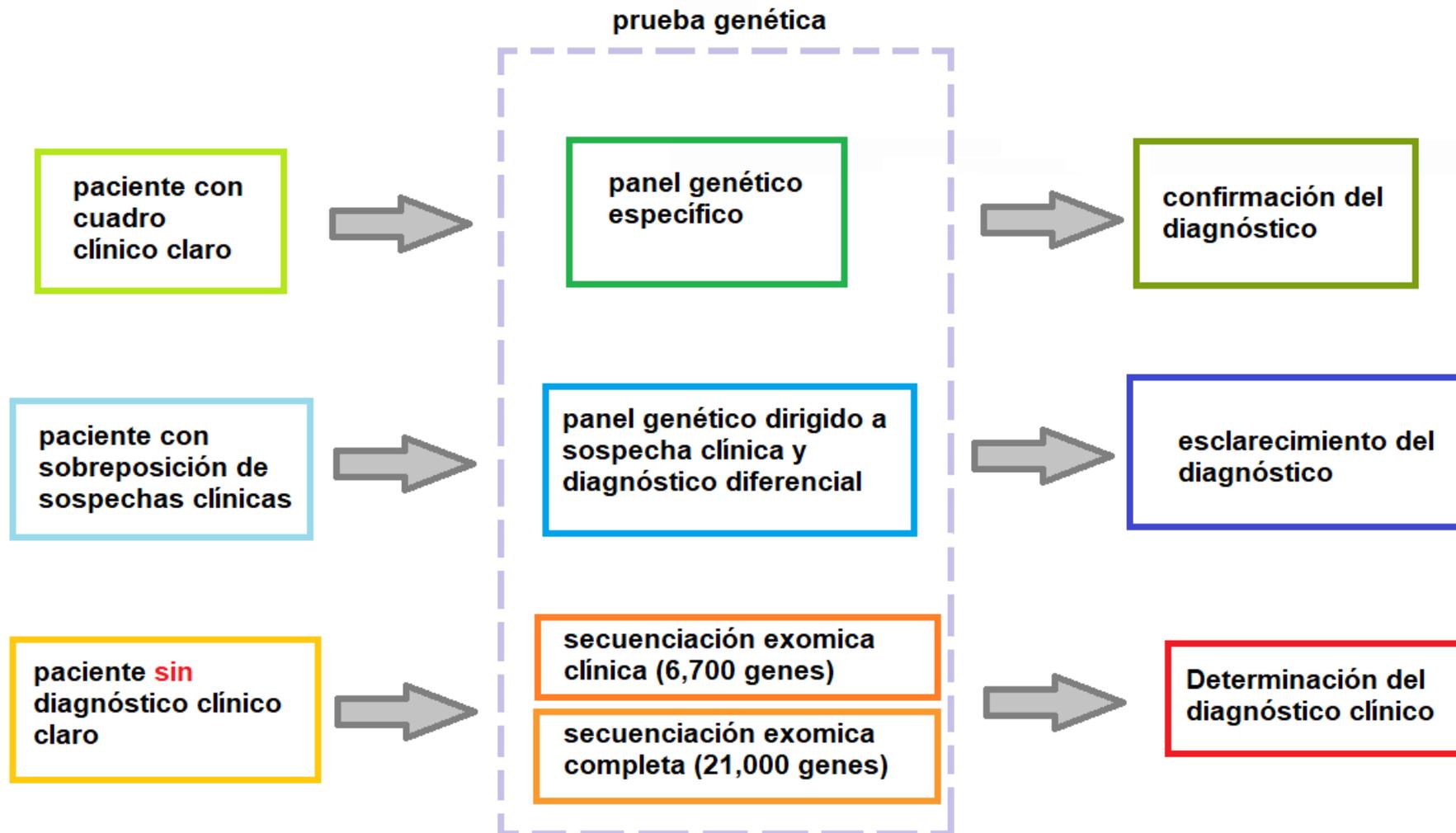


# Secuenciación de última generación (Exoma)

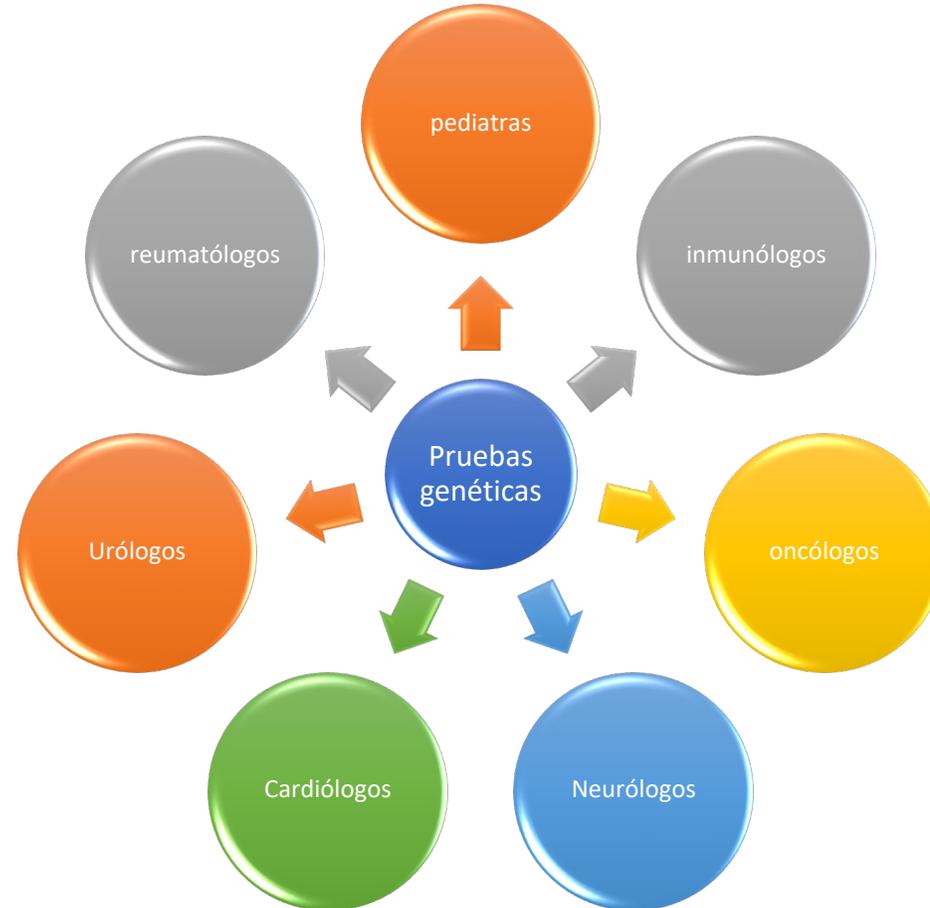


- Cada humano tiene diferentes mutaciones en su exoma, sin embargo, distinguir entre mutaciones insignificantes y patogénicas es clave para interpretar los resultados de la secuenciación exomica.

# Distintos enfoques de aproximación al diagnóstico



# Apoyo diagnóstico a diferentes especialidades médicas



# Enfermedades relevantes

## Pediatría

- Fibrosis quística
- Sordera congénita
- Hipercolesterolemia
- Hemocromatosis
- Neurofibromatosis
- Enfermedad Tay-Sachs

## Inmunología

- Inmunodeficiencias primarias
- Agamaglobulinemia
- Síndrome Hiper IgE
- Asma
- Síndrome linfoproliferativo autoinmune

# Nosotros



6ª avenida 6-63 zona 10 Sixtino | Of. 810

2375-5555

- Nos enfocamos en el diagnóstico celular y molecular utilizando las tecnologías más innovadoras y novedosas para el estudio de enfermedades y síndromes relacionados al sistema inmune.
- Nuestro laboratorio ofrece un servicio comprensivo incluyendo: inmunodeficiencias, alergia, autoinmunidad, cáncer, enfermedades cardiovasculares, errores innatos del metabolismo y otros.
- Nuestro sistema se basa en el uso de la secuenciación de nueva generación, citometría de flujo y cultivos celulares.