

Agraïments

- A la meva tutora i professora de Biologia que ha tingut l'amabilitat d'ajudar-me en tot; des d'encontrar una plaça per fer el treball pràctic fins a fer l'índex; i per portar-me en moto els primers dies que vaig visitar IRSICAIXA.
- Al investigador predoctoral al IRSICAIXA que m'he explicat tot el seu procediment del treball perquè el pugui utilitzar en el meu treball. Les seves companyes per ajudar-me de qualsevol manera possible.
- El meu germà que va ser tan pacient i tan amable durant tot l'estiu. Em va acompanyar cada dia quan havia d'anar al IRSICAIXA. Em va aguantar quan el vaig molestar perquè em compri els fulls i els llibres que necessitava.
- A les meves amigues i el meu professor de química pel seu ajut amb la llingüística i ortografia catalanes.

ÍNDEX

1. Introducció	1
Marc Teòric	
2. EL SISTEMA IMMUNITARI.....	2
2.1 Conceptes bàsics del sistema immunitari.....	2
2.2 Les respostes específiques i no específiques.....	16
2.3 Com actua el sistema immunitari davant de microorganisme.....	20
2.4 Les cèl·lules dendrítiques: l'autobús del virus.....	22
2.4.1 Estructura i forma.....	22
2.4.2 Funcions principals.....	23
3. EL VIRUS DE LA SIDA/VIH.....	24
3.1 Estructura i tipus.....	24
3.2 Desenvolupament del procés d'infecció.....	27
3.3 Actuació del sistema immunitari davant el virus.....	30
3.3.1 Quan hi ha contacte directe amb limfòcits.....	30
3.3.2 Quan hi ha contacte amb les cèl·lules dendrítiques.....	30
3.3.2.1 Trans-infecció.....	31
3.4 Tractaments i protocols pels pacients.....	31
MARC PRÀCTIC	
4. Recerca al laboratori de la unitat IRSICAIXA de l'Hospital Trias i Pujol.....	32
5. Materials i mètodes.....	34
5.1 Com s'obtenen les cèl·lules dendrítiques	
5.2 Com s'obtenen els VLPs (partícules que imiten al virus: "virus like particles")	
6. Procediments del treball.....	34
6.1 Normes de seguretat: nivell P3.....	34
6.2 Tractaments de les cèl·lules dendrítiques infectades.....	34
6.2.1 Lipopolisacàrid LPS	
6.2.2 Interferó alfa IFN α	
6.3 Observació amb microscopi spinning disk.....	35
6.3.1 Preparació de les mostres per l'observació.....	35
7. Resultat: taules i gràfics.....	38
8. Anàlisi de les dades.....	41
9. Conclusions.....	41
10. Valoració personal.....	42
11. Bibliografia.....	43
12. Annex.....	47

1. Introducció

1. Què significa el treball de la recerca per mi?

Aquest treball de recerca m'ha premés aprofundir en un dels temes presents en el currículum de 2n Batx. que és la Immunologia.

La possibilitat de fer-ho amb un tutor especialista en el tema i en un centre de recerca pioner en el virus d'immunodeficiència adquirida (VIH) m'ha donat l'oportunitat d'aprendre aspectes molt específics en el camp totalment encara experimentals que d'altra manera no haurien estat a l'abast.

Jo vull ser metgessa i aquesta ha estat una oportunitat per aproper-me a la vida professional dins un hospital. D'altra banda ha estat un repte amb la llengua, ja que m'ha obligat a esforçar-me amb l'expressió correcta en català i, encara més, amb el llenguatge científic.

Sense dubtes és un tema molt interessant en el que encara queden moltes portes per obrir.

2. En què consisteix el meu treball de recerca?

En començar el batxillerat ja tenia una idea del que volia fer algun tema relacionat amb la carrera de medicina però no havia pensat en res en concret. No em va fer falta buscar molt perquè la meva professora em va proposar tres temes diferents sobre el virus i, a mi el que més em va interessar va ser el VIH. A més, poc després em va oferir la possibilitat de fer el treball a l'IRSICAIXA a l'hospital Trias i Pujol on els investigadors em guiarien per fer un treball associat a les actuals línies de recerca, absolutament pioners al voltant del virus de la SIDA.

Ja en el mes de maig vam escriure sol·licitant l'ajut i de seguida van començar els primers contactes amb els investigadors a l'hospital. IRSICAIXA és l'institut de la recerca de la SIDA i com l'objectiu té recerca dels tractaments més eficaços contra el virus abans que progressi la malaltia.

3. Per què he escollit aquest tema i quin és l'objectiu principal del meu treball?

Quan la professora em va presentar uns quants temes, em va interessar immediatament el tema de la SIDA. Sabia alguns trets característics de la malaltia, però volia conèixer més. Aquesta malaltia afecta a milions de persones cada any i, jo com que sóc d'un país subdesenvolupat (el Pakistan) on la SIDA afecta moltes persones que ignoren que aquesta malaltia es transmet per via sexual volia estudiar-ne més. M'agradaria pensar que les

joves, si estan més informats poden millorar el camí cap al futur.

D'altra banda volia saber més sobre els temes relacionats amb el virus VIH: el procés d'infecció, la malaltia i com ens defensa el sistema immunitari, els tractaments i processos.

Vaig enviar un e-mail a la cap d'IRSICAIXA per quedar amb ella. Com que havia d'escollir un tema entre diferents possibilitats els investigadors d'IRSICAIXA em van orientar cap al procés d'infecció. Concretament l'objectiu és utilitzar unes partícules semblants al virus (VLPs) que el nostre cos detecta com si fossin el VIH, afegir-les a la sang del banc de donants (en principi persones sanes) i veure com actuen sobre les cèl·lules dendrítiques (cèl·lules amb un paper molt important en la defensa del nostre cos) en presència d'unes substàncies que estimulen el creixement d'aquestes cèl·lules, com són l'interferó-alfa IFN- α i el lipopolisacàrid LPS. El meu treball ha consistit en analitzar, mitjançant l'observació de fotos tretes amb tècniques específiques de microscòpia electrònica, l'actuació d'aquestes cèl·lules dendrítiques davant el virus en el procés de **Trans-infecció**.

El meu contacte amb els investigadors em dóna la possibilitat de conèixer més l'ambient dels científics. Puc saber com treballen, quines normes segueixen, quin és el procés d'investigació i sobretot, adonar-me de la quantitat d'hores d'anàlisi davant un ordinador que suposa qualsevol tipus d'investigació.

Cal remarcar que l'idioma més utilitzat l'àmbit científic és l'anglès, i per aquesta raó la terminologia correspon a les inicials de l'expressió anglesa.

L'anglès és una de les meves llengües però pel treball de recerca he traduït totes les expressions possibles al català excepte les sigles que es consideren així internacionalment.

Marc teòric

2. El sistema immunitari

2.1 Conceptes bàsics del sistema immunitari

La immunitat es defineix com la resistència a les malalties. És l'esforç que fa el nostre cos davant la presència d'una infecció, d'un virus o simplement davant les cèl·lules pròpies danyades com per ex: les cancerígenes. Aquesta resistència, aquest esforç per defensar el cos s'anomena el sistema immunitari. Un conjunt de respostes coordinades de les cèl·lules contra les molècules estranyes pel nostre cos és la resposta immunitària.

La immunologia és l'estudi del sistema immunitari, inclòs les seves respostes als patògens i els teixits danyats, així com la seva participació en la malaltia que provoquen. La funció més important del sistema immunitari és evitar les infeccions potencials i eradicar les ja establertes.

La importància del sistema immunitari per a la salut és indubtable, ja que els subjectes amb respostes immunitàries defectuoses tendeixen a patir infeccions greus que posen en perill la seva vida. La vacunació permet adquirir resistència immunitària davant els possibles patògens i que quedi memoritzada en el nostre sistema defensiu. Ara bé només la virola és l'única malaltia completament eliminada de la civilització amb la vacunació. En altres patògens, com el VIH de la SIDA o el virus de la grip, canvien tant que és impossible trobar vacunes per eradicar les infeccions.

La repercussió del sistema immunitari va més enllà que les malalties infeccioses. El sistema immunitari:

- Impedeix el creixement d'alguns tumors
- Participa en l'eliminació de cèl·lules mortes i en l'inici de la reparació tissular

Malgrat tots els beneficis del sistema immunitari, també pot representar greus problemes com:

- Malalties inflamatòries, al·lèrgiques i autoimmunitàries
- Rebuig als trasplantaments, ja que es tracta de la defensa davant les cèl·lules no pròpies.

Els òrgans i les cèl·lules del sistema immunitari

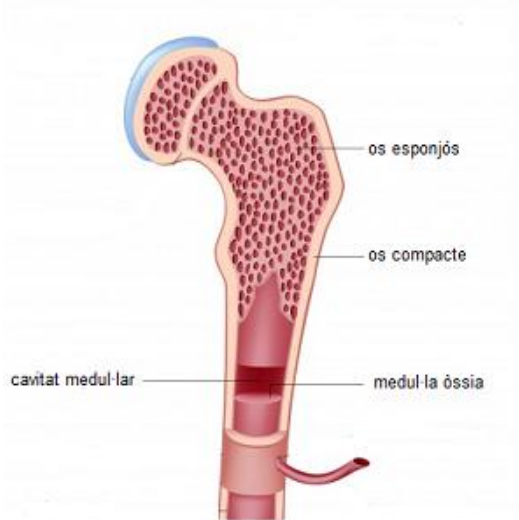
El sistema immunitari com resta dels sistemes del cos necessita uns soldats molt potents que defensen el cos davant els patògens. Aquestes cèl·lules són una fàbrica que treballa en cadena. Cada cèl·lula està relacionada amb les altres pel millor funcionament del sistema. A part de la seva dependència a unes i altres també estan equipades amb una estructura molt especialitzada per ajuntar-se als diferents patògens que, al seu torn, també tenen una estructura especialitzada (els antígens). La maduració de les cèl·lules i la seva diferenciació en un tipus o altre té lloc en uns òrgans anomenats els òrgans limfoides.

Podem diferenciar els òrgans limfoides en els òrgans primaris i secundaris.

Els òrgans primaris són on es formen les cèl·lules de la línia defensiva que són:

La medul·la òssia

Es troba dins la cavitat medul·lar de l'interior d'ossos curts i plans i a la zona esponjosa dels ossos llargs. És l'òrgan principal d'elaboració de quasi totes les cèl·lules, però sempre no ho era. En l'embrió la funció de la producció cel·lular es dur a terme al sac vetel·lí en els primers quarts mesos i que després es desplaça cap a la medul·la òssia. El nadó té tots els seus ossos capaços de produir les cèl·lules però al llarg de creixement alguns ossos perden aquesta capacitat i en un adult només les vèrtebres, les costelles, la pelvis, el crani, l'estern i els ossos llargs conserven la capacitat de producció cel·lular o la capacitat hematopoiètica. Hi formen les cèl·lules del sistema immunitari com els limfòcits, els macròfags i els monòcits.



Localització de l'os esponjós i la medul·la òssia en un os llarg

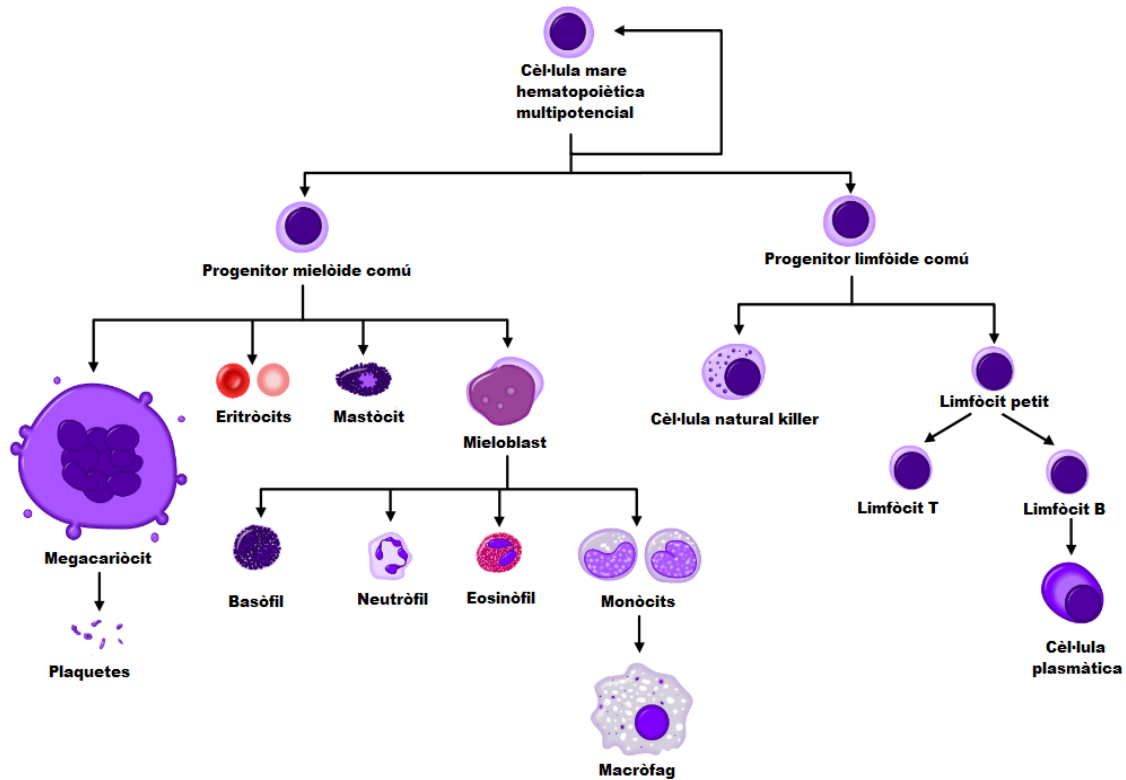
Google imatges



Ossos d'un adult amb capacitat de producció cel·lular

Google imatges

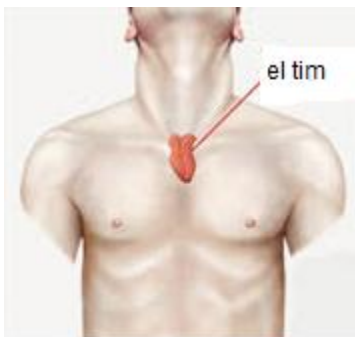
Hematopoiesi és el procés de donar lloc a totes les cèl·lules del cos des d'un mateix progenitor, les cèl·lules mares pluripotents.



Hematopoiesi Google imatges

El tim

El tim és un òrgan localitzat per sobre del cor i format per dos lòbuls. Cada lòbul s'organitza en diversos fol·licles els quals estan constituïts per una escorça externa i una medul·la interna. És un òrgan que desenvolupa durant la vida fetal i la infància i que en arribar la pubertat es comença a atrofiar-se progressivament.



Localització del tim

Google imatges

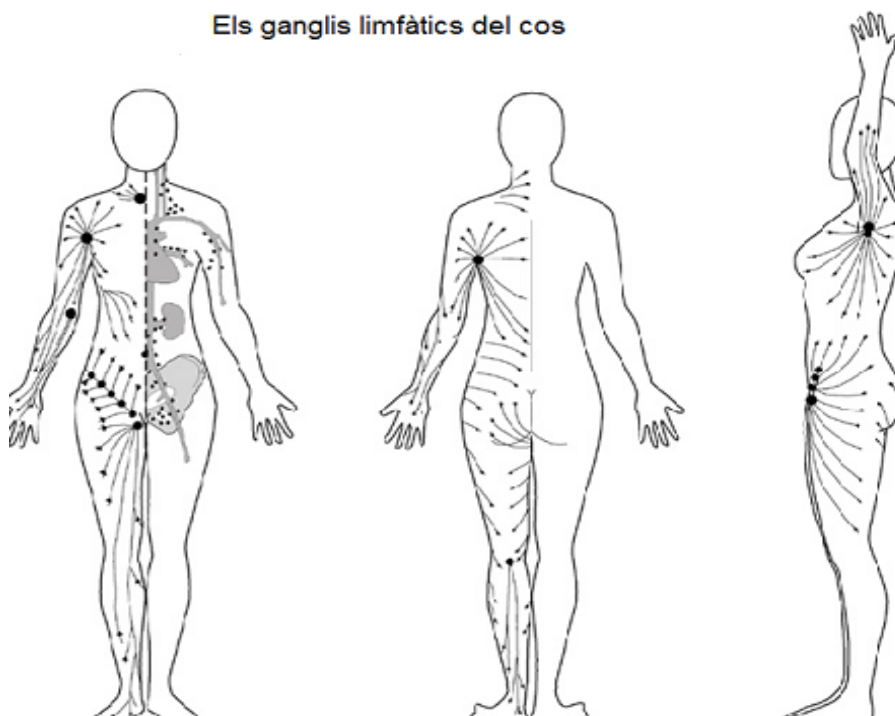
Els limfòcits immadurs migren cap al tim des de la medul·la òssia on maduren en limfòcits T perifèrics o els timòcits. Aquests limfòcits surten del tim i una altra vegada van cap a la medul·la òssia on aprenen a diferenciar-se entre el que és propi i el que no és durant la fase prenatal.

Els ganglis limfàtics i la melsa són els que es consideren com els òrgans limfoides secundaris. Són els òrgans on els limfòcits localitzen, reconeixen els antígens invasors i munten una resposta immunitària contra ells.

Els ganglis limfàtics

La funció principal dels ganglis limfàtics és filtrar el líquid intersticial i la limfa dels antígens i dels germans nocius, quan es passen dels vasos limfàtics perifèrics cap als vasos limfàtics més interns. Els més importants són els ganglis limfàtics auxiliars, els inguinals, els d'amígdala, els cervicals i les plaques de Peyer (a l'intestí).

Als ganglis limfàtics es troben en abundància els limfòcits B i els limfòcits T.



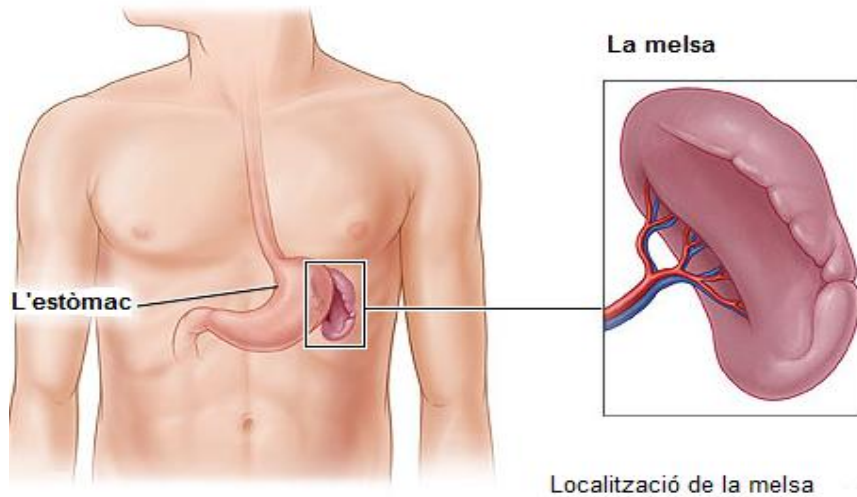
Els punts negres indiquen la localització dels ganglis limfàtics

imatges

Google

La melsa

Situat a la part superior esquerra de l'abdomen, darrere de l'estómac i prop del diafragma és l'òrgan limfoide més gran del cos humà. Filtra la sang i és l'òrgan principal on es localitzen els limfòcits T i B que s'activaran en presència d'antígens. Aquí també té lloc l'intercanvi de les substàncies entre els vasos limfàtics i els vasos sanguinis.



Googleimatges

Les cèl·lules del sistema immunitari

Les cèl·lules del sistema immunitari són els soldats especialitzats i equipats per combatre les infeccions al camp de batalla (el lloc d'infecció), són els leucòcits. Poden originar reaccions:

- humorals: indueixen la producció dels anticossos, substàncies citotòxiques, estimuladors, etc.
- cel·lulars: indueixen la fagocitosi , apoptosi, etc.

Es poden trobar en el corrent sanguini o en estat repòs en els teixits, ja que amb un estimulador deixen el seu lloc en els vasos sanguinis i passen pels capil·lars al lloc d'infecció mitjançant el fenomen de **diapedesi**. Entre els diferents tipus que hi ha dels leucòcits, es poden diferenciar dos grans grups: els granulòcits i els agranulòcits.

Els granulòcits

Els granulòcits són els leucòcits que presenten unes molècules anomenades grànuls, petits sacs que contenen els enzims que digereixen els microorganismes.

Uns granulòcits tenen la histamina que provoca la vasodilatació durant una inflamació. El que incrementa el flux de la sang cap al lloc d'infecció. Aquest flux aportarà altres leucòcits cap als antígens per matar-los. Alguns dels granulòcits també tenen la tendència de provocar la mort d'una cèl·lula afectada. La seva activitat no és específica i formen part de la resposta innata del sistema immunitari. Són els tipus més nombrosos dels leucòcits en el cos, i només s'activen en presència d'un invasor. En cas que no hi hagi una invasió es moren en els vasos sanguinis.

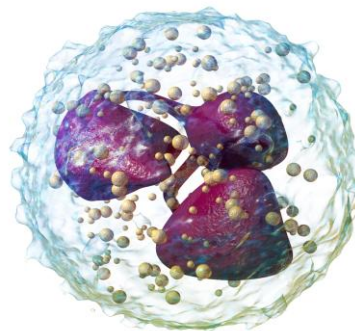
A partir de característics grànuls que contenen, també estan reconeguts pel seu nucli multilobulat isegons la diferència de tinció d'un colorant químic es distingeixen en tres tipus: els neutròfils, basòfils i eosinòfils.

Els neutròfils

Els 54-75% dels leucòcits són els neutròfils. Els neutròfils tenen un nucli que està dividit en 3-5 lòbuls. Són la classe dels granulòcits que reaccionen poc amb les tintes químiques, i per tant, el nom "neutro-". Fagociten els microorganismes. Són produïts en quantitat de 10 bilions cada dia, en un adult, per compensar el fet que tenen una vida molt curta, només d'unes quantes hores. Madurats en la medul·la òssia, circulen per la sang i es multipliquen tres a quatre vegades quan reben els senyals del lloc d'infecció.



El neutròfil al microscopi

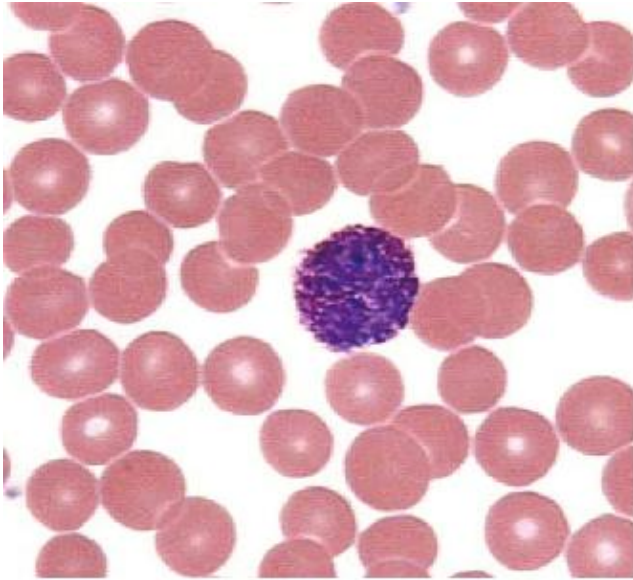


Imatge 3D d'un neutròfil

Google imatges

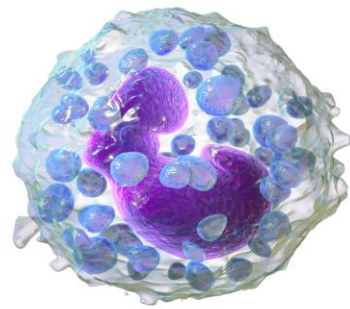
Els basòfils

Són els tipus dels granulòcits que només representen 0.4% - 1% de tots els leucòcits en el cos. Tenen grànuls amb heparina que és un anticoagulant i, amb histamina i leucotriens (ambdós són antiinflamatoris). El que aconseguen és augmentar el flux sanguini a la zona afectada.



Com es veu un basòfil sota el microscopi

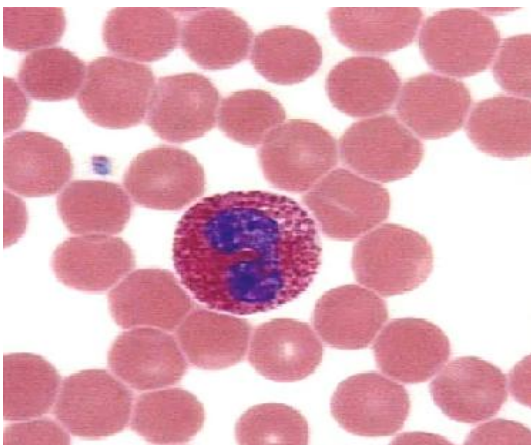
Google imatges



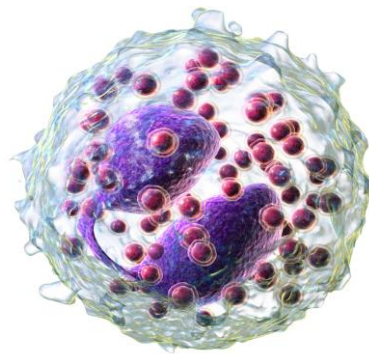
Imatge 3D d'un basòfil

Els eosinòfils

Els eosinòfils tenen un nucli bilobulat. Els eosinòfils realitzen diverses funcions des de participar en les reaccions inflamatòries i al·lèrgiques fins a fagocitar els microorganismes, en concret els paràsits i també tenen un paper fisiològic en la formació dels òrgans. Tenen una vida d'1-2 setmanes. Representen una proporció entre 1% i el 3% dels leucòcits totals.



Imatge microscòpica d'un eosinòfil



Imatge 3D d'un eosinòfil

Els agranulòcits

Es diferencien dels granulòcits per l'absència dels grànuls en el seu citoplasma i perquè presenten un nucli no lobulat. Aquests tenen una resposta adaptativa i tenen la capacitat de transformar en les cèl·lules de memòria que fan que la resposta sigui més eficaç si hi ha una segona infecció.

Els monòcits

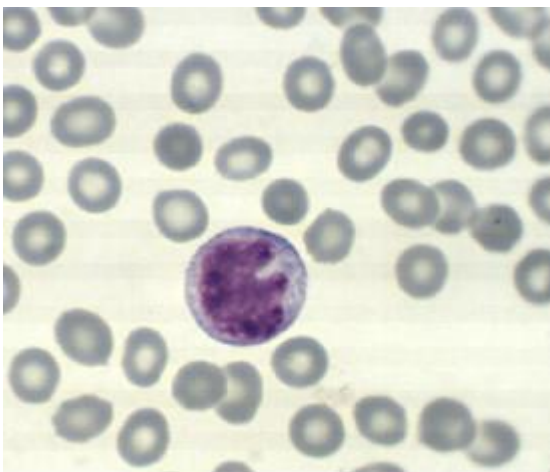
Són els leucòcits més grans que circulen la sang. Representen entre el 2% i el 10% dels leucòcits. Són unes cèl·lules molt flexibles que poden adaptar una forma o altra depenent dels canvis produïts en el seu entorn, és a dir, en el cos quan hi ha invasió per un microorganisme.

En el procés de diferenciació es converteixen en els macròfags que fagociten els microorganismes de manera inespecífica. Digereixen tot, sigui un virus o sigui un bacteri i presenten els fragments del microorganisme conegut com a antígens als altres leucòcits, principalment als limfòcits T.

Els monòcits també divideixen en les cèl·lules dendrítiques o cèl·lules presentadores de l'antigen que també fan la funció de fagocitosi.

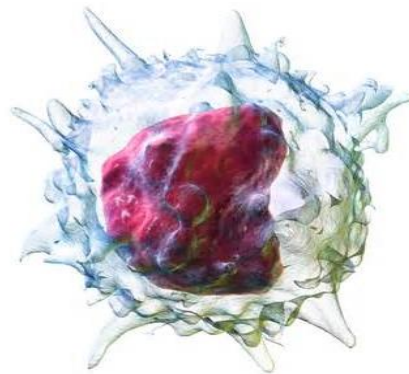
A partir de les seves funcions en el sistema immunitari els monòcits tenen les següents funcions:

- Reparen els teixits danyats
- Eliminen les cèl·lules mortes del lloc d'infecció quan la ferida es repara
- Influeixen la formació dels alguns òrgans com el cor i el cervell



Monòcit al microscopi

Google imatges



Un monòcit

Els limfòcits

Els limfòcits són les cèl·lules amb un nucli gran i arrodonit i els principals que intervenen en les respostes humoral i cel·lular. Constitueixen aproximadament el 10% - 20% de tot el recompte leucocitari de la sang. Produïts en el teixit limfàtic, es diferencien en dos tipus de les cèl·lules segons les funcions que fan:

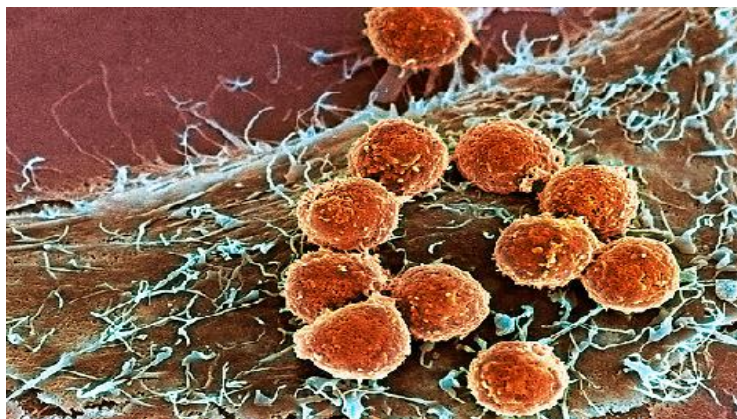
Els limfòcits T

Els limfòcits T reben el seu nom perquè maduren en el tim, d'anglès 'thymus' i són intermedis de la resposta cel·lular. Són 'els controladors' del sistema immunitari adaptatiu i les funcions principals que fan són:

- un atac directe sobre l'invasor (virus, paràsit, bacteri, etc.)
- augmentar la resposta immunitària dels limfòcits B
- produir substàncies com per exemple: les citocines que actuen com estimuladors de les altres cèl·lules del sistema immunitari.

En el tim es multipliquen i es diferencien en quatre tipus diferents. Un compte baix del normal del nombre dels limfòcits T és una manera d'avaluar la salut dels pacients de VIH/SIDA. Els tipus són:

Citotòxic T cells (cèl·lules citotòxiques): destrueixen les cèl·lules infectades alliberant citotoxines, perforines que indueixen la formació del porus a la membrana de la cèl·lula infectada i destruint el microorganisme atacant.



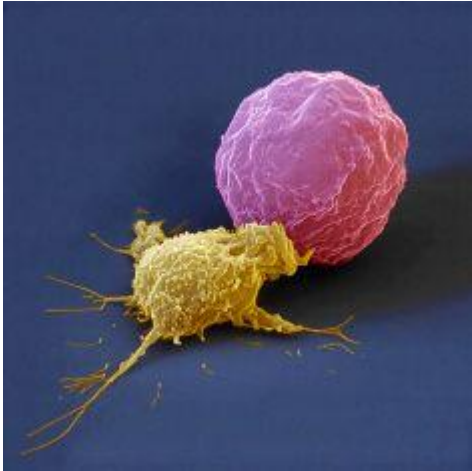
Les cèl·lules citotòxiques atacant una cèl·lula infectada

Google imatges

Helper T cells (cèl·lules T ajudant): encarregades de l'activació i diferenciació dels limfòcits B i proliferació dels limfòcits T citotòxics secretant interleucines (missatgers químics).

Regulatory T cells (cèl·lules T reguladores): són els que controlen la resposta immunitària.

Natural killer T cells: activats per diferents citocines són els que s'uneixen a les cèl·lules infectades o a les cèl·lules cancerígenes i alliberen substàncies químiques que les maten, que produeixen l'apoptosi cel·lular (la mort cel·lular).



Una cèl·lula Nk atacant una cèl·lula tumoral

Google imatges

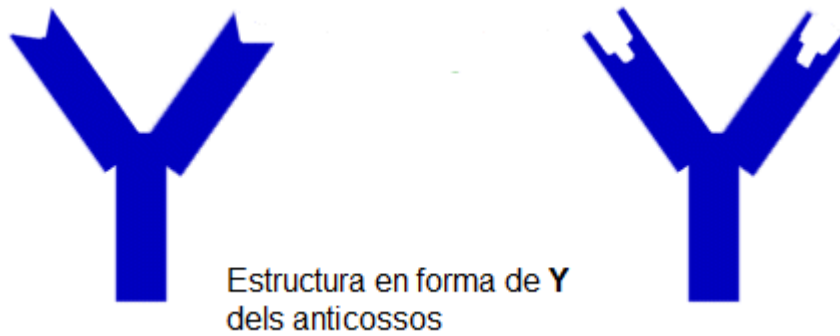
Memory T cells (cèl·lules de memòria): són un subconjunt dels tots limfòcits anteriors que prèviament han encontrat i han respost un tipus específic d'antigen i gaudeixen 'la memòria' per la qual el sistema immunitari és capaç d'actuar d'una manera ràpida i més eficaç si torna a enfrontar aquest mateix antigen.

Els limfòcits B

Els limfòcits B són produïts en la medul·la òssia com el seu nom en anglès 'bone marrow' indica. Responsables de la immunitat humoral, formen en la medul·la òssia. Maduren i prolifereixen en la melsa i en els ganglis limfàtics en presència d'antígens en les cèl·lules plasmàtiques. Les cèl·lules plasmàtiques circulen pel corrent sanguini alliberant anticossos.

Els anticossos

Els anticossos o immunoglobulines són de la naturalesa proteica i tenen una estructura que consisteix en una cadena pesada (heavy chain) i dues cadenes lleugeres (light chains) que estan construïdes en forma d'una Y.



Google imatges

Els anticossos produïts pels limfòcits B poden ser de dos tipus:

Anticossos superficials: són els tipus dels anticossos que el limfòcit B presenta a la seva membrana. La cadena pesada està en contacte amb el limfòcit mentre que les cadenes lleugeres s'uneixen als antígens.

Anticossos lliures: són els que se separen dels limfòcits i mouen lliurement en la sang.

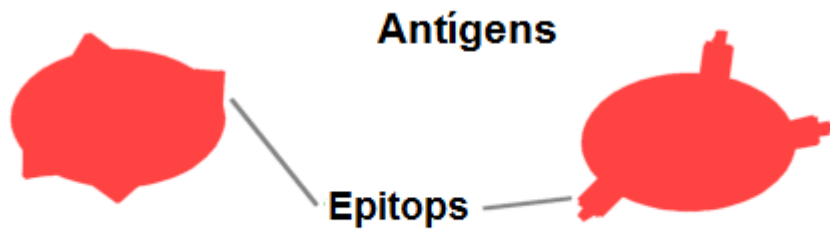
La funció principal dels anticossos és reconèixer i unir-se a l'antigen, per la destrucció d'aquest. El procés que du a terme als anticossos, ho poden fer a través de:

- la lisi cel·lular (destrucció cel·lular)
- opsonització dels microorganismes (procés pel qual es marca l'antigen per la seva posterior fagocitosis).
- aglutinació dels antígens en una determinada zona facilitant l'acció dels fagòcits
- activació dels limfòcits T

Els Antígens

Són molècules estranyes que s'uneixen a anticossos específics, un per a cadascú d'ells. Els antígens poden ser cel·lulars, molècules o simplement unes determinades proteïnes de la membrana del microorganisme, sigui un virus o un bacteri perquè tot tenen una membrana externa que els cobreix i amb els antígens propis.

Els antígens més comuns tenen una naturalesa proteica. A la seva superfície hi ha regions, anomenades determinants antigènics que s'uneixen als anticossos o/i als receptors específics de la membrana dels limfòcits. Si un antigen només presenta un determinant antigènic o **epítot**, parlem d'antígens univalents que s'uneixen a un sol anticòss o a un sol receptor, mentre que si presenten diversos epítots, parlem d'antígens polivalents.



Exemple d'un tipus d'antigen

Google imatges

Cèl·lules presentadores d'antigen

Com el seu nom indica són cèl·lules que detecten la presència d'antígens, els agafen i els presenten als limfòcits, concretament als limfòcits T. De manera que els limfòcits indueixen una resposta efectiva contra aquest antigen.

Per fer aquesta funció són necessaris els complexos MHC (major histocompatibility complex). MHC són uns gens que codifiquen per a les glucoproteïnes de la membrana, o les glucoproteïnes d'identitat, ja que cadascú de nosaltres les tenim pròpies per diferenciar entre el que és propi i que no és. Això és evident quan hi ha un rebuig, a nivell cel·lular durant un trasplantament.

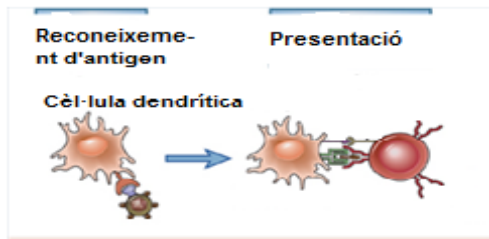
Hi ha dues classes, **MHC class I** i **MHC class II**. Classe I són els que estan presents a la membrana de les cèl·lules nucleades, les que tenen un nucli mentre que la classe II són característics de les cèl·lules presentadores d'antigen.

Les cèl·lules presentadores d'antigen digereixen el patogen que troben al cos. Això anomenem 'internalització no-específica'. Una vegada que l'antigen o el patogen està dins de la cèl·lula, es consumeix en una lisosoma amb la qual s'uneixen altres vesícules que porten enzims proteolítics (proteïnes que trenquen els antígens en més petits).

Al mateix temps en ER rugós se sintetitzen les molècules de MHC class II. Les molècules MHC class II s'uneixen amb fragments proteolítics d'antigen i migren cap a la membrana cel·lular, on són presentats als limfòcits T, específicament a helper T cells. El limfòcit T s'uneix a l'antigen i el receptor CD4 de la seva membrana s'uneix a MHC class II. Amb uns receptors estimuladors, les cèl·lules presentadores d'antigen alliberen citocines que li senyalen que prengui una posició més hostil per matar qualsevol patogen que li queda al seu interior, i el limfòcit T allibera l'estimulador IFN- γ per l'activació i replicació de les altres cèl·lules del sistema immunitari.

Les cèl·lules dendrítiques, els limfòcits B i els macròfags són les cèl·lules

principals amb la funció del processament i presentació d'antigen.



Cèl·lula presentadora d'antigen Google imatges

2.2 Les respostes específica i inespecífica

Quan s'inicia una infecció en les primeres hores intervenen els mecanismes defensives innates, les accions defensives de la pell i dels epitelials i la primera intervenció dels neutròfils i macròfags.

Després d'unes quantes hores té lloc la resposta inflamatòria, fagocitosi i activació de les cèl·lules Nk, etc.

Al voltant d'uns quants dies hi fiquen els limfòcits que amb el contacte a l'antigen s'inicien la resposta adaptativa o l'específica. Algunes de les seves cèl·lules es converteixen en les de memòria que guardaran un rècord dels antígens que l'individu ha enconrat al llarg de la seva vida.

La resposta innata o no específica

La resposta innata és la resposta natural que cada individu té des del seu naixement, mentre que l'adaptativa és la que va desenvolupant amb l'edat.

Les cèl·lules principals de la resposta innata són els macròfags, els neutròfils i les dendrítiques, aquestes últimes també participen en l'adaptativa.

Els òrgans més externs proporcionen la primera defensa, que són:

Epitelis: tant externs, epidermis (la pell) com interns, (epitelis del tub digestiu). L'epidermis està formada per les cèl·lules queratinitzades, amb descamació contínua de les cèl·lules mortes impeding la fixació dels microorganismes. A més, tenen glàndules sebàcies que segreguen el seü (substància greixosa) que juntament amb la suor forma un mantell àcid-gras que dificulta la supervivència dels microorganismes.

Mucoses: present a les obertures exteriors, la boca, la vagina, l'anús, etc. impedeixen-hi la fixació i proliferació dels microorganismes, ja que tenen un caràcter àcid molt fort que els destrueix.

Flora microbiana pròpia: a la pell, a l'intestí, a la vagina, hi tenim una flora bacteriana pròpia que ens defensa davant els microorganismes patogènics, per

competència interespecífica o per segregació de substàncies inhibidores.

Però amb factors com:

- menys resistència de les superfícies mucoses perquè tenen una temperatura favorable al creixement dels microorganismes i perquè hi té lloc l'intercanvi de gasos
- la sequedat de les cèl·lules mortes que cobreixen les capes més externes de la pell

limiten el funcionament del sistema immunitari en aquests llocs.

La defensa física dels òrgans externs es posa en marxa de manera següent:

- **La defensa dels cilis i del mucus** que arrossegueu i empenyen els microorganismes cap a les zones altes i, posteriorment a la saliva i les secrecions nasals que permeten la seva expulsió cap a la fora.
- **Els lisosomes** presents en les secrecions nasals, vaginals i lacrimals i en la saliva, trenquen els peptidoglicans de les parets bacterianes i s'hi origina la lisi cel·lular.

El pH és un mecanisme de defensa químic d'aquests òrgans. Cada òrgan en contacte amb l'exterior té un pH adequat que provoca la mort del microorganisme si no és el més adequat per la seva supervivència per exemple: el pH vaginal és àcida i no deixa créixer el bacteri de la classe 'Candida albicans' que si creix, pot causar vaginitis.

Si les primeres defenses es fallen i els microorganismes entren el cos, es posa en marxa la segona línia de defensa. La segona línia de defensa que proporciona el cos consisteix de:

- **Els interferons**

Un grup de proteïnes que tenen un paper molt important contra les infeccions virals. Produïts per les cèl·lules infectades o pels limfòcits T ja activats o per les de tipus Nk alliberen uns senyals químics i, així inicien un estat de resistència antiviral en les cèl·lules no infectades. Actuen contra els virus que encara estan en la fase inicial d'infectar les cèl·lules i que especialment presenten un RNA bicatenari com el material genètic.

- **Fagocitosi**

El procés d'engolir completament el microorganisme dins del citoplasma i, després destruir-lo amb l'ajuda dels lisosomes que és dur a terme pels neutròfils i macròfags. Són els que més ràpidament s'activen en presència d'un microorganisme invasor. Els fagòcits, principalment, es localitzen en els òrgans que tenen la funció de filtrar la sang com els ganglis limfàtics, el fetge, els

pulmons, etc. Si el microorganisme és present en la sang, s'activen les cèl·lules defensives a causa d'uns senyals químics per les altres cèl·lules defensives.

procés de fagocitosi



Google imatges

- **La inflamació**

La inflamació caracteritzada per la inflor, dolor, calor i vermellor en la zona infectada és una resposta immunitària. És tant inespecífica com específica. Hi ha diferents components que indueixen la inflamació però els principals són els macròfags que provoquen l'extravasació del plasma cap als teixits infectats i la vasodilatació dels vasos sanguinis, així s'augmenta el reg sanguini que porta les proteïnes i els leucòcits cap a la zona i causa la vermellor. La vasodilatació també augmenta la quantitat del líquid intersticial que provoca la inflor i el dolor perquè s'eleva la pressió sobre les terminacions nervioses regionals.

- Una altra manera defensiva és elevar la temperatura corporal, que anomenem la febre. Un increment de temperatura dificulta el creixement normal dels alguns microorganismes .
- La caiguda de la concentració de ferro en la sang també és un factor contribuint en la resposta immunitària perquè els microorganismes se l'utilitzen com font d'energia.

Les defenses específiques o adaptatives

Les dues respostes del sistema immunitari són interrelacionades perquè la segona s'activa quan es falla la primera. Les cèl·lules funcionades de la resposta adaptativa són els limfòcits i que desencadenen una resposta quan un determinat antigen penetri al cos. Les característiques del sistema adaptatiu són:

Especificitat: només actuen les cèl·lules activades per l'antigen i, només actuen sobre els antígens externs, mai sobre les cèl·lules pròpies.

Especialització: actuen les cèl·lules i/o molècules que poden atacar a l'antigen concret i no a altres.

Regulació de la resposta: el procés s'acaba de manera gradual, a mesura que disminueix la quantitat dels antígens al cos.

Memòria immunològica: és una resposta ràpida, eficaç, i duradora enfront a l'antigen presentat per segona vegada.

Como s'actuen davant un microorganisme o altre depèn del seu tipus (si és un virus o un bacteri o qualsevol altre patogen) i, si es troba fora de la cèl·lula o a dins.

Destrucció dels bacteris i virus extracel·lular

Davant d'un bacteri es col·laboren els anticossos (precedents dels limfòcits B) i els fagòcits. Els fagòcits els degraden i els anticossos neutralitzen l'efecte dels tòxics bacterians.

En el cas d'un virus els anticossos aglutinen les partícules virals i faciliten per opsonització la seva fagocitosi i digestió pels macròfags.

Destrucció de virus en fase intracel·lular

Les cèl·lules infectades són reconegudes pels limfòcits T que activen la diferenciació i proliferació dels altres limfòcits en els ganglis limfàtics. Els limfòcits provoquen la mort de la cèl·lula infectada, és a dir la lisi cel·lular.

Destrucció de bacteri intracel·lular

Ho fan de la mateixa manera que amb el virus, però alguns bacteris a més de la lisi cel·lular necessiten defenses exteriors com la intervenció dels anticossos i del complement per la destrucció completa.

2.3 Com actua el sistema immunitari davant de microorganisme

Molts microorganismes viuen en el cos dels animals, on formen una complexa xarxa de relacions, especialment amb les cèl·lules del sistema immunitari. Normalment no es troben en el medi intern del cos (la sang i el sistema limfàtic) i no desperten el sistema immunitari, sinó que ell les detecta com un factor de normalitat però quan apareixen en quantitats significatives en aquestes zones, solen indicar una patologia i s'inicia la resposta immunitària.

Els mamífers, en general, i l'espècie humana, en particular, ofereixen:

- Un ambient favorable pel creixement de molts microorganismes, ja que els seus teixits són rics en nutrients orgànics i els factors de creixement requerit pels heteròtrofs.
- Condicions relativament constants de pH i de pressió osmòtica.

- Temperatura òptima i constant pel creixement de microorganisme.

No obstant això, un organisme animal no pot ser considerat com un ambient microbià uniform, perquè cada regió i òrgan difereix químicament i físicament d'altres regions i òrgans, que proporciona que les infeccions microbianes siguin molt específiques: especificitat de l'hoste i especificitat d'òrgan. La relació resultant pot ser de dos tipus:

- Beneficiós per ambdós (simbiosi).
- Prejudicial per l'hoste i beneficiós pel paràsit. En aquest cas el paràsit pot causar la malaltia i se'l considera patògen.

EL CAMP DE BATALLA

Imaginem que ens hem tallat amb un clau oxidat. Això viola la primera defensa del cos, la pell. Els bacteris propers entren a la ferida i utilitzen els recursos del cos per multiplicar-se'n en quantitats molts grans fins que arriben a una població immensa que pot danyar el cos canviant l'ambient que l'envolta.

Primera línia de defensa

Primer hi intervien els macròfags "les cèl·lules de la guàrdia" que fagociten els bacteris. Els introdueixen al seu citoplasma i els digereixen amb els enzims dels lisosomes (òrgànuls cel·lulars). A més envien senyals als vasos sanguinis que arribi més sang amb més líquid i més fagòcits. Això provoca inflor. Quan els macròfags fallen, alliberen uns senyals químics per alertar a altres cèl·lules defensives.

Segona línia de defensa

Són els neutròfils que reben aquests senyals, els que deixen els vasos sanguinis i mouen al camp de batalla. Alliberen les toxines per eliminar els bacteris però en el procés també maten algunes de les cèl·lules sanes. Atrapen els bacteris i es suïciden.

Tercera línia de defensa

Si tot això no funciona 'el cervell' del sistema immunitari entra en acció, són les cèl·lules dendrítiques. Reaccionen als senyals dels neutròfils. Esquincen els bacteris en trossos i els presenten a la seva membrana externa, per això s'anomenen "presentadores d'antigen". Es mouen fins als ganglis limfàtics propers on troben milions de cèl·lules T de tipus helper i killer i llavors començarà la massacre.

Els limfòcits T tenen uns receptors específics per cada antigen, si és el que coincideix amb el que presenta la cèl·lula dendrítica començarà una reacció en cadena:

- es duplicaran ràpidament els limfòcits T
- es 'guradaran' algunes cèl·lules de memòria

A la rereguarda

Activen els limfòcits B que són els que faran els anticossos davant aquest antigen en concret. Els anticossos uniran al seu antigen i s'activaran diversos mecanismes per eliminar-lo.

Una vegada la infecció està anul·lada, les cèl·lules mortes seran substituïdes i les del sistema, com que ara no reben cap senyal per activar-se, es moren per estalviar els recursos energètics del cos. Romandran les cèl·lules de memòria que assegurin que la propera vegada que aquesta mateixa infecció entri al cos, el sistema immunitari actuarà immediatament (resposta secundària).

2.3 Les cèl·lules dendrítiques

Les cèl·lules dendrítiques que van ser descobertes pel Ralph Steinman en 1900. Són unes de les cèl·lules presentadores dels antígens (ACP: antigen-presenting cells). Les ACPs són les cèl·lules especialitzades en la degradació de les molècules i dels diferents antígens. Els fagociten i presenten els parts resultants a la seva membrana, principalment a les cèl·lules T.

2.3.1 Estructura

Els canvis morfològics inclouen el desenvolupament de les dendrites, del grec 'dendron' que significa arbre, i la reorganització i reestructuració del citosquelet (l'estructura interna del citoplasma que dona a la cèl·lula la seva forma).

Normalment vigilen el cos en estat immadur. Els antígens, siguin propis o estranys, però actuen com estimuladors i com a conseqüència les cèl·lules dendrítiques es maduren i poden comunicar amb els limfòcits T als quals activen.



Una cèl·lula dendrítica madura amb les dendrites Google imatges

La seva localització, podem dir que és a zones en contacte amb l'exterior així que les podem trobar a la pell, on s'anomenen les cèl·lules de langerhan, revestiment del nas, pulmons, estómac i intestí i en el corrent sanguini.

A més a més dels canvis estructurals les cèl·lules dendrítiques també es poden

classificar en subsets, dels quals n'hi ha quatre:

Les cèl·lules dendrítiques mieloides: derivats del mateix progenitor que dona lloc als granulòcits i monòcits. Són els que presenten l'antigen als limfòcits T i els activen.

Les dendrítiques plasmacitoides (plasmacytoid): tenen un reticle endoplasmàtic molt activat que sembla molt de les plasmàtiques, secreten una quantitat molt gran dels interferons en resposta a les infeccions virals.

CD8+ i CD8- cèl·lules dendrítiques: els CD8+ i CD8- són els receptors presents la seva membrana i només diferencien en els tipus dels antígens que presenten. Els CD8+ presenten els antígens fagocitats de l'espai intercel·lular, mentre que els CD8- presenten els antígens dels invasors.

Les dendrítiques derivades dels monòcits: els monòcits exposats als bacteris gramnegatius es converteixen en dendrítiques.

Els bacteris gramnegatius són els que no tenyeixen amb la tècnica de tinció de gram.

2.3.2 Funcions principals

Com destacat abans són les cèl·lules presentadores d'antigen als limfòcits T. Són el tipus que contínuament estan vigilant l'entorn. Ingerixen els antígens, substàncies que detecten com estranyes per endocitosi (fagocitosi i pinocitosi) i li degraden fins a presentar-lo al limfòcit T. Els antígens propis són les cèl·lules mortes i les proteïnes extracel·lulars i els antígens estranys que reconeixen són el virus, bacteri, etc. (els patògens). Aquest procés s'anomena processament i presentació dels antígens.

A part d'aquesta funció també activen els limfòcits T ingènues, estimulen el creixement i diferenciació dels limfòcits B i ajuden a mantenir la seva memòria immunològica.

Els intermedis de comunicació entre les dendrítiques i el seu entorn, en cas d'infecció, són les quimiocines i les citocines (missatgers químics).

Les cèl·lules reconeixen els invasors que presenten una estructura molecular que:

- no comparteixen amb les de l'hoste
- comparteixen amb diferents patògens

Aquestes estructures s'anomenen els patrons moleculars associats als patògens (PAMP: pathogen associated molecular pattern) que estan a seva membrana externa. Els exemples més destacables són els components de la paret dels bacteris gramnegatius, els flagels dels bacteris, RNA bicatenari del virus, etc.

Els PAMP són reconeguts pels uns receptors de la membrana anomenats TLPs (toll-like receptors) que identifiquen la naturalesa del patogen i activen una resposta efectiva alliberant diversos senyals químics.

Una vegada que la cèl·lula ha detectat la presència d'un antígen, el fagocita i després el degrada en fragments peptídics en els lisosomes, que estan exposats a la superfície cel·lular. Un cop processat l'antigen, les DCs mouen cap als ganglis limfàtics més propers i la melsa on troben els limfòcits T amb els receptors apropiats que uneixen amb els antígens corresponents.



Imatge 3D d'una cèl·lula dendrítica google imatge

3. El virus de la SIDA (síndrome de la immunodeficiència adquirida) o el VIH (virus de la immunodeficiència humana)

A diferència d'altres virus, el cos no pot resistir aquest. El VIH ataca els limfòcits T que presenten el receptor CD4 a la seva membrana. Amb els anys, potser anys, el virus debilita el sistema immunitari perquè el recompte dels limfòcits T cau dràsticament.

El VIH és una forma mutada del VIS (virus d'immunodeficiència simia) endògena d'Àfrica i que va ser transmesa quan els humans van caçar els ximpanzés africans. Els registres afirmen que els virus va aparèixer al final dels anys 1800, després del qual el va estendre a tot el món.

3.1 Estructura i forma

El VIH és un retrovirus, és a dir, un virus que es replica en la cèl·lula hoste a través de transcripció inversa. Encara que hi ha autors que no el consideren ésser viu, sí que hi ha una classificació taxonòmica:

família: *retriviridae*

gènere: *lentivirus*.

És un virus embolcat, diploide, monocatenari, amb RNA de sentit positiu. Hi ha tres gens retroviral que defineixen l'espècie: *gag*, *pol* i *env*.

Gag: codifica l'antigen del grup específic i les proteïnes estructurals.

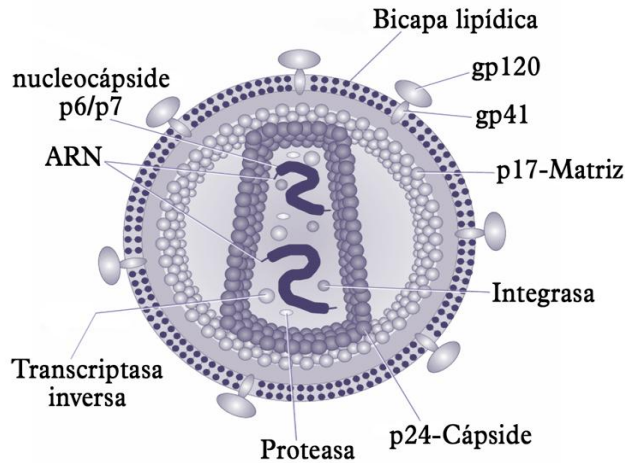
Pol: codifica els enzims virals que són polimerasa, integrasa i proteasa.

Env: codifica l'embolcall viral, les proteïnes estructurals exteriors que són responsables d'especificitat de tipus cel·lular. Una de les proteïnes, la

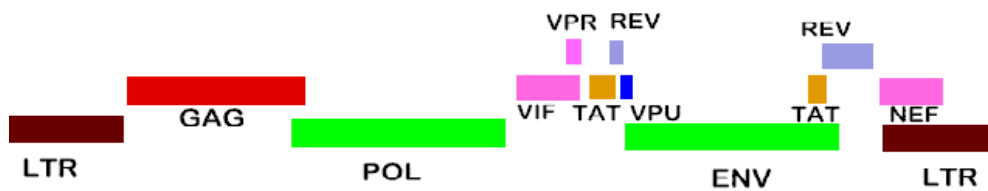
glicoproteïna 120 és el que s'uneix al receptor CD4 dels limfòcits T.

Hi ha dos tipus de VIH que diferencien en un gen, en el *vpx* i *vpu*. El VIH-2 té el *vpx* i VIH-1 té el *vpu*.

L'estructura és d'un càpside que conté el RNA, els enzims virals i l'enzim de transcripció reversa amb un embolcall viral que està encrestat amb glicoproteïnes a la membrana.



L'estructura del VIH Google imatges

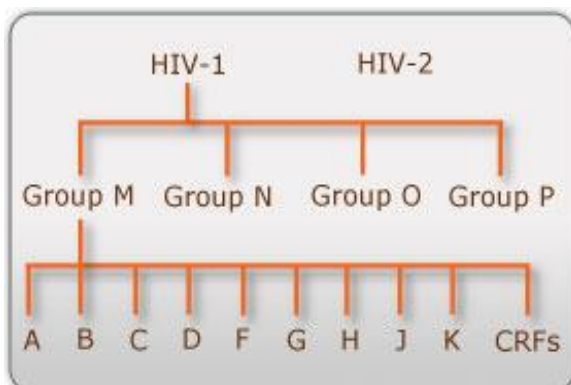


El genoma del VIH-1

imatges

Google

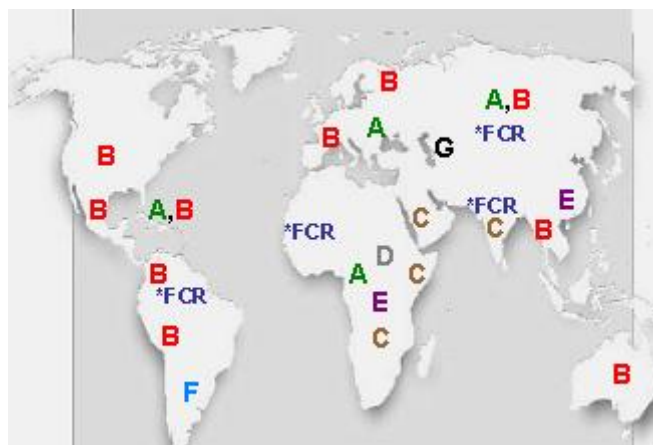
Cada subtipus de VIH-1 i VIH-2 tendeix a causar una malaltia similar però la distribució global de cada espècie difereix.



La classificació dels subtipus

VIH-1 va originar en Àfrica central, principalment en la república democràtica del Congo, de transmissió entre espècies entre els humans i els ximpanzés. Els seus subtipus són els més dominants globalment. Podem diferenciar el VIH-1 en quatre grans grups anomenats M (d'anglès major, responsable de la majoria d'epidèmia), N, O i P. Els altres grups són relativament poc comuns i només s'ocorren en Camerun, Gabon i Guinea equatorial. Dins del tipus M, hi ha nou genèticament diferent subtipus del VIH-1. El subtipus A, B, C, D, F, G, H, J i K. A més els diferents subtipus poden combinar la matèria genètica per formar un virus híbrid (circulating recombinant form-CRF). El subtipus dominant de VIH-1 en Amèrica del nord, Àfrica i Europea occidental és el B i, per tant la majoria d'investigació clínica aconduïda és del tipus B, malgrat el fet que només representa 12% de la població afectada. El subtipus C és l'altre més difós en Àfrica de sud, Índia i Banya d'Àfrica.

Encara que cada vegada la distribució dels subtipus canvia a causa de migració i barreja de les poblacions. Una altra espècie menys coneguda és el VIH de tipus 2 que per ara està limitat a Àfrica occidental. La seva epidèmia no té un impacte tan gran com el de tipus 1. Superficialment són similars però cada tipus té uns gens i un procés de replicació propi. El tipus 2 té un risc menor de transmissió i la seva infecció tarda més temps a progressar cap a la SIDA.



La distribució dels subtipus arreu al món

3.3 El cicle víric i el desenvolupament d'infecció

Sabem que el virus infecta els limfòcits CD4. És la caiguda en el recompte dels limfòcits CD4 que resulta en la inversió de la ràtio normal de les cèl·lules i la desregulació de la producció antigènica dels limfòcits B. La resposta immunitària a certs antígens disminueix i l'hoste falla a respondre a les infeccions oportunistes i els organismes que fins ara estaven en la situació de comensalisme (simbiosi).

El patró de les infeccions oportunistes difereix de regió a regió per exemple a USA els dominants són espècies de candida i pneumocitosi (pneumònia per Pneumocystis), mentre que als països desenvolupats el més freqüent és la

tuberculosi.

Un cicle cel·lular normal és molt important per la replicació viral com que el virus interromp aquest cicle per produir més virus en quantitats grans que atacarien més limfòcits T.

El cicle viral

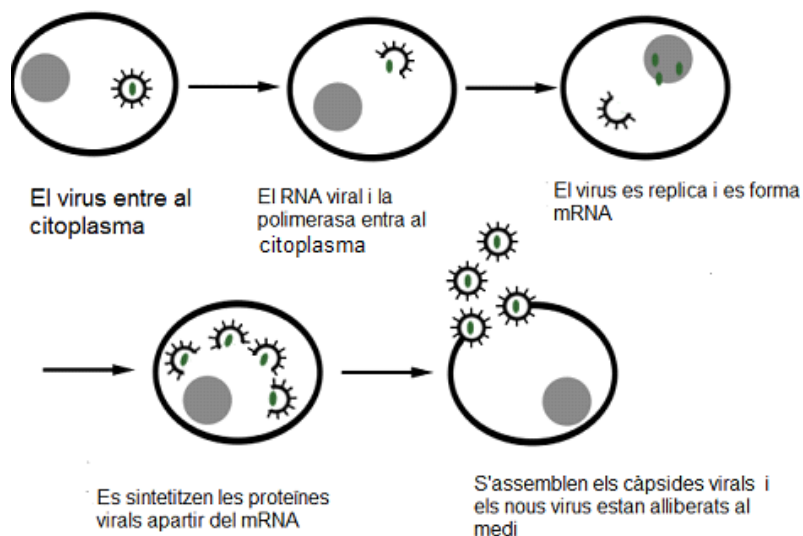
El virus fa contacte amb els receptors de la membrana de les cèl·lules per poder entrar-hi. El virus perfora la membrana cel·lular i s'uneixen les dues membranes (la fusió de les membranes). La material genètica del virus està injectat en el citoplasma de la cèl·lula. L'embolcall es queda a la membrana cel·lular, mentre que una vegada dins del citoplasma, es dissol el càpside del virus.

S'alliberen els enzims virals, i així comença el procés de replicació. L'enzim, la transcriptasa inversa, utilitzant els nucleòtids de la cèl·lula hoste, fa la transcripció inversa del RNA viral a DNA monocatenari, que és transcrit una altra vegada en DNA bicatenari.

L'enzim, la integrasa, porta el DNA de VIH a través dels pores nuclears al nucli cel·lular on simplement fa un tall en el cromosoma de la cèl·lula i permet que el DNA viral pot inserir en el DNA del hoste.

La polimerasa RNA transcriu el bri de DNA a mRNA que codifica per les proteïnes virals. El mRNA s'associa amb els ribosomes del reticle endoplasmàtic rugós que el tradueix en les proteïnes de l'embolcall, que quan surten de l'ER rugosa s'uneixen a la membrana cel·lular.

Mentrestant altres ribosomes tradueixen altres proteïnes que juntes amb el RNA i els enzims virals també acaben de ser incorporades a la membrana cel·lular. L'estructura final brota de la superfície cel·lular, però no abans que la proteasa reorganitza els polipèptids per formar una estructura viral madura que infectarà altres limfòcits.



Desenvolupament d'infecció

Ja que ha començat el procés de replicació del virus i, simultàniament la infecció dels limfòcits CD4 amb els temps això progressarà fins que el sistema immunitari no sigui capaç de defensar el cos.

El control immunitari podem, distingir-lo en tres fases depèn del progrés del virus. La defensa principal ens proporcionen fins a un cert grau els limfòcits citotòxics, els anticossos i les cèl·lules Nk. Quan es fallen totes aquestes defenses la infecció s'apodera del cos. Si no es tractat immediatament, el progrés és molt més ràpid a la SIDA. Les fases són:

La infecció aguda: 2-4 setmanes després del contacte amb el virus, també coneguda com la síndrome aguda retroviral (ARS:acute retroviral syndrome) o infecció primària de VIH. És el període de la producció viral no controlada i la caiguda dràstica del recompte dels limfòcits CD4. Els pacients presenten els símptomes similars que una grip, però molt més intens. Els símptomes poden ser:

- febre
- ganglis inflamats
- mal de coll
- borradura
- dolors musculars i articulars
- mal de cap

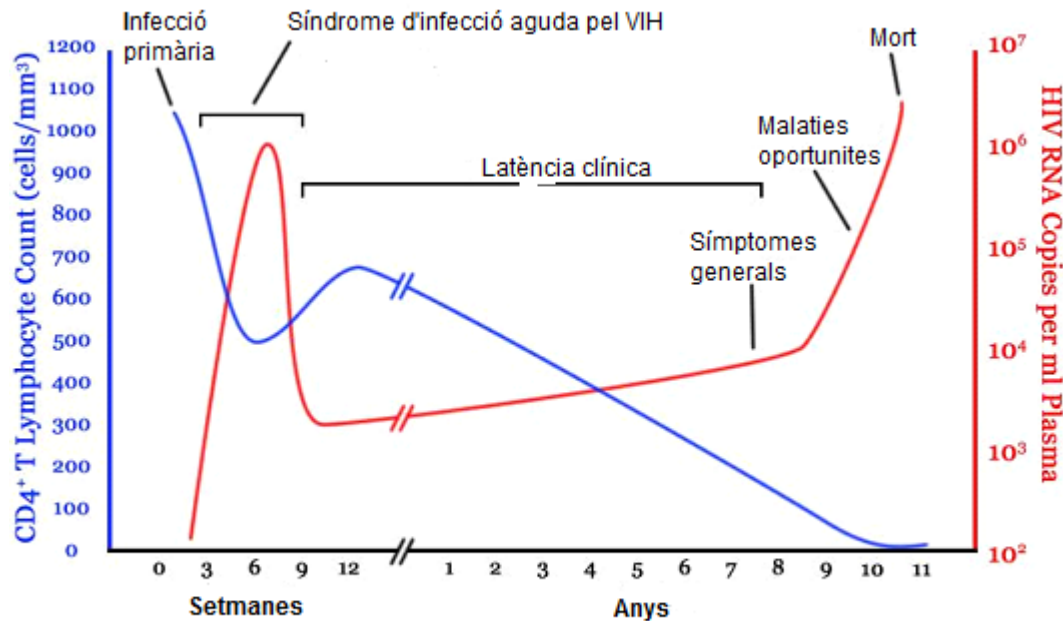
Aquesta és la manera com el cos ens defensa. Amb la defensa primària el recompte del virus disminueix, però no tant i el dels limfòcits T augmenta però no tant com estava abans de la infecció. És la fase on hi ha major risc de transmissió. El virus està detectat amb les tests de la sang i de la saliva, el procés anomenat 'mètode ELISA'.

Latència clínica: és caracteritzat per no mostrar cap símptoma, és un estat d'inactivitat. El virus continua desenvolupant i dominant el cos però amb símptomes lleus que la majoria de la gent ignora i en quantitat tan baixa que no es poden detectar amb el test de VIH. Aquesta fase pot prolongar durant dècades. Al final quan els símptomes apareixen és quan el sistema immunitari ha fallat completament.

SIDA: el cos és més vulnerable a les infeccions oportunistes, el recompte dels limfòcits T cau sota de 200 cèl·lules/mm³, el normal és entre 500-1600 cèl·lules/mm³.

Si el pacient ha desenvolupat més d'una infecció oportunista, independentment del recompte dels limfòcits CD4, s'ha progressat a la SIDA.

Els pacients amb tractaments sobreviuen al voltant de 3 anys. Sense tractaments l'esperança de la vida és d'un any o menys.



El progrés del VIH al la SIDA amb els anys

Google imatges

3.4 Actuació del sistema immunitari davant del virus

El VIH és el virus molt potent que comença a debilitar el sistema immunitari des del moment que entra en el cos. La resposta immunitària no és tan eficaç contra el VIH. Malgrat això les cèl·lules infectades alliberen uns senyals que activen el sistema adaptatiu però, només aconseguen a reduir el procés d'infecció i no eradicar-lo completament.

3.4.1 Quan hi ha contacte directe amb limfòcits T

El virus segueix el cicle viral explicat a l'apartat anterior, ja que el limfòcit T és una cèl·lula normal del cos que fa el contacte amb el virus VIH. És específicament aquest limfòcit perquè presenta el receptor CD4 que el VIH reconeix.

3.4.2 Quan hi ha contacte amb les cèl·lules dendrítiques

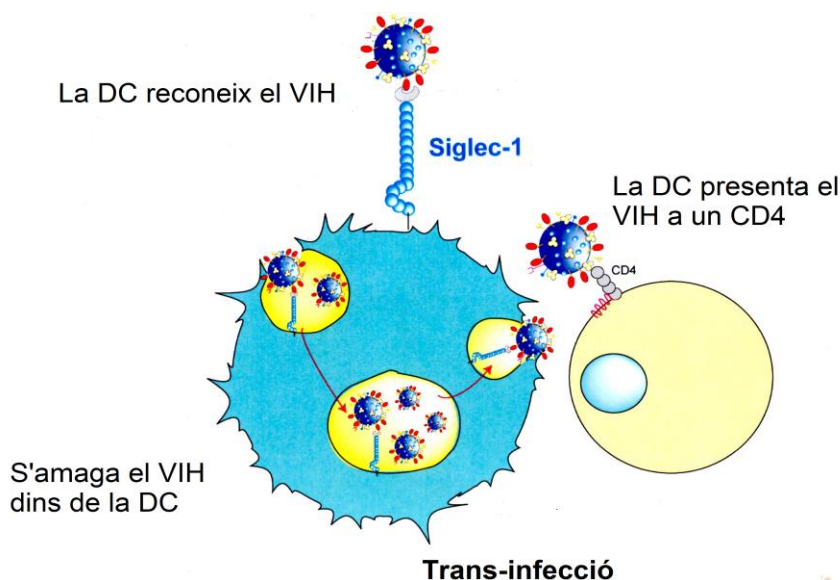
Com destacat abans en l'apartat de les cèl·lules dendrítiques, les DCs detecten la presència del patògen, el fagociten i en els lisosomes de les cèl·lules es descompon en fragments proteics que presenten a la seva membrana perquè els limfòcits T els puguin reconèixer i posi en marxa una resposta adequada.

3.4.2.1 Trans-infecció

Malgrat el seu paper com una cèl·lula del sistema immunitari, a vegades la cèl·lula dendrítica també pot transportar el virus, amagant-lo i després introduir-lo de forma intacta al limfòcit T que s'infecta.

Perquè una DC pugui dur a terme el procés de trans-infecció, ha de tenir a la seva membrana un receptor especial, el siglec-1. Siglec-1 és una proteïna membranal que s'uneix amb àcid siàlic, present en el complex de la glicoproteïna de l'embolcall del virus. La DC si segueix aquesta via de trans-infecció, pot resultar en la disseminació del VIH en el pacient.

Un cop que es fusionen el receptor siglec-1 amb la membrana del virus, aquest entra en el citoplasma i allí s'amaga, dins d'un embolcall resistent a la proteasa, sense replicar-se. Quan una DC amb el virus "amagat" es troba a un limfòcit T CD4, s'unirà a aquesta i així es facilita la infecció. Aquest model és conegut com la hipòtesi de "cavall de Troia".



Imatge d'IRSICAIXA

3.5 Tractaments i protocol pels pacients

Com sabem no hi ha una cura definida contra el virus de VIH, però sí que existeixen uns tractaments que alenteixen la infecció i prolonguen la vida del pacient. Són els que coneixem com els tractaments antiretrovirals en conjunt anomenat **la teràpia antiretroviral (TAR)**.

El cicle de vida del virus passa per les diferents etapes al llarg de temps, TAR actua interrompent cadascú d'aquestes etapes. Consisteix d'unes drogues virals que es diferencien segons l'etapa sobre que actuen. 2 o 3 drogues estan

combinats en una píndola perquè funcioni millor el tractament. N'hi ha cinc:

Inhibidors de fusió i d'entrada: actuen bloquejant la fusió de l'embolcall viral i de la membrana del limfòcit T.

Inhibidors d'integrasa i de transcriptasa reversa (NRTIs i NNRTIs): impedeixen que la integrasa o transcriptasa reversa puguin transcriure o puguin inserir el DNA del virus al DNA del hoste.

Inhibidors de proteasa: Una vegada que el virus ja s'ha replicat i està a punt de ser alliberat perquè pugui infectar altres limfòcits T, necessita que el reorganitzi la proteasa. Les drogues impedeixen que aquesta funcioni correctament.

El tractament alenteix la infecció però el virus encara pot transmetre. El tractament ha de ser continuu i és millor començar-lo com més aviat possible i la prescripció depèn del cada metge.

A part dels seus avantatges també hem de considerar la realitat de que no tot el món té l'accés al medicament, i la meitat de la població afectada continua ser descuidada i a més d'això prendre els medicaments amb altres drogues com per exemple: les recreatives fan que el tractament no funcioni bé.

Els protocols del tractament posats en acció per l'OMS (organització mundial del salut) per la regió europeu són els següents:

- Avaluació dels pacients i tractament antiretroviral pels adults i adolescents.
- Gestió de les infeccions oportunistes i símptomes generals de la SIDA/VIH.
- Cures pal·liatives per les persones vivint amb VIH.
- Gestió de tuberculosi i coinfecció de VIH.
- VIH/SIDA tractaments pels usuaris de drogues injectables.
- Gestió d'hepatitis C i coinfecció de VIH.
- Gestió d'hepatitis B i coinfecció de VIH.
- Prevenció d'hepatitis A, B i C i altres factors hepatòxics en persones vivint amb VIH.
- Suport per la salut sexual i reproductiva en persones vivint amb VIH.
- Prevenció de transmissió de VIH de les mares infectades a nadó.
- Tractament i cuida de SIDA/VIH pediàtric.
- Immunització de persones vivint amb VIH i de persones que són al risc de la infecció.
- Prolaxi postexposició (Post-exposure prophylaxis) per la infecció de VIH.

Marc pràctic

4. Recerca al laboratori de la unitat IRISCAIXA de l'hospital Trias i Pujol

La seva missió

La missió de l'institut d'investigació de la SIDA al IRISCAIXA és realitzar, impulsar i divulgar la investigació biomèdica en l'àmbit de les ciències de la salut i epidemiologia, especialment en el camp de la síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA) i el seu virus de la immunodeficiència humana (VIH).

Els seus objectius

- Desenvolupar investigació d'excel·lència de nivell internacional sobre la SIDA i el VIH, amb l'objectiu de contribuir a millorar els coneixements, la prevenció i els tractaments de la malaltia.
- Posar a disposició els resultats de la investigació als professionals i els pacients perquè es beneficien directament, així com a la societat en general amb la finalitat de contribuir a la prevenció i eradicació de la SIDA.

Localitzat a Badalona a la facultat de medicina de l'hospital Trias i Pujol, IRISCAIXA està constituït per vuit grups d'investigació que treballen en els àmbits següents:

1. Investigació bàsica: amb l'objectiu d'entendre millor els mecanismes d'infecció de VIH i d'identificar noves dianes terapèutiques.
2. Investigació clínica: per avaluar les noves estratègies terapèutiques d'investigació bàsica.
3. Investigació de la vacuna: per desenvolupar una vacuna preventiva i terapèutica contra el VIH.
4. Investigació en els països desenvolupats: per facilitar-los la seva tasca en la investigació.

Objectius específics del grup de retrovirologia i estudis clínics (GREC)

Aquesta va ser el grup amb el qual vaig treballar al llarg de l'estiu. Estudien els mecanismes de patogènesi viral i les intervencions terapèutiques de reconstitució immunitària en els pacients infectats.

En el camp de la patogènesi viral s'està estudiant la capacitat que tenen les cèl·lules dendrítiques madures per dispersar VIH-1, mitjançant la trans.infecció, als limfòcits T.

El grup s'ha identificat l'estructura molecular anomenada sialilactosa present en la membrana viral com un patró de reconeixement molecular de captura viral

per les cèl·lules dendrítiques madures, també s'ha identificat Siglec-1 com el receptor viral present en les cèl·lules dendrítiques madures.

Atès que els estudis de immunopatogènia estan aportant importants resultats, el grup pretén intensificar la recerca en cèl·lules dendrítiques, la seva contribució a la dispersió viral i el seu potencial en l'activació del sistema immunitari en el context de les vacunes terapèutiques contra el VIH-1. Treballa en la identificació d'entitats químiques que permetin bloquejar la interacció entre la sialilactosa i el seu receptor Siglec-1, per aprofitar-los des d'un punt de vista terapèutic.

Una de les coses que els interessa veure és si el mecanisme de trans-infecció del VIH-1 intervingut per cèl·lules dendrítiques pot tenir rellevància in vivo, és a dir, en els pacients amb VIH-1, ja que fins ara moltes de les coses s'han estudiat in vitro (al laboratori), que sempre pot ser una mica diferent del que està passant realment en el cos de les persones.

Aquesta va ser el tema que vaig estudiar i per això volem veure si alguns factors que es troben en el plasma dels pacients amb VIH-1, com són el LPS i el IFN- α , poden donar lloc a l'activació de les dendrítiques i augmentar la seva capacitat de capturar virus i després transmetre'l als limfòcits T CD4.

- El IFN- α és un agent antiviral que produeixen les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (un subtipus de dendrítiques) en resposta a les infeccions virals com del VIH-1.

- El LPS es pot trobar en plasma, ja que durant la infecció per VIH-1 es produeix una ruptura en la barrera epitelial de l'intestí que provoca el pas de bacteris comensals intestinals (flora bacteriana que es troba en l'intestí) a la sang. Aquest procés es coneix com translocació bacteriana.

5. Materials i mètodes

Per una millor comprensió explicaré els mètodes en forma d'una pràctica. Cal tenir en compte que només sé el procediment que em van donar i no com es realitza la pràctica en el laboratori, ja que ni sóc una persona autoritzada a entrar un laboratori professional ni tampoc és l'objectiu del meu treball i per això no he obtingut jo els resultats o les conclusions de cada una dels protocols que destacaré en l'annex.

6. Procediment del treball

6.1 Normes de seguretat: nivell P3

Hi ha protocols i normes per assegurar la seguretat dels treballadors. Com ja he dit abans no podia entrar al laboratori, a l'annex us explicaré les normes i mesures que s'apliquen a un laboratori de nivell P3, adequat pel virus VIH, ja que ni hi ha risc de la seva propagació a través d'aire o amb contacte directe (si no hi ha una ferida) mentre la recerca i la investigació de l'Ebola té lloc a un laboratori de nivell P4, el nivell més alt de seguretat que proposen internacionalment per la seguretat dels treballadors.

6.2 Tractaments de les cèl·lules dendrítiques

Les cèl·lules dendrítiques immadures no són les principals que indueixen la trans-infecció, ja que degraden el virus en fragments antigènics només poques hores després de la infecció i a més no posseeixen el receptor Siglec-1 que és responsable d'unir DC amb el virus.

A l'altra banda les DCs madures són els presentadors del receptor Siglec-1 i, per tant més sospitoses de que són les que duen a terme el procés de trans-infecció. Ho fa reconeixent l'àcid siàlic (sialilactosa) de la membrana de l'embolcall viral. Els dos actuen com un clau i pany que serveix per digerir el virus sense la fusió de la seva membrana amb la plasmàtica i així amagar-lo de les altres cèl·lules del sistema immunitari.

Entre els estimuladors de creixement de les DCs que els d'IRSICAIXA estudien i treballen amb el lipopolisacàrid LPS de la paret bacteriana i l'interferó-alfa IFN- α . Destacaré una mica com són i les seves funcions principals a l'annex, ja que tampoc vaig treballar amb aquests.

6.3 Observació amb microscopi spinning disk

La informació que us proposo a l'annex me l'ha passat un investigador d'IRSICAIXA, sobre com és el disseny i com funciona al microscopi que utilitzen per analitzar les cèl·lules tractades amb LPS i IFN- α .

La meva part pràctica

6.3.1 Preparació de les mostres per l'observació

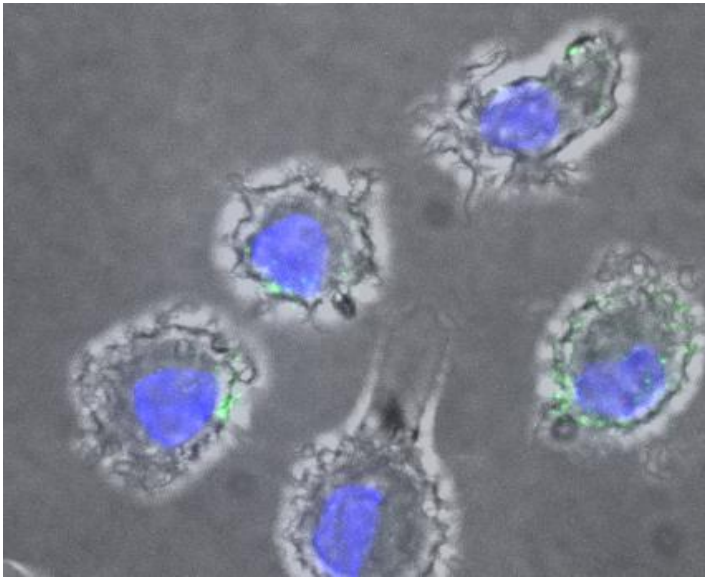
El microscopi confocal, utilitzat per visualitzar la captura dels VLPs per part de cèl·lules dendrítiques, està en la "Advanced Digital Microscopy Core Facility" de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRBB). Vaig acompanyar allà un investigador d'IRSICAIXA.

Ell ja tenia les mostres preparades però amb mi va fer tot el procediment per fer la preparació per tal d'ensenyar-me-la i per això l'he considerat en aquest apartat. Tot el que quedava per fer era veure-les a través del microscopi. Ell les va mirar a través del microscopi mentre jo les vaig veure en una pantalla on es van projectar simultàniament. Aquest microscopi també té la possibilitat de control de la temperatura i de diòxid de carboni però en aquest cas no va ser necessari, ja que les mostres estaven paralitzades (mortes).

L'objectiu de veure les cèl·lules a través del microscopi és analitzar com les VLPs es distribueixen en la cèl·lula sabent que poden presentar tres formes diferents de distribució:

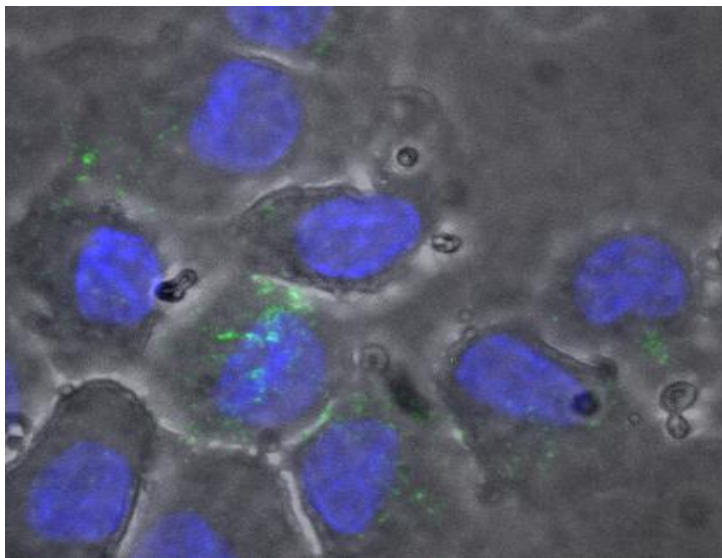
- distribució en forma d'una pilota concentrada en una regió de la cèl·lula anomenada "sack-like compartment",
- distribució aleatòria "random" per tota la cèl·lula

- la distribució polaritzada



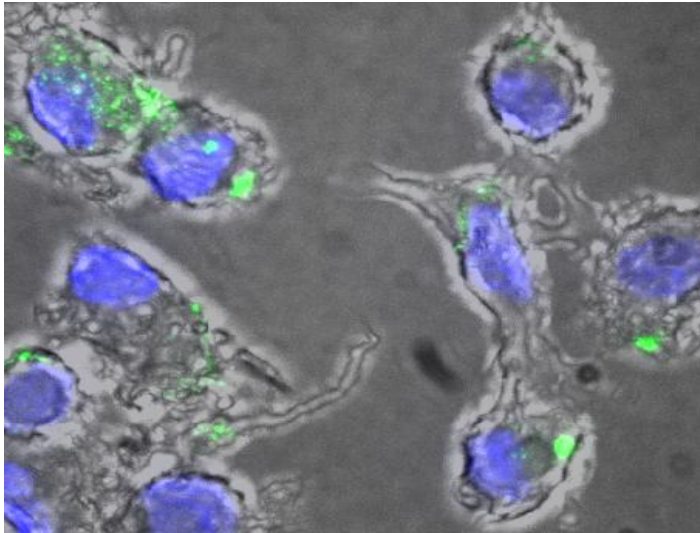
Imatge d'IRSICAIXA

La distribució polaritzada en un DC immadur



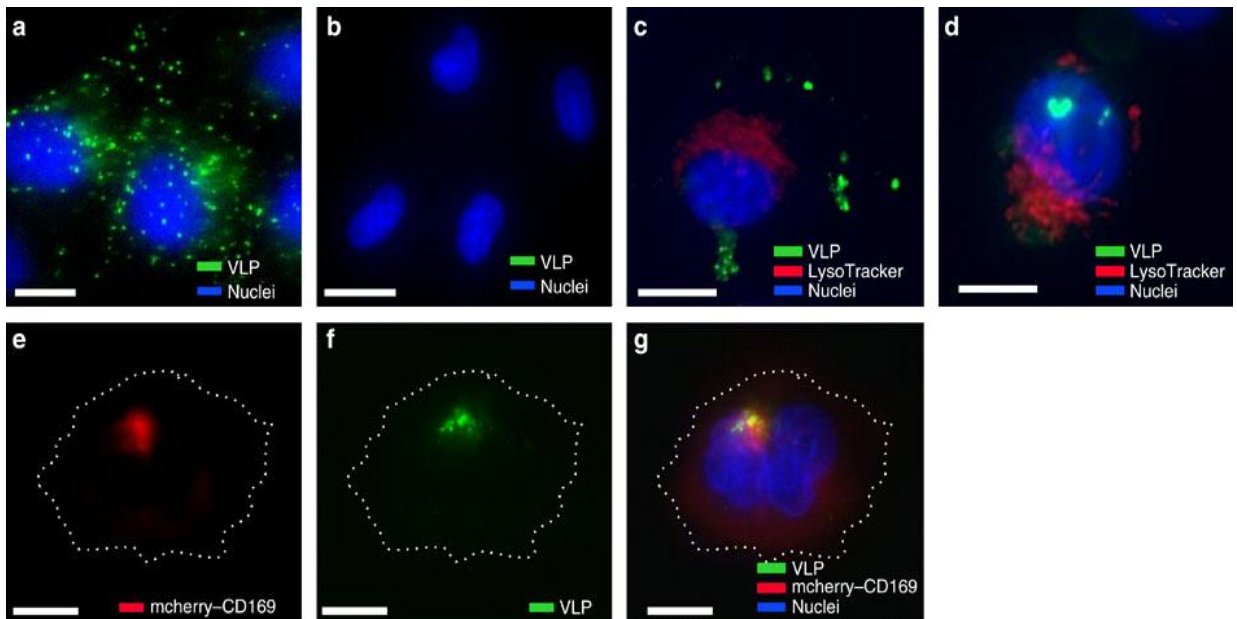
Imatge d'IRSICAIXA

La distribució aleatòria en un DC tractat amb IFN- α



Imatge d'IRSICAIXA

La distribució en forma de pilota (sac-like) i en forma polaritzada de les DCs tractades amb LPS



La imatge A és una distribució aleatòria(random), la B no presenta cap VLPs. Al C podem dir que és una distribució polaritzada i la D i la F són clarament en forma de pilota(sack-like compartment).

L'augment del microscopi és de 63X i les fluorescències que utilitzades són:

- **DAPI** per veure els nuclis de la cèl·lula
- **GFP**(green fluorescent protein) per veure els VLPs
- **RFP**(red fluorescent protein) per als fons

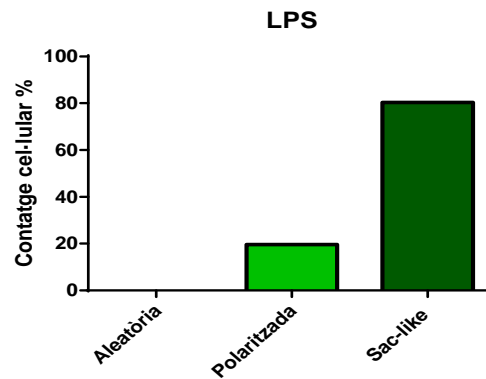
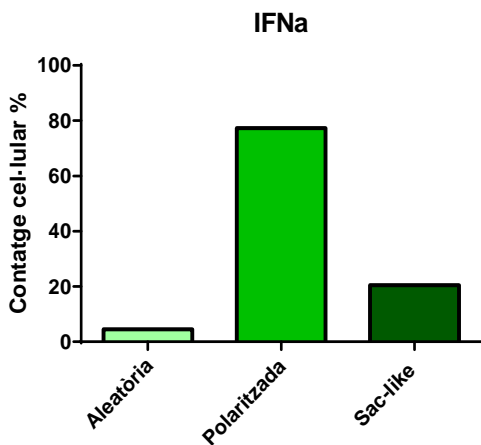
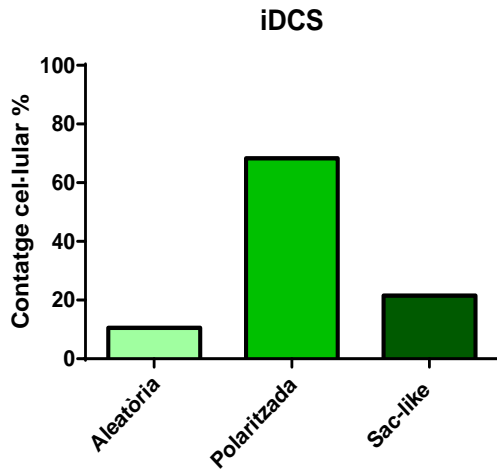
El contatge de les cèl·lules queda enregistrat en la taula del següent apartat.

7. Observació i obtenció dels resultats

L'estructura de les taules ha estat dissenyada per tal de facilitar la posterior anàlisi comparatiu en forma de gràfics entre DCs immadures i madures i també es diferencia les que estan madurades per LPS i les madurades per IFN- α .

	Imatge	No VLPS	Aleatòria	Polaritzada	Sac-like (forma de pilota)	Apoptosi	Cèl·lules totals en el camp	Cèl·lules vives	VLP+
iDCs	1	4	0	1	0	0	5	5	1
	2	4	0	1	0	0	5	5	1
	3	4	0	0	1	0	5	5	1
	4	6	0	1	0	0	7	7	1
	5	3	1	1	0	0	5	5	2
	6	1	1	1	1	1	5	4	3
	7	4	0	3	0	0	7	7	3
	8	5	0	0	0	0	5	5	0
	9	7	0	2	0	0	9	9	2
	10	2	0	2	1	0	5	5	3
	11	3	0	1	1	0	5	5	3
		43	2	13	4	1	63	62	19
IFN-α	1	0	0	6	0	0	6	6	6
	2	1	0	2	1	0	4	4	3
	3	0	1	4	2	0	7	7	7
	4	1	0	5	2	0	8	8	7
	5	1	0	3	1	0	5	5	4
	6	2	0	4	0	0	6	6	4
	7	0	0	3	1	0	4	4	4
	8	2	0	2	0	0	4	4	2
	9	1	0	4	1	0	6	6	5
	10	0	1	1	1	0	3	3	3
		8	2	34	9	0	53	53	44
LPS	1	0	0	0	5	0	5	5	5
	2	0	0	0	1	0	1	1	1
	3	2	0	0	1	0	3	3	1
	4	0	0	1	2	0	3	3	3
	5	1	0	1	2	0	4	4	3
	6	0	0	0	5	0	5	5	5
	7	0	0	0	3	0	3	3	3
	8	1	0	2	0	0	3	3	2
	9	0	0	1	2	0	3	3	3
	10	0	0	0	6	0	6	6	6
	11	1	0	2	2	0	5	5	4
	12	1	0	1	5	0	7	7	6
	13	3	0	1	3	0	7	7	4
		9	0	9	37	0	55	55	46

	%Aleatòria	%Polaritzada	%Sack-like
iDCs	10.5	68.4	21.5
IFN- α	4.5	77.3	20.5
LPS	0	19.6	80.4
	%Apoptosi		
iDCs	1.6		
IFN- α	0		
LPS	0		



8. Anàlisi de dades

La comparació entre DCs immadures i madures:

Madures afavoreixen més la trans-infecció. Les DCs immadures, en un 10%, seran eliminades per apoptosi. A les DCs madures no s'observa apoptosi que significa que el VIH directament s'hi amaga i, com que les altres cèl·lules

immunitàries no li reconeixen fàcilment, es transmès als CD4.

A les DCs immadures i madures per IFN- α , la distribució dels VLPs és majoritàriament polaritzada.

Encara que IFN- α alliberat per les cèl·lules infectades serveix per avisar les cèl·lules sanes del cos de la presència del VIH, en el cas de les DCs madures no hi ha cap canvi amb la presència d'IFN- α , amb la qual cosa el virus està completament amagat, no el detecten.

Amb les DCs madures de LPS el cas és completament diferent, el virus està concentrat en un punt (sac-like) així que la DC madurada pel LPS també facilita la trans-infecció al CD4 sense que hagi estat detectat.

8. Les conclusions

- Les DCs madures són les principals portadores dels virus per trans-infecció.
- Les DCs immadures encara que resisteixen la infecció, no poden combatre-la per massa temps i també poden ser considerades susceptibles de trans-infecció.
- Les DCs madurades pel LPS són les que trigen poc temps a infectar un CD4 que una madurada pel IFN- α , ja que tenen el virus encapsulat llest per infectar, mentre que les d'IFN- α ho tenen de manera polaritzada.
- Com que les DCs són les primeres que detecten el VIH al cos i el fagociten, la seva desorganització pot afectar tant el sistema defensiu innat com el sistema defensiu adaptatiu.
- És molt difícil trobar una vacuna contra el VIH perquè les DCs presenten una habilitat d'actuar de diferents maneres davant diferents estimuladors com per exemple LPS i IFN- α .

També cal destacar que les DCs no són l'única via d'infecció, n'hi ha moltes, pot ser de contacte directe entre VIH i CD4 o de contacte als macròfags, etc.

10. Valoració personal

Abans de començar el treball ni tan poc sabia la diferència entre els leucòcits presents al cos. Al llarg del desenvolupament he après molt sobre el sistema immunitari. Ara sóc conscient que no ens adonem de que el sistema fa la seva funció silenciosament, fins que fracassa. Cal cuidar-lo, cal ser conscient del fet que el que fa el sistema immunitari té moltíssima importància pel nostre cos. Però cuidar-lo, com? Cuidar-lo fent vacunes, fent el test de la sang de tant en tant... i especialment en el cas del VIH cal la prevenció i cal que no ignorem els símptomes que es presenten en la primera fase d'infecció.

A més he conegut l'àmbit científic i com cadascú fa el seu paper per millorar les condicions dels pacients i controlar l'epidèmia que presenten algunes malalties.

A mi m'ha servit per corroborar que vull treballar a l'àmbit de la salut però no com a investigador, ja que són moltíssimes hores davant d'ordinador i fer un treball molt repetitiu i mai amb pacients.

11. Bibliogràfia

Les pàgines webs:

Les DCs

<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2013/164203/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185725/>

https://en.wikipedia.org/wiki/Dendritic_cell

<http://lab.rockefeller.edu/steinman/>

<https://www.rndsystems.com/resources/articles/dendritic-cell-maturation>

http://www.biolegend.com/dendritic_cells

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DCs.html>

EI VIH

<http://www.britannica.com/science/retrovirus>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0854.2005.00293.x/full>

<http://i-base.info/qa/36>

<http://www.retrovirology.com/content/6/1/51>

EI LPS

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0854.2005.00293.x/full#f1>

<https://www.youtube.com/watch?v=gKFXTJ9MjFg>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581570>

https://en.wikipedia.org/wiki/Gram-negative_bacteria#Medical_treatment

<http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273606001970>

EL sistema immunitari en general

<https://www.youtube.com/watch?v=zQGOCOUBi6s>

<https://www.rndsystems.com/research-area/cells-of-the-immune-system>

http://missinglink.ucsf.edu/lm/immunology_module/prologue/objectives/obj04.ht

ml

<http://www.niaid.nih.gov/topics/immunesystem/Pages/immuneCells.aspx>

http://www.garlandscience.com/res/pdf/9780815341468_ch01.pdf

http://www.imgt.org/IMGTeeducation/Tutorials/ImmuneSystem/UK/the_immune

<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003440.htm>

<http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=8780>

<http://www.handwrittentutorials.com/videos.php?id=32>

<https://www.youtube.com/watch?v=zQGOCOUBi6s>

<https://www.youtube.com/watch?v=CeVtPDjJBPU>

Els granulòcits

<http://study.com/academy/lesson/cell-mediated-immunity-how-granulocytes-function.html>

<http://www.britannica.com/science/granulocyte>

<http://www.enkivillage.com/immature-granulocytes.html>

Els neutròfils

<http://www.medfriendly.com/neutrophil-neutropenia.html>

<http://www.britannica.com/science/neutrophil>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022058/>

Els basòfils

<http://www.medfriendly.com/basophil.html>

https://www.labce.com/spg538085_basophil_function_and_lifespan.aspx

Els eosinòfils

<http://www.cincinnatichildrens.org/service/c/eosinophilic-disorders/conditions/eosinophil/>

Els monòcits

<http://www.medfriendly.com/monocyte.html>

<http://www.monocytes.de/>

<http://study.com/academy/lesson/what-are-monocytes-definition-function-blood-test.html>

<http://chemocare.com/chemotherapy/what-is-chemotherapy/the-immune-system.aspx>

Els leucòcits

<http://www.medfriendly.com/lymphocyte.html>

<http://www.britannica.com/science/lymphocyte>

<http://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Definition-of-MS/T-cells>

<http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=11300>

<http://www.tcells.org/beginners/tcells/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>

<https://www.rndsystems.com/research-area/b-cells>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761314001545>

http://www.biolegend.com/dendritic_cells

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DCs.html>

<http://www.nature.com/nri/journal/v14/n6/full/nri3683.html>

VIH/SIDA

<http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>

<https://www.aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/what-is-hiv-aids/>

<http://www.avert.org/about-hiv-aids/what-hiv-aids>

<http://emedicine.medscape.com/article/211316-overview>

<https://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Treatment/Pages/arvDrugClasses.aspx>

<http://www.avert.org/professionals/hiv-science/types-strains>

<https://www.youtube.com/watch?v=odRyv7V8LAE>

<http://www.retrovirology.com/content/12/1/37>

<http://www.who.int/hiv/topics/treatment/en/>

http://www.aidsinfonet.org/fact_sheets/view/403

<http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001448>

<http://www.who.int/hiv/topics/idu/care/E90840.pdf>

<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572310>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200324241/pdf>

El laboratori

<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>

Els llibres:

LPS i IFN

[Pescott,Harley,Klein.Microbiología\(5a edició\)n.Ed.McGraw-Hill Interamericana 2004](#)

[G.Prats.Microbiología y parasitología médica. Ed.medica panamericana.2013](#)

[Termcat.Diccionari d'immunologia. Ed.Masson.2005](#)

Els sistema immunitari

[J.R.Regueiro González,et al. Inmunología biología y patología dels sistema immunitario.4a edició\)n. Ed.medica panamericana.2011](#)

[Peter Parham.The immune system. Ed.Garland publishing/Elsevier science Ltd. 2000](#)

[Murphy.Inmunobiología de Janeway.7a edició\)n. Ed.McGraw-Hill. 2009](#)

[Caballo,Falcó,Lope. biologia 2 el sistema immunitari. Ed.Claret.2003](#)

12 . Annex

5.1 Protocol per obtenir les cèl.lules dendrítiques

Objectiu: Processament de PBMCs (cèl.lules mononuclears de la sang perifèrica) del donant(Buffy coat), aïllament dels monòcits i la seva posterior diferència a cèl.lules dendrítiques

Materials

- Gases
- Tubs de 50 ml
- Tisores
- Pipetes Pastuer
- Media R10
- Lymphoprep
- ACK lysing buffer
- RosetteSep Human CD3 Depletion Cocktail
- CD14 microbeads
- GM-CSF e IL-4(R&D system)

1. Processament de PBMCs de donant (Buffy coat)

-Esterilitzar la bossa del residu leucocitari amb etanol i barreja bé la sang de la bossa, amb les tisores tallar un dels tubs de la bossa

-Passar el contingut de la bossa a un tub de 50 ml

-Afegir 20 ml de PBS(phosphate-buffed saline: una solució salina que s'utilitza per separar les cèl.lules adjuntades o maldestres) amb una pipeta de 10 ml en un altre tub. D'aquesta manera podem rentar la bossa del residu leucocitari i recuperar més cèl.lules.

-Passar el contingut amb PBS al tub de 50 ml on tenim la sang

-Preparar més tubs de 50 ml per la separació cel.lular, amb 15 ml de Lymphoprep (una media de gradient de densitat que es fa servir per a la separació dels monòcits de sang perifèrica, sang del cordó umbilical i de la medul-la òssia).2 tubs de 50ml per cada donant són suficients i és millor protegir-los de la llum.

-Tirar el contingut de la sang diluïda (uns 25 ml) molt a poc a poc, deixant caure lentament sobre el Lymphoprep amb pipeta de 25 ml.

-Centrifugar 30' a 1850 r.p.m

- Recollir el núvol de PBMCs, fase intermèdia més densa.
- Afegir-hi PBS estèril fins 45ml aprox. i barrejar bé.
- Centrifugar una altra vegada 5' a 1400 r.p.m.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 40-45ml de R10.
- Comptar el nombre de PBMCs amb el citòmetre i determinar el percentatge dels monòcits de la mostra
- Introduir les dades al excel
- Deixar en un incubador a 37 °C amb 5% de CO2 fins que se separen els monòcits.

2. Aïllament dels monòcits de les PBMCs per la selecció positiva

- Encendre el separador cel·lular autoMACs (maquina amb imant per separar els monòcits)
- Centrifugar la suspensió cel·lular de PBMCs a 1460 r.p.m. per 5 minuts. Mentrestant preparar 50 ml de Buffer de separació (PBS+2 mM EDTA preparat en la nevera+0.5% FBS) per cada mostra. És molt important que el Buffer està fred i sense bombolles.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 80 µl de Buffer de separació per 10⁷ PBMCs
- Afegir 20 µl de CD14 MicroBeads per 10⁷ PBMCs
- Barrejar bé i incubar durant 15 min a 4 °C.
- Fer un altre rentat amb el Buffer de separació, afegint 1-2ml de Buffer per 10⁷ PBMCs.
- Centrifugar a 1460 r.p.m. per 5 mins.
- Resuspendre en el Buffer de separació en una proporció de 500 µl per 10⁸ PBMCs.
- Treure de la nevera el rac de tubs del autoMACs. Ha de ser congelat (no posar mai en un congelador). Posar el rac a l'autoMACs. Col·locar els tubs de mostres i dos tubs més, un que recull la fracció positiva (els monòcits) i un que recull la fracció negativa (els limfòcits).
- Programar la separació i prémer run per començar la separació.
- Recuperar la fracció positiva i afegir-hi 5 ml de R10.
- Comptar el nombre de les cèl·lules CD14+(els monòcits)

3. Sembrar dels monòcits i la diferència a cèl·lules dendrítiques

- Ajustar la concentració final del cultiu a 0.8x10⁶ cèl·lules/ml en media de R10 amb penicil·lina/estreptomicina i 1000 U/ml de GM-CSF i IL-4 (ambdós són

factores de creixements dels leucòcits).

-Escollir aprox. 20×10^6 monòcits per donant i centrifugar-les 5 min a 1460 r.p.m.

-Preparar el mix: 51 ml de R10+173.40ul IL-4+170.85 ul GM-CSF.

-Després de centrifugació treure el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en el mix.

-Sembrar els monòcits en 2 flascons T25. En cada flascó posar-hi 2,5 ml de la mix i 10 ml més de R10.

-Incubir les cèl·lules a 37 °C, per molt fins a 5 dies.

-Els dies 2 i 5 canviar el media i afegir-hi de nou R10,IF-4 i GM-CSF frescos

-Ara que tenim les cèl·lules dendrítiques immadures, per obtenir les madures cal que hi posem al dia 5 els estimuladors de maduració IFN- α .

5.2 Protocol per obtenir els VLPs

1. Objectiu: Cultivar el virus o VLPs en les cèl·lules 293T transfectades (cèl·lules embrionàries humanes de ronyó).

2. Materials.

Línia cel·lular 293T

Calphos Mammalian Transfection Kit

3. El protocol

Per transfectar, les cèl·lules han d'estar crescudes però tampoc massa (50-80%). 24 hores abans de fer la transfecció cal sembrar les cèl·lules en un T75.

Calcular quant virus volem. Amb dos flascons T75 a confluència 50-80% i 30 ug de plasmidi per flascó, podem aconseguir fins a 18-20 vials de virus (9-10 vials per flascó).

- 24 h abans de la transfecció:

* Retirar el medi a un flascó T75.

* Afegir al medi 1 ml de Versene o tripsina.

* Incubar 3 'a 37 °C.

* Deixar anar les cèl·lules donant cops suaus perquè no facin grumolls i no s'apeloten.

* Afegir 9 ml de D10 en el T75.

* Repartir 9 ml en 2 flascons més de T75 on anem a transfectar (4,4 ml o 4,5 ml segons les crescudes que estiguin) i deixar 1 ml al T75 per deixar cultivant les

cèl·lules.

* Afegir en els 2 flascons per transfectar uns 10 ml de D10. I en el flascó de cultiu afegir uns 13 ml de D10. Quedarà en els dos flascons per transfectar una dilució $\frac{1}{2}$ (posarem 4,5 ml de cèl·lules), i en el de cultiu $\frac{1}{10}$ (posarem 1 ml de cèl·lules).

* Calcular volums necessaris per al dia de la transfecció (Excel).

-El dia de la transfecció:

* Canviar el medi a les 293 (treure el que tenen i afegir altres 12 ml de D10).

* Obrir i netejar la cabina de transfeccions.

* Descongelar el 2X HBS (solució salina similar al PBS)

* Agafar el volum de plasmidi necessari (en tub eppendorf de 2 ml), agafar altres 2 eppendorf de 2 ml (o tubs de 13 ml). Deixar-les al torn.

* Portar els plasmidis del torn de la cabina.

* Afegir al plasmidi l'aigua i el fosfat càlcic, sempre en aquest ordre, això serà la solució A). En un altre Eppendorf / tub afegir el HBS (serà la solució B).

* Posar el eppendorf de la solució B al vòrtex (a poc a poc); agafar el contingut de la solució A amb una pipeta pasteur de punta fina i afegir-se'l a la solució B (a poc a poc i fixant-te sempre que la solució B s'està barrejant).

* Incubar la barreja 20 minuts a temperatura ambient.

* Portar les cèl·lules a la cabina; tornar a barrejar amb cura la barreja A + B amb una pipeta i afegir-lo al mig de les 293 (posant el T75 de peus, que no caigui directe a les cèl·lules). Moure el T75 cap endavant i cap a darrere i d'un costat a l'altre (mai en cercles).

* Després de 4 hores (més o menys, les cèl·lules han d'estar grassonetes i rodonites) cal treure el media, afegir 10 ml de PBS al T75 i després treure el PBS i afegir-R10 (12 ml o 8-10 ml si vols aconseguir virus més concentrat).

* Incubar a 37 °C durant 48 h.

48 h després de la transfecció:

* Recollir el sobrenedant i posar-lo en un reservori estèril per poder filtrar-lo. Agafar un filtre de 0,45 i una xeringa de 10 ml. Amb la xeringa agafar el sobrenedant del reservori i connectar-la amb el filtre que haurem posat a sobre d'un tub de 50 ml. Un cop filtrat tot el sobrenedant, l'aliquotem en vials d'1 ml (o del volum que sigui convenient per als experiments que calguin fer).

6.1 Normes de seguretat: nivell P3

El laboratori de contenció de nivell de bioseguretat 3 s'ha dissenyat i proporcionat per al treball amb els microorganismes de grup de risc 3 i amb

grans volums o altes concentracions del Grup de risc 2 que presenten un major risc de propagació a través de l'aire. Bioseguretat Nivell 3 de contenció requereix l'enfortiment dels programes operatius i de seguretat per sobre dels laboratoris bàsics - nivells de bioseguretat 1 i 2.

Als laboratoris d'IRISCAIXA segueixen el protocol internacional que s'han posat per treballar amb el VIH, considerant que la seva propagació és a través de contacte directe amb la sang infectada si no ha tingut en compte les mesures de seguretat proposades o per la via respiratòria.

Els vestits

Per treballar en un laboratori de P3 la roba de carrer no és suficient, ja que pot ser contaminat sense adornar-nos i no és apta per protegir-nos si hem de treballar amb àcids i bases. El vestit apropiat consisteix de:

Macares

Ulleres de protecció

Doble guants

Pantalons llargs

Sabates tancades

Una bata

Protecció pel cap



Un treballador al laboratori

Google imatges

Disseny i instal·lacions del laboratori

1. El laboratori ha d'estar separada de les àrees que estan oberts a un flux de trànsit sense restriccions dins de l'edifici. Separació addicional pot aconseguir col·locant el laboratori a l'extrem cec d'un passadís, o accés a través d'una avantsala o a través d'una doble porta. La d'IRISCAIXA té accés a través d'una doble porta.
2. Portes de tancament automàtic i els mecanismes que proporciona una sortida d'emergència.
3. Les superfícies de parets, terres i sostres han de ser resistent a l'aigua i fàcil de netejar.
4. La sala de laboratori ha de ser hermètic. Les finestres han d'estar tancades, segellades i resistents al trencament.
5. Hi ha d'haver un sistema de ventilació controlat que manté un flux d'aire direccional a la sala de laboratori i que no la recirculi a altres àrees dins de l'edifici.
6. Armaris de seguretat biològica han d'estar situats lluny de zones de passeig i fora de contracorrents de portes i sistemes de ventilació.
7. Una autoclau per a la descontaminació de material de rebuig contaminat s'ha de ser disponible al laboratori.

Equipaments del laboratori

L'equipament és un tema molt ampli, ja que cada laboratori pot tenir el que necessita. Malgrat això equipaments com la centrífuga, l'autoclau, les neveres, etc. són els que són quasi en tots els laboratoris.



Els equipaments del laboratori

Google imatges



Un laboratori estàndard de nivell P3

Google imatges

6.2.1 LPS

El LPS és un component de la paret dels bacteris gramnegatius. Els bacteris gramnegatius són els que no retenen el color violeta cristall quan es tenyeixen amb el mètode de la tinció de gram que s'utilitza per a la diferenciació bacteriana. El peptidoglicà de la seva paret és tan fina que no pot retenir la tinta per massa temps, els grampositius sí que tenen una capa grossa del peptidoglicà que agafa la tinta i la gaudeix per prou temps que es pot ser reconegut al microscopi.

A més d'una fina capa del peptidoglicà els gramnegatius també posseeixen una gran quantitat de proteïnes, dominades per porines a la seva membrana que hi formen canals i regulen la permeabilitat.

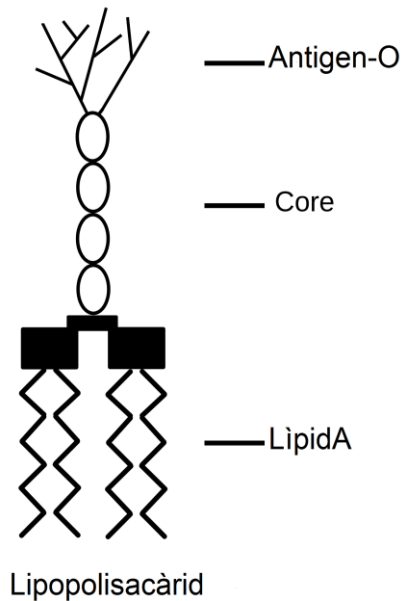
El LPS és una molècula allargada que posseeix dos fragments, un intern de naturalesa proteica, ancorat en la membrana, que es coneix com lípid A, i altre polisacàrid, que sobresurt a l'exterior, format al seu torn per dues parts: una interna (core) i altra externa que consisteix l'antigen de superfície més important dels bacteris gramnegatius dominat antigen O.

La cadena lateral O o antigen O és fàcilment recognoscible pels anticossos de l'hoste però els gramnegatius poden incapacitar les defenses de l'hoste canviant ràpidament la naturalesa de les seves cadenes per evitar la seva detecció. A més la interacció del LPS amb els anticossos, abans d'arribar a la membrana pròpiament dita, pot protegir la paret davant un atac directe de l'hoste.

El LPS també facilita l'estabilització de l'estructura de la membrana i pot actuar com una endotoxina. La seva capacitat endotòxica es manifesta quan la seva inoculació a les cèl·lules animals produeix una complexa i greu reacció que aboca al xoc, el xoc sèptic.

En el cas de VIH, el LPS que regula en la sang ve dels bacteris de la flora de l'intestí que han travessat la membrana intestinal a causa de la seva ruptura, la ruptura produïda per la infecció de VIH. Com que el sistema immunitari

reconeix LPS com un invasor, per combatre'l es produeixen una sèrie de reaccions, una de les quals és la maduració de les cèl·lules dendrítiques.



Estructura d'un lipopolisacàrid google imatges

6.2.2. IFN- α

Quan s'infecten les cèl·lules per un virus, el cos respon secretant i produint les proteïnes anomenades interferons- α i β . Els dos són la classe de citocines que interfereixen en el procés de la replicació viral i l'inhibeixen.

L'expressió dels interferons de tipus 1 (α i β) està induïda per un RNA bicatenari, un tipus d'àcid nucleic que no es troba en les cèl·lules 'normals' del cos humà però que és un component important del genoma dels virus.

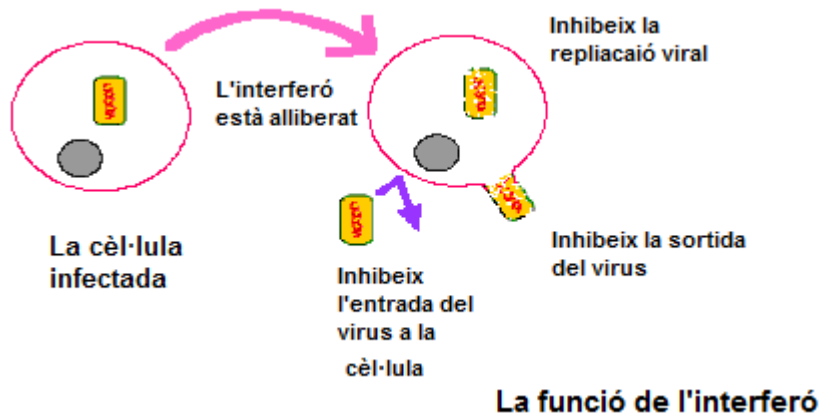
Inhibeixen la replicació del virus en les cèl·lules infectades i la seva propagació a les cèl·lules no infectades. Actuen a través d'un receptor de la superfície cel·lular que és comú per cada cèl·lula humana, el receptor d'interferons, que induïx l'expressió d'una varietat de gens humans. Una proteïna induïda per interferó és la sintetasa oligoadenilít que al seu torn activa endoribonucleasa que degrada el RNA viral. També activats pels interferons és una quinasa, la quinasa P1 que impedeix la síntesi de les proteïnes víriques, i consegüentment el muntatge dels nous virions.

La segona funció que duen a terme els interferons és l'estimulació del sistema innat i adaptatiu que específicament estan dirigits cap a les infeccions causades pel virus. Indueixen l'expressió de les molècules MHC de classe 1 que augment el nivell de presentació antigènica als limfòcits T citotòxics per part de les cèl·lules infectades.

En tercer lloc activen les cèl·lules nk per matar les cèl·lules infectades.

En cas de VIH els interferons emesos per les cèl·lules infectades o pel mateix

virus activa les DCs immadures que viatgen als ganglis limfàtics més propers on té lloc la seva maduració.



Google imatge

6.3 Observació amb microscopi spinning disk

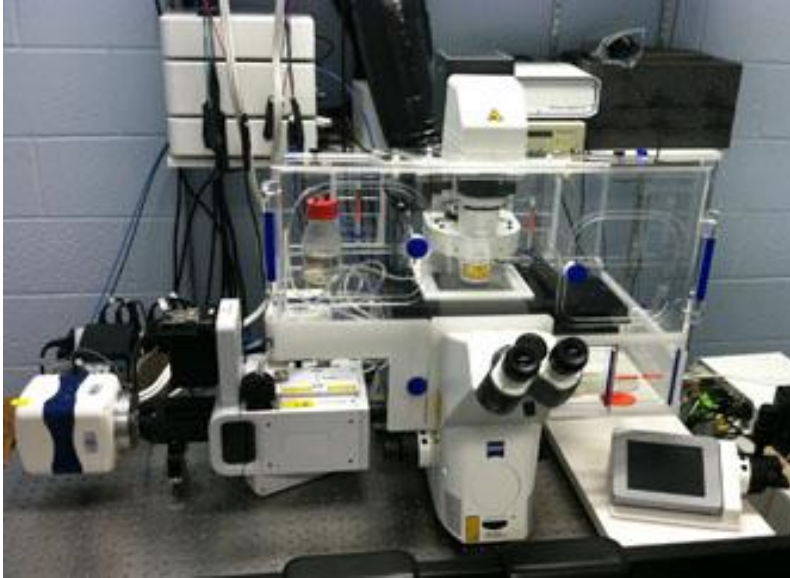
El sistema Ultraview ERS està muntat sobre un microscopi invertit Zeiss Axiovert 200M. Conté DAPI, PPC, FITC i Cubs de filtre de rodamina, que són tintes fluorescentes, per a la il·luminació de epifluorescència convencional, i s'implanta amb tots els accessoris necessaris (temperatura, CO₂) per aconseguir imatges d'alta velocitat de cèl·lules vives i està equipat amb els objectius de:10X a 100X.

S'utilitzen els làsers per excitar els fluoròfors. Els fluoròfors són components de les molècules que remeten llum quan estan excitats pe la llum, i la càmera anomenada'1000x1000 píxels, multiplicat electrons 14bit Hamamatsu (C9100-50), dispositiu de càrrega acoblada (EMCCD), la mida de píxel de les imatges és de 16umx16um.

S'utilitza un disc girant amb múltiples orificis per aconseguir confocalitat, rebutjant la llum fora de focus. La llum d'emissió de la mostra passa a través dels forats per generar una imatge confocal de la mostra que es pot detectar

amb un EMCCD.

Està especialment indicat per a imatges 4D en viu de processos cel·lulars ràpids i per FRAP (recuperació de fluorescència després de photobleaching) i pels experiments relacionats.



Google imatge

El microscopi spinning disc

