

Técnicas en inmunología.

Tema 1: Introducción

Sistema inmune innato:

- Componentes celulares:
 - ◆ Células Natural Killer (NK).
 - ◆ Macrófagos.
 - ◆ Células dendríticas.
- Componentes Humorales:
 - ◆ Complemento: Ayuda a los anticuerpos y células fagocíticas. Abre poros.
 - ◆ Citoquinas: Secretadas por linfocitos y macrófagos entre otras células.

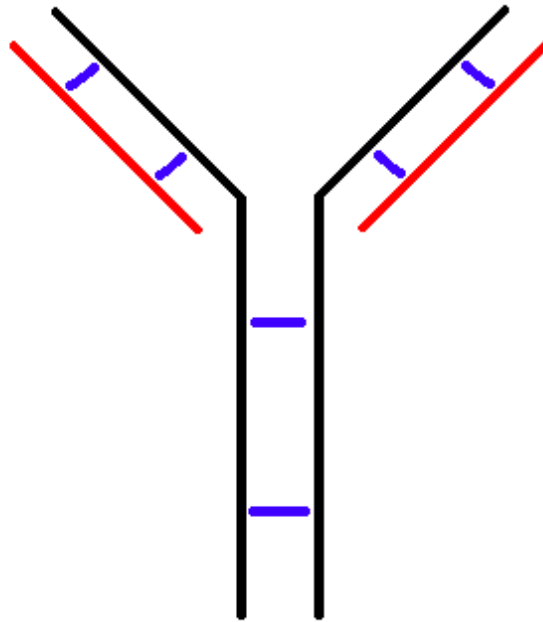
Sistema inmune específico:

- Componentes celulares:
 - ◆ Linfocitos T.
 - ◆ Linfocitos B.
- Componentes humorales:
 - ◆ Anticuerpos.

Técnicas en inmunología: Surgieron al estudiar el sistema inmune de un individuo, y comprender su funcionamiento. Posteriormente se extendieron a otros campos.

Anticuerpos

Son moléculas denominadas gammaglobulinas. Hay cinco clases distintas. Su estructura consta de cuatro cadenas iguales dos a dos, con dos **cadenas pesadas** y dos cadenas ligeras. Están unidas por puentes disulfuro, tanto entre las cadenas (Intercatenarios) como entre ligera y pesada.



Existen cinco cadenas pesadas distintas que forman los cinco tipos de inmunoglobulinas. El nombre de cada inmunoglobulina viene dado por su cadena pesada (Cadena gamma Inmunoglobulina gamma (Ig G)). En cuanto a las cadenas ligeras, solo existen dos tipos, κ y λ .

Existen por tanto cinco tipos de inmunoglobulinas, y una de ellas posee dos variantes, una de ellas con cada uno de los tipos de cadena ligera. Esta inmunoglobulina es la Ig G.

Algunas de ellas pueden formar agrupaciones, como el caso de la Ig G y la Ig A. Los cinco tipos de inmunoglobulinas son:

- Ig M (μ).
- Ig G (γ): Pentámeros. Se encuentra en la placenta. Cadenas ligeras κ y λ .
- Ig A (α): Dímeros o trímeros.
- Ig D (δ).
- Ig E (ϵ).

Son las regiones N terminales las responsables de reconocer al antígeno. El resto, que se denomina región constante, es la que cumple la función del anticuerpo. La región variable cambia mucho entre anticuerpos. Las dos cadenas tienen región variable.

La combinación entre la región variable de la cadena ligera y la de la cadena pesada constituye la región que reconoce el determinante antigénico. Los dos brazos de son iguales, pudiendo unir dos determinantes antigénicos iguales. Este es el número de valencia de un anticuerpo (2), pero existen dos excepciones. En el caso de la Ig G, esta se encuentra en pentámeros, que se forman al unirse los anticuerpos al denominado segmento J, con lo cual presenta una valencia potencial de 10, que suele quedarse en seis por razones de

espacio físico a la hora de unirse a su determinante antigénico. Algo similar ocurre con la Ig A, que forman agregados por el segmento J, forma dímeros o trímeros, con valencias potenciales de 4 y 6, respectivamente. Los tres tipos restantes son monómeros.

Los anticuerpos no solo se encuentran solubles, sino también en forma de membrana en los linfocitos B. Cuando reconocen el antígeno se activa el linfocito, pasando a célula plasmática, secretora de inmunoglobulinas. Segregará el mismo anticuerpo que tenía en la membrana, excepto que pierde la región de anclaje a la misma.

Regla nemotécnica: GAMDE. Los anticuerpos se encuentran circulantes. La de mayor concentración es la G (8–10 mg/ml) seguida de la A (1–4 mg/ml) y la M (0,5–2 mg/ml). La D se encuentra en cantidades bajísimas (0–0,4 mg/ml) y la E es prácticamente indetectable (10^{-4} – 10^{-3} mg/ml).

Los valores de las inmunoglobulinas en el suero humano son muy similares a los de la rata o ratón, animales donde se practican ensayos y técnicas de posterior utilización en humanos.

La Ig G puede pasar a través de la placenta. El niño tiene sus primeras inmunoglobulinas de la madre. No forma anticuerpos a menos que se produzca una infección, por lo que sintetizaría Ig M. La Ig G activa la cascada del complemento por la vía clásica.

La Ig A se encuentra en la mayor parte de las secreciones corporales, y produce la activación de la cascada del complemento por la vía alternativa.

La Ig M se encuentra circulante y se encarga de la activación de la cascada del complemento por la vía clásica.

La Ig D se encuentra como molécula de membrana en los linfocitos B.

La Ig E, aparece en alergias e infecciones por parásitos, siendo indetectable en situaciones normales.

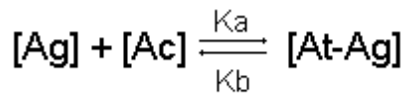
La región variable de los anticuerpos tiene tres zonas que varían más que el resto. Se conocen como las regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad. Las tres unidades son las que reconocerán el antígeno. Esto nos da la gran diversidad de anticuerpos. Esta región se llama idiotipo: su estructura en el espacio es como una cerradura para un determinado antígeno. Las fuerzas entre el anticuerpo y el determinante antigénico es un sumatorio de fuerzas, que individualmente no son fuertes. Participan cuatro fuerzas.

Los primeros conocimientos sobre estas fuerzas fueron obtenidos mediante el uso de enzimas como la pepsina o la papaína, que cortan la molécula. La pepsina corta los puentes disulfuro, dando dos zonas, los fragmentos F(ab) y los fragmentos F(c), cristalizables.

Ventajas de los anticuerpos en las técnicas de inmunología.

La interacción antígeno–anticuerpo es específica, pudiendo determinar la presencia del antígeno que buscamos en una mezcla de cosas, sin necesidad de purificar. Nos permiten realizar técnicas muy específicas. Hay que saber la concentración de lo que queremos medir, además de contar con el tamaño de aquello que buscamos. También hay que conocer el mayor o menor grado de especificidad, que depende de la pureza de la muestra y del anticuerpo que utilizemos. Otros factores de diseño son los costes.

La selección de reactivos es importante. Podemos determinar muchas veces el anticuerpo y el antígeno. Hay que conocer el *grado de afinidad* entre ellos.



$$K_{\text{Afinidad}} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[At-Ag]}{[Ag] + [Ac]} = \text{Si 50\% unido} = \frac{1}{[Ag]}$$

Avidez: Es el sumatorio de fuerzas que se establecen entre un antígeno y un anticuerpo. Una Ig M uniéndose por varios brazos tendrá alta avidéz aunque su afinidad sea pequeña. Depende de la afinidad y de las valencias, así como de la estructura en el espacio.

Especificidad: Sería ideal cuando el anticuerpo solo reconoce un determinante antigénico. No siempre es ideal.

Anticuerpo heterófilo: Se han generado frente a un determinado organismo y son capaces de reconocer otras cosas en otras especies distintas.

Crossreacción: Posee reacción cruzada. El anticuerpo detecta otras estructuras que no debería, pero puede llegar a ser útil en las técnicas.

Los anticuerpos deben estar en condiciones correctas, para ello se usa el denominado buffer fisiológico. Podemos utilizar matrices para desarrollar las técnicas. A veces son semisólidas, plásticas, de vidrio, etc. Dependiendo de la técnica a utilizar, seremos más o menos específicos y mas o menos concretos.

En resumen, las ventajas del uso de las técnicas de inmunología son dos, la especificidad y la rapidez.

En casi todas las técnicas de inmunología se lleva a cabo la lectura utilizando uno de los tres procedimientos siguientes:

- El complejo antígeno + anticuerpo posee un comportamiento distinto: Precipitación de complejos y aglutinación.
- Unir cosas al anticuerpo sin que pierda su capacidad de reconocer. Podemos pegarle enzimas, bombillas (Fluorescencia), sustancia luminiscentes, sustancias radioactivas, etc.
- Al antígeno podemos pegarle cosas sin que cambie la reacción con el anticuerpo. Podemos pegarle las mismas cosas que a los anticuerpos.

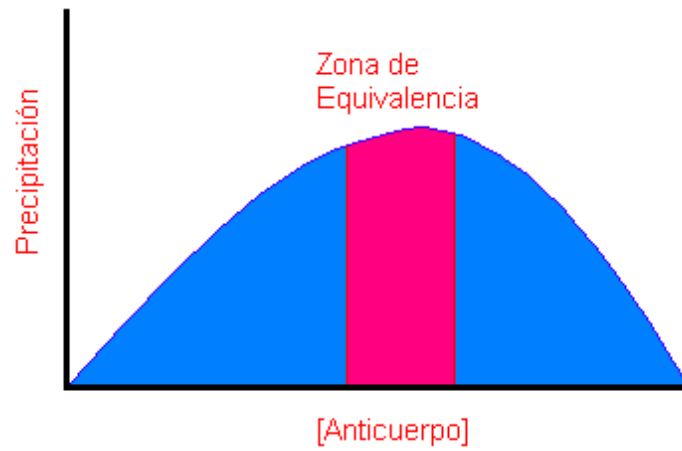
Temas 2-3: Técnicas de aglutinación y precipitación.

Se basan en la propiedad de los anticuerpos de tener dos brazos. Unen los antígenos aproximándolos en el espacio, formando complejos insolubles. Dependiendo si es un elemento soluble o particulado, veremos reacciones de precipitación o aglutinación. En una primera fase las moléculas de anticuerpo se van uniendo, y siempre que tengan mas de un determinante antigénico igual, se darán estas técnicas.

Necesitamos que el antígeno tenga mas de un determinante antigénico igual, para poder ser reconocido por mas de un anticuerpo a la vez, formando redes que sean insolubles, y precipiten en caso de las técnicas de

precipitación.

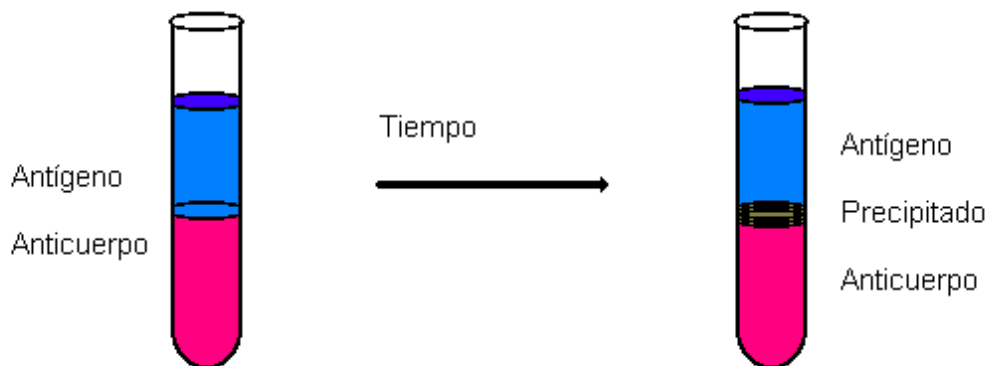
La concentración de antígeno y anticuerpo debe ser homogénea, con un poco de exceso de anticuerpo. Si el exceso de anticuerpo es grande, este no formará redes. El momento óptimo estará en proporciones bastantes homogéneas, donde la precipitación será máxima, y se conoce como zona de equivalencia. En excesos de antígeno, los anticuerpos estarán bloqueados y no precipitan. Podemos realizar una curva.



Tema 2: Técnicas de precipitación

Difusión pasiva (Medio líquido)

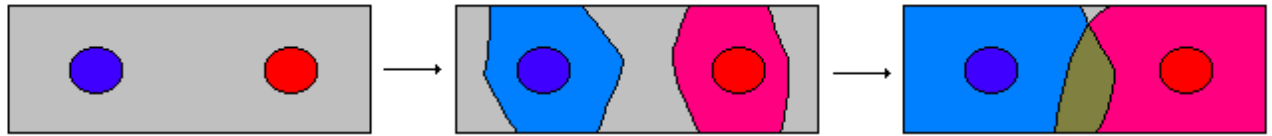
Se pondrá anticuerpo y antígeno y se dejarán que difundan sin forzarlos. Si lo hacemos en medio líquido se conoce como técnica de difusión doble.



No es una buena técnica para cuantificar, debido a su falta de precisión. Existen otras dos técnicas de difusión pasiva, pero en lugar de utilizar medio líquido, utilizan geles semisólidos, También requieren un tiempo de incubación.

Difusión pasiva (Medio semisólido) Ouchterlony.

El nombre se debe al creador de la técnica. Se realiza sobre un portaobjetos. Sobre este se coloca una película de agar, y se hacen dos pocillos. En cada uno de esos pocillos se coloca antígeno y anticuerpo (Uno en cada pocillo). Lo dejamos difundir 16 horas normalmente. Si aparece entre ellos la línea de precipitación, habremos identificado aquello que buscábamos, ya sea antígeno o anticuerpo. No es muy sensible.



Además de la falta de sensibilidad, posee otro gran problema, que es la gran cantidad de muestra necesaria (En torno a microgramos), lo cual hace su uso limitado a ciertos ensayos y utilidades.

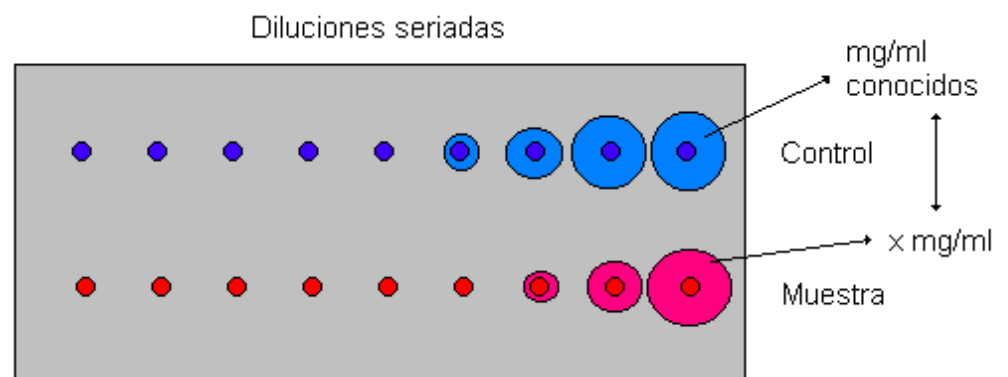
Su utilidad es la de comparar la línea de precipitado entre distintos antígenos. Podemos poner mas de un pocillo en dos pocillos y comparar ambos. Si la línea de precipitación es continua, los dos antígenos son iguales. Si son distintos tendremos dos redes de precipitado que se cruzan. Puede detectar crossreactividad o que alguno de los antígenos no se reconozca por el antígeno.

Como es un método cualitativo, podemos hacer diluciones seriadas y ver donde se pierde la banda, para poder cuantificar, pero es muy poco precisa, denominándose semicuantitativa. Es la técnica conocida como Ouchterlony de difusión pasiva doble.

Difusión pasiva (Medio semisólido) Inmunodifusión radial.

Se realiza en gel. El gel está embebido en uno de los reactivos, y hacemos un pocillo con diluciones en el otro (Ag-Ac). Dejamos difundir mucho tiempo. El Ag irá difundiendo, y al llegar a la zona de equivalencia ($[Ac] = [Ag]$) se formará precipitado. La distancia del punto central a la línea de precipitado es proporcional a la cantidad de Ag de la muestra. Al compararlo con un patrón tendremos una cantidad.

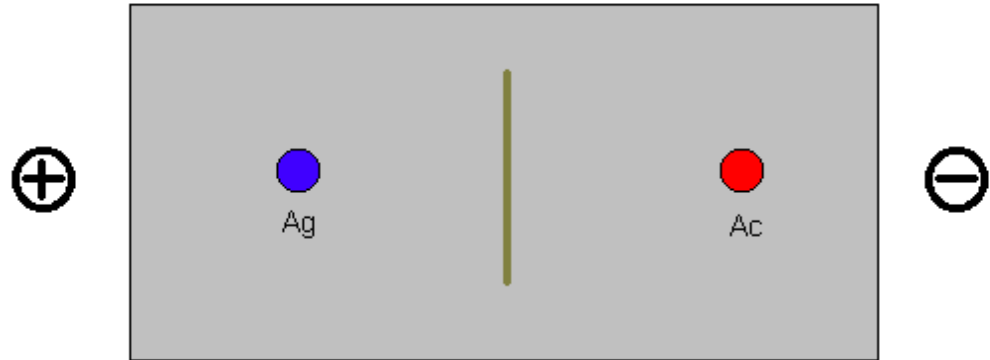
Realizamos una recta patrón con las áreas de las muestras conocidas y extrapolamos a la muestra problema.



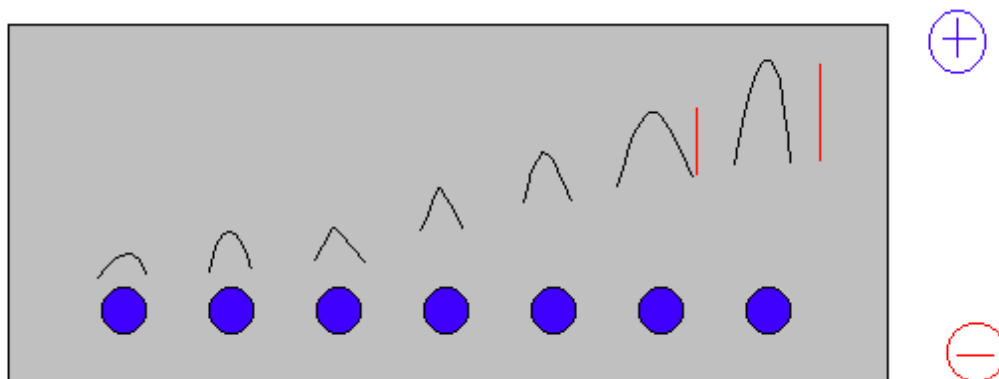
Todas estas técnicas de precipitación podemos agilizarlas en el tiempo, pudiendo en ciertas condiciones, como pH y corriente eléctrica, forzando el movimiento para que se vean antes. Son técnicas de difusión que ya no son pasivas, y suelen utilizarse por electroforesis.

Combinadas con electroforesis.

- En gel: Electroforesis en contracorriente. Es como el Ouchterlony pero aplicando una corriente eléctrica. La línea aparece en pocas horas. A pesar de ser cualitativa podemos hacerla semicuantitativa, pero se hace en pocas ocasiones. Se usa poco, pero sobre todo para diagnosticar enfermedades autoinmunes.

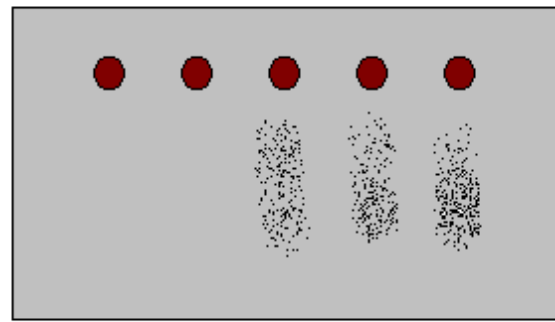


- Técnica de Laurell o del cohete: El gel se embebe con uno de los reactivos, y hacemos diluciones seriadas. Lo sometemos a electroforesis. El arco del precipitado es como un cohete en lugar de redondo. Es cuantitativa, comparando con una recta patrón utilizando la longitud de los cohetes. A mayor longitud mayor concentración de antígeno.

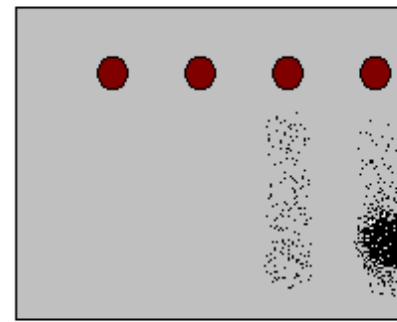


- Inmunoelectroforesis: Posee una utilidad concreta: diagnóstico de tumores de células plasmáticas: Mielomas. Aparece en personas ancianas. Tendremos muchos anticuerpos de un solo tipo. En una electroforesis migrarán todas en el mismo punto, en lo lugar de lo normal. También identifica el tipo de

mieloma.

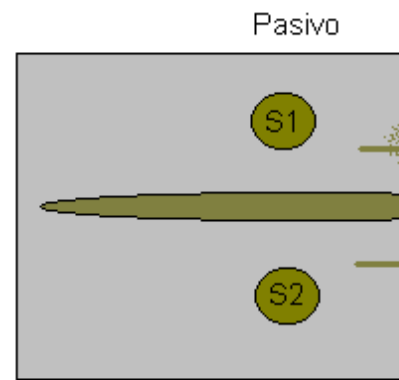
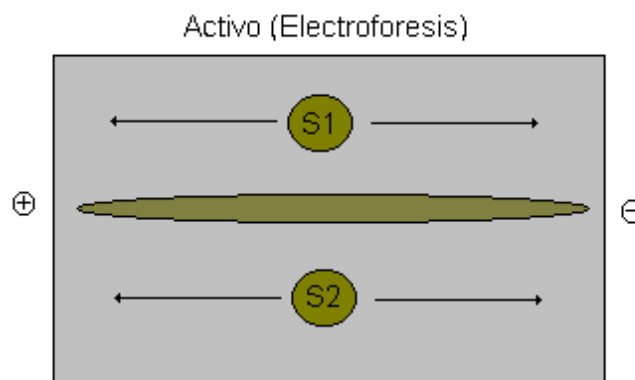


Normal



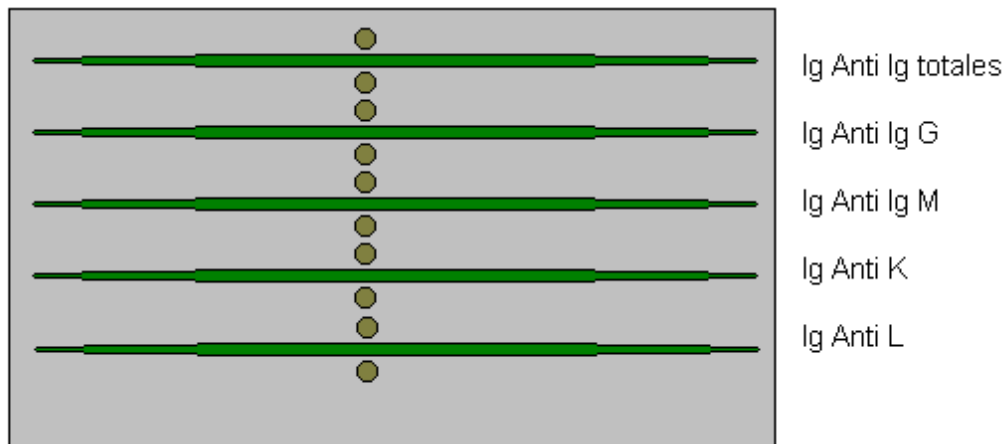
Mieloma

Se hace en medio semisólido (Agar normalmente), y haremos un pocillo con el suero del enfermo, y un suero control, sometiéndolo a un campo eléctrico. Cortamos el agar en esa zona entre los sueros y se aplica anticuerpo contra Ig humana (Ig M por ejemplo). Al encontrar la equivalencia se formará línea de precipitados.



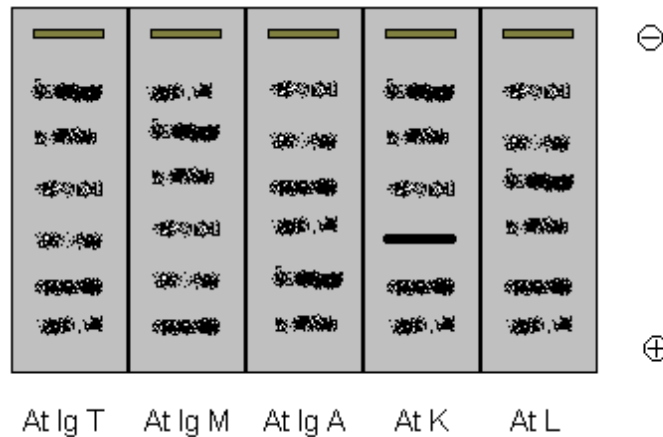
Mieloma Tip Ig M

Para la realización de un diagnóstico se deben poner todos los anticuerpos frente a las inmunoglobulinas humanas.



- **Inmunofijación:** Es el mas utilizado en los últimos años. Sirve también en diagnóstico de mielomas, pero es más rápido y sencillo. Se realiza en geles de agar. Aplicamos el suero en distintos pocillos y se somete a una electroforesis. Se colocan plantillas para separar los carriles y añadimos a cada canal una anticuerpo distinto, Anti Ig totales, Anti Ig M, Anti Ig A, Anti y Anti . No se pone para D y E, porque son rarísimos dada su baja concentración en sangre. Rápidamente se encuentra con el antígeno

y precipita. Lo normal es un patrón poco homogéneo de anticuerpo. Si existen mielomas habrá mucha cantidad de ese anticuerpo y encontraremos una línea concreta. Se dan casos de existencia de mas de un mieloma.



Turbidimetría

Antes de precipitar, el medio se pone turbio, y midiendo esta turbidez, podemos cuantificar. Se necesita muestra control. Para la realización de esta técnica es necesario el uso de un espectrofotómetro.

Nefelometría

Es actualmente muy utilizada. Es un método directo para medir la dispersión de la luz de forma cinética. Se hace normalmente con láser, que incide sobre una solución. Se mide la desviación de la luz a lo largo del tiempo. Es muy rápido y cuantifica. Puede utilizarse para medir el complemento, pero no es demasiado sensible.

Tema 3: Técnicas de aglutinación

Se basan en los cambios de propiedades que sufren el antígeno y el anticuerpo al formar un complejo. Para poder darse necesitan cumplirse una serie de características:

- El anticuerpo debe poder unir por los dos brazos al antígeno.
- El antígeno deber tener mas de un determinante antigénico igual.
- Los antígenos son elementos pequeños, son partículas: bacterias, partículas de látex, hematíes, complemento...

Aglutinación directa

Se utilizan antígenos ya presentes en la cubierta de las células. Es el caso de la determinación de grupos sanguíneos.

Se saca un poco de sangre, y se le añade a tres alícuotas de esta, Ac A, Ac B, Ac RH un control positivo y uno negativo. Según la aglutinación en cada pocillo, tendremos el grupo sanguíneo del individuo a tipar.

Aglutinación indirecta

Las partículas no llevan el antígeno pero se lo podemos pegar químicamente. Se utilizan hematíes y partículas

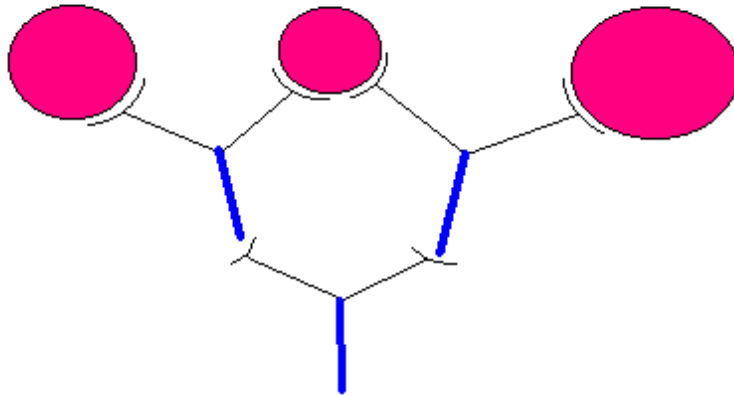
de látex. Puede usarse el tamino como pegamento, entre otros. Incubación: Hematíes o látex + antígeno
Complejo partícula-antígeno.

En el caso de los hematíes tienen pegados fármacos o drogas de forma inespecífica en la membrana, por ello al tomar un fármaco hay personas que tienen anemia. Se utiliza para la detección de anticuerpo contra *Treponema pallidum* o algunos factores reumatoides.

En caso de poseer aquello que estamos buscando, se producirán grumos. A pesar de ser una técnica diseñada para su uso cualitativo, puede hacerse semicuantitativa mediante el uso de diluciones. Esta técnica es capaz de detectar 0,001 g/ml. Se denomina título a aquella dilución del suero que todavía no ha perdido su acción.

Aglutinación con antiinmunoglobulina.

La mejor Ig para realizar este tipo de técnicas es la Ig M, puesto que es la que mayor aglutinación produce, además de tener un mayor número de brazos. Los hematíes tienen mucha carga negativa, y se repelen si están muy cerca, haciendo imposible que un anticuerpo tenga un hematíe distinto en cada brazo.



Utilizando una inmunoglobulina frente a la propia inmunoglobulina G, obtenemos una ampliación que permite la aglutinación en el espacio.

Un ejemplo de utilización de esta técnica es la que se realiza cuando se practica el test de Coombs:

- Los anticuerpos frente a la Ig G pasan la placenta.
- En la sangre del niño hay mas anticuerpos de la madre Añadimos Ac frente a la Ig G y se ve la aglutinación Test directo.
- Esto ocurre cuando la madre es RH negativa y el niño RH positivo.
- Se coge sangre de la madre mas hematíes RH positivos, le añadimos Ac frente a Ig G humana y vemos si hay aglutinación Test indirecto.
- La Ig G es mala aglutinante.

Reacciones de inhibición

Es la más sensible de todas las técnicas de aglutinación. Se utilizan hematíes. Ya se conoce el antígeno problema, y lo hemos pegado a la superficie de los hematíes. Lo que intentamos ver es cuando se produce la inhibición del proceso de aglutinación. A mayor cantidad de antígeno, menor capacidad de aglutinación voy a tener. Partimos de cantidades conocidas de antígeno y anticuerpo, y prosigo añadiendo antígeno.

Se utiliza para ver en asesinatos o violaciones el RH o grupo sanguíneo del acusado. Esto se hace si hay

muestras de semen o saliva. También puede concluirse si existen restos de drogas en las muestras.

Existe un problema en la utilización de estas técnicas, dado que los hematíes se destruyen en un período de tiempo muy corto. Para solucionar este problema se intenta utilizar bolas de látex. De todas maneras casi todos los reconocimientos han de realizarse con sangre fresca.

Técnicas que utilizan el complemento.

Estas técnicas se crearon para poder medir el complemento de un individuo. Para poder llevarlo a cabo medimos componente por componente y nos fijamos si el complemento activo forma poros en las membranas de los hematíes.

Para ello se utilizan hematíes de oveja, anticuerpos de conejo o antihematíes de la propia oveja, además del suero problema con C1–C9. Ponemos a incubar el conjunto. Los anticuerpos se pegarán a los hematíes, activando el complemento, que provocara poros en estos, causando la lisis, que podemos observar.

Deben compararse con controles, y debemos fijarnos en que cantidad hace falta para lisar el 50% de los hematíes. La cantidad de suero que hace falta para lisar el 50% de los hematíes se denomina CM50 y se utiliza como unidad de medición de la actividad del complemento.

Fijación del complemento.

Existe competencia entre el control y la muestra problema para la unión del anticuerpo y el antígeno. Hay que añadir complemento conocido, e inactivar el complemento a 56° a hora. Tenemos anticuerpo conocido, complemento conocido, hematíes de oveja con anticuerpo pegado, y nuestro problema con o sin antígeno (No lo sabemos).

Si no hay antígeno los hematíes rodeados de anticuerpo que reconocen el antígeno, activándose el complemento provocando la lisis Hemolisis → Control positivo.

Si existe antígeno, los hematíes rodeados de anticuerpo que reconocen el antígeno, pero como no hay complemento libre no se produce la lisis de los hematíes No hay hemolisis.

Se utiliza para detectar enfermedades provocadas por virus, rickettsia y hongos. El complemento también se utiliza para purificar, matando específicamente aquellas células para las que añadamos anticuerpo.

Células formadoras de placas o ensayo de placa hemolítica.

Para contar el número de linfocitos B que responden a un antígeno después de haber un mixado con ese antígeno.

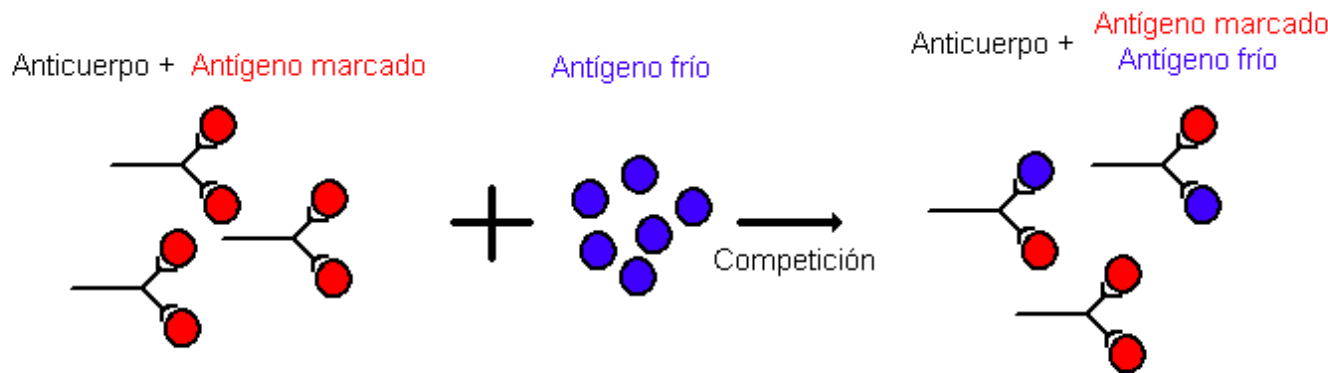
Tema 4: Técnicas de ligando.

Marcamos el antígeno o el anticuerpo, sin modificar sus propiedades de reconocimiento antígeno–anticuerpo. Podemos realizar el marcaje con:

- Radioactividad RIA.
- Enzimáticamente EIA, ELISA.
- Emisión de luz.
- Fluorescencia.

Radio Inmuno Análisis (RIA)

Fue descrita por primera vez por Yalow/Bason. Con concentraciones conocidas de anticuerpo marcado radiactivamente y antígeno frío (Sin marcar). Es un ensayo de competición.



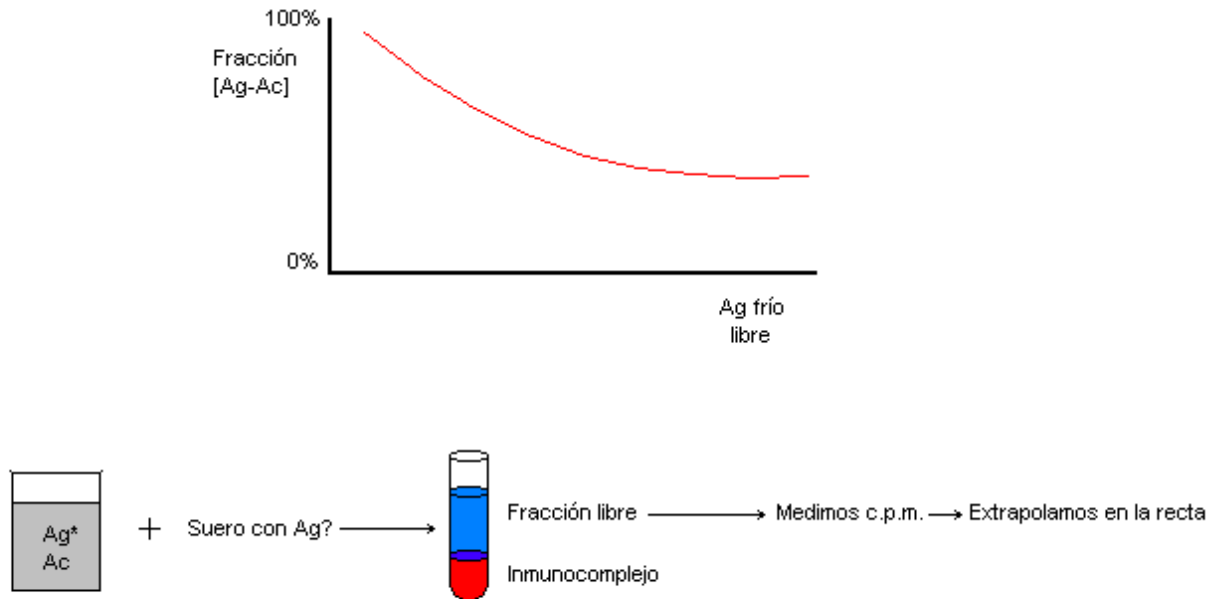
La técnica se basa en medir la cantidad de antígeno marcado que se desplaza de los lugares de unión del anticuerpo debido a la llegada y posterior competición del antígeno frío (Que es la muestra problema), conociendo así la cantidad de antígeno frío que teníamos en nuestra muestra. La medición se realiza de la fracción libre que queda, antes y después de la adición del antígeno frío.

Debemos precipitar los complejos para poder separar las fracciones. Existen varios métodos para ello:

- Atrapar el ligando libre: Absorción. A través de sustancias, que se pegan al antígeno libre y nos queda el anticuerpo separado. Como sustancias se utilizan el dextrano o partículas de carbono.
- Hacer precipitar los inmunocomplejos. Existen varias formas:
 - ♦ Química: Sulfato amónico por ejemplo. Hace precipitar el inmunocomplejo y nos queda la fracción libre con antígeno radioactivo.
 - ♦ Específica con anticuerpo: Usamos un anticuerpo frente a anticuerpos, quedando libre el antígeno marcado.
 - ♦ Unido a una fase sólido. Pegamos en una membrana, tubo o bolitas, inmovilizando los inmunocomplejos o el antígeno.

Dado que utiliza radioactividad es muy sensible. La mas sensible de todas estas técnicas, pudiendo llegar a detectar cantidades del orden de picogramos.

De todas formas, tras el experimento, hay que realizar una curva patrón para extrapolar nuestras muestras.



En estos últimos años está siendo prácticamente desbancada por otra técnica, el ELISA, que a pesar de ser menos sensible, utiliza reacciones enzimáticas en lugar de radiación, haciendo el ensayo más sencillo y menos peligroso para la salud de los operadores.

Enzyme Link Immuno Solvent Assay (ELISA)

Utiliza un anticuerpo unido a un enzima. También necesitamos separar la fracción unida de la libre. Utilizamos mayoritariamente un soporte sólido de plástico. Se utilizan placas de 96 pocillos para testar varias cosas a la vez y abaratar costes. Fue descrita en el año 1961. Existen varios tipos de ELISA, de los cuales veremos cuatro.

ELISA directo.

En un soporte sólido de plástico, pegamos en el fondo el antígeno que queremos analizar. Se bloquean los huecos con proteína (Albúmina bovina normalmente). Añadimos anticuerpo que reconoce el antígeno, ya marcado con un enzima. Incubamos un tiempo y realizamos lavados para quitar todo el anticuerpo que no se ha pegado. La fracción libre se tira. La cantidad de anticuerpo con enzima que tengamos es proporcional a la cantidad de antígeno. Añadimos un sustrato que en presencia del enzima marcador, pasa a tomar un color específico (Sustancia cromógena). Por ejemplo, la peroxidasa utiliza aminobendicina, que en presencia de agua oxigenada pasa a agua y oxígeno, que oxida al DAB, produciendo un color marrón. Ese color lo podemos leer en un espectrofotómetro con los filtros adecuados.

ELISA indirecto.

En este caso el primer anticuerpo no está unido con el enzima de marcaje, sino que necesitamos un anticuerpo secundario marcado que reconozca al primero. Pasos:

- Pegar el antígeno.
- Bloquear con proteína.
- Añadimos el suero del enfermo (Si hay anticuerpos frente al antígeno, se pegan).

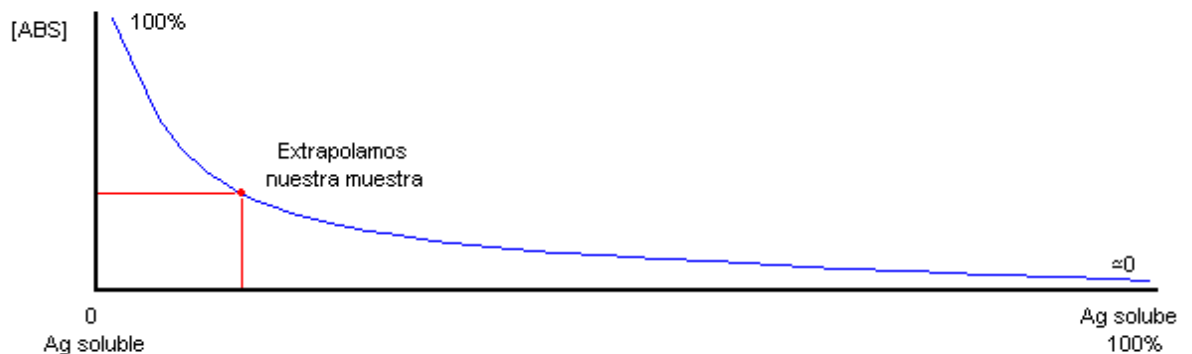
- Lavamos Separamos fracciones Tiramos la libre.
- Añadimos el anticuerpo secundario marcado con un enzima. Suelen ser anticuerpos frente a inmunoglobulinas humanas,.
- Incubamos.
- Lavado para eliminar anticuerpos libres.
- Añadimos el cromógeno, a mas color mas anticuerpo y mas antígeno.

Nos permite cuantificar, al comparar con un control. Tendremos de antemano una curva patrón específica para cada ensayo. Es necesario además establecer rangos de positivo y negativo.

ELISA competitivo.

Se trata en muchos aspectos a una técnica similar al RIA. Pegamos el antígeno al sustrato. Añadimos anticuerpo primario. Añadimos antígeno libre igual al que está pegado. Parte del anticuerpo se pega al antígeno pegado y otra al libre. Al lavar nos llevamos la fracción con anticuerpo pegado al antígeno libre. Añadimos el anticuerpo secundario marcado con enzima. El color aparece tras el revelado, y a mayor antígeno soluble en la muestra, menor color obtendremos.

Es mas sensible que el resto de los ELISA. También debemos realizar una curva patrón con cantidades conocidas de antígeno y anticuerpo.



Esta técnica suele hacerse por triplicado, dada su sensibilidad. Debe incluirse un control negativo de algo que no debe reconocer ese anticuerpo, y un control positivo, para realizar una recta patrón que nos permita cuantificar. Se toma como resultado la media de los tres pocillos.

ELISA Sándwich.

Tendremos dos zonas de anticuerpo, en la parte de abajo y de arriba. En el sustrato pegamos una anticuerpo que reconozca el antígeno a testar. Bloqueamos los huecos con proteína. Añadiremos el antígeno. Lavamos tras incubación. Ponemos otra vez anticuerpo que reconozca el antígeno, que suele estar ya unido al enzima (Aunque puede hacerse con otra capa de anticuerpo). Lavamos tras incubación y añadimos el cromógeno. A mas antígeno mas color.

Enzimas que se usan en los ELISA.

- Peroxidasa del rábano picante.
- Fosfatasa alcalina.

- Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa.
- Malato deshidrogenasa.
- Galactosidasa.

El enzima elegido no debe de estar presente en el medio que estamos analizando. Su función es la de estar inactivo hasta que deseemos activarlo.

Tema 5: Producción de anticuerpos monoclonales y policlonales.

Al estar expuesto a un patógeno, muchas células del cuerpo se ponen a funcionar. Una bacteria tiene muchos determinantes antigénicos, y muchos de ellos serán reconocidos. Dependiendo de que determinantes antigénicos tengamos, habrá mas anticuerpo de un tipo que del resto. El antisuero de una persona inmunizada tiene una mezcla de muchos anticuerpos, que proceden de linfocitos que se activaron al reconocer un determinante antigénico. Como se han activado muchos clones, la respuesta es policlonal. La mayor parte de las respuestas son de este tipo.

Un anticuerpo monoclonal procede de un solo tipo de clon. En ocasiones, queremos tener mucha cantidad de un único tipo de anticuerpo monoclonal, pero es muy difícil de purificar en un antisuero de una respuesta policlonal. Se buscaron técnicas para obtenerlos. El problema es que no se pueden tener células B produciendo anticuerpo constantemente. Para obtención de anticuerpos debemos:

- Debemos seleccionar el antígeno (No todos los antígenos dan respuesta inmune). Surge una diferencia, lo que si da respuesta inmune es un inmunógeno, que no es mas que un antígeno que inyectado da lugar a una respuesta inmune. Debe de tener un tamaño grande (5000-10000). Los mejores son las proteínas y los peores los azúcares. Otras sustancias, aunque son muy pequeñas, si las asociamos a una proteína transportadora si son inmunógenos. Se conocen como haptenos.
- Debemos ver cual será la vía de inmunización, es decir, por donde meteremos el antígeno. La subcutánea es una de las que mejor respuesta inmune dan. Rara vez se usa intramuscular, y muy rara vez la vía oral. En animales se suele utilizar la vía intraperitoneal, y obtenemos una respuesta sanguínea que irá al bazo. La intravenosa es la menos usada porque los antígenos pueden tolerarse. Para monoclonales se utilizará un ratón por vía intraperitoneal varias veces, seguido de una intravenosa, para extraer finalmente el bazo. Si añadimos adyuvantes, estos potenciarán la respuesta inmune, ya que enlentece la liberación del antígeno y favorece la fagocitación de este por los macrófagos. Suelen utilizarse emulsiones de aceite (Adyuvante de Freud), solución ACUM o la toxina colérica.
- Debemos escoger el animal que vamos a utilizar. Depende de la función que queramos realizar. En experimentación utilizamos conejos para obtener anticuerpos policlonales, al igual que ovejas o el hámster. Si queremos anticuerpo monoclonales son fundamentalmente ratón (Mas frecuente) y rata.

Protocolos de inmunización.

Lo mejor es inmunizar varias veces. Entre una respuesta primaria y la segunda se tarda menos. La primera vez se tardan semanas, la segunda necesitamos menos tiempo y obtenemos mas anticuerpo. Suelen repetirse las inmunizaciones. Se realiza la primera, tras 20-30 días la segunda, dejamos dos o tres semanas y hacemos la tercera, para finalmente extraer el bazo. Los tiempos varían entre los distintos protocolos.

Obtención de anticuerpos policlonales.

Una vez preparado el antígeno (Por ejemplo, linfocitos humanos), se inmuniza tres veces a un conejo, y se le va sangrando cada cierto tiempo, extrayendo el suero, donde tenemos anticuerpo, que reconocen los linfocitos humanos (Mezcla de anticuerpos). Si inyectaran inmunoglobulina G humana, obtendríamos anticuerpos de conejo frente a inmunoglobulina G humana. Si el conejo se muere se acaba el ensayo. Además los lotes no son reproducibles.

También podemos obtener halosueros, que son capaces de diferenciar unos organismos de otros.

Obtención de anticuerpos monoclonales.

El desarrollo de esta técnica valió el premio Nóbel a dos investigadores, Cesar Milstein y George Kohler (La técnica es de 1975, el Nóbel en 1984). Trabajaban intentando conocer los genes de los anticuerpos. Tenían un problema, que tenían mezclas de células B, y querían tener una única célula B con un anticuerpo de especificidad conocida. Querían comparar la secuencia proteica con la secuencia de la inmunoglobulina. Tenían las células de mieloma (Tumorales) que se pueden inducir en el ratón. El anticuerpo que secretaba era de especificidad desconocida. Unieron una célula B de especificidad conocida con un mieloma. Consiguieron un hibridoma, que son inmortales (Cultivables) que secreta anticuerpos de especificidad conocida. Es el principio de la técnica de obtención de anticuerpo monoclonales.

Inmunizaban varias veces un ratón por vía intraperitoneal (2 veces) y tres veces por vía intravenosa, para causar una mayor respuesta en el bazo. Extraen el bazo y unen estas células al mieloma, mediante virus que forman sincitios, pero también agregando químicos, como el polietilenglicol (PEG). Obtenemos híbridos, pero existe un primer problema, ya que tenemos células sin fusionar junto a los híbridos. Para poder distinguirlos, las células de bazo mueren tras un tiempo, pero las células de mieloma todavía viven. Tenía que modificar las células de mieloma para que en determinados medios selectivos se murieran. Utilizaron la vía de síntesis de nucleótidos, para ver como podían alterar estas células. Hay dos maneras de sintetizar nucleótidos, por la vía de salvación o la vía de novo. La de salvación necesita dos enzimas, y la de novo solo uno. Al tener mielomas deficientes en alguno de los enzimas de la vía de salvación y bloqueando la de novo, las células morirán, pero el híbrido conserva la enzima del linfocito B. Así consiguieron que solo sobreviviera el hibridoma. Para hacer que sea defectiva en una vía, forzamos a las células en medios análogos a las vías, y si sobreviven, es que ya no la usa. Hay sustancias tóxicas para la enzima, y si sobreviven células es que ya no las usan.

Con la línea de mieloma deficientes para un enzima, las fusionamos con las células del bazo mediante el uso de PEG. En el cultivo en el medio correcto solo sobreviven los hibridomas.

Cuando ya tenemos los hibridomas, testamos si están produciendo o no anticuerpo. Analizamos la producción de anticuerpos en los pocillos. Lo hacemos por distintas técnicas, pero la mas frecuente es el ELISA. Lo haremos teniendo una única célula por pocillo, porque todos los anticuerpos que produzca esta célula van a ser iguales (Monoclonales). Para separar las células una en cada pocillo tenemos que hacer una dilución límite, hasta que tengamos 0,3 células por pocillo, para tener la probabilidad de que no hayan células en el pocillo o que tengamos solamente una.

1000 cs 500 cs 250 cs 125 cs 125 cs ... 0,3 cs por pocillo.

Se comprueba en el microscopio, y se espera a que crezca. Ya tenemos un clon que da anticuerpos monoclonales. En otros pocillos habrá otras células que darán otro anticuerpo monoclonal.

Podemos tener estos clones indefinidamente o bien congelarlos, obteniendo una producción ilimitada del anticuerpo monoclonal obtenido. Son anticuerpos con especificidad única frente al antígeno. Todos tienen idéntica afinidad por el antígeno.

Usos e inconvenientes de los anticuerpos monoclonales.

Usos:

- Identificación de nuevas moléculas.
- Estudiar complejos proteicos.
- Tipos de grupos sanguíneos.

- Medición de niveles hormonales.
- Detección de virus.
- Detección de anticuerpos específicos.
- Purificación de moléculas: Interferón.
- Diagnóstico de tumores.
- Terapia:
 - ◆ Inmunosupresores.
 - ◆ Enfermedades infecciosas.
 - ◆ Cáncer.
 - ◆ Intoxicaciones.

Problemas:

- La mayoría se generan en ratón, y al utilizarlos en otras especies pueden provocar rechazo.
- Dificultad técnica de reproducir hibridomas humanos.
- En terapia pueden tener efectos secundarios por crossreactividad.
- Pueden pasarse virus de otras especies.
- Han intentado humanizar los anticuerpos de ratón por ingeniería genética.

Análisis de anticuerpos.

Dilución en agar: Utilizamos la propiedad de formación de colonias en placas petri con medio enriquecido, y al mezclarlo con los hibridomas se formarán colonias independientes. Podemos poner cada colonia en un pocillo independiente.

Debemos caracterizar los anticuerpos obtenidos. Para ello utilizaremos técnicas como el ELISA, el Western-Blot, fluorescencia o inmunoprecipitación.

Para la obtención a gran escala, se cultiva en un medio donde crecen las células, y los anticuerpos se van liberando. Podemos obtener, en el caso de la inmunoglobulina G de 10–50 g/ml, o en otras del orden de 0,5–2 g/ml. Para poder obtener mas podemos provocar ascitis a los ratones (Líquido en el peritoneo) . Existen aparatos similares a ratones in vitro. La mayoría de constan de reservorios donde se ponen las células, con membranas que permiten el intercambio gaseoso y líquido con otro reservorio donde se encuentran los medios de cultivo. Crecen las células y antes de morir liberan todo el anticuerpo, y retiramos el líquido obteniendo unos 75–100 ml con una concentración de anticuerpo de 0,5–1 mg/ml.

Purificación de anticuerpos.

Cuando ya hemos obtenido un antisuero, este no está formado únicamente por anticuerpo. Para su purificación, las técnicas mas utilizadas son las basadas en cromatografía de afinidad, donde podemos purificar el anticuerpo y el antígeno. Existen tres cromatografías para ello:

- Purificar antígeno: Hay una proteína (Proteína A) que tiene mucha afinidad por las inmunoglobulinas (Especialmente por la G), concretamente por la porción Fc. Puede comprarse la proteína A asociada a bolitas de ciertos polímeros. Diseñamos una columna con la proteína A mas el anticuerpo y le pasamos la mezcla de antígeno, solo quedándonos los antígenos en la columna, ya que el resto sale en el diluido. Hacemos lavados para quitar todo aquello no específico que nos quede. Separamos ahora el antígeno el anticuerpo, ya sea bajando el pH o modificando la molaridad del buffer. Normalmente el buffer es glicina a pH 3, para no estropear el antígeno.
- Purificar anticuerpos específicos: La columna lleva bolitas de sephadex rodeadas de antígeno, y hacemos pasar muestra con antígeno específico mas otras cosas, pero solo se un el anticuerpo

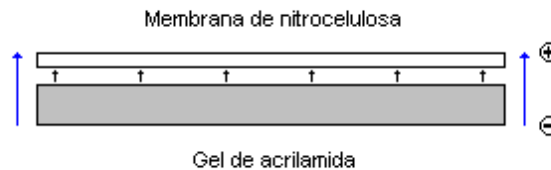
específico. Lavamos. Bajamos el pH para separar y ya tenemos el anticuerpo específico para una sustancia.

- Purificar anticuerpos no específicos: Únicamente purificamos anticuerpo con la capacidad de pegarse a la proteína A mas el sephadex. En la columna habrá proteína A mas sephadex y pasaremos las muestras.

Existen otras proteínas además de la A, como la proteína G o la L, que se unen a una cadena ligera kappa. También pueden utilizarse otros tipos de cromatografía. Existen otras técnicas para el análisis y purificación de los anticuerpos, como pueden ser el Western-Blot o la inmunoprecipitación.

Western-Blot

Combina electroforesis con transferencia en membrana y posterior incubación con anticuerpo. Nos permite saber el peso molecular de una determina proteína. Lisamos las células, y realizamos una electroforesis en gel de acrilamida, poniendo el lisado. Utilizamos marcadores de peso molecular. Se hace doble, uno de ellos lo teñimos y otro lo transferimos a una membrana de nitrocelulosa o nylon, mediante carga eléctrica.



En esta membrana quedan pegadas las proteínas. Ya tenemos las proteínas. Incubamos con anticuerpo contra lo que queremos saber, y estos lo reconocen. Se lava y se añade un anticuerpo secundario marcado (Enzimáticamente normalmente) que detecta el anticuerpo primario. Añadimos el cromógeno, viendo la unión en color. Comparando con el patrón de pesos moleculares, sabemos el peso molecular del antígeno.

A veces esta técnica no sale, pudiendo ser debido a que en el proceso de ponerlos con SDS para cargar las proteínas, el anticuerpo se desnaturaliza.

Inmunoprecipitación

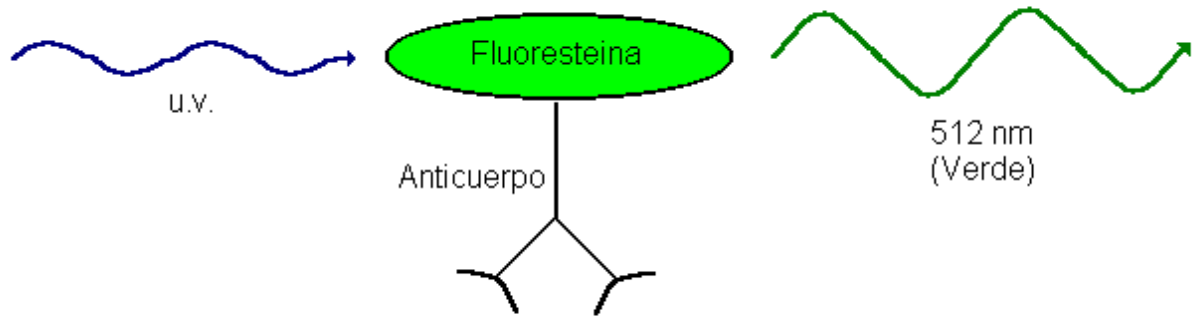
Consiste en rescatar el antígeno de una mezcla utilizando el anticuerpo y alguna técnica que nos precipite los complejos antígeno-anticuerpo.

Tenemos anticuerpo que reconoce células humanas. Buscamos un sustrato donde pegar el anticuerpo (Bolitas mas anticuerpo). A ellos añadimos el lisado celular (Puede estar marcado). El antígeno se unirá al anticuerpo. Para separar la fracción unida de todo aquello que no se ha pegado, centrifugamos, y quedará en el fondo las bolitas mas el complejo antígeno-anticuerpo. Lavamos y centrifugamos repetidamente, desechando todo lo no específico. Ya solo tenemos las bolitas con el complejo antígeno-anticuerpo. Hacemos una electroforesis con control de peso molecular. El complejo antígeno-anticuerpo lo desnaturalizamos con calor, y rompemos los puentes disulfuro. Tendremos una banda de bolitas, otra de cadenas pesadas, ligeras y otra con el antígeno. Como es poco sensible, suele hacerse un Western-Blot posterior, incubando la membrana con un anticuerpo marcado. Se pueden realizar muchas variantes

Tema 6: Técnicas de marcaje celular y visualización.

Técnicas con anticuerpo mas fluorescencia.

Los fluorocromos reciben luz a una determinada longitud de onda, y emiten a otra longitud de onda que podrá ser detectado dentro de un espectro y otra en el rango de un color.



Con medios especiales que visualizan la fluorescencia, podemos ver los anticuerpos.

Inmunofluorescencia directa

En esta técnica el anticuerpo está marcado directamente con el fluorocromo.

Inmunofluorescencia indirecta

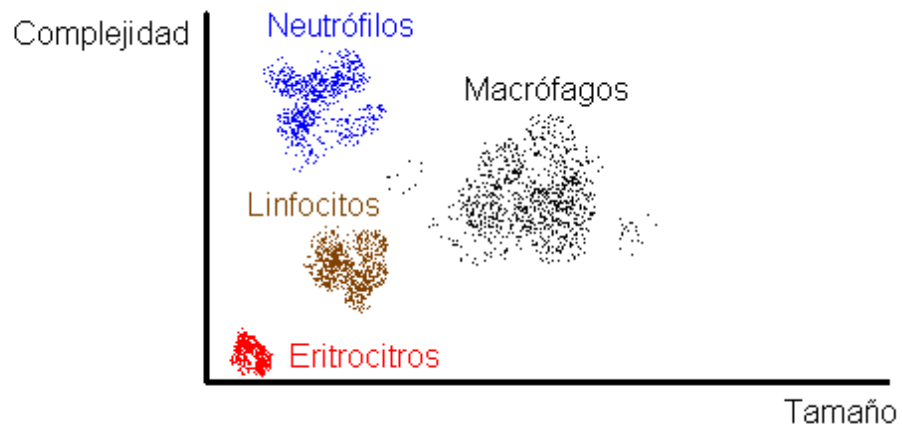
Es más frecuente (Diagnósticos). En este caso el primer anticuerpo no está marcado, y los anticuerpos que se utilizan suelen ser monoclonales. Usamos un anticuerpo secundario que reconozca el primer anticuerpo. Los secundarios ya suelen ser policlonales.

Si pensamos que el enfermo detecta partes propias (Enfermedades antiinmunes), ponemos tejidos humanos y añadimos suero del enfermo. El anticuerpo primario será el del suero, y el secundario será frente a inmunoglobulinas humanas.

También puede hacerse sobre suspensiones celulares. En este caso suele usarse para visualizarlos el citómetro de flujo.

Citómetro de flujo.

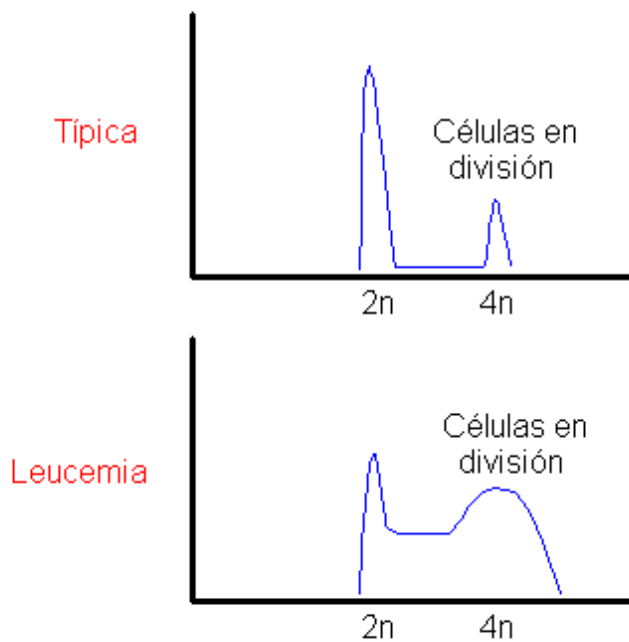
Es un aparato que pretende analizar una a una todas las células que pasan por una capilar muy fino donde incide un rayo láser, y donde habrá filtros y espejos que nos dirán el tamaño que tiene esa célula, su complejidad y si va rodeada con fluorocromos de un color, otro o ambos. Los resultados salen en una gráfica tal y como nosotros le indiquemos. Por ejemplo, en una gráfica de tamaño frente a complejidad obtendríamos esta gráfica en una persona sana.



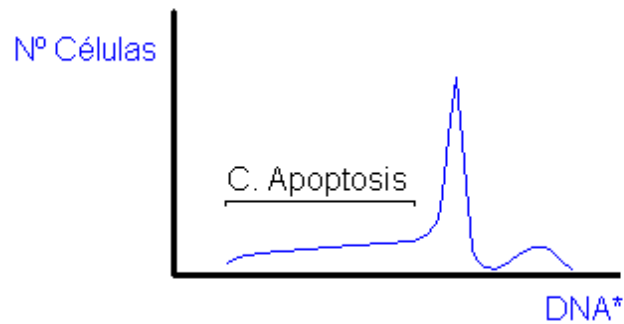
Podemos saber tantos por cientos de las distintas células (Con distintos fluorocromos). Podemos pedir gráficas y tantos por cientos de todos los parámetros que mide el citómetro de flujo.

El citómetro posee muchas mas funciones, y es de uso obligatorio en centros hospitalarios, para la realización de gran número de pruebas. Entre ellas cabe destacar:

- Ver el contenido de DNA (En esporas y plantas por ejemplo). Nos vale para poder ver algunas leucomías (Células de división continua).



- Ver si las células se mueren o no por apoptosis: Habrá células con menos dotación de $2n$.



- Hacer gráficas con tres, cuatro o mas parámetros.
- Separa poblaciones celulares: En citómetros con capacidad para hacerlo. Mezcla de células, por ejemplo, con marcador verde en un tubo y rojas en otro. Cargamos gotas en el citómetro, y lo sometemos a un campo eléctrico, desplazando el tubo que nosotros queremos.

Microscopio de fluorescencia: Solo hay una distancia de trabajo, donde veremos la preparación.

Microscopio confocal: Podemos en tejidos gruesos, enfocar en todo momento. Podemos además guardar todas las imágenes secuencialmente y ponerlas forma tridimensional.

Microscopio electrónico: Mayor definición, que también puede utilizar técnicas inmunológicas.

Tema 7: Inmunología celular.

Podemos ir a médula o timo, pero lo normal es la utilización de la sangre, ya que la linfa es más difícil. También podemos ir a los ganglios linfáticos. También podemos obtener el bazo. Los órganos tienen mezcla de células. Se han desarrollado técnicas de separación celular.

Separación por gradiente de densidad.

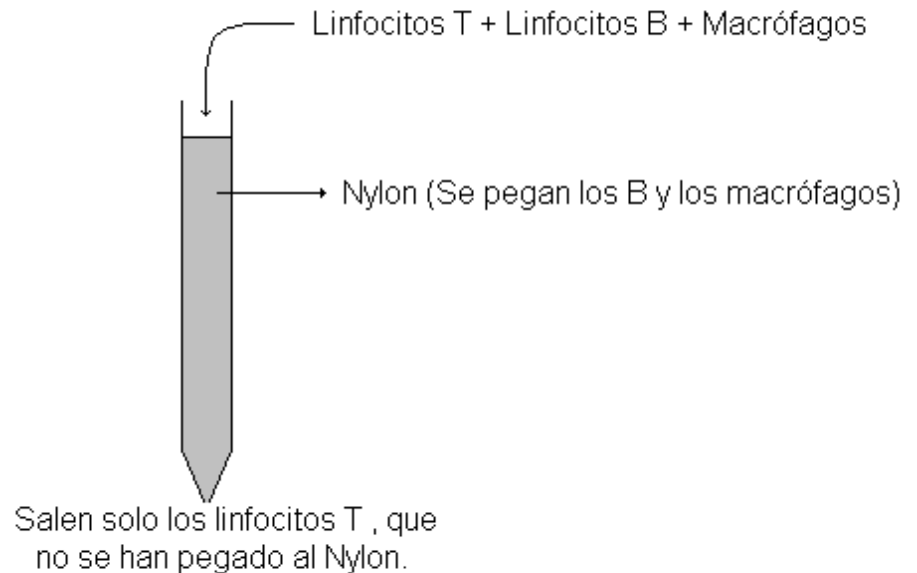
Usamos una sustancia que por centrifugación nos las separe por gradiente de densidad.



Ahora, utilizamos una pipera pasteur para recoger la banda donde se encuentran los linfocitos y lo pasamos a un medio específico. Centrifugamos para quitar el ficol (Sustancia densa). Hemos obtenido linfocitos y monocitos parcialmente purificados.

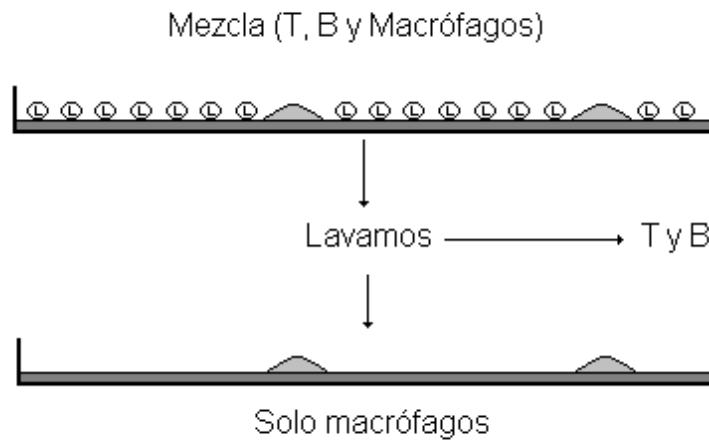
Adherencia a nylon (Linfocitos B, Macrófagos y células muertas).

El nylon tiene una serie de propiedades que hace que las células B, los macrófagos y las células muertas se adhieran a el. Podemos aprovechar esta capacidad para separar células de una mezcla.



Si queremos recuperar posteriormente los linfocitos B, junto con los macrófagos, debemos de exprimir el nylon, para que estas células se suelten del nylon.

Si lo queremos obtener son los macrófagos, existe un método mas sencillo, utilizando un medio plástico donde se adhieren los macrófagos. Utilizamos una proteína como la albúmina para forrar el plástico. Si añadimos la mezcla, solo los macrófagos se pegarán. Al lavar nos quedaremos con ellos pegados, y se irán las demás células no adherentes. Para separarlos utilizamos o bien un agente químico (Un querante de calcio, EDTA, tripsina...) o bien simplemente rascando el fondo de la placa plástica.



Rosetas con hematíes de carnero.

Algunas células forman rosetas con los hematíes de carnero. Lo hacen aquellas que presentan CD2 en su membrana. Es el caso de los linfocitos T. Los linfocitos B y los macrófagos no presentan esta molécula, y por lo tanto no forman rosetas con estos hematíes.

Apuntes de Técnicas en Inmunología Cuarto de Biología 99/00

Página 24 de 24