

INMUNOLOGÍA BÁSICA

SEMINARIOS

Métodos de laboratorio

Docentes

Marina Etcheverrigaray

Carolina Veaute

Maria Ines Garcia

Eduardo Mufarrege

Adriana Soutullo

Carolina Attallah

Ma. de los Milagros Bürgi

Romina Russi

Sonia Ricotti

Sofia Giorgetti

Ivana Reidel

2019

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

Índice

SEMINARIO I	4
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO POLICLONALES Y MONOCLONALES.....	4
Generalidades – conceptos	4
1.1 Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales.....	4
1.2 Factores críticos en la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales	5
1.3 Tecnología de la producción de hibridomas	8
1.4 Producción de AcMo a mayor escala.....	11
1.5 Diferencias entre anticuerpos mono y policlonales.....	13
1.6 Aplicaciones de los AcMo y AcPo	14
SEMINARIO II.....	16
MÉTODOS BASADOS EN LA INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO. Parte 1.....	16
Interacción antígeno – anticuerpo: generalidades	16
2.1 Reacciones de precipitación.....	17
2.1.1 Precipitación en medio semi-sólido o gelificado.....	18
2.1.1.1 Técnica de mancini o inmunodifusión radial simple (IDR)	19
2.1.1.2 Inmunoelectroforesis (IEF).....	20
2.2 Reacciones de aglutinación	21
2.2.1 Clasificación de las reacciones de aglutinación	21
2.2.2 Aglutinación con fines cuantitativos: titulación.....	22
2.3 Inmunoturbidimetría e Inmunonefelometría	24
SEMINARIO III	26
MÉTODOS BASADOS EN LA INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO. Parte 2.....	26
3.1 Inmunoensayos enzimáticos.....	27
3.1.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	27
3.1.2 Inmunoblotting: WESTERN BLOT, DOT BLOT y SLOT BLOT.....	31
3.1.3 Inmunocitoquímica-Inmunohistoquímica	33
3.1.4 Sistemas de detección del inmunocomplejo.....	36
3.1.5 Sistema de amplificación.....	37
3.2 Inmunoensayos fluorescentes.....	38
3.3 Otras técnicas basadas en la unión antígeno-anticuerpo	41

3.3.1 Inmunocromatografía de flujo lateral	41
3.4 Factores de impacto en la calidad del inmunoensayo	45
SEMINARIO IV.....	49
MÉTODOS QUE EVALUAN LA INMUNIDAD CELULAR	49
4.1 Inmunidad celular: generalidades. mecanismos involucrados	49
4.2 Métodos de separación celular	50
4.3 Ensayos “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”	50
4.3.1 Pruebas no funcionales	51
4.3.1.1 Inmunofluorescencia	51
4.3.1.1.1 Citometría de flujo	51
4.3.2 Pruebas funcionales	56
4.3.2.1 Evaluación de la capacidad funcional de células fagocíticas	56
4.3.2.2 Evaluación de la capacidad funcional de los linfocitos	57

SEMINARIO I

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO POLICLONALES Y MONOCLONALES

GENERALIDADES – CONCEPTOS

Desde su descubrimiento, hacia finales del siglo pasado, los anticuerpos han captado la atención de médicos, bioquímicos y científicos en el área de las biociencias, dado que representan herramientas invaluable tanto en el laboratorio como en la clínica.

Los anticuerpos policlonales, o antisueros, fueron los protagonistas en la época de la serología y la seroterapia. Los anticuerpos monoclonales de primera generación aparecieron a mediados de los años setenta para convertirse en las herramientas principales de poderosas técnicas analíticas como los radioinmunoensayos, los ensayos inmunoenzimáticos y la citometría de flujo. Más recientemente, avances importantes en el área de la biología molecular y el desarrollo de técnicas de ADN recombinante han hecho posible la creación de anticuerpos recombinantes, también llamados anticuerpos monoclonales de segunda generación.

Un solo antígeno puede presentar diferentes epitopes, es decir, puede estimular la producción de diferentes anticuerpos. Cada uno de estos anticuerpos es específico para un epítopo determinado. Este conjunto de anticuerpos, capaz de reconocer distintos epitopes de un mismo antígeno, se denominan **anticuerpos policlonales**, y están producidos por un conjunto de diferentes clones celulares, mientras que los **anticuerpos monoclonales** son específicos para un solo epítopo y están producidos por un único clon celular.

Gracias a los avances que han experimentado disciplinas como la proteómica y la genómica, ha sido posible identificar y caracterizar nuevas moléculas que desempeñan funciones importantes en el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes, víricas e incluso el cáncer. Las características que presentan los anticuerpos monoclonales hacen de ellos agentes terapéuticos potentes y prometedores.

1.1 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES

Del mismo modo que ocurre en los seres humanos, los animales también producen anticuerpos. Es por esta razón que es posible obtener anticuerpos contra un antígeno conocido empleando modelos animales.

Para la producción de anticuerpos en animales, el primer paso consiste en inocular al animal la sustancia para la cual se desea obtener las inmunoglobulinas específicas. Posteriormente es posible extraer suero de los animales y aislar los anticuerpos específicos del suero.

Al inocular un antígeno, se produce una respuesta de anticuerpos frente a cada uno de los determinantes antigénicos del antígeno. Todos los anticuerpos se producen simultáneamente y todos reaccionan con el antígeno, pero cada uno de ellos con un determinante antigénico particular. Esta mezcla de anticuerpos se denomina **Suero policlonal**, porque procede de varios linfocitos B que reconocieron al antígeno y se expandieron, produciendo cada uno un clon celular. Estos sueros son heterogéneos e irreproducibles (Figura 1).

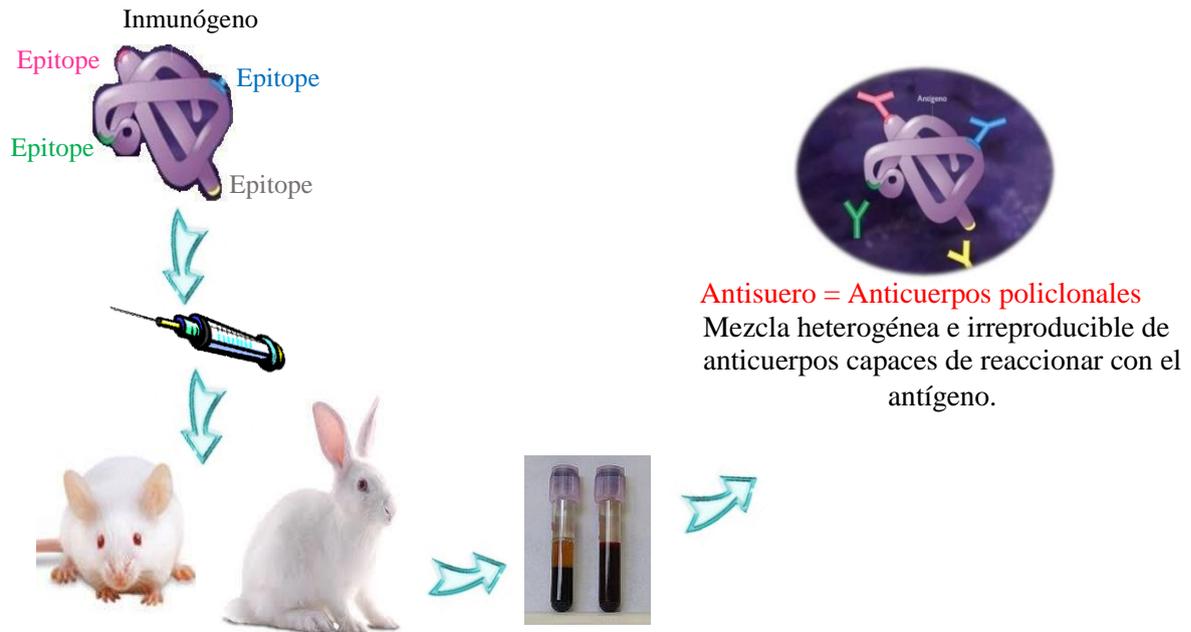


Figura 1- Producción de anticuerpos policlonales.

Contrariamente, si la inmunización se realizara con un antígeno que presenta un único epítipo, sólo se activaría un único clon celular y como consecuencia se produciría un único anticuerpo. A un suero de estas características se lo denomina suero monoclonal. No obstante, esta situación no se produce de manera normal, sino frente a determinadas condiciones patológicas. En este caso particular, se desarrollan neoplasias de células B y de los plasmocitos derivados de ellas (mieloma múltiple). Como son células productoras de anticuerpos, estos se acumulan en la sangre en grandes cantidades. Como ocurre en todos los procesos tumorales, el origen está en una célula que se maligniza y se multiplica de forma autónoma e independiente de los sistemas de regulación del organismo, lo que es semejante a decir que todas las células del mieloma proceden de una misma célula, y por lo tanto, producen el mismo anticuerpo. Este tipo de patologías son denominadas GAMMAPATÍAS. Las mismas pueden ser mono o policlonales, dependiendo de la producción anormal de una única inmunoglobulina o de varias de ellas.

En 1975 Kohler y Milstein desarrollaron la técnica de hibridación de células somáticas, denominados hibridomas, que permite el establecimiento y la inmortalización de células productoras de anticuerpos monoclonales (AcMo). Mediante esta técnica es posible obtener poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único epítipo antigénico.

1.2 FACTORES CRÍTICOS EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES

Los pasos críticos en la producción de anticuerpos policlonales (AcPo) son: (1) preparación del Ag; (2) selección de la especie animal; (3) selección y preparación del adyuvante; (4) el protocolo de inyección; (5) observaciones pos-inyección y (6) recolección de los Ac.

1. Preparación del Ag

La calidad, cantidad y la preparación del Ag determinan el éxito de la respuesta inmune.

En cuanto a la calidad del Ag es indispensable su pureza, dado que permitirá desarrollar una respuesta inmune específica.

La preparación del inóculo deberá realizarse con diluyentes libres de endotoxinas y a pH fisiológicos para obtener la respuesta deseada. Asimismo, la preparación del inóculo deberá realizarse en condiciones estériles.

La cantidad de Ag dependerá del animal seleccionado, de su peso y de su tamaño. Para conejos el rango de Ag recomendado es entre 50 y 1000 μg ; para ratones entre 10 y 200 μg y para cabras, ovejas, entre 250 y 5000 μg .

2. Selección de la especie animal

La selección de la especie animal dependerá de la cantidad de AcPo que se desea obtener. Generalmente se utilizan conejos debido a su tamaño, la facilidad de manipulación, el título de Ac con alta afinidad que producen y a que son animales que presentan una buena sobrevida.

Otros aspectos importantes en la selección del animal dependerá de:

- **la facilidad para obtener las muestras,**
- **la relación filogenética entre el Ag y la especie animal:** el Ag debe ser de una especie diferente para que pueda ser reconocido por el sistema inmune del animal,
- **el uso para el cual se necesitan los Acs,**
- **la edad del animal:** es importante utilizar animales jóvenes inmunológicamente adultos para desarrollar una respuesta inmune robusta,
- **el sexo del animal:** generalmente las hembras son más dóciles y menos agresivas, motivo por el cual conviene trabajar con ellas,
- **el estado de los animales:** es fundamental que el animal esté sano, dado que los animales enfermos desarrollarán una respuesta inmune diferente debido a que los agentes infecciosos pueden suprimir, modular o estimular el sistema inmune.

3. Selección y preparación del adyuvante

El sistema inmune necesita de un estímulo que induzca una respuesta inmune efectiva. Cuando el Ag para el cual se desean obtener Acs es un inmunógeno débil, se utilizan adyuvantes. Los adyuvantes que se utilizan comúnmente para la obtención de AcPo son:

- Adyuvante de Freund Completo (FCA)
- Adyuvante de Freund Incompleto (FIA)
- Sales de aluminio
- Iscoms

En cuanto a la preparación de la mezcla Ag/adyuvante, es fundamental generar una emulsión estable en el tiempo entre ambas sustancias. Esta emulsión, además, protege al Ag de su degradación.

4. Protocolo de inyección

En este punto varios aspectos son importantes:

- **La vía de inyección:** las más utilizadas son: (sc) subcutánea; (ip) intraperitoneal; (id) intradérmica; (iv) intravenosa; (im) intramuscular. La vía de inyección dependerá también del animal seleccionado.

- **Volumen de inyección:** se trata de utilizar el menor volumen capaz de desarrollar una respuesta eficiente. El volumen máximo dependerá del animal, de la vía de inoculación y de la mezcla Ag/adyuvante.

- **Número de inyecciones:** generalmente es conveniente utilizar la menor cantidad de inyecciones posibles y elegir un mismo sitio para efectuar las mismas.

- **Empleo de booster:** este es un re-estímulo con el Ag, sin adyuvante, cuando el título de Ac alcanzó el *plateau* para generar una respuesta inmune más intensa.

5. Observaciones pos inyección

Luego de la inyección es necesario evaluar los animales diariamente para evidenciar la presencia de efectos secundarios, enfermedades, etc. También es necesario palpar el sitio de inyección para asegurarse que no haya ninguna obstrucción.

6. Recolección de los Acs

Se debe analizar una muestra de suero del animal inmunizado para determinar el título y la afinidad del antisuero. Luego se realizan las extracciones correspondientes para obtener los AcPo pero asegurando el bienestar y la sobrevida del animal inmunizado.

Por otro lado, los pasos críticos para la producción de AcMo contemplan: (1) la inmunización del animal para generar células B Ag-específicas; (2) la producción de AcMo en ascitis de animales de laboratorios y (3) la colección del líquido ascítico.

Inmunización del animal para generar células B Ag-específicas

En este sentido deben tenerse en cuenta los mismos factores críticos previamente desarrollados para la producción de AcPo.

Generalmente se emplean ratones BALB/c para la producción de células B Ag-específica, que luego formarán los hibridomas productores de AcMo, porque la mayoría de las células de mieloma provienen de esta misma cepa murina.

Una vez realizado el protocolo de inmunización, debe evaluarse el título de Ac desarrollados en el suero del animal. Si la respuesta es correcta, se realiza un *booster* sin adyuvante para disparar la producción de Acs y luego de 3-4 días se sacrifica el animal para recuperar los esplenocitos que darán origen a los hibridomas productores de AcMo. En ese momento la respuesta inmune es máxima.

Las células B son fusionadas a las células de mieloma. A continuación las líneas híbridas deben clonarse para seleccionar los hibridomas Ag-específicos. El paso siguiente es el *scaling up* de la producción de AcMo; que generalmente se realiza en animales de laboratorio.

Producción de AcMo en ascitis de animales de laboratorios

Generalmente el escalado de la producción de AcMo se realiza en animales de laboratorio mediante la obtención de ascitis. Este punto se explica más abajo, en la sección “Producción de AcMo a mayor escala” de este mismo apunte.

Colección del líquido ascítico

Mediante este procedimiento es posible obtener entre 0 y 10 ml de ascitis por animal, con un promedio de 4 ml/animal y con una concentración de AcMo que varía entre 1 y 28 mg/ml, lo que representa una masa importante de Igs.

No obstante, algunos países prefieren realizar la producción *in vitro*, en lugar de la producción *in vivo*, ya que éste último representa el empleo de animales de laboratorio. Por ello, siempre que se trabaje con animales de laboratorio, el N (número de animales) debe ser tenido en cuenta y es fundamental su atención y cuidado.

1.3 TECNOLOGÍA DE LA PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS

Esta tecnología se desarrolló empleando células de ratón; no obstante, hoy en día es posible desarrollar hibridomas de diferentes especies animales. Para la generación de estas células híbridas es necesario seguir una secuencia de pasos que se resumen en la Figura 2.

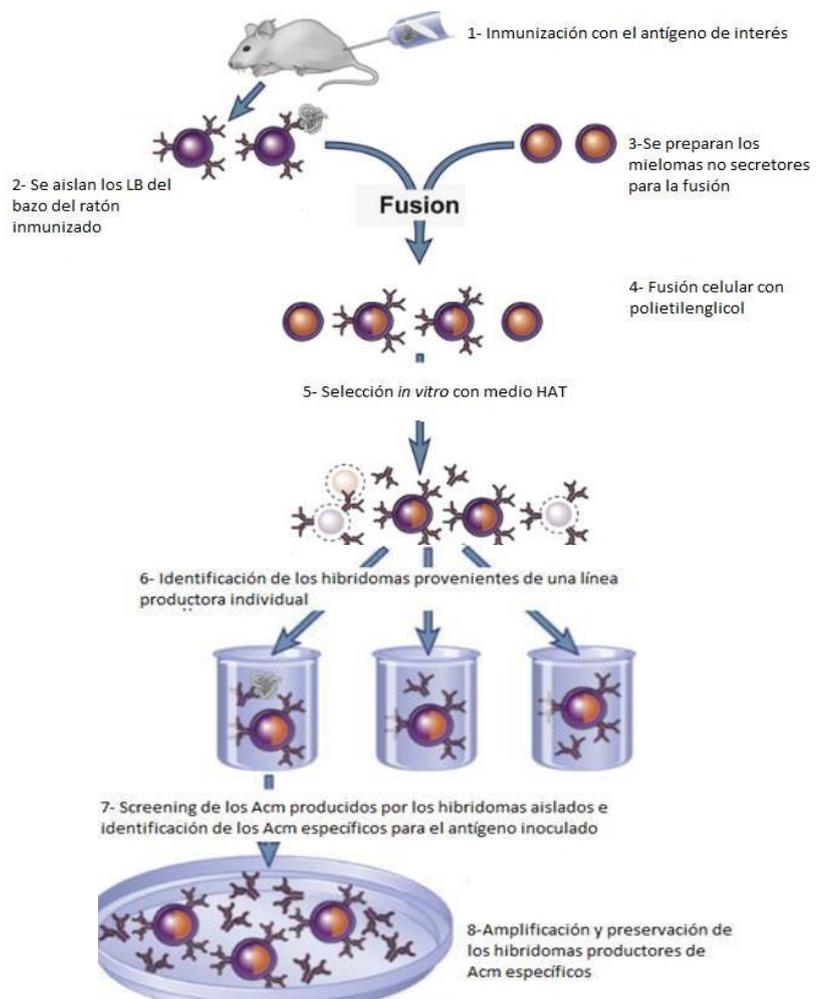


Figura 2:- Tecnología de la producción de hibridomas productores de AcMo. Abbas, K. Inmunidad celular y molecular (7° ED)-2012.

1. Inmunización con el antígeno de interés:

El inmunógeno puede ser soluble, particulado, células vivas, carbohidratos, etc. Es fundamental que el inmunógeno esté puro, estéril y se utilice en concentraciones aptas para estimular la respuesta inmune sin comprometer el bienestar del animal.

Los buenos inmunógenos desarrollarán una respuesta de anticuerpos específicos empleando cualquier protocolo. Contrariamente, los inmunógenos débiles deben ser conjugados a proteínas transportadoras o bien administrarse con adyuvantes para favorecer la respuesta inmune en el animal.

Asimismo, en este paso es muy importante seleccionar y diseñar un protocolo de inmunización adecuado, el cual va a estar determinado por la inmunogenicidad y características del Ag, así como el isotipo y la afinidad del Ac buscado. Estos aspectos son críticos en la producción de anticuerpos, motivo por el cual se discutirán y analizarán detalladamente más adelante en el presente seminario.

2. Aislamiento de los linfocitos B del bazo del animal inmunizado:

Previo al sacrificio del animal inmunizado es fundamental determinar si la respuesta inmune contra el inmunógeno inoculado fue desarrollada. Para ello, es necesario monitorear el título de anticuerpos específicos en el suero de dicho animal. Mediante un ELISA específico se evalúa la presencia de Ac específicos, así como la afinidad y la cantidad de los mismos. Si estos parámetros son adecuados, se realiza un re-estímulo con el inmunógeno y 3-4 días posterior a dicha inoculación se procede al sacrificio del animal para extraer el bazo y recuperar las células B.

3. Preparación de mielomas no secretores:

La célula parental responsable de la proliferación del hibridoma es una línea de mieloma. Estas son células aneuploides, capaces de vivir y dividirse *in vitro*. Fueron seleccionadas por ser defectivas en la enzima hipoxantil-guanil-fosforribosil-transferasa (HGPRT); defecto enzimático necesario en la selección luego de la fusión celular. La HGPRT es una enzima que utiliza guanina o hipoxantina para producir purinas, lo que permite la reutilización de las bases cuando la síntesis *de novo* se ve interrumpida, por ejemplo, por antagonistas del ácido fólico (como la aminopterina), que bloquean la síntesis de purinas y timidina. La adición de timidina al medio le permite a la célula sintetizar TMP (timidina monofosfato) vía timidina quinasa (TK), pero al no poder sintetizar bases púricas la célula muere.

4. Fusión celular con polietilenglicol (PEG):

Para la generación de los hibridomas es necesario fusionar las células de mieloma no secretor con las células del bazo del ratón inmunizado. Para ello se emplea como agente fusionante el PEG. Este fusógeno secuestra moléculas de agua permitiendo la interacción y fusión de las membranas plasmáticas. Se emplea al 40-50 % (P/V), que es la relación que permite máxima frecuencia de fusión. El tiempo de exposición con PEG debe ser menor a 2 min., y una vez que las células han sido fusionadas, las mismas son cultivadas en placas de 96 cavidades. En el cultivo de hibridomas, la cantidad de los componentes del medio de cultivo debe ser óptima para favorecer la división celular y la producción y secreción de Ac.

Muchos autores utilizan *Feeder layer*, que es una capa de células alimentadoras. Éstas son células extraídas del bazo de un ratón no inmunizado. Las mismas proporcionarán nutrientes y factores de crecimiento a las células recientemente fusionadas.

También es posible utilizar medios de cultivos que estén condicionados con nutrientes del crecimiento de células. Asimismo, el aporte de suero fetal bovino es fundamental para el crecimiento de estas células, utilizando generalmente una concentración 20 % (v/v).

5. Selección *in vitro* con medio HAT:

El medio selectivo HAT es un medio de cultivo que contiene hipoxantina, timidina y aminopterina. Este último como inhibidor de la síntesis *de novo* de las purinas. Las células de mieloma y los linfocitos B no podrán proliferar en cultivo por distintas razones: los linfocitos no tienen la capacidad para crecer en cultivos *in vitro*, ya que no son líneas celulares establecidas; mientras que los mielomas son defectivos en la HGPRT, motivo por el cual no podrán sintetizar purinas. En presencia de aminopterina solo podrán sobrevivir las células que expresen HGPRT, es decir los hibridomas. Incubando las células fusionadas con medio HAT, se seleccionarán y proliferarán únicamente las células híbridas.

6. Identificación de los hibridomas provenientes de una única línea celular productora:

Luego de la fusión celular, debe monitorearse mediante microscopía óptica cada uno de los pozos conteniendo células, para identificar y seleccionar aquellas cavidades que manifiesten crecimiento de una única línea celular progenitora.

7. Screening de los AcMo producidos por los hibridomas seleccionados e identificación de los AcMo específicos para el antígeno inoculado:

La detección de anticuerpos en el medio de cultivo donde crecen los hibridomas es uno de los puntos críticos. Las técnicas utilizadas para este fin deben presentar alta sensibilidad y ser rápidas. Las técnicas más utilizadas con este propósito son los enzoinmunoensayos (ELISA), los fluoroinmunoensayos (FIA) y los radioinmunoensayos (RIA).

Una vez identificadas las líneas de hibridoma productoras de AcMo específicos para el Ag de interés, deben ser clonadas rápidamente para establecer clones productoras de Ac. El método de clonado más utilizado es el de dilución límite, el cual se basa en diluciones del cultivo original de forma de obtener una única célula por pozo de cultivo. Una vez identificados los clones, deben ser nuevamente monitoreados los AcMo que ellos producen, para finalmente seleccionar y amplificar los mejores clones.

8. Amplificación y preservación de los hibridomas productores de AcMo específicos:

Una vez identificados los clones productores de los AcMo específicos, los mismos deben amplificarse en recipientes de cultivo de mayor capacidad, para luego recoger las células mediante centrifugación. Finalmente, las mismas se resuspenden en el medio de congelamiento y se colocan en crioviales, los que son criopreservados en nitrógeno líquido. De esta forma, se dispone de las células productoras de AcMo de manera indefinida en el tiempo.

1.4 PRODUCCIÓN DE AcMo A MAYOR ESCALA

La producción de grandes cantidades de AcMo puede realizarse tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 4). Cuando se realiza la producción *in vivo*, los rendimientos son superiores, alcanzando concentraciones de Ac en el orden de mg/ml; mientras que la producción *in vitro* tiene menor rendimiento y permite recuperar AcMo en el orden de µg/ml. A pesar de eso, el cultivo de hibridomas *in vitro* permite trabajar en condiciones controladas y sin posibles contaminaciones debidas a la fuente (líquido ascítico).

La producción *in vivo* aprovecha la propiedad tumoral del hibridoma para cultivarlo en un huésped adecuado (habitualmente isogénico con la línea celular). El procedimiento para llevar a cabo esta producción requiere la inyección de células de hibridoma productoras de AcMo específicos en la cavidad abdominal del animal, generalmente ratones, y la recolección posterior del líquido ascítico que se desarrolla dentro de los 7 a 14 días posteriores. La cavidad abdominal es un sitio óptimo para el desarrollo de los hibridomas, dado que garantiza una temperatura constante, nutrientes óptimos, aporte de oxígeno, depuración de metabolitos tóxicos, entre otros. En este entorno tan favorable, los hibridomas pueden alcanzar altas densidades, lo que se traduce en altas concentraciones de AcMo.

En este procedimiento es necesario inyectar algún agente estimulado, como el Pristane, 7 días antes de la inoculación de los hibridomas. Este agente cumple múltiples funciones: suprime el sistema inmune para que los hibridomas puedan proliferar, genera irritación tóxica del peritoneo para favorecer la secreción de fluidos serosos y retarda la depuración de los hibridomas de la cavidad abdominal. Es decir que este agente prepara el entorno para que el hibridoma pueda proliferar. El rendimiento que este procedimiento permite es de aproximadamente 4 ml de ascitis por ratón con una concentración de Ac entre 1 y 28 mg/ml. El líquido ascítico es extraído por punción del abdomen del animal y luego debe ser purificado.

Por su parte, la producción *in vitro* se realiza mediante el cultivo de hibridomas y la cosecha de los sobrenadantes de cultivo. Estas células pueden crecer en distintos soportes, o incluso en biorreactores, y trabajar los cultivos en alta o baja densidad. No obstante, la cantidad de AcMo es 10 veces menor que la obtenida en ascitis.



Figura 4- Producción de AcMo.

Cualquiera sea el método empleado para la producción de AcMo a mayor escala, los mismos deben ser purificados del resto de contaminantes (provenientes de los fluidos biológicos o de los cultivos celulares) para poder recuperar las inmunoglobulinas específicas libres de cualquier impureza.

La metodología que generalmente se utiliza con este objetivo es la purificación por cromatografía de afinidad a proteína A; ya que permite recuperar anticuerpos con una elevada pureza y con un rendimiento muy importante en un único paso de purificación. Esta proteína tiene afinidad por la porción Fc de los Ac. La proteína A se acopla a una columna de *Sepharose* sobre la cual se hace pasar la muestra a purificar (ascitis o sobrenadante de cultivos) (Figura 5).

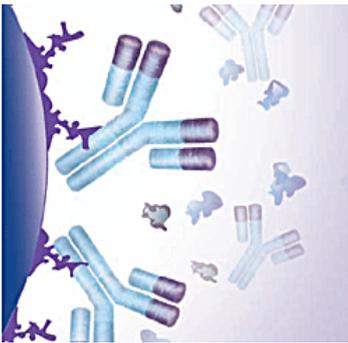


Figura 5- Purificación de Acs mediante cromatografía de afinidad a proteína A. Fuente: Bargal [Analytical Instruments](http://www.bargal.co.il/index2.php?id=9&productId=565&lang=ENG) (<http://www.bargal.co.il/index2.php?id=9&productId=565&lang=ENG>)

También es posible y muy eficiente, purificar tanto los AcPo como los AcMo empleando una cromatografía de afinidad, donde a la *Sepharose* está acoplado el Ag específico para el cual se obtuvieron los anticuerpos en lugar de la proteína A. En este caso, se obtendrán todos los anticuerpos que presenten afinidad por cualquiera de los determinantes antigénicos del antígeno (Figura-6).

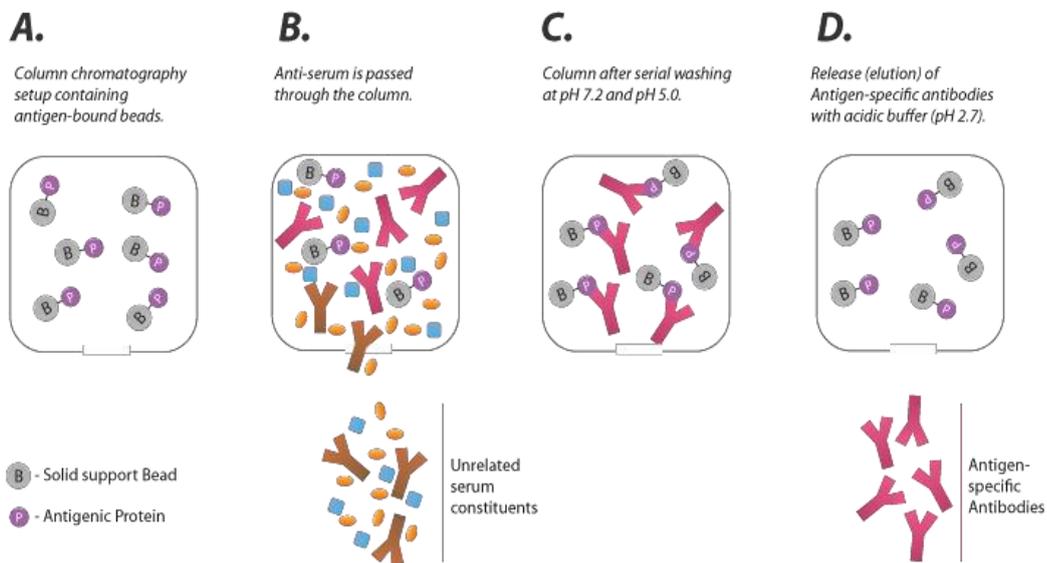


Figura 6- Purificación de anticuerpos específicos para el Ag de interés mediante cromatografía de inmunoafinidad. Peprotech: http://www.peprotechchina.com/enUS/Pages/ProtocolItem/Antigen_Affinity_Purification_of_Antibodies

1.5 DIFERENCIAS ENTRE ANTICUERPOS MONO Y POLICLONALES

Las principales diferencias entre los AcMo y los antisueros (anticuerpos policlonaes) derivan básicamente en que los primeros, por ser químicamente **homogéneos**, tienen las propiedades individuales de la proteína anticuerpo que lo compone, mientras que el antisuero tiene propiedades que son promedio entre las de sus componentes, siendo químicamente **heterogéneos**. Debido a estas características, podemos asegurar que los **AcMo son monoespecíficos** (reconocen un único epítope), mientras que los **AcPo son considerados poliespecíficos** ya que representan una mezcla de anticuerpos cada uno con una especificidad para un epítope diferente del antígeno en cuestión. Asimismo, los **AcMo presentan un único isotipo**, dado que son Ac homogéneos con características idénticas, mientras que en un **suero policlonal**, es posible encontrar anticuerpos que sean de **diferente isotipo**.

La **ESTABILIDAD** puede ser un inconveniente para los AcMo purificados, debido a que algunos de ellos son inestables a ciertos pH, no resisten la marcación o conjugación con enzimas, se inactivan rápidamente a temperatura ambiente o no resisten la descongelación o liofilización. Estos inconvenientes pueden ser salvados realizando estudios que permitan detectar aquellos AcMo que cumplan con las condiciones predeterminadas para su utilización. El antisuero, en cambio, no se ve afectado en el campo de la estabilidad, ya que como consecuencia de su heterogeneidad sólo una pequeña proporción de sus componentes podrá ser sensible a un tratamiento dado y no incidirá en sus propiedades promedio.

La **AFINIDAD** es otra característica importante. Para los antisueros, ésta es una propiedad promedio entre la de todos los anticuerpos que lo componen. Es suficiente que en un suero policlonal un porcentaje de la población de anticuerpos tenga alta afinidad para que el conjunto se comporte de esa manera. Contrariamente, los AcMo responderán a las características fisicoquímicas de su único componente. De esta forma, podrán tenerse AcMo de alta o baja afinidad. En cuanto a la producción de Acs, existe una diferencia importante, dado que la producción de **AcMo** puede realizarse **indefinidamente**, una vez que se han generado, caracterizado y criopreservado los hibromas productores de AcMo. Contrariamente, la producción de **AcPo es limitada**, ya que el pool de anticuerpos obtenidos en el suero del animal inmunizado es heterogéneo. Es decir, cuando ese antisuero se termina, no es posible obtener un antisuero con idénticas características.

Como consecuencia de lo recientemente explicado, los lotes de producción de **AcMo tendrán una calidad reproducible, contrariamente a lo que respecta a los lotes de AcPo**.

Finalmente, otra diferencia que no es menor es el tiempo de producción y obtención de los anticuerpos mono y policlonaes. **La producción de AcPo requiere de un tiempo menor**, comprendido generalmente entre 4 y 8 semanas, mientras que **la producción de AcMo comprende un tiempo de producción superior** de entre 3 y 6 meses. De acuerdo con el objetivo para el cual se producirán los anticuerpos y la urgencia en obtenerlos, se elegirá la producción de uno u otro anticuerpo. Asimismo, el costo de producción de ambos anticuerpos es diferente. Dado que **el proceso de obtención de AcMo** requiere de un tiempo superior e implica la generación de hibromas con todos los gastos ocasionados en laboratorios de cultivo resulta un proceso **más costoso**.

1.6 APLICACIONES DE LOS AcMo y AcPo

La propiedad de los anticuerpos de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco permite su utilización como herramientas esenciales en investigación biomédica y clínica, las cuales han probado ser invaluable para:

- **Identificación de marcadores fenotípicos únicos de tipos celulares particulares.** La base para la clasificación de los linfocitos y otros leucocitos es el reconocimiento de poblaciones celulares individuales por AcMo específicos. Estos anticuerpos son utilizados para definir marcadores de grupos de diferenciación (CD) para diversos tipos celulares.

- **Inmunodiagnóstico.** El diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y sistémicas se basa en la detección de Ags o Acs particulares en circulación o en los tejidos, mediante el uso de AcMo en inmunoensayos.

- **Detección de tumores.** Se utilizan AcMo específicos para la detección de tumores mediante técnicas que involucran marcación de tejidos con anticuerpos marcados y luego la visualización mediante microscopía (Figura 7).

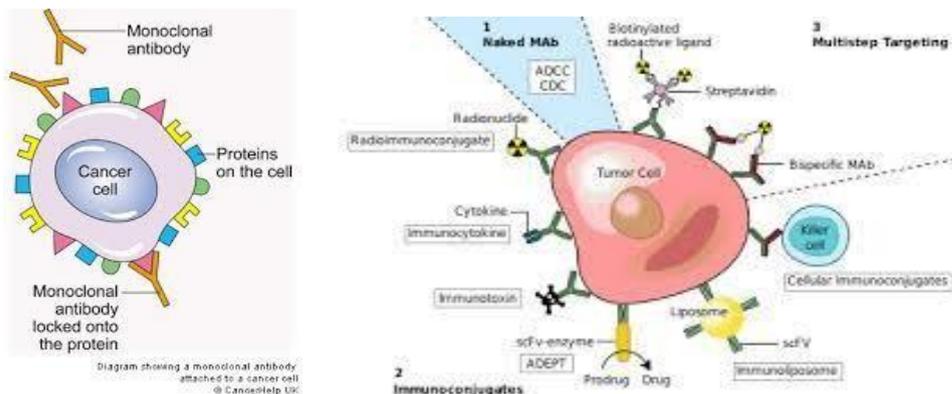


Figura 7- Empleo de AcMo para detección de tumores. : Modificado de Carter P (November 2001). "Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies". *Nat. Rev. Cancer* 1 (2): 118–29. doi:10.1038/35101072.PMID 11905803.

- **AcMo terapéuticos.** Los avances en la investigación médica han conducido a la identificación de células y moléculas que están implicadas en la patogénesis de muchas enfermedades. Un gran número de AcMo se utilizan como terapéuticos en la actualidad. Algunos ejemplos incluyen anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral (TNF), que se utiliza para tratar la artritis reumatoidea y otras enfermedades inflamatorias, los anticuerpos contra CD20 para el tratamiento de leucemias de células B, entre otros.

- **Análisis funcional de moléculas de la superficie celular.** En investigación biológica, los AcMo que se unen a moléculas de la superficie celular o bien estimulan o inhiben funciones celulares particulares representan herramientas muy valiosas para definir funcionalidad de moléculas de superficie, incluyendo los receptores para antígenos.

- **Purificació.** Los AcMo son también ampliamente utilizados para purificar poblaciones celulares seleccionadas a partir de mezclas complejas para facilitar el estudio de las propiedades y

funciones de estas células. Además son utilizados para la purificación de Ags para los cuales son específicos mediante cromatografía de inmutafinidad (Figura 8).

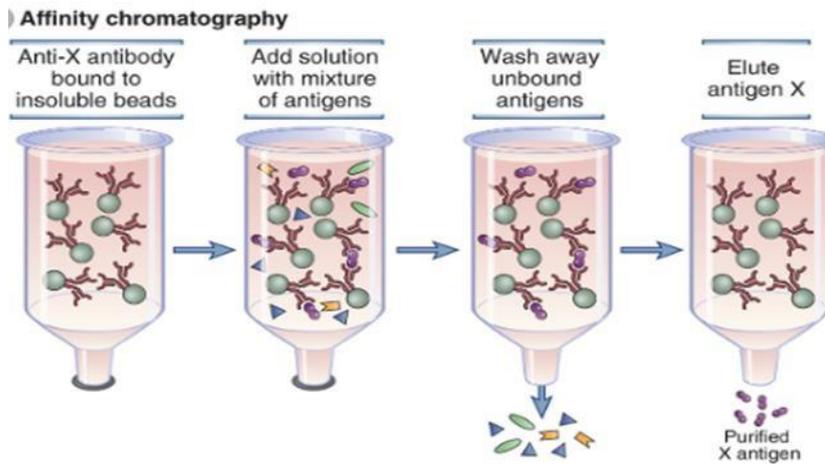


Figura 8- Empleo de AcMo para la purificación de Ags específicos mediante cromatografía de inmutafinidad. Abbas, K. Inmunitad celular y molecular (7º ED)-2012

• **Investigación básica y aplicada**, los AcMo y AcPo son ampliamente utilizados para identificar proteínas en diversas metodologías, como western blot, ELISA, RIA, Dot blot, FIA, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, entre otras. Asimismo, numerosos AcMo son conjugados a un fluoróforo para ser utilizados en microscopía de fluorescencia y en citometría de flujo (Figura 1 Seminario IV).

Dado que la mayoría de los AcMo son producidos en ratones, cuando los mismos empezaron a utilizarse en la terapéutica para el tratamiento de distintas enfermedades comenzaron a evidenciarse algunas limitaciones. Los pacientes tratados con estos AcMo de origen murino, desarrollaban anticuerpos anti-ratón, lo que se conoce como respuesta HAMA (*human anti-mouse antibody*). Estos anticuerpos pueden neutralizar el AcMo, aumentar su *clearance* o incluso generar reacciones de hipersensibilidad. Por otra parte, también puede ocurrir una ausencia de estimulación apropiada de los sistemas efectores humanos.

En general, todos los problemas recientemente mencionados anulan el efecto terapéutico de los AcMo debido a su inmunogenicidad.

Actualmente, la incorporación de las técnicas de biología molecular e ingeniería genética y proteica han permitido ampliar el horizonte de la generación de anticuerpos monoclonales y sus usos, y se han encontrado técnicas como la hibridación, la quimerización, la humanización y la producción de anticuerpos monoclonales totalmente humanos.

Ésta es una de las áreas de mayor crecimiento en la industria biotecnológica y farmacéutica. En el mercado se encuentran cerca de 29 anticuerpos monoclonales aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para uso en humanos. Actualmente existen numerosas variantes de anticuerpos terapéuticos construidos mediante ingeniería genética, que comprenden solo fragmentos pequeños específicos para el reconocimiento del antígeno: Fab, Fv, scFV, diabody, triabody, tetrabody, entre otros.

SEMINARIO II

METODOS BASADOS EN LA INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO. Parte 1

INTERACCIÓN ANTÍGENO – ANTICUERPO: GENERALIDADES

La interacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) es una interacción reversible, típica entre macromoléculas, que depende de la complementariedad de las estructuras del Ag y Ac, por lo tanto las fuerzas que facilitan esta unión son de tipo no covalente. Las interacciones que participan son: electrostáticas, hidrofóbicas, Van der Waals y puentes de hidrógeno (Figura 1). Estas uniones se producen entre el epitope o determinante antigénico y el sitio de combinación del Ac o paratope.

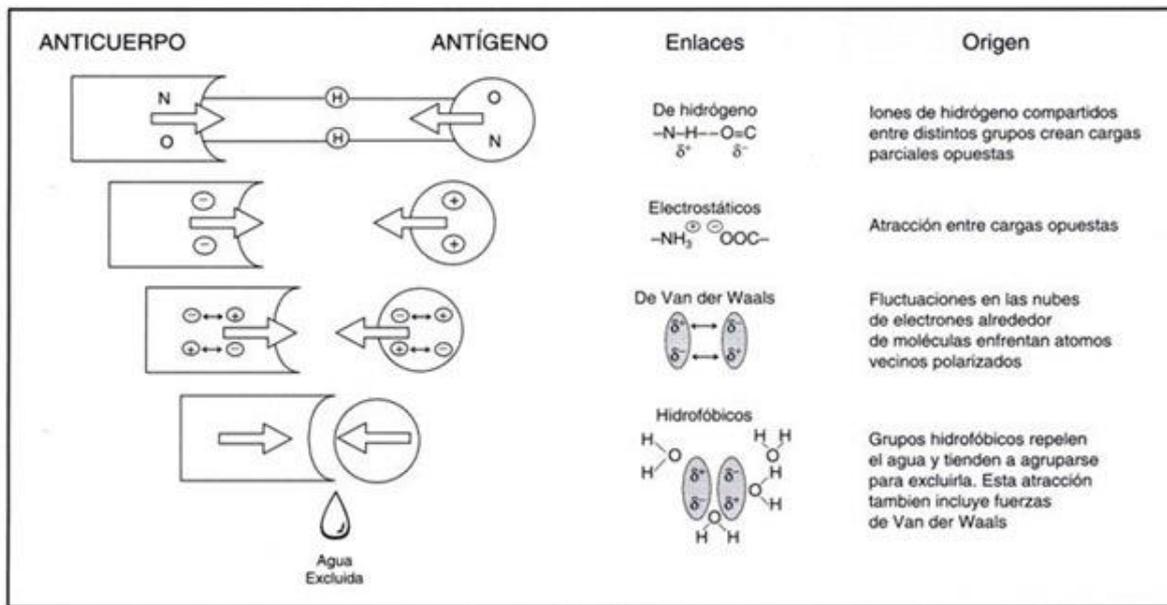
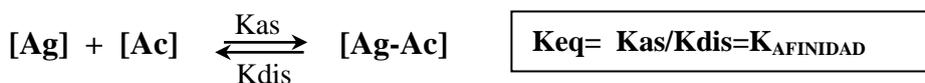


Figura 1- Fuerzas que operan en la interacción Ag-Ac. <http://epidemiologiamolecular.com/category/apuntes-de-inmunologia/moleculas-que-reconocen-ag/>

In vitro, la interacción entre un Ac y su correspondiente Ag ocurre en dos etapas. En un primer momento, la complementariedad existente entre paratope y epitope da lugar a la “interacción primaria”, la cual no es visualizable, de manera que su detección se realiza en forma indirecta.

En este tipo de interacción, si epitope y paratope se ponen en contacto el tiempo necesario hasta alcanzar el equilibrio, la velocidad de formación de los complejos Ag-Ac se iguala a la velocidad de disociación de los mismos, alcanzándose un estado de equilibrio dinámico. La AFINIDAD del paratope por su epitope es la suma de todas las fuerzas atractivas y repulsivas entre ambos, y se expresa como K de afinidad, según la ley de acción de masas:



En caso de que el Ac sea al menos bivalente, y el Ag sea multivalente, la interacción primaria se continúa con la “interacción secundaria”, en la cual los complejos Ag-Ac formados se agregan, formando una especie de red capaz de ser visible. En esta etapa es importante el control de la temperatura, el pH y la concentración salina.

En este caso la fuerza de interacción entre el Ag multivalente y el Ac en su totalidad se conoce como AVIDEZ y su valor está dado por la constante de avidéz (K_{av}) o “constante de afinidad media pesada o ponderada”, que corresponde al promedio de las afinidades pesada o ponderada por la concentración de los anticuerpos con cada afinidad. Aunque depende de las afinidades individuales de cada uno de los epitopes de ese antígeno su valor es mucho mayor que la suma de afinidades

Es decir, si consideramos la interacción de un Ag polivalente con 2 Ac, donde un Ac es una IgG y el otro una IgM, la avidéz de la IgM será mayor debido a su valencia más alta (Figura 2).

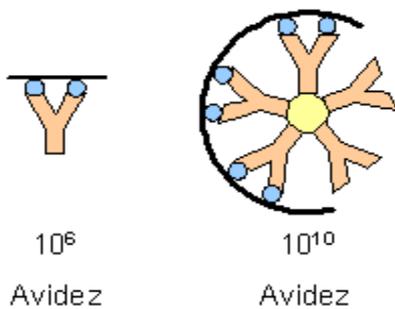


Figura 2- Esquema representando la interacción de un Ag multivalente con una molécula de IgG y una molécula de IgM.
<http://epidemiologiamolecular.com/category/apuntes-de-inmunologia/moleculas-que-reconocen-ag/>

La avidéz refleja mejor la situación fisiológica, mientras que la afinidad nos caracteriza lo que ocurre con cada tipo de anticuerpo concreto en su interacción con el epitope.

En general, las fuerzas involucradas en las interacciones Ag-Ac están afectadas por varios factores. Un pH y una concentración salina fisiológicos promueven una óptima unión. Las fuerzas de atracción tienden a ser más débiles en condiciones muy ácidas ($pH < 4.0$) o muy alcalinas ($pH > 10.0$). Altas concentraciones salinas también pueden disociar la interacción entre un Ag y su Ac específico. La velocidad de reacción aumenta conforme aumenta la temperatura (temperaturas superiores a $37^{\circ}C$ hasta un máximo de $50-55^{\circ}C$) debido al incremento en la movilidad cinética de los reactantes.

2.1 REACCIONES DE PRECIPITACIÓN

INTRODUCCIÓN

Cuando el Ag se encuentra en forma soluble y es multivalente, y el Ac está en solución y es al menos bivalente, las moléculas se unen formando un enrejado que se hace visible en la forma de un precipitado.

Si se adicionan, *in vitro*, cantidades crecientes de Ag a una cantidad constante de Ac, y se grafica la cantidad de inmunocomplejo formado vs la concentración de Ag, se obtiene una “Curva de precipitación”, en la cual se pueden observar tres zonas: exceso de Ac, zona de equivalencia y exceso de Ag (Figura 3).

En un primer momento, cuando la concentración de Ag es muy pequeña y hay exceso de Ac (zona de exceso de Ac) se forman complejos solubles y el Ac residual permanece en la solución. Al ir aumentando la cantidad de Ag se forma mayor cantidad de inmunocomplejos, observándose la precipitación en la zona de equivalencia, en la cual se forma la máxima cantidad de complejos Ag-Ac. Si se continúa incrementando la cantidad de Ag (zona de exceso de Ag) se produce la disociación del enrejado, solubilizándose el

precipitado por exceso de Ag.

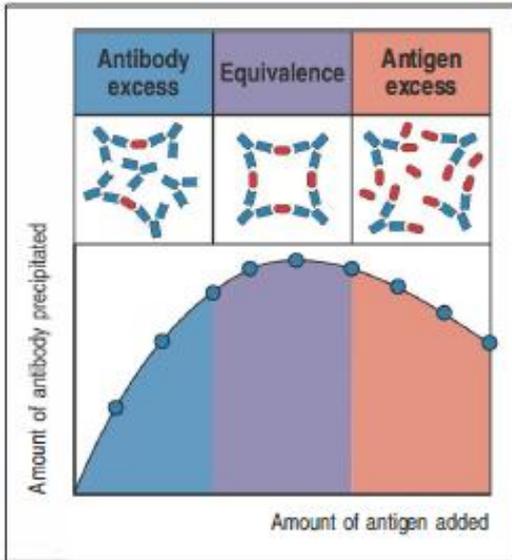


Figura 3- Curva de precipitación. Kenneth, M. (2012) *Janeway's Immunology*, 8th Edition.

Si bien las reacciones de precipitación pueden ocurrir en medio líquido o en medio semisólido-gelificado, sólo este último tipo de precipitaciones tienen aplicaciones en la actualidad.

2.1.1 PRECIPITACIÓN EN MEDIO SEMI-SÓLIDO O GELIFICADO

Esta metodología aprovecha la capacidad de las macromoléculas de difundir libremente a través de la trama de un gel. Esta difusión es directamente proporcional a la concentración del inmunorreactivo e inversamente proporcional a su peso molecular y a la concentración del gel (trama del mismo). Utilizando agar disuelto en electrolitos como soporte, es posible hacer migrar Ag y Ac de modo tal que al encontrarse en la zona de equivalencia, interaccionen formando líneas de precipitación (Figura 4). Estas bandas permanecerán estables a menos que un mayor flujo de moléculas provoque su redisolución.

Los soportes pueden ser diversos entre ellos se encuentran: agar, agarosa, poliacrilamida, acetato de celulosa gelatinizado

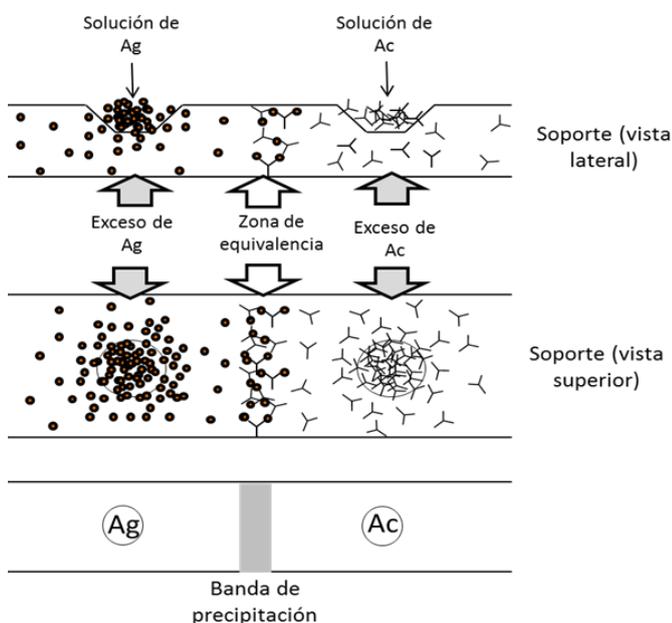


Figura 4- Análisis de la unión del Ag con el Ac por difusión en gel (Inmunodifusión radial). Kuby, J., *Immunology*, 5th edition.

Basándose en este principio se han desarrollado diferentes técnicas, las que podemos agrupar en *técnicas de difusión simple* y *técnicas de electroinmunodifusión*. Estas a su vez pueden ser cualitativas y/o cuantitativas.

Técnicas de difusión simple:

- ✓ Cualitativa: Doble difusión bidimensional o Técnica de Ouchterlony.
- ✓ Cuantitativa: Inmunodifusión radial simple (IDR) o Técnica de Mancini.

Técnica de electroinmunodifusión:

- ✓ Cualitativa: Inmunoelectroforesis.
Contrainmunoelectroforesis.
- ✓ Cuantitativa: Electroforesis en cohete o rocket.

2.1.1.1 TÉCNICA DE MANCINI O INMUNODIFUSIÓN RADIAL SIMPLE (IDR)

En 1965 Mancini introdujo la técnica de IDR. Este método cuantitativo consiste en colocar el Ag a cuantificar en pocillos practicados en un gel que contiene el Ac monoespecífico (específico sólo para el Ag a valorar). La ventaja del método es que permite el empleo de muestras complejas, como es el suero humano.

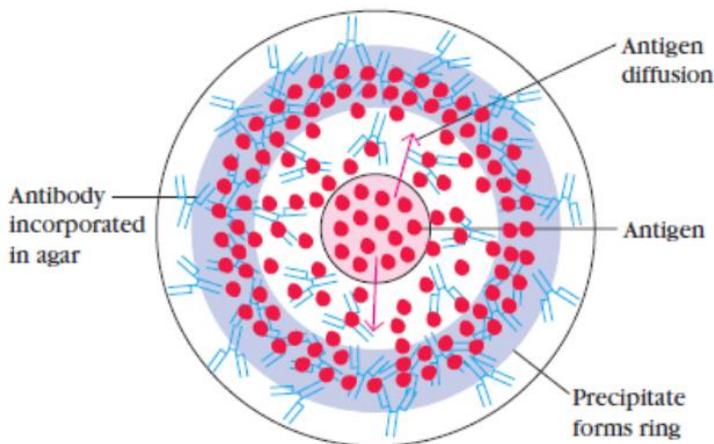


Figura 5- Diagrama que representa la inmunodifusión radial. Solo el Ag (rojo) difunde radialmente, el Ac (azul) está incorporado en el gel, formándose un halo visible en la zona de equivalencia. Kuby, J., Immunology, 5th edition.

A partir del momento de la siembra, los antígenos comienzan a difundir radialmente formándose un halo o anillo de precipitación en la zona de equivalencia (Figura 5). El diámetro del halo se correlaciona directamente con la concentración del Ag en la muestra. La concentración de Ag se determina refiriendo el diámetro alcanzado en una curva realizada en las mismas condiciones con el estándar en concentraciones conocidas (curva patrón) (Figura 6). De esta manera se grafica el diámetro del halo de precipitación en función de la concentración antigénica.

Algunas de las aplicaciones de esta técnica es la cuantificación de Igs (IgG, IgM, IgA), componentes del complemento (C3, C4) y otras proteínas séricas.

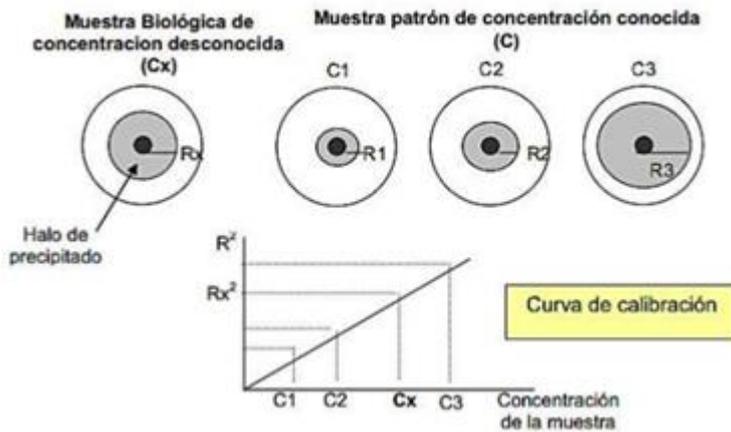


Figura 6- La Inmunodifusión Radial Simple permite la cuantificación de antígenos. <http://es.slideshare.net/silviaksh/precipitacion-31927445>

2.1.1.2 INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

Con la técnica de doble inmunodifusión bidimensional no siempre se pueden resolver mezclas de Ag altamente complejas. Uno de los métodos aplicados para tal fin es la IEF, la cual consiste en realizar, en primer lugar, la separación electroforética de los componentes de una mezcla de Ags en un soporte, para luego hacer difundir lateralmente un inmunosuero específico para dichos Ags. En el sitio de interacción entre cada uno de los Ags y su Ac específico aparecerá una banda de precipitación (Figura 7). La ubicación de cada banda dependerá de la movilidad electroforética y de la velocidad de difusión de cada Ag, así como del peso molecular y concentraciones de Ag y Ac, dando una información adicional sobre las características de la mezcla en estudio.

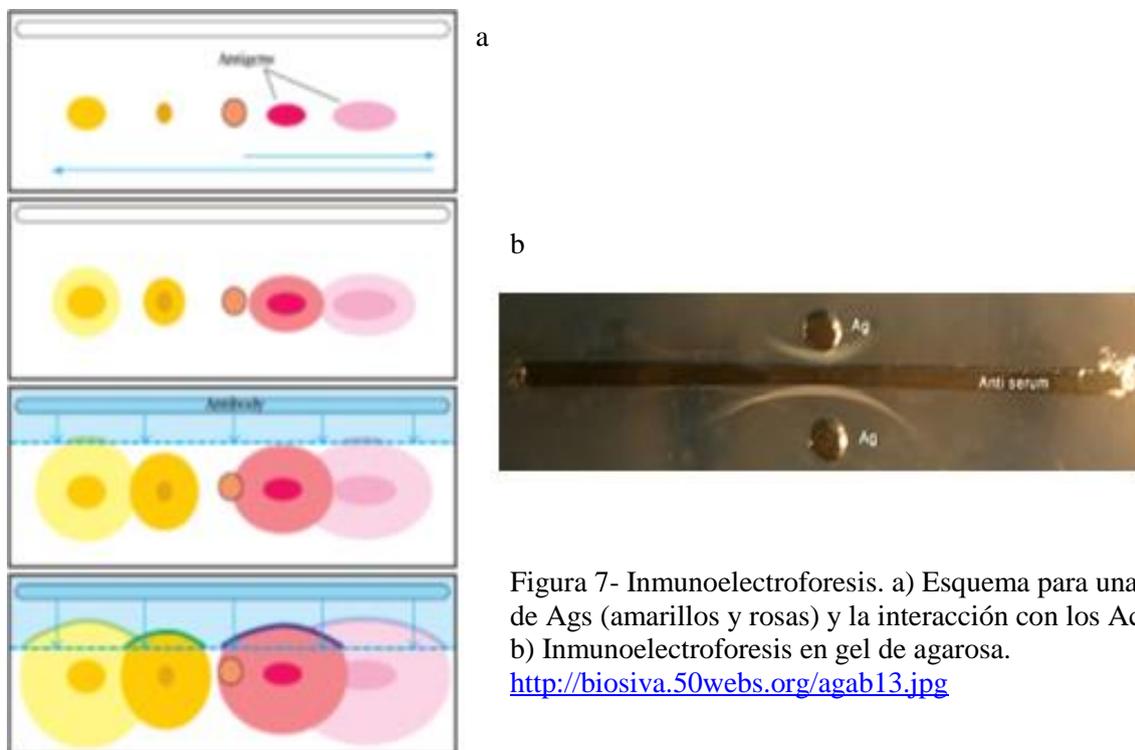


Figura 7- Inmunoelectroforesis. a) Esquema para una mezcla de Ags (amarillos y rosas) y la interacción con los Acs (azul). b) Inmunoelectroforesis en gel de agarosa. <http://biosiva.50webs.org/agab13.jpg>

Como el agar no es una sustancia absolutamente neutra, aparece junto con la electroforesis, un fenómeno denominado electroendósmosis. Este consiste en el movimiento del líquido que embebe al gel en el sentido opuesto a la corriente eléctrica. La intensidad de este efecto dependerá de la naturaleza del soporte utilizado.

2.2 REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

INTRODUCCIÓN

Cuando uno de los inmunorreactantes, ambos multivalentes, se encuentra en forma particulada y el otro en forma soluble, las moléculas se unen formando un enrejado que se hace visible en la forma de un aglutinado.

Las reacciones de aglutinación se producen entre:

Antígenos multivalentes que se hayan unido o que estén formando parte de la superficie de células, bacterias o partículas inertes (las partículas deben ser de un tamaño considerable para que sea visible la aglutinación).

Anticuerpos por lo menos bivalentes (con dos sitios activos de elevada afinidad).

Este tipo de reacciones son muy utilizadas en serología diagnóstica con fines cualitativos:

- Determinación de grupo sanguíneo
- Identificación de bacterias

O con fines semicuantitativos:

- Determinación del título de anticuerpos contra distintos agentes infecciosos
- Determinación del título de autoanticuerpos.
- Reacción de Coombs, titulación de Ac anti-Rh.

2.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

a- Aglutinación directa o activa: aquella donde el Ag se encuentra en la superficie, formando parte de la estructura nativa de la partícula (bacteria, célula, glóbulo rojo) (Figura 9-a). Este método se emplea para el diagnóstico serológico de infecciones bacterianas (brucelosis, salmonelosis) y determinación de grupo sanguíneo. En los seres humanos para determinar el tipo o grupo sanguíneo ABO se usa la aglutinación directa, y para ello se enfrentan los glóbulos rojos a tipificar con una batería de Acs específicos para los Ag de superficie del sistema ABO. Los Ags del sistema ABO que permiten establecer los grupos A, B, AB y O, están constituidos por cadenas de hidratos de carbono, donde la ausencia o presencia de un azúcar determina la diferencia entre los Ag (Figura 8).

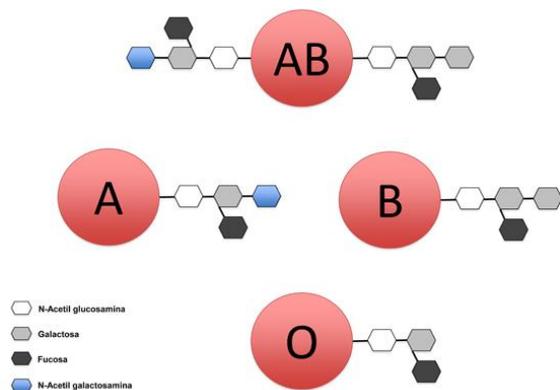


Figura 8- http://funcionsanguinea.blogspot.com.ar/2014/11/sistema-abo_30.html

Estos Ags son ubicuos y en cada individuo estimulan la formación de Acs contra el Ag que no está presente en sus propios glóbulos rojos (Tabla 1).

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Eritrocito				
Anticuerpos en plasma sanguíneo	Anti-B	Anti-A	Ninguno	Anti-A y Anti-B
Antígenos en los eritrocitos	Antígeno A	Antígeno B	Antígenos A y B	Ninguno

Tabla 1- <https://drleaz.files.wordpress.com/2011/06/cap2cla7gra1.png>

b- Aglutinación indirecta o pasiva: aquella donde el Ag se encuentra en solución y no forma parte de la superficie de una partícula, por lo tanto se la debe unir en primer lugar a un soporte, para luego realizar la reacción de aglutinación (Figura 9-b). Los soportes más utilizados son los glóbulos rojos, humanos o animales, partículas de látex, microcápsulas, poliestireno. En el caso de utilizarse como soporte glóbulos rojos (GR), estamos en presencia de una **hemoaglutinación indirecta**.

Generalmente las uniones de los Ags a los soportes son no covalentes y la fijación se hace por mezcla directa o previo acondicionamiento de la superficie de las partículas. Si se emplean glóbulos rojos y el Ag es de tipo **hidrocarbonado** o **lipopolisacárido** no se requiere intermediarios, por el contrario para Ag **proteicos** es necesario el tratamiento previo con ácido tánico o tratamiento con aldehídos (fórmico, pirúvico).

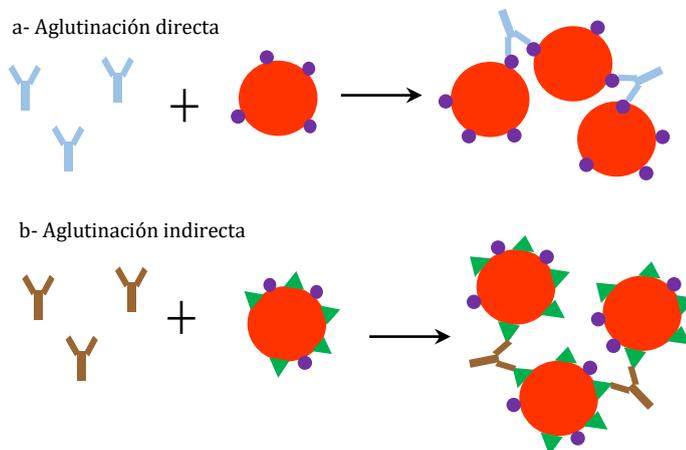


Figura 9- a- Aglutinación directa o activa. b- Aglutinación indirecta o pasiva

2.2.2 AGLUTINACIÓN CON FINES CUANTITATIVOS: TITULACIÓN

En las determinaciones semicuantitativas, la valoración del Ac consiste en determinar su título, es decir, la dilución máxima del mismo capaz de producir aglutinación con su antígeno específico. Para ello se realizan diluciones sucesivas de la muestra, generalmente al medio, y se le adiciona un volumen constante de la suspensión del antígeno (Figura 10). El título se expresa como la última dilución que presenta aglutinación o bien la inversa de ésta (Ej: 1/64 o 64).

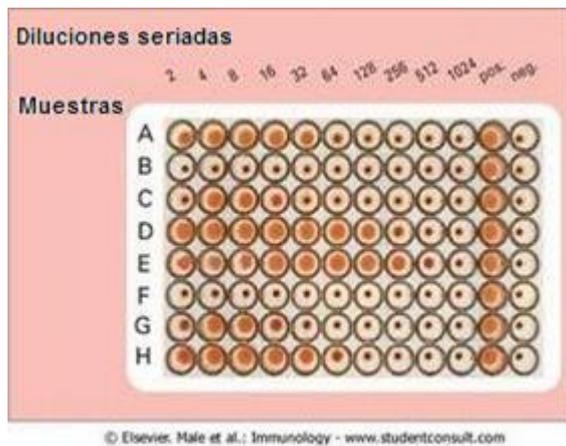


Figura 10. - Ejemplo de valoración de un suero. Hileras A-H: sueros, Filas 1-10: diluciones de los sueros, Filas 11 y 12: controles positivos y negativos.

<http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap18/ss3.htm> Pearson Education Inc, Benjamin Cunming 2004

Fenómeno de Prozona: En general, cuando se determina el título de un anticuerpo, el fenómeno de aglutinación decrece hasta hacerse nulo, como consecuencia de la disminución en su concentración debido a las diluciones efectuadas. No obstante, en algunos casos se observa un comportamiento particular, caracterizado por ausencia de aglutinación en los primeros pocillos de la serie, a pesar de tener la máxima concentración de anticuerpos, y con aglutinación positiva a diluciones mayores. Esto recibe el nombre “Fenómeno de Prozona”. Por otras metodologías, se ha demostrado que en esos primeros pocillos, aún en ausencia de aglutinación, el anticuerpo está unido al antígeno. Debido a que existe un marcado exceso de anticuerpo, respecto de los determinantes antigénicos, es muy poco probable que los dos sitios activos del anticuerpo puedan unirse a epitopes de dos partículas diferentes. Es decir, las moléculas de anticuerpo se unirían a los antígenos de la misma partícula, impidiendo así la formación de agregados.

Control de Anticuerpos Heterófilos: En las reacciones de aglutinación en las que se emplean glóbulos rojos como partícula aglutinante, es necesario hacer un control extra, llamado “Control de anticuerpos heterófilos” para cada muestra analizada. Esto se debe a la presencia, en el suero de algunos individuos, de anticuerpos que reaccionan frente a determinados antígenos distribuidos ampliamente en la naturaleza, llamados antígenos heterófilos. Un ejemplo de dichos antígenos es el Ag de Forssman, a menudo presente en los glóbulos rojos de algunas especies animales.

Este control se realiza con los glóbulos rojos sin sensibilizar y permite detectar las muestras que posean este tipo de Ac. En caso de resultar positivo el control de Ac heterófilos, se debe proceder a eliminar los Ac heterófilos permitiendo su adsorción a las partículas aglutinantes y realizando luego una centrifugación de las mismas.

También existen técnicas de inhibición, tanto de la aglutinación como de la precipitación, las cuales se utilizan especialmente cuando el Ac no es bivalente y/o el Ag no es multivalente. En consecuencia, no se establecen las interacciones necesarias para formar la red entre Ag y Ac. Por ejemplo, cuando el Ag a determinar es un hapteno, o el Ac empleado es un fragmento Fab.

Además, la inhibición de la aglutinación se puede utilizar también para calcular la concentración de Ag en una muestra, en particular cuando el Ag se encuentra en bajas concentraciones (Figura 11). Consiste en incubar cantidades constantes del Ag particulado con cantidades constantes del Ac bivalente específico. A esta mezcla, capaz de aglutinar, se la enfrenta con cantidades variables de Ag libre como competidor. A partir de una determinada concentración de Ag libre, se producirá una inhibición de la aglutinación por

competición del Ag libre por el Ac (que de esta manera no podrá unirse al Ag particulado para aglutinar). Si se realiza una curva de este tipo con una solución estándar de Ag libre se podrá calcular la concentración (micromolar, g/ml, etc) que inhibe la aglutinación. Luego, determinando qué dilución de Ag libre presente en una muestra biológica produce dicha inhibición de la aglutinación, será posible calcular la concentración de Ag libre en la muestra problema:

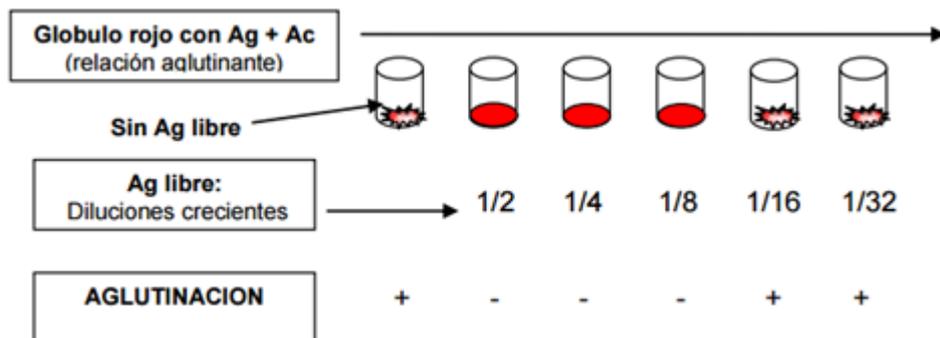


Figura 11- Esquema de una reacción de Inhibición de la Aglutinación

2.3 INMUNOTURBIDIMETRÍA E INMUNONEFELOMETRÍA

INTRODUCCIÓN

En los laboratorios actuales (ya sean analíticos, clínicos y/o de procesos tecnológicos) la inmunturbidimetría y la inmunonefelometría se han convertido en técnicas con una gran variedad de aplicaciones ya que permiten trabajar con muestras gaseosas, líquidas e incluso con sólidos transparentes. La formación de complejos inmunes (Ag-Ac) en suspensión suelen proporcionar muestras ideales para la aplicación de métodos ópticos basados en la dispersión de la luz.

FUNDAMENTO

Los métodos ópticos de análisis cubren un amplio campo de aplicaciones debido a su rapidez, a la gran gama de instrumentación disponible y sus grandes posibilidades de automatización. Estos métodos son aquellos en los que no hay intercambio de energía, sino cambios en la dirección o en las propiedades físicas de la radiación electromagnética. En nuestro caso particular, cuando un haz de luz choca con un complejo Ag-Ac en suspensión parte de la luz se dispersa, parte de la luz se refleja y parte de la luz se absorbe. La dispersión de la luz depende de: la longitud de onda de la luz, del tamaño de la partícula y del índice de refracción de la partícula en relación con el medio que lo rodea. La dispersión de la luz se puede medir por turbidimetría o por nefelometría.

DEFINICIÓN Y APLICACIONES

La **inmunturbidimetría** mide la disminución de la luz transmitida a través de una suspensión de complejos inmunes utilizando para ello un espectrofotómetro (detector en la misma dirección del haz de luz incidente, cuantificando la luz residual transmitida) (Figura 12). Se suele utilizar para soluciones concentradas, por ejemplo: determinación de una amplia variedad de proteínas en suero (transferrina, IgG, IgA, IgM, proteína C reactiva, fracciones C3 y C4 del complemento), LCR u orina (albúmina, opiáceos).

La **immunonefelometría** mide la luz dispersada en dirección distinta a la luz emitida (generalmente con ángulos que oscilan entre 15 y 90°). Utiliza como instrumento el nefelómetro en el que el detector se ubica con un ángulo que oscila entre 15 y 90° (Figura 12). Suele utilizarse en la caso de muestras diluidas.

La immunonefelometría es una técnica más sensible que la inmunoturbidimetría, pero esta última exaltada con partículas de látex podría tener sensibilidades similares a la primera.

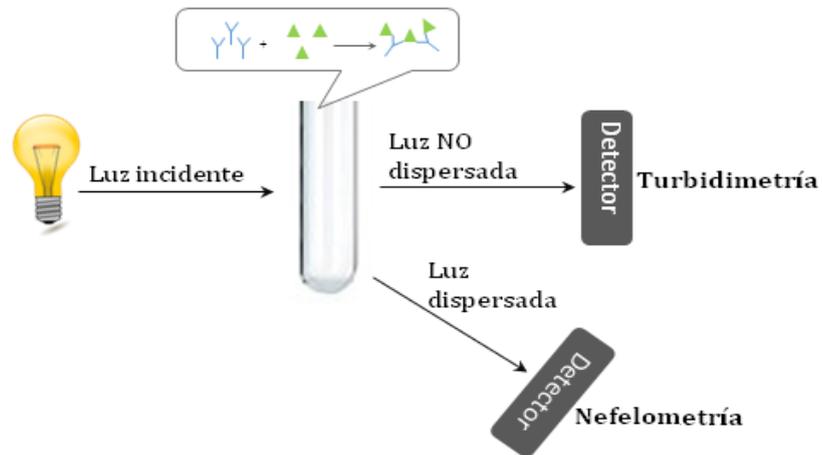


Figura 12- Fundamento de la nefelometría y turbidimetría.

SEMINARIO III

MÉTODOS BASADOS EN LA INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO. Parte 2

INTERACCIÓN ANTÍGENO – ANTICUERPO NO VISIBLE: GENERALIDADES

Como se desarrolló en el transcurso del primer seminario, en la interacción *in vitro* de un Ag con su correspondiente Ac se pueden distinguir dos etapas, En un primer momento, la complementariedad existente entre paratope y epitope da lugar a la “interacción primaria”, la cual **no es visible a simple vista**, de manera que su detección se realiza en forma indirecta, seguida de la “interacción secundaria”, caracterizada por la aparición de un fenómeno visible.

Existen una serie de técnicas que poseen **mayor sensibilidad**, que se basan en detectar de **manera indirecta** la “interacción primaria” y permiten la identificación de Ag o Ac, que por su baja concentración o por sus características fisicoquímicas no pueden detectarse aplicando técnicas directas como las de precipitación y aglutinación que se detallaron en el primer seminario. Estas técnicas son indirectas ya que utilizan Ag o Ac marcados y son más sensibles lo que permite aumentar la sensibilidad de los sistemas y detectar la interacción Ag-Ac no visible a simple vista. Dependiendo de la molécula utilizada para la marcación (enzimas, fluorocromos o radioisótopos), los inmunoensayos se denominan: inmunoenzimáticos, inmunofluorescentes e inmunoradiométricos, respectivamente. El empleo de una u otra marcación dependerá de las características de la sustancia a investigar. El reactivo, denominado **conjugado**, consta de un Ag o un Ac unido a una enzima, un fluorocromo o un radioisótopo.

Por otro lado, los inmunoensayos se pueden clasificar según el formato de medición del analito. La medición de la sustancia a investigar (Ag o Ac) en un inmunoensayo se puede realizar mediante un formato competitivo o un formato no competitivo. En los **inmunoensayos competitivos**, la concentración de analito es inversamente proporcional a la intensidad de la señal. El analito sin marcar (generalmente antígeno) en la muestra se determina por su capacidad para competir con el antígeno marcado. El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del antígeno marcado de unirse, ya que ese sitio de unión en el anticuerpo ya se encuentra ocupado. La concentración de antígeno en la muestra está inversamente relacionada con la intensidad de la señal que se mide en el formato competitivo (Figura 1). En los **inmunoensayos no competitivos** el Ac es generalmente el reactivo marcado, y la intensidad de la señal es directamente proporcional a la concentración de antígeno a determinar en la muestra. Esto puede representarse por medio de una curva de respuesta a la concentración (Figura 2).

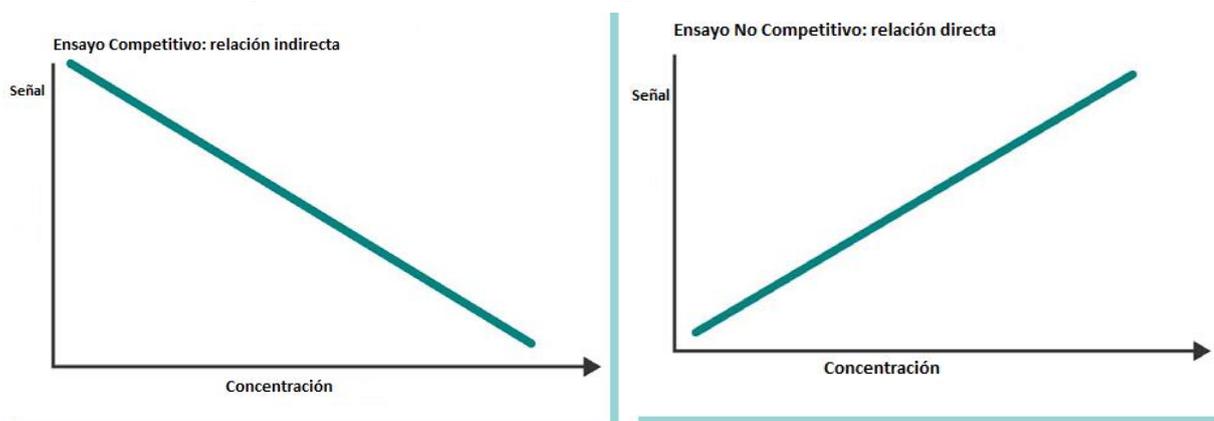


Figura 1- La concentración del analito está inversamente relacionada con la intensidad de la señal.

Figura 2- La concentración del analito está directamente relacionada con la intensidad de la señal.

3.1 INMUNOENSAYOS ENZIMÁTICOS

3.1.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

La detección de Ag o Ac se realiza mediante el empleo de enzimas unidas a uno de ellos. En este caso el conjugado puede ser tanto el Ag como el Ac unido a una enzima, que cataliza la reacción de conversión de un sustrato específico generando un producto soluble. La concentración del Ag o Ac se mide a partir de la intensidad de la señal.

Es una técnica de elevada sensibilidad y especificidad, de gran aplicación en diversas áreas de la bioquímica y de la biotecnología para la detección de Ag o Ac. La gran ventaja del ELISA sobre los otros métodos reside en que no requiere de equipamiento demasiado sofisticado para su implementación en el laboratorio. Además, los reactivos empleados son de una vida media muy alta en comparación con los empleados por otros inmunoensayos, por ejemplo los empleados para radioinmunoensayos.

Clasificación de ELISA

-ELISA No Competitivos: se diferencian los siguientes esquemas (Figura 3):

ELISA directo: en el sistema de detección se utiliza un único inmunorreactante (Ag o Ac), el cual está marcado. Por ejemplo: para detectar la presencia de un Ag, se utiliza un Ac específico marcado, así la reacción se realiza en un solo paso.

ELISA indirecto: el sistema de detección emplea dos anticuerpos. Un primer Ac, específico hacia el Ag, denominado Ac primario, y un segundo, específico hacia el Ac primario, denominado Ac secundario marcado.

ELISA sándwich: un Ac inmovilizado en fase sólida captura al Ag en solución. Posteriormente, otro Ac (segundo Ac) reconoce al Ag capturado. Dependiendo del sistema de detección, se denominan ELISA sándwich directo o indirecto. Esta técnica es de elección cuando se desea cuantificar un determinado antígeno.

-ELISA Competitivo: generalmente se emplea para la determinación de antígenos, para ello se debe inmovilizar un Ac en fase sólida que tenga especificidad hacia el Ag a detectar. Posteriormente, se agrega simultáneamente la muestra (Ag a analizar) y una concentración conocida del mismo Ag marcado con una enzima, el cual va a competir con el Ag de la muestra. La señal de densidad óptica (DO) obtenida en este tipo de ensayo es inversamente proporcional a la concentración de Ag desconocida.

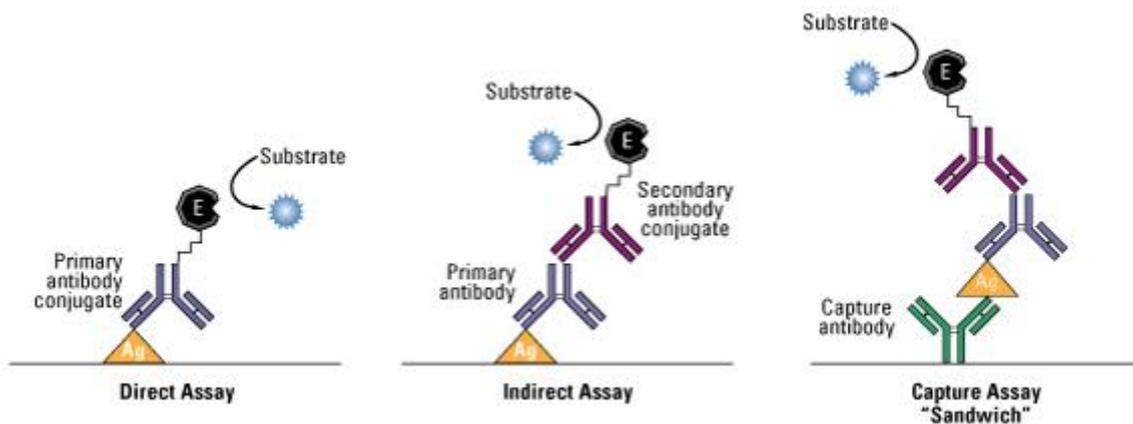


Figura 3- Esquemas representativos de distintos tipos de ELISA no competitivos.

<http://www.piercenet.com/method/overview-elisa>

Las técnicas de ELISA pueden llevarse a cabo en fase líquida o sólida, siendo esta última la más utilizada. En todos los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida, independientemente de las múltiples estrategias que pueden ser utilizadas, se pueden distinguir diversas etapas.

Etapas generales de un ensayo de ELISA

1) Inmovilización de uno de los reactantes (Ag o Ac) en fase sólida

Las superficies de los soportes deben presentar alta capacidad de unión del inmunorreactante y producirse una mínima disociación y desnaturalización de las moléculas durante el ensayo. Existen soportes compuestos de diversos materiales, tales como celulosa, nitrocelulosa, poliestireno y cloruro de polivinilo, siendo estos dos últimos los más utilizados.



Figura 4- Microplacas de poliestireno de 96 pocillos

Estas superficies plásticas pueden presentarse en forma de esferas, discos, tubos o placas de múltiples pozos o policubetas (Figura 4).

La inmovilización del inmunorreactante en fase sólida puede ser covalente o no covalente. En la mayoría de los casos la inmovilización es mediante uniones no covalentes. La unión covalente se utiliza sólo en los casos en que no es posible la adsorción. La máxima cantidad de inmunorreactante que se puede adsorber se denomina "capacidad de saturación" de la placa. Este valor está en el orden de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ para una amplia variedad de Ag y Ac. Concentraciones más elevadas producen adsorción en múltiples capas lo que interfiere en las posteriores etapas del ensayo.

Los factores que influyen en el proceso de adsorción son temperatura, tiempo, pH y concentración de los reactivos. Generalmente, esta unión se realiza incubando toda la noche a 4°C o 2h a 37°C. Los inmunorreactantes se diluyen en solución de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 o buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6.

2) Bloqueo de los sitios libres

Se deben bloquear los sitios libres de la placa luego de la inmovilización del inmunorreactante, para evitar uniones inespecíficas. Las soluciones de bloqueo más utilizadas son caseína, gelatina, albúmina sérica bovina, leche descremada.

3) Incubación con la muestra a estudiar y controles

En los ensayos de ELISA se deben realizar réplicas de la muestra a investigar y de los controles. Estos últimos son fundamentales incluirlos en el ensayo para su validación. Se deben realizar siempre controles positivos y negativos. La muestra a evaluar debe diluirse en solución tamponada. La dilución óptima será establecida previamente realizando una curva dosis-respuesta con diferentes diluciones de la muestra, manteniendo el resto de las variables constantes. La dilución óptima será aquella que se obtenga en la zona de mayor sensibilidad de la curva obtenida.

4) Incubación con el conjugado enzimático

Se llama conjugado enzimático, a un inmunorreactante, ya sea un Ac o un Ag, unido a una enzima y se utiliza para visualizar el complejo antígeno-anticuerpo. El conjugado enzimático debe tener especificidad hacia el inmunorreactante a estudiar. Independientemente de la molécula que se marque con la enzima, un buen conjugado debe reunir las siguientes características:

- Debe tener una composición definida y homogénea así como una elevada pureza
- Presentar estabilidad durante el almacenamiento por períodos prolongados
- De fácil obtención y sin pérdida de la actividad enzimática e inmunológica
- Estable en las condiciones de reacción y de fácil detección.

Las enzimas comúnmente empleadas para marcar el inmunorreactante son peroxidasa y fosfatasa alcalina, las cuales emplean sustratos específicos. Los sustratos a utilizar deben ser solubles en agua, inodoros, incoloros y de baja toxicidad, presentar estabilidad durante su almacenamiento, presentar un amplio rango de linealidad entre el color desarrollado y la concentración enzimática. Cuando estas enzimas son usadas en ELISA, se debe tener en cuenta que el producto coloreado debe ser soluble.

Peroxidasa:



- # Utiliza peróxido de hidrógeno como sustrato junto con el cromógeno:
 - tetrametilbencidina (TMB) para generar un producto soluble de color celeste
 - *o*-fenilendiamina (OPD) para generar un producto soluble de color amarillo.

Fosfatasa alcalina:



- # Utiliza *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) como sustrato para generar un producto soluble de color amarillo.

Luego de cada uno de los pasos descriptos anteriormente (1-4) se deben realizar lavados para eliminar el remanente del reactivo utilizado en cada etapa. La solución de lavado más comúnmente utilizada es PBS suplementado con Tween 20 (detergente no iónico).

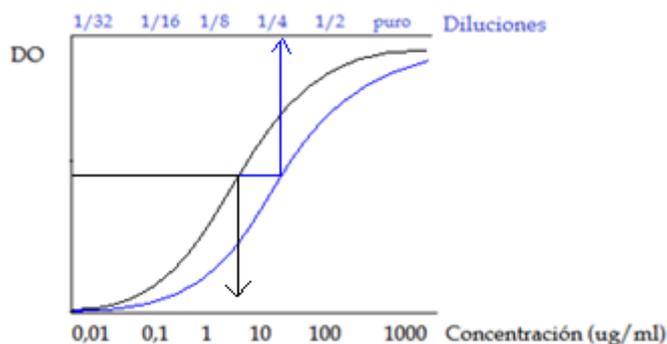
5) Revelado:

Para visualizar el complejo antígeno-anticuerpo se deben agregar los sustratos correspondientes para que se produzca la reacción de color. Se debe frenar dicha reacción con el agregado de ácido sulfúrico 2 N. El color desarrollado puede observarse visualmente, pero la intensidad de color debe cuantificarse mediante los equipos adecuados (fotocolorímetro, espectrofotómetro, lector de placas de ELISA). El sistema de detección más utilizado es el colorimétrico sin embargo existen otros sistemas los cuales depende del tipo de sustrato que emplee la enzima: fluorescentes, lumiscentes. *Ver en detalles en el apartado 3.1.4. Sistemas de Detección del Inmunocomplejo.*

Procesamiento de datos y expresión de resultados

Las distintas clasificaciones del ELISA se pueden emplear para obtener resultados cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos.

ELISA Cuantitativo: estos ensayos permiten obtener un valor de la concentración del inmunorreactante en estudio. Los resultados se pueden expresar en unidades de concentración (p. ej., mg/ml) o en unidades arbitrarias o internacionales, calculados a partir de una curva realizada con un estándar (Figura 5). Partiendo de la base de que una misma absorbancia es producida por cantidades equivalentes de Ac, será posible calcular la cantidad de Ac incógnita por comparación con el Ac patrón. El valor de absorbancia para realizar la interpolación debe estar en la zona lineal de las curvas de titulación de los Ac. Para que sea posible comparar el comportamiento de la muestra y el estándar, las curvas de titulación deben ser paralelas. Mediante interpolación de ambas curvas y aplicando la siguiente fórmula se puede obtener la concentración en la muestra incógnita (C_M) a partir de la concentración del estándar (C_E).



$$C_M = C_E \times 1/\text{dilución}$$

$$C_M = 6 \mu\text{g/ml} \times 4$$

$$C_M = 24 \mu\text{g/ml}$$

Figura 5- Representación curvas dosis-respuesta. Reactivo estándar (DO vs Concentración ($\mu\text{g/ml}$)). Muestra (DO vs Diluciones).

ELISA Semi-cuantitativo: en estos ensayos se calcula el título de Ac como medida semi-cuantitativa. Se utiliza la **Titulación a punto final**. Consiste en analizar diluciones seriadas de la muestra incógnita. El título corresponderá a la mayor dilución (o inversa de la dilución) que resulte positiva para la línea de corte o *cut-off* (ver definición más adelante). Es importante tener presente que el título de Ac es la resultante de su afinidad y su concentración.

ELISA Cualitativo: hace referencia a aquellos casos en los que sólo se quiere conocer la presencia o ausencia del inmunorreactante. En estos casos se realiza el ensayo, se obtiene un valor de DO y, en función del valor línea de corte o *cut-off*, se clasifica a la muestra positiva o negativa según se trate de un ensayo de tipo competitivo o no competitivo.

Valor de corte o *cut-off* de una técnica de ELISA: se define como aquel valor límite de DO según el cual una muestra es considerada positiva o negativa.

Algunas de las formas para establecer el *cut-off* son:

~ **promedio DO muestra / promedio DO de sueros negativos > 2 o 3**

~ **promedio DO de sueros negativos + 2 o 3 desviaciones estándar**

~ ***Distribución de frecuencia***: El punto de corte puede establecerse empíricamente por inspección visual de las distribuciones de frecuencia de los resultados del ELISA con muestras de referencia positivas y negativas.

~ ***Curvas ROC***: la determinación del *cut-off* se basa en análisis de las características de tipo receptor-operador (ROC) teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad que se requiere que posea el método. Por ejemplo, existen situaciones en las que se requiere disponer de un ELISA para un test diagnóstico altamente sensible (tamizaje de enfermedades) o bien un ELISA altamente específico (confirmación de enfermedades). En tales circunstancias, no es aconsejable utilizar el punto de corte de máxima sensibilidad y especificidad (identificado por índice de Youden), por el contrario, resulta más útil conocer los valores de sensibilidad y especificidad determinados por los diferentes puntos de corte, y optar por aquel que determine la mayor sensibilidad, o la mayor especificidad, según sea el objetivo del método.

3.1.2 INMUNOBLOTTING: WESTERN BLOT, DOT BLOT Y SLOT BLOT

Western blot o Inmunoelectrotransferencia

Esta técnica combina la separación por electroforesis en geles con la especificidad de la detección inmunoquímica. Puede usarse para determinar la masa molecular relativa de una proteína y explorar su comportamiento dentro de una mezcla compleja de proteínas. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se separan las proteínas de una muestra compleja de acuerdo con su diferente masa molecular. Se puede verificar la electroforesis tiñendo los geles de poliacrilamida con colorantes como por ejemplo Coomassie Blue. En caso que las proteínas del gel sean teñidas luego no son aptos para la transferencia. Por lo tanto muchas veces es recomendable realizar una electroforesis empleando dos geles, de los cuales uno se tiñe (para verificar la correcta electroforesis) y el otro no, para posteriormente poder transferir las proteínas a membranas con alta capacidad de adsorción (nitrocelulosa, polivinildifluoruro conocido como PDVF, entre otras). Es necesaria la transferencia porque trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana tiene ventajas sobre el emplearlas dentro del gel. Para controlar la transferencia requerida en *western blot* se emplean técnicas de tinción de proteínas. Existen diferentes métodos para teñir las proteínas presentes en la membrana. Los colorantes que permiten teñir las proteínas en los geles de poliacrilamida no son utilizables en las membranas pues se unen inespecíficamente. Para teñir las proteínas en la membrana se emplean: Rojo Ponceau, Tinta china o Negro amido, entre otros. Alguno de estos colorantes permiten continuar con el proceso de inmunodetección, mientras que otros como el negro amido es incompatible con la inmunodetección posterior. Una vez que las proteínas se encuentran adheridas a la membrana se incuban con anticuerpos específicos. La detección puede ser de manera directa mediante aplicación de anticuerpo conjugado específico al antígeno o de manera indirecta empleando un anticuerpo primario que se detectan añadiendo anticuerpos secundarios anti-Ig conjugados con una enzima, seguido de la aplicación de un sustrato adecuado para la enzima, el cual genere un producto insoluble. De este modo, se produce un precipitado coloreado al añadir el cromógeno en la zona correspondiente al antígeno a detectar en la muestra compleja. A diferencia del ELISA, el resultado obtenido por *western blot* es visual y,

por lo tanto, no sirve para realizar cuantificaciones, sino que sólo permite obtener información sobre el peso molecular, complejidad antigénica e inmunoreactividad con alto grado de sensibilidad.

Dot blot y Slot blot

Existen otros métodos de transferir o aplicar proteínas sobre una membrana. Lo más sencillo es aplicarlas directamente sobre la membrana en forma de una pequeña gota de una solución concentrada. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana. Existen dispositivos que facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana, aplicando una succión que facilita la penetración de la solución, y reciben los nombres de “dot blot” o “slot blot” en función de que la proteína quede aplicada en forma de una gota circular o de una línea. Así, luego del revelado, se verán manchas circulares o en forma de línea, respectivamente.

Todo procedimiento de blotting consta de varias etapas (Figura 6):

- Inmovilización del antígeno sobre la membrana, ya sea mediante transferencia (capilar, por difusión, electroforética) o mediante aplicación directa.
- Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos.
- Incubación con la muestra (posibles anticuerpos contra el antígeno de interés).
- Incubación con un anticuerpo secundario, que actúa como ligando del anticuerpo primario, unido a enzimas u otros marcadores.
- Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

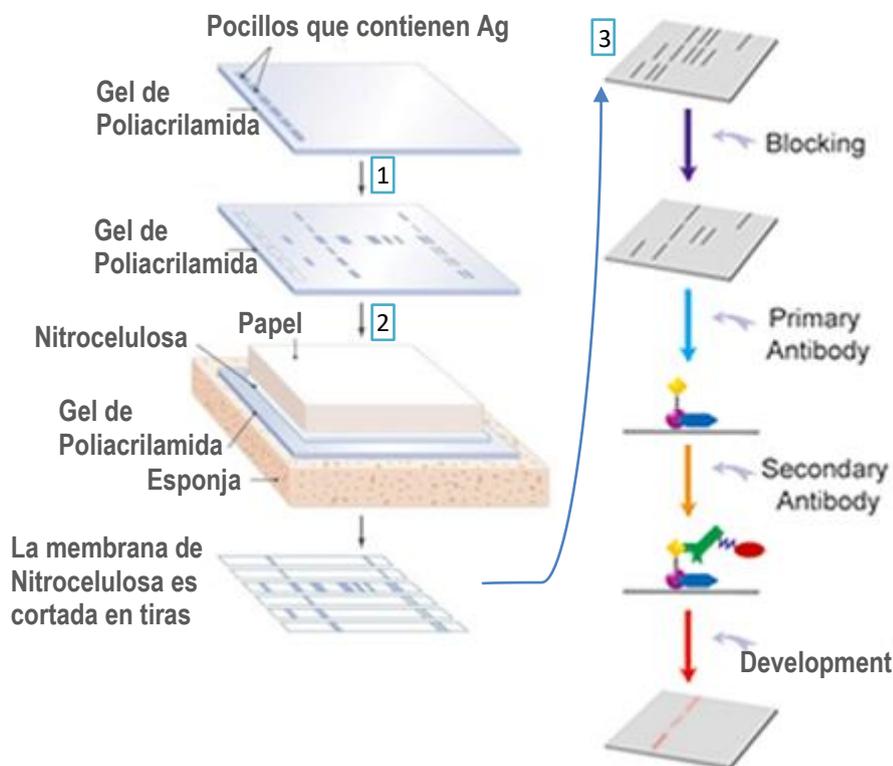


Figura 6- Representación esquemática de los pasos de western blot. 1. Electroforesis, 2. Transferencia, 3. Inmunorevelado. : http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/17_immune_applications.htm y <http://www.tata-box.com/>

3.1.3 INMUNOCITOQUÍMICA-INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunocitoquímica (ICQ) consiste en la detección de un antígeno en extendidos de células mientras que la inmunohistoquímica (IHQ) consiste en la detección de un antígeno en secciones de tejido a través de interacciones antígeno-anticuerpo específicas que finalizan con la unión de un marcador. Este marcador permite localizar al antígeno respecto de la estructura celular y del tejido (en el caso de cortes histológicos). La ICQ/IHQ son técnicas muy específicas, relativamente rápidas y sensibles pudiendo determinarse mediante con microscopía óptica (técnicas inmunoenzimáticas), microscopía de fluorescencia (inmunofluorescencia) y microscopía electrónica. Estas técnicas se aplican tanto en el área de investigación como en la clínica, por ejemplo, en el estudio de marcadores tumorales, en la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias, en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes.

Básicamente, el procedimiento es similar al descrito para la técnica de ELISA, con algunas consideraciones adicionales relativas al manejo de tejidos o células (Figura 7).

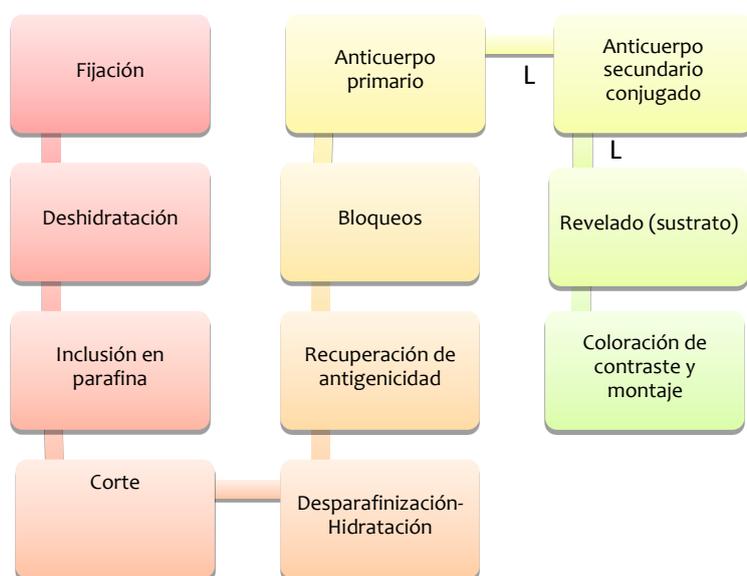


Figura 7- Esquema general del protocolo de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina. L: Lavado.

1. Preparación de las muestras

Como se mencionó anteriormente, las muestras para ICQ son células mientras que para IHQ son tejidos. La preparación de las mismas debe seguir los mismos criterios que se aplican en otras técnicas histológicas: el grado de conservación de la morfología debe estar de acuerdo con la resolución del microscopio que se utilizará para su análisis, pero además, debe conservarse la estructura del epítipo que se busca detectar, reteniendo su capacidad de unión al Ac y su posición dentro de la célula. Las muestras pueden ser fijadas o no.

Preparados citológicos: Las técnicas de inmunorrevelado pueden aplicarse a cualquier muestra citológica, incluyendo fluidos biológicos como líquido pleural, ascítico, orina, lavados gastrointestinales y del tracto respiratorio. Si bien la preparación del material depende de la muestra en cuestión y del antígeno a ser demostrado, la técnica consiste, básicamente en:

- Obtención de las células por centrifugación

- Lavado con solución buffer para eliminar componentes del fluido que puedan interferir en la técnica de inmunocitoquímica.
- Preparación de los extendidos en forma manual o mediante citocentrífuga, sobre portaobjetos. Es conveniente tratar los portaobjetos con aminopropil-tri-etoxi-silano (APES) o polilisina para facilitar la adhesión de las células al vidrio.
- Los preparados pueden secarse, aunque este procedimiento, en algunos casos puede disminuir la reactividad de algunos antígenos.
- Fijación: puede realizarse después de la confección del preparado o bien después del lavado de las células (Ver “Fijación” en la sección siguiente).

Preparados histológicos: la preparación de muestras de tejidos para inmunohistoquímica comprende las siguientes etapas:

• **Fijación:** este procedimiento estabiliza las células contra la deshidratación y las protege durante la inclusión, el corte y la tinción. Existen diferentes tipos de fijadores químicos como por ejemplo aldehídos, mercuriales, alcoholes, agentes oxidantes y picratos. La fijación puede alterar la capacidad de unión del Ag al Ac, como consecuencia de la desnaturalización que las proteínas sufren en este paso. Por ello, la técnica de fijación debe ser elegida cuidadosamente para conservar la actividad antigénica. Existen estrategias de recuperación de la antigenicidad como por ejemplo, el tratamiento con alta temperatura en microondas o los tratamientos enzimáticos. Por otro lado, una fijación deficiente, o una demora en la fijación, puede producir pérdida de antigenicidad o difusión de los antígenos en el tejido circundante.

• **Deshidratación:** se coloca la muestra en alcoholes de concentración creciente para eliminar el agua que contenga ya que la parafina no es miscible con agua. Se utiliza etanol 70%, 80%, 96% y 100%.

• **Inclusión:** la parafina es el medio más usado para incluir tejidos para análisis histológicos y es empleado satisfactoriamente para inmunohistoquímica. El procedimiento de inclusión en parafina requiere la deshidratación del material, lo que se logra mediante pasajes sucesivos por alcoholes de graduación creciente. Una vez que el tejido se encuentra embebido en parafina se procede a confeccionar el taco. El taco es un bloque de parafina de forma regular que contiene el tejido en su interior y que permite realizar los cortes con el micrótopo. Existen otros medios de inclusión como resinas epoxi o acrílicas, cuyo uso está menos difundido, y que pueden emplearse alternativamente a la parafina. Existen antígenos que no resisten la fijación con aldehídos y/o la inclusión en parafina, y que sólo son detectables en cortes congelados. El congelamiento del tejido permite una buena conservación de la morfología y evita el uso de fijadores aldehídicos, manteniendo la capacidad de los Ag de unirse a los Ac.

• **Corte:** los cortes de tejidos incluidos en parafina se realizan con un micrótopo y para tejidos congelados se emplea un crióstato. Los cortes deben ser delgados (aproximadamente 5 μm) y de espesor uniforme en todos sus puntos. Para que las secciones de tejido no se despeguen del portaobjetos durante la realización de la técnica de IHQ, se utilizan portaobjetos tratados con APES o polilisina.

• **Desparafinización y rehidratación:** antes de proceder al inmunorrevelado de las muestras, debe retirarse la parafina y volver el tejido a un medio acuoso. Para esto, se elimina la parafina con xilol y se realiza el proceso inverso a la deshidratación, Se debe hidratar el tejido ya que la mayoría de los colorantes son de base acuosa. Para ello se coloca el portaobjeto en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes. Etanol 100%, 96%, 80%, 70% y agua destilada

• **Recuperación antigénica:** la reactividad de muchos antígenos puede ser alterada por la fijación, lo que puede ocasionar que no puedan ser reconocidos por los anticuerpos. El formaldehído, uno de los fijadores más utilizados, induce la formación de uniones cruzadas entre proteínas o entre proteínas y ácidos nucleicos, ocasionando el enmascaramiento de muchos determinantes antigénicos. Por otra parte, el efecto

de la deshidratación y la temperatura de inclusión en parafina, también pueden afectar la conformación o estabilidad de los antígenos tisulares. Los determinantes antigénicos que han sido ocultados o alterados pueden ser desenmascarados, recuperando su conformación mediante tratamientos proteolíticos o métodos físicos como el calor o ultrasonido.

2. Bloqueos

El objetivo del bloqueo es disminuir o eliminar la tinción de fondo provocada por unión inespecífica de los anticuerpos o de algún componente del sistema de revelado al tejido. Algunos agentes bloqueantes son: albúmina sérica bovina, leche descremada, gelatina así como agentes surfactantes como el Tween 20.

La inhibición de la unión inespecífica del Ac secundario se realiza, generalmente, con suero del animal en que fue desarrollado dicho Ac, agregado antes del Ac primario.

Además, algunos tejidos poseen la enzima que va a ser utilizada en el sistema de revelado, por lo tanto debe inhibirse esa actividad endógena. Tal es el caso de la peroxidasa que se encuentra normalmente en hematíes, macrófagos y tejidos tumorales; la biotina, en tejidos normales de hígado, bazo o riñón; la fosfatasa alcalina, presente en tejido intestinal y en tejidos congelados.

3. Lavados

Al igual que en la técnica de ELISA, los reactivos débilmente unidos o no unidos deben eliminarse mediante lavado. Para esto se utilizan soluciones buffer (PBS, TBS) que pueden suplementarse con detergentes como Tween-20.

4. Incubación con el Ac

Se debe incubar con un anticuerpo que sea específico para el antígeno a detectar. Este anticuerpo puede estar conjugado a una enzima (**método directo**). Este método emplea sólo un Ac y, por lo tanto, es muy rápido, a pesar de que por lo general da señales de baja intensidad y es poco usado para secciones incluidas en parafina. Se aplica para inmunofluorescencia, por ejemplo para la identificación de inmunoglobulinas y complemento en secciones congeladas de piel y biopsias renales.

En caso de que el anticuerpo específico no esté conjugado, se debe colocar un segundo anticuerpo marcado con una enzima (específico contra inmunoglobulinas del animal en que se desarrolló el primer Ac). Este método se conoce como **método indirecto**. Este método es más sensible que el directo dado que varios Ac marcados pueden unirse al Ac primario. La técnica es más versátil ya que un mismo Ac secundario puede emplearse con distintos Ac primarios desarrollados en la misma especie.

5. Revelado

Cuando se trata de microscopía óptica, en la que se utilizan enzimas inmunomarcadoras, es necesario un paso final de agregado de un sustrato capaz de dar un producto coloreado en presencia de dicha enzima. Las enzimas más utilizadas, como se describió en sección ELISA son la Peroxidasa y la Fosfatasa alcalina (Tabla 1). Cuando estas enzimas son usadas en IHQ, se debe tener en cuenta que el producto coloreado debe ser insoluble, al igual que para los empleados para la técnica de WB.

Enzima	Sustrato	Color del Producto
<p><i>Peroxidasa</i></p> 	<p># Utiliza peróxido de hidrógeno como sustrato junto con un cromógeno:</p> <p>3,3'-diaminobenzidina (DAB)</p> <p>4-cloro-1-naftol (CN)</p>	<p>Marrón</p> <p>Azul</p>
<p><i>Fosfatasa alcalina</i></p> 	<p>5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT)</p> <p>Fat Red/ Naftol AS-TR fosfato</p>	<p>Púrpura</p> <p>Rojo</p>

Tabla 1 Enzimas empleadas para el revelado en IHQ.

La combinación de diferentes técnicas de inmunomarcación y diferentes sistemas enzima-sustrato, permiten realizar marcación múltiple, esto es, detectar Acs diferentes en un mismo corte de tejido. Por ejemplo, una opción es utilizar Acs primarios desarrollados en diferentes especies y los Acs secundarios marcados con distintas enzimas. De esta forma, el revelado se hará con dos cromógenos diferentes.

6. Validación del resultado

La validación de un resultado de una inmunohistoquímica exige el procesamiento de muestras controles, simultáneamente con la muestra problema, así como la realización de controles metodológicos. Estos son:

- a. Tejido que contenga el Ag a detectar: control positivo
- b. Tejido que no contenga el Ag a detectar: control negativo
- c. Muestra problema sin anticuerpo primario
- d. Muestra problema sin anticuerpo secundario
- e. Muestra problema con avidina-enzima: para poner en evidencia actividad de biotina endógena en el tejido.
- f. Muestra problema con sustrato: para poner en evidencia actividad de la enzima marcadora en el tejido.

Los controles c, d, e y f, deben dar un resultado negativo.

3.1.4 SISTEMAS DE DETECCIÓN DEL INMUNOCOMPLEJO

Existen diversos sistemas de detección que se pueden emplear en las técnicas inmunoenzimáticas, los cuales van a depender del tipo de sustrato que emplee la enzima: colorimétricos, fluorescentes, lumiscentes.

Sustratos colorimétricos: los ensayos colorimétricos dan un producto de reacción coloreado que absorbe luz en el espectro visible, siendo la densidad óptica (DO) del mismo proporcional a la cantidad de producto medido si se trata de un ensayo de tipo no competitivo e inversamente proporcional si se trata de un ensayo de tipo competitivo.

Sustratos fluorescentes: en los ensayos de fluorescencia, la enzima convierte el sustrato en un producto de reacción que emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda,

siendo las unidades relativas de fluorescencia (fotones de luz emitidos) proporcionales a la cantidad de producto analizado. En comparación con los métodos colorimétricos, los ensayos de fluorescencia son ligeramente más sensibles y, lo que es más importante, amplían el rango de medida. Los ensayos fluorimétricos están sujetos a distintos problemas que reducen o aumentan la señal inespecíficamente. El “*background*” (fluorescencia de fondo) y/o la autofluorescencia son el principal problema para la realización de ensayos en placas de 96 pocillos. Las fuentes de este *background* son los propios componentes de la muestra, los componentes de los diluyentes (iones metálicos), el material de la placa (tipo de plástico utilizado) y la contaminación variable (partículas de polvo, huellas digitales).

Sustratos luminiscentes: en la luminiscencia la enzima transforma un sustrato en un producto que emite fotones en lugar de dar color visible. La luminiscencia se describe como la emisión de luz por parte de una sustancia, que regresa desde un estado electrónicamente excitado a su estado original. Las diferentes formas de luminiscencia difieren, precisamente, en la forma en que se alcanza dicho estado excitado:

- **Fotoluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante luz a determinada longitud de onda.

- **Bioluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante la utilización de un compuesto que emite luz al ser degradado, como luciferina o luciferasa.

- **Quimioluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante una reacción química. La quimioluminiscencia consiste, en términos generales, en la producción química de la luz. Los compuestos quimioluminiscentes son sustancias capaces de emitir luz cuando, al absorber la energía de una reacción química oxidativa, son colocadas en un estado de excitación electrónica. La emisión de luz se produce al volver a su estado inicial y la energía química absorbida se cede en forma de fotones fácilmente cuantificables con un fotodetector. Los tipos de inmunoensayos que recurren a la quimioluminiscencia utilizan un compuesto que genera luz, en lugar del compuesto cromogénico (de las reacciones de ELISA o *blotting* ordinarias). Tal es el caso de la oxidación del compuesto luminol por peróxido de hidrógeno (sustrato de la peroxidasa), con producción de luz. La luz que se genera en dichas reacciones puede detectarse gracias a su capacidad de sensibilizar una película fotográfica. La medición cuantitativa de la emisión de luz puede hacerse mediante el uso de un luminómetro. La ventaja de las pruebas de quimioluminiscencia sobre las cromogénicas es la mayor sensibilidad.

3.1.5 SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN

Para las diversas técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, western blot, dotblot, slot blot, inmunohistoquímica) se puede emplear un sistema de amplificación de la señal, para aquellos casos en los que el inmunoreactante a detectar sea escaso. El sistema más utilizado es el de Biotina-Avidina, (también conocido como ABC, del inglés: Avidin Biotin Complex) O Biotina-Streptavidina. La avidina es una glicoproteína con capacidad de unir 4 moléculas de biotina en una interacción de elevada afinidad. Por otra parte, varias moléculas de biotina pueden conjugarse eficientemente a muchas proteínas, entre ellas las inmunoglobulinas. El sistema biotina-avidina consiste en un anticuerpo conjugado con biotina y una enzima unida a avidina. Esta estrategia permite aumentar la cantidad de moléculas de enzima unidas al complejo Ag-Ac.

Una aplicación muy difundida de este sistema es la utilización de complejos preformados. Para ello, se mezclan avidina (conjugada con la enzima) con biotina para formar el ABC y luego se agrega este complejo a la muestra conteniendo el anticuerpo biotinilado. De esta manera se obtiene una señal muy amplificada (Figura 8).

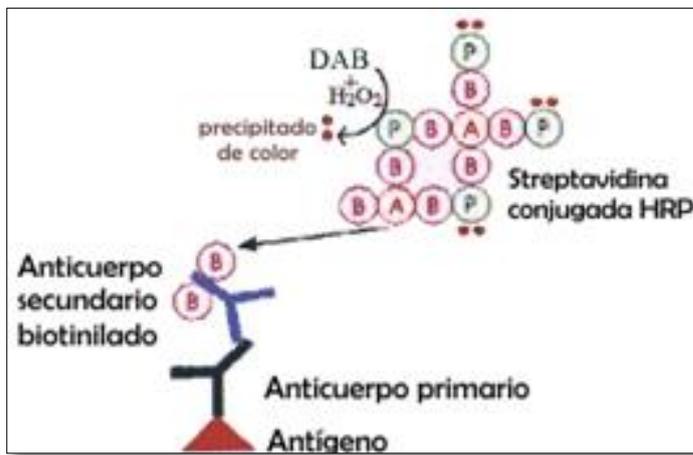


Figura 8- Complejo Biotina-Avidina. B: biotina A: avidina P: peroxidasa

3.2 INMUNOENSAYOS FLUORESCENTES

La fluorescencia es el resultado de un proceso que ocurre en ciertas moléculas llamadas fluorocromos. Estas sustancias cuando son excitadas con longitudes de onda en el rango ultravioleta, emiten luz a una longitud de onda mayor, en el rango del visible. Para excitar una sustancia fluorescente se emplea una fuente externa, tal como una lámpara incandescente o un láser, la cual emite fotones de energía que son absorbidos por el fluorocromo. Durante este estado de excitación, el fluorocromo sufre cambios conformacionales y vuelve a su estado estable emitiendo así fluorescencia.

Esta técnica se utiliza casi exclusivamente con Ag particulados. Aquí el conjugado es un Ac unido covalentemente a un fluorocromo como isotiocianato de fluoresceína (ITCF) o rodamina, que al ser excitados por luz UV emiten luz de color verde o rojo, respectivamente.

Este método ha permitido desarrollar técnicas de histoquímica de muy alta sensibilidad. Estas permiten detectar inmunocomplejos (Ac específicos para Ag) presentes en un determinado tejido o en microorganismos, así como Ags presentes en la superficie o interior de células.

Para la elección del fluorocromo se debe tener en cuenta:

- que sea estable
- que posea elevada capacidad de absorción
- que emita a una longitud de onda adecuada
- que no interfiera en la reacción del ligando con el Ac
- que sea fácilmente detectado cuando está presente en cantidades mínimas (un buen reactivo fluorescente es aquel que ha fijado 2 o 3 grupos fluorescentes por molécula).

En todos los sistemas de detección de fluorescencia puede distinguirse: una fuente de excitación, filtros para separar los fotones de emisión de los de excitación, un detector que registre los fotones de emisión y produzca un registro (generalmente como una señal eléctrica o una imagen fotográfica). Los instrumentos que existen dan diferente información y deberá optarse por el más adecuado según el objetivo que se persigue.

En la actualidad se dispone de:

Espectrofluorómetros y lectores de microplacas: miden el promedio del total de emisión en un volumen dado de muestra.

Scanners fluorescentes, incluye lectores de microarray: la fluorescencia se resuelve como una función de coordenadas espaciales en dos dimensiones para objetos macroscópicos como es el caso de la electroforesis en geles, *blots* y cromatogramas.

Microscopios de fluorescencia: resuelven la fluorescencia como una función de coordenadas espaciales en 2 o 3 dimensiones para objetos microscópicos. El desarrollo de nuevas sondas fluorescentes y el aumento de resolución que proporciona la utilización de la microscopía confocal, han hecho posible que la fluorescencia sea, en la actualidad, una de las técnicas más utilizadas. La característica principal y exclusiva del microscopio confocal radica en la capacidad de obtener secciones ópticas ultrafinas de una célula o tejido. Para ello el microscopio tiene 2 diafragmas incorporados, uno de iluminación y uno de detección. El diafragma de detección elimina la luz que proviene de planos superiores e inferiores al plano focal, aumentando con ello la claridad y resolución de la imagen. La excitación con un haz de láser, dirigida a un punto concreto del plano focal y la utilización de un sistema informático acoplado, permiten la obtención de imágenes en tres dimensiones proporcionando, además, información referente a la localización tridimensional, así como la intensidad lumínica del punto excitado.

Citómetros de flujo: permiten analizar rápidamente múltiples parámetros de células vivas o muertas (Figura 10). Si se marca una subpoblación de linfocitos con un Ac específico marcado con un fluorocromo y se hace fluir una corriente de células frente a un rayo láser, un detector de luz registrará la intensidad de la señal fluorescente, mientras que la dispersión del rayo de luz es registrada por otro detector, el cual entrega información relacionada con el tamaño de las células.

La tecnología de citometría de flujo puede también separar distintas subpoblaciones de células por deflexión electrostática. Este sistema de separación se llama **fluorescent activated cell sorting (FACS)** (Figura 1 Seminario IV).

Las técnicas de inmunofluorescencia (IF) pueden clasificarse en:

Inmunofluorescencia Directa (IFD): El Ac conjugado interaccionará directamente con el Ag. (Figura 9). Esta metodología consiste en añadir el Ac conjugado directamente al corte de tejido o a la suspensión celular, luego de lavar para eliminar el material fluorescente no fijado específicamente. Se analiza empleando una fuente de luz UV y filtros adecuados. Si el Ag se unió al Ac marcado el complejo emite fluorescencia.

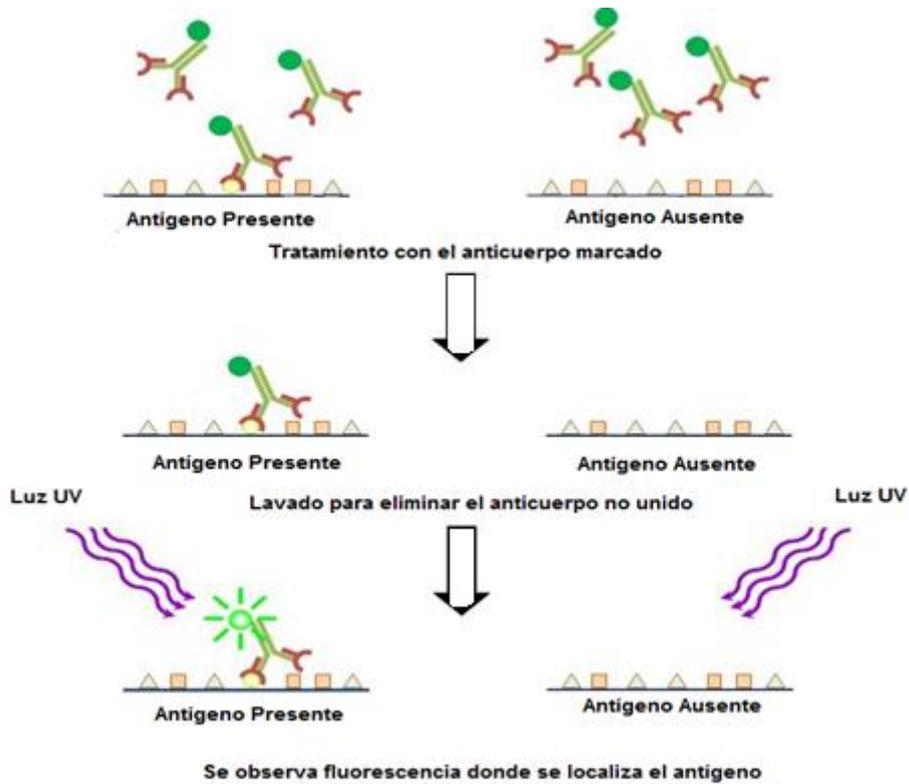


Figura 9- Esquema representativo de Inmunofluorescencia directa. <http://www.di.uq.edu.au/indirectif>

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): El reactivo marcado es un anticuerpo específico para el anticuerpo primario, y se lo hace actuar sobre el complejo Ag-Ac que se formó en una primera etapa (Figura 10). Luego de dejar reaccionar el material que contiene el Ag con el Ac específico no marcado y lavar, se agrega el conjugado (Ac anti-inmunoglobulina específica marcado). Finalmente, se lava y se analiza empleando una fuente de luz UV y filtros adecuados. Si el Ag se une al Ac sin marcar y sobre este complejo se acopla el conjugado, se emitirá fluorescencia.

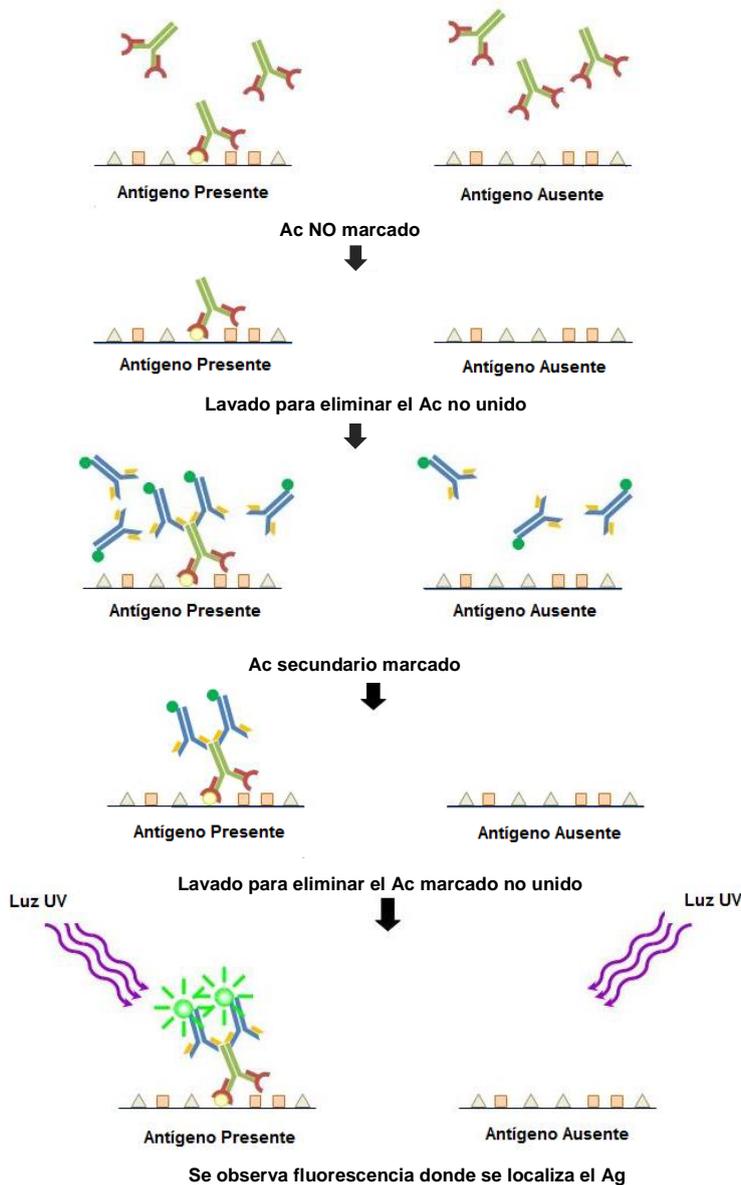


Figura 10- Esquema representativo de Inmunofluorescencia indirecta. <http://www.di.uq.edu.au/indirectif>

3.3 OTRAS TÉCNICAS BASADAS EN LA UNIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

3.3.1 INMUNOCROMATOGRAFÍA DE FLUJO LATERAL

Los ensayos de inmunocromatografía, también llamados ensayos de flujo lateral, están diseñados para confirmar la presencia o ausencia de determinado analito en una muestra. Estos ensayos son de detección visual y de fácil lectura, pueden considerarse, en muchos casos, como un test POC ideal. Los test POC (de la sigla Point-Of-Care) son aquellos que pueden realizarse lejos del laboratorio, en el lugar de atención. Los requisitos que, según la Organización Mundial de la Salud, debe reunir un test POC ideal, se pueden resumir con el acrónimo inglés ASSURED (seguro) que corresponde a:

- **Affordable** (asequible): económico, permitiendo el fácil acceso de la población en riesgo.
- **Sensitive** (sensible): altamente capaz de detectar resultados positivos.
- **Specific** (específico): altamente capaz de diferenciar muestras negativas.

- **User friendly** (de fácil uso): los usuarios requieren un entrenamiento mínimo.
- **Rapid** (rápido): capaz de generar un resultado rápido permitiendo la toma de decisiones inmediatas
- **Robust** (robusto): permite su uso en ambientes de recursos limitados y mantiene un alto rendimiento por un largo periodo de tiempo conservados, incluso, a temperatura ambiente.
- **Equipment-free** (sin instrumentación): no requiere la utilización de equipamiento específico para obtener el resultado.
- **Deliverable** (distribuable): fácil de trasladar, sin requerimientos específicos.

Los test de flujo lateral más populares, disponibles en el mercado, son los test de embarazo y los test de detección de estupefacientes, pero existen muchos más como los utilizados para detectar distintos tipos de infecciones (VIH, *Chlamydia spp.*, entre otros) así como analitos presentes en el ambiente o en productos agrícolas.

La inmunocromatografía se basa en la capacidad de una muestra de migrar por capilaridad a través de una tira de material poroso (por ejemplo, nitrocelulosa). En las tiras reactivas se pueden distinguir 5 zonas (Figura 14):

- **Zona de siembra de la muestra:** es el lugar donde se coloca la muestra a analizar, pudiendo esta contener o no el analito de interés.
- **Zona del conjugado:** en esta zona se encuentra un compuesto conjugado a nanopartículas coloreadas, por ejemplo con metales pesados (oro o selenio coloidal, color rosa o azul respectivamente). Este compuesto se debe solubilizar al pasar la muestra, debe ser capaz de migrar junto con ella, y siempre debe ser capaz de unirse específicamente al analito de interés, si está presente en la muestra, formando un inmunocomplejo.
- **Zona de detección:** en esta zona se encuentra fijado a la membrana un compuesto capaz de reaccionar con el inmunocomplejo previamente formado. De esta manera la presencia o ausencia de color en esta banda permitirá conocer si el analito se encuentra presente en la muestra.
- **Zona de control:** en esta región se encuentra inmovilizado un anticuerpo capaz de reconocer al compuesto conjugado. De esta manera el exceso de conjugado es capturado, formándose una banda coloreada tanto en presencia como ausencia del analito. La presencia de banda en esta zona válida la técnica, ya que verifica el estado de conservación del test y la correcta migración de la muestra durante su uso.
- **Almohadilla absorbente:** absorbe los restos de muestra para evitar derrames.

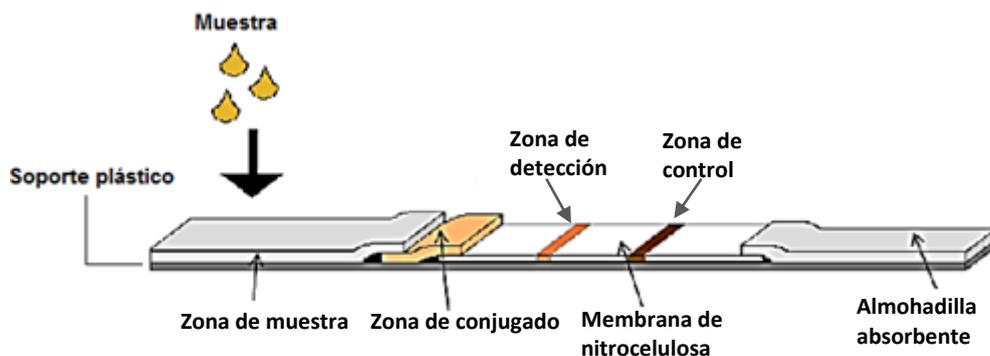


Figura 14- Modelo del Test de Inmunocromatografía de flujo lateral. Adaptado de: <http://www.creative-diagnostics.com/Colloidal-Gold-Lateral-Flow-Strips-Development.html>

Esta prueba puede ser utilizada para la detección tanto de Ags como de Acs. Si bien existen un sin número de sistemas reaccionantes posibles para estos fines, en el presente apunte se resumen los 3 sistemas más utilizados.

Para la detección de ANTÍGENOS existen 2 esquemas de reacción predominantes, los basados en test directos (o no competitivos) y los basados en interacciones competitivas (o competitivos).

Los test directos presentan, principalmente, un sistema reaccionante con formato sándwich y son utilizados para evaluar la presencia de antígenos de gran tamaño y con múltiples sitios inmunogénicos, como por ejemplo, las hormonas LH y hGC (Figura 15). En este tipo de test, la muestra a analizar se coloca en la zona de siembra de la muestra, y fluye por capilaridad hasta la zona del conjugado, en donde se encuentra un Ac marcado (conjugado) capaz de reconocer específicamente un epítipo del antígeno de interés. Al pasar la muestra solubiliza al conjugado, y en caso de estar presente el Ag en ella se logra la formación de inmunocomplejos. Estos inmunocomplejos siguen migrando hasta la zona de detección, en la cual se hallan fijados a la membrana Acs específicos capaces de reconocer otros epítipos del Ag (que no se encuentren ocupados por el Ac-conjugado), de manera que los inmunocomplejos son fijados en esta región, formando una banda coloreada. La muestra sigue fluyendo por capilaridad hasta la zona de control, donde el exceso de Ac-conjugado es capturado por un Ac anti-Ac-conjugado, formándose una banda coloreada en todos los casos. Nótese en la Figura 15 que, de no encontrarse el Ag en la muestra, el Ac-conjugado no podría unirse a la zona de detección, por lo que un resultado negativo se visualizaría como ausencia de coloración en esta banda.

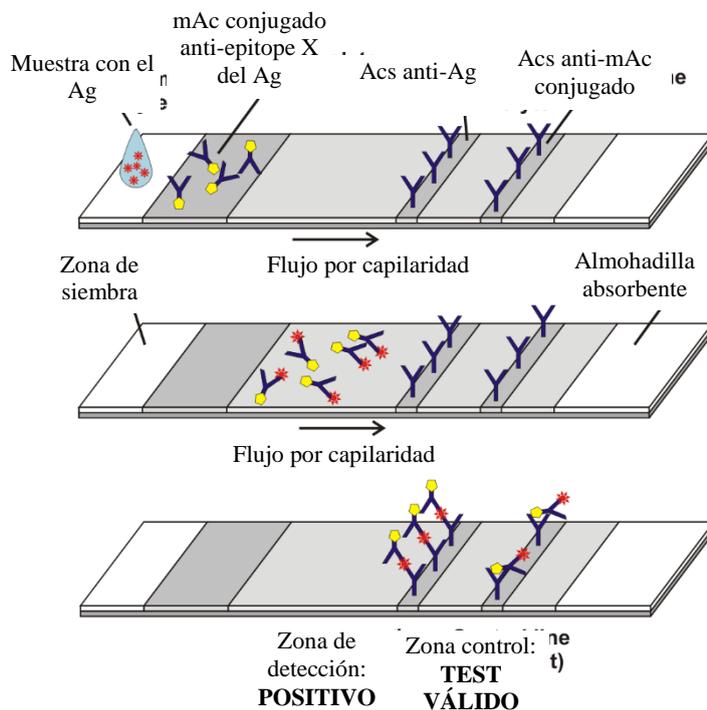


Figura 15- Esquema de la prueba de inmunocromatografía directa para la detección de ANTÍGENOS. Adaptado de: <http://med.unr.edu/ddl/technology/lateral-flow-immunoassay>

Por otro lado, los test competitivos se utilizan cuando se desea determinar la presencia de moléculas pequeñas, que no pueden unirse de manera simultánea a dos anticuerpos, como es el caso de los haptenos. Con una inmunocromatografía lateral competitiva se pueden determinar, por ejemplo, la presencia en la muestra de antibióticos como la penicilina, estupefacientes como cannabinoides o toxinas como las

aflatoxinas, entre otras. El sistema reaccionante, en este caso, se puede resumir de la siguiente manera (Figura 16). Al igual que en los test no competitivos, la muestra se coloca en la zona de siembra, y fluye por capilaridad hasta la zona del conjugado, en donde se encuentra un Ac marcado capaz de reconocer específicamente al hapteno de interés. Al pasar la muestra solubiliza al conjugado, y siguen migrando conjuntamente hasta la zona de detección. En la zona de detección se encuentra el hapteno de interés conjugado a una proteína, la cual le permite mantenerse fijado a la membrana. De esta manera pueden presentar dos situaciones: si el hapteno no se encuentra en la muestra (Figura 16-b), este no ocupa los sitios de unión del Ac-conjugado y por consiguiente, al llegar la muestra a la zona de detección el Ac-conjugado presenta sus paratopes libre lo que le permite unirse a los haptenos fijado en esta región, generando una banda coloreada. En el caso de que el hapteno esté presente en la muestra al llegar a la zona de conjugado (Figura 16-c), formará inmunocomplejos con el Ac-conjugado, ocupando sus paratopes e impidiéndole su unión los haptenos presente en la zona de detección, de esta forma la banda de detección no presentará color. En ambos casos, la muestra sigue fluyendo por capilaridad hasta la zona de control, donde el exceso de Ac-conjugado es capturado por un Ac anti-Ac-conjugado, formándose una banda coloreada que valida el ensayo.

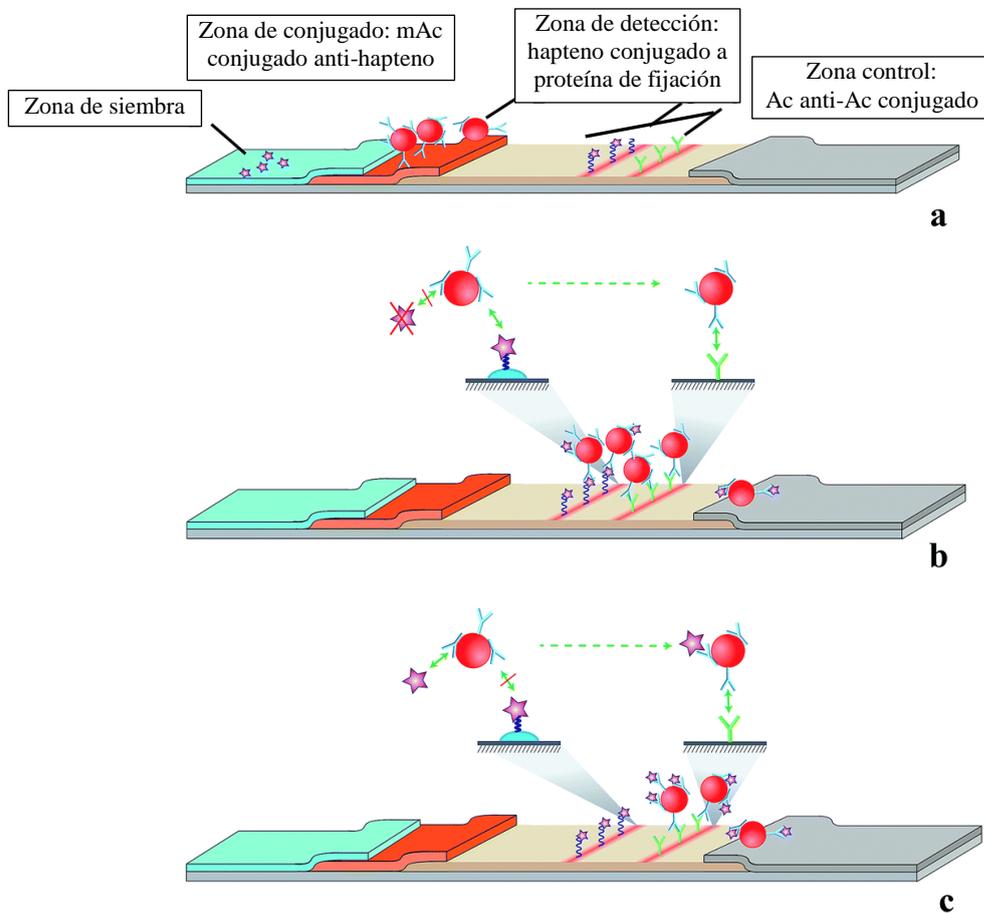


Figura 16- Esquema de la prueba de inmunocromatografía competitiva para la detección de ANTÍGENOS. Adaptado de: Zvereva, E. y N. Byzova. Cut-off on demand: Adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol. *Anal. Methods*, 2015,7, 6378-6384.

Para la detección de ANTICUERPOS el sistema más comúnmente utilizado es el indirecto. El sistema reaccionante cuenta en la zona de conjugado con un Ac conjugado capaz de reconocer

específicamente al isotipo de inmunoglobulina (Ig) que se desea determinar en la muestra. Por su parte, para comprobar si los anticuerpos detectados en la muestra son específicos para un Ag de interés, en la zona de detección se encuentra inmovilizado el Ag. Como se puede observar en la Figura 17, en este

sistema, al colocar la muestra en la zona de siembra, comienza a fluir por la membrana hasta alcanzar la zona de conjugado, donde los Acs conjugados, podrán reconocer específicamente al isotipo de inmunoglobulina de interés presentes en la muestra. Los inmunocomplejos formados continuarán migrando hasta la zona de detección, donde serán retenidos si las inmunoglobulinas en la muestra son específicos para el Ag de interés, generando una banda de color. El exceso de Ac-conjugado es capturado en la zona de control por un Ac específico, generando una banda de color que valida el ensayo. Nótese en la Figura 17 que, de no encontrarse, en la muestra, Acs que reconozcan específicamente el Ag, el Ac-conjugado no podría unirse a la zona de detección, por lo que un resultado negativo se visualizaría como ausencia de coloración en esta banda.

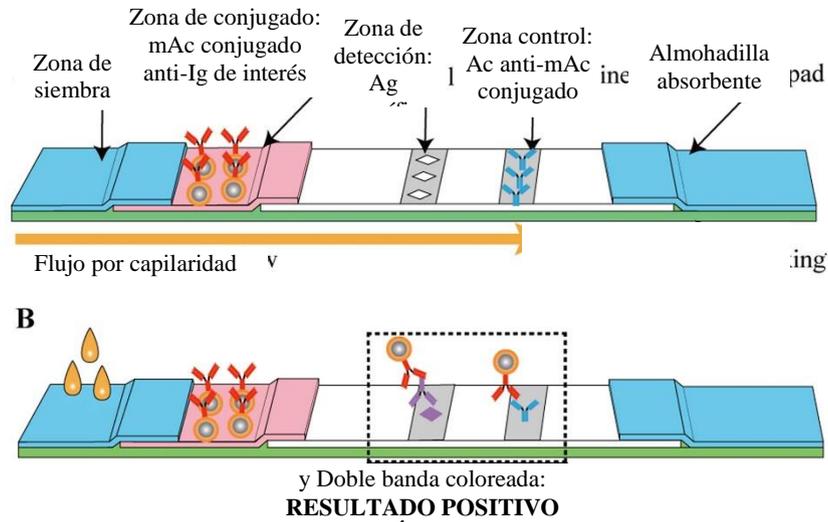


Figura 17- Esquema de la prueba de inmunocromatografía para la detección de ANTICUERPOS. Adaptado de Li et al. Gold magnetic nanoparticle conjugate-based lateral flow assay for the detection of IgM class antibodies related to TORCH infections. *Int J Mol Med.* 2015 Nov; 36(5):1319-26.

3.4 FACTORES DE IMPACTO EN LA CALIDAD DEL INMUNOENSAYO

Cifras de mérito del método

La **exactitud** y la **precisión** en los inmunoensayos son fundamentales para la utilidad de los mismos. La exactitud es la capacidad de medir la concentración correcta de analito en una muestra (Figura 19). La precisión en los inmunoensayos significa que la combinación de reactivos, analizador y otros factores de influencia puede proporcionar resultados reproducibles.

La **sensibilidad** y **especificidad** se refieren a la capacidad del ensayo de generar resultados exactos y reproducibles que minimicen la cantidad de falsos positivos y falsos negativos que pudieran ocurrir (Figura 18).



Figura 18- Esquema ilustrativo de definición de exactitud, precisión, sensible y específico

Los **calibradores** son soluciones con valores conocidos que establecen la relación entre la cantidad de señal producida en el ensayo y la concentración de analito.

La **sensibilidad de calibración** es igual a la pendiente de la recta de calibración. Indica la variación de respuesta producida por una unidad de variación de concentración del analito, y sus unidades son de señal (eje y) vs concentración (eje x).

Se considera que el **rango lineal** comprende desde la menor concentración que puede medirse (el LOQ) hasta la pérdida de la linealidad (Figura 19).

El **rango dinámico** se considera que va desde la menor concentración detectable (el LOD) hasta la pérdida de la linealidad entre respuesta y concentración. El rango dinámico es también el rango de aplicabilidad de la técnica. En la zona de pérdida de la linealidad, podría aplicarse, en principio, un método de regresión polinómica para la calibración (o algún otro de naturaleza no lineal), de modo que nada impide que dicha zona sea utilizada con propósitos predictivos.

El **Límite de detección (LOD)** es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica.

El **límite de cuantificación (LOQ)** es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Se calcula a partir de la desviación estándar del blanco ($LOQ = 10 \times SD$).

Los **controles** son imprescindibles en todos los inmunoensayos ya que son muestras de concentración conocida que se usan para monitorear la exactitud y la precisión de un analizador y un ensayo.

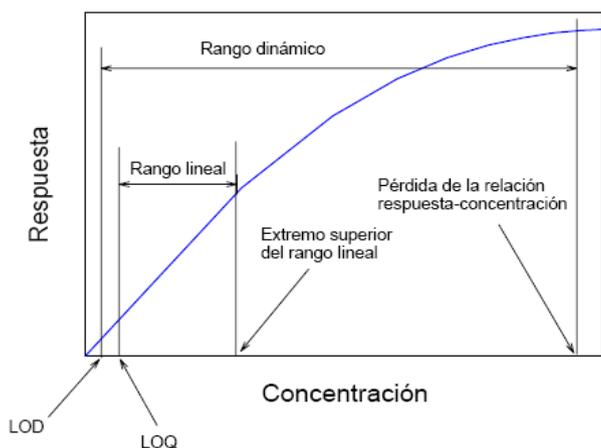


Figura 19- Rangos dinámico y lineal de un método analítico.

Impacto del calibrador en los inmunoensayos

Los calibradores son soluciones con valores conocidos que establecen la relación entre la cantidad de señal producida en el ensayo y la concentración de analito (Figura 20). Son útiles para determinar las concentraciones de analito desconocidas mediante la interpolación de la señal obtenida en el ensayo.

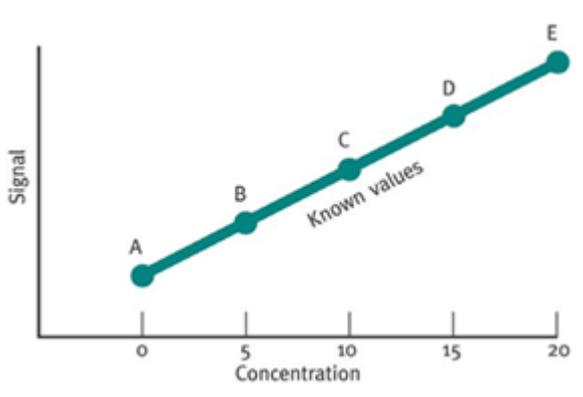


Figura 20- Curva de calibración de una muestra.

Para establecer una correcta curva de calibración es muy importante que se trate adecuadamente el material de calibración según recomendaciones del fabricante y que el criterio de aceptación sea el apropiado. Si la calibración no es correcta, los resultados correspondientes no serán correctos. La mayoría de los aspectos de la calibración están automatizados en los analizadores para inmunoensayos actuales, aunque los calibradores líquidos, refrigerados y listos para usar aseguran menos errores por parte del operador comparados con aquellos que necesitan ser reconstituidos o descongelados manualmente. También es importante que el fabricante elija la matriz correcta para los calibradores. La matriz es el solvente que contiene al analito en el calibrador (o control). Es para asegurar que la respuesta de la señal de la curva de calibración sea idéntica a la señal de las muestras. Las matrices pueden ser a base de suero animal, acuosas, o derivadas de otros materiales. Los controles son muestras que contienen concentraciones conocidas de analito. Se utilizan para monitorear la exactitud y la precisión del rendimiento de un ensayo y de un analizador. Si el control se encuentra “dentro del rango”, se supone que el rendimiento de los reactivos y del analizador es correcto y que el análisis de la muestra puede comenzar. Es típico hacer un ensayo de los controles en cada corrida y una curva de calibración cada vez que se analizan muestras.

Interferencias en los ensayos

Los inmunoensayos pueden tener tendencia a las interferencias que afectan tanto la sensibilidad como la especificidad. En la mayoría de los casos las interferencias se deben a agentes (proteínas de unión, sustancias endógenas de interferencia y efectos generales de la matriz) que interfieren en la unión de anticuerpos con antígenos por varias razones. Nos ocuparemos de las interferencias que se deben al efecto “hook” (Fenómeno de Prozona) debido a las concentraciones elevadas de antígeno.

Las concentraciones muy elevadas de antígeno en la muestra se unen a todos los sitios disponibles del anticuerpo saturándolos antes que se forme el complejo a detectar. Bajo estas condiciones, el nivel medido de analito puede ser significativamente más bajo que el nivel real presente en la muestra. La curva dosis-respuesta típica de estos métodos es lineal hasta una concentración determinada en que se produce una meseta; en caso de producirse el efecto *hook*, la curva inicia una pendiente negativa hasta alcanzar valores bajos (Figura 21). Este efecto (“gancho”) se suele producir a partir de una concentración determinada que varía según el método y el fabricante. Se ha descrito el efecto *hook* en algunos procedimientos de determinación de tiroglobulina, hCG, prolactina, etc. Cuando se sospecha este fenómeno se deben realizar

diluciones sucesivas de la muestra hasta alcanzar una concentración dentro del intervalo de medida. Afortunadamente, este problema cada vez es menos frecuente debido a que los inmunoanálisis no isotópicos actuales disponen de un amplio intervalo de linealidad en la medida. Los fabricantes deben proporcionar información sobre la concentración a partir de la cual puede producirse el efecto.

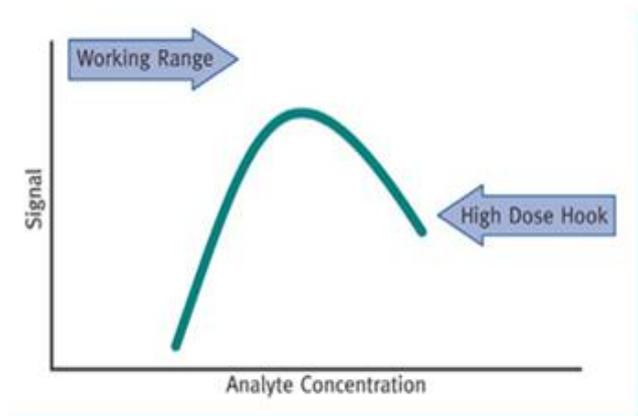


Figura 21- Representación gráfica del efecto Hook.

SEMINARIO IV

MÉTODOS QUE EVALUAN LA INMUNIDAD CELULAR

4.1 INMUNIDAD CELULAR: GENERALIDADES. MECANISMOS INVOLUCRADOS

La respuesta inmune está constituida por una serie de eventos que comienzan con la presencia de un estímulo antigénico y culmina con la eliminación del agente agresor que la provocó. Esta respuesta depende principalmente de diferentes tipos celulares: células dendríticas, macrófagos, células NK (*Natural Killers*), linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB). Estas células interactúan entre sí ya sea en forma directa o a través de citoquinas. Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) desempeñan un rol fundamental en este proceso ya que, frente a la llegada de un inmunógeno, las células presentadoras de antígenos (APCs) procesan el antígeno (Ag) y lo presentan, junto a moléculas MHC clase II, a los linfocitos T *helper* (LTh). Las APCs activadas producen diferentes citoquinas esenciales para la activación y proliferación clonal de los LTh, LTc (linfocitos T citotóxicos) y LB. Al expandirse, la mayoría de estas células mediarán funciones efectoras. De esta manera, los LTh efectores colaboran con los LTc y con los LB. En el primer caso, los LTc efectores tienen como función eliminar células que expresan el antígeno específico (por ejemplo, células tumorales, células infectadas por virus) en el contexto de las moléculas MHC clase I, mientras que en el segundo caso, los LB se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos con especificidad por el antígeno.

Una fracción menor de linfocitos T y B en expansión, se diferenciará a células de memoria, las cuales permanecen por años, permitiendo en el futuro una respuesta más rápida y eficiente frente a un nuevo contacto con el antígeno. Debido a la presencia de estas células de memoria es posible realizar una evaluación funcional de las mismas.

El estado del sistema inmunológico de un individuo puede analizarse evaluando tanto la inmunidad innata como la adquirida, analizando parámetros humorales y celulares. Esta división se realiza con fines prácticos, ya que ambas están estrechamente relacionadas.

En los trabajos prácticos anteriores hemos evaluado la inmunidad humoral específica al detectar y semi-cuantificar anticuerpos. De modo indirecto, su presencia nos indica que los mecanismos inmunitarios celulares están en plena actividad.

Ahora bien, para evaluar directamente el estado inmunitario celular se pueden realizar pruebas no funcionales y/o funcionales. Las primeras consisten en cuantificar diferentes clones celulares que participan en la respuesta inmune, mientras que las segundas, ya sean “*in vivo*” o “*in vitro*”, dan información respecto de la actividad celular.

Independientemente del tipo de prueba a realizar, es necesario disponer de poblaciones celulares purificadas o semipurificadas. Para tal fin, se describen las siguientes metodologías que permiten separar diferentes clones, según sean sus características fenotípicas.

4.2 MÉTODOS DE SEPARACION CELULAR

Los métodos de separación celular más frecuentemente empleados son:

A) Para semi-purificar poblaciones celulares:

* Gradientes de densidad: Ficoll-Hypaque, Percoll:

El método de centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (F-H) permite separar células mononucleares a partir de diferentes suspensiones celulares, por ejemplo, sangre periférica, órganos linfoides (bazo, ganglios, timo, médula ósea) o de diferentes tejidos. El Ficoll es un polisacárido que produce la aglutinación de los eritrocitos, formando un aglomerado de alta densidad que, luego de la centrifugación, se ubica en el fondo del tubo. El Hypaque es una sustancia de elevada densidad responsable de la formación del gradiente. Las células mononucleares (linfocitos, monocitos, células NK) se ubicarán en una capa blanquecina entre el plasma (amarillento) y el F-H (transparente). Este método será utilizado en el TP para obtener células mononucleares a partir de sangre periférica humana y de bazo de ratón.

* Adhesión a diferentes soportes: separación de macrófagos y monocitos por adherencia al plástico-vidrio.

B) Para obtener poblaciones celulares altamente puras:

* Empleo de Acs específicos de marcadores de superficie: Citometría de flujo, Fluorescence Activated Cell Sorting FACS (Figura 1- Seminario IV), empleo de partículas magnéticas, entre otras.

4.3 ENSAYOS “*IN VIVO*” E “*IN VITRO*”

A los efectos de evaluar el estado inmunitario, se podrán realizar los siguientes ensayos:

➤ **Ensayos “*in vivo*”:** Proveen información relativa al estado inmunitario global, desde los mecanismos innatos hasta los adaptativos.

En general, los ensayos “*in vivo*” se realizan aplicando, por la vía cutánea, antígenos o alérgenos para evaluar la reacción inflamatoria local producida. Si bien existen diferentes ensayos, la determinación de la hipersensibilidad cutánea tardía es la de elección para examinar integralmente el sistema inmune del hospedero, ya que es el resultado de una serie de eventos que comprenden desde mecanismos innatos hasta adquiridos. En el caso de existir memoria inmunológica, a las 24- 48 hs de la inoculación, habrá un rápido reconocimiento antigénico y expansión clonal, con liberación de citoquinas que conducirán a modificaciones en la permeabilidad vascular, con la aparición de eritema, edema e induración cuyo diámetro se toma como índice de la reacción. Los clones celulares que principalmente participan en estos eventos celulares son los macrófagos y linfocitos Th de memoria, en especial los Th1 efectores/memoria, que reconocerán al Ag inoculado. Una reacción positiva indicará que el huésped es inmunocompetente y que además ha estado en contacto con el Ag. La falta de respuesta a un grupo de antígenos se denomina anergia.

➤ **Ensayos “*in vitro*”:** Proporcionan información parcial y relativa de las células que participan en la respuesta inmune, imitando en forma parcial e “*in vitro*” las fases que suceden *in vivo*.

Estas determinaciones pueden ser clasificadas según se cuantifiquen poblaciones celulares (pruebas no funcionales), o bien se evalúe la función biológica celular (pruebas funcionales).

4.3.1 PRUEBAS NO FUNCIONALES.

Las pruebas más utilizadas son el recuento de leucocitos totales y/o de diferentes poblaciones celulares, identificándolas de acuerdo a su morfología y/o presencia de moléculas de superficie. En el trabajo práctico se realizará el recuento de células mononucleares de sangre periférica humana, separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, según la técnica propuesta en el Practico de laboratorio.

4.3.1.1 INMUNOFLUORESCENCIA

La presencia de moléculas de superficie características de cada clon en particular, nos permite distinguirlos, siendo las técnicas de inmunofluorescencia, ya sea directa (IFD) o indirecta (IFI) las más empleadas. La IFD emplea Acs conjugados con moléculas fluorescentes o fluorocromos, específicos de la molécula o antígeno de superficie. De esta manera es posible efectuar el recuento de uno o varios clones celulares. En particular, en el TP se observará los LB presentes en sangre periférica humana y en bazo de ratón utilizando Acs anti-Ig de superficie conjugados con fluorocromoisotiocianato de fluoresceína (FITC).

Conociendo los antígenos de la superficie celular es posible determinar el número relativo de subpoblaciones de LT, como por ejemplo $CD4^+/CD8^+$. Si sólo se dispone de estos Acs primarios pero no conjugados, será necesario emplear un segundo Ac conjugado, con especificidad hacia el primer Ac, en cuyo caso la técnica recibe el nombre de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La presencia del Ac conjugado con el fluorocromo no necesita de ninguna reacción química para hacerse evidente, por cuanto las moléculas fluorescentes emiten luz de una determinada longitud de onda luego de ser excitadas por un haz de luz de longitud de onda menor. Cada fluorocromo es capaz de emitir luz dentro de un determinado rango de longitud de onda. Por ejemplo, el fluorocromo FITC emite en la gama del verde, mientras que la Ficoeritrina (PE) emite en la gama del rojo. El hecho de que existan distintos fluorocromos capaces de emitir a diferentes longitudes de onda, permite que puedan detectarse antígenos diferentes en un mismo corte de tejido o célula.

La visualización de la fluorescencia puede realizarse utilizando un microscopio de fluorescencia (para cortes de tejido o células en portaobjetos) o por citometría de flujo (para células en suspensión).

4.3.1.1.1 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CF) es una herramienta poderosa que permite el análisis multiparamétrico de una célula individual dentro de una población celular heterogénea. Es una metodología analítica mediante la cual se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión

de la luz de células o partículas microscópicas, alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar, al ser presentadas una a una y a gran velocidad (miles de células por segundo) frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada. La dispersión de luz se produce en distintos ángulos, y es colectada por diferentes detectores. La luz que se difracta y colecta en un ángulo de 180 °C es proporcional al tamaño celular (*Forward Scatter*, FSC), mientras que la luz refractada/reflejada a 90 °C es proporcional a la complejidad intracelular (*SideScatter*, SSC). Finalmente, la fluorescencia es también detectada en un ángulo de 90 °C y es proporcional al número de fluoróforos. La fluorescencia medida puede deberse a proteínas fluorescentes, como es el caso de la GFP (*Green Fluorescent Protein*); colorantes fluorescentes específicos como el yoduro de propidio (IP) que se intercala específicamente con los ácidos nucleicos y brinda información del contenido de ADN o, colorantes fluorescentes acoplados a anticuerpos específicos para un determinado antígeno.

En un comienzo, esta tecnología fue utilizada fundamentalmente para identificar el fenotipo celular, es decir, la expresión diferencial de antígenos en la membrana plasmática; sin embargo, en la actualidad, la CF permite medir numerosos parámetros estructurales y funcionales. (Tabla 1).

Parámetros nucleares	Parámetros basados en ADN	-Contenido de ADN -Contenido de pares GC/AT -Superenrollamiento de ADN -Estructura de la cromatina -Roturas de hebras de ADN	-Ploidía de ADN -Ciclo celular -Apoptosis-necrosis -Cariotipo en flujo
	ADN + otros parámetros	-ADN/ARN -ADN/proteínas totales -ADN/antígenos nucleares -ADN/antígenos celulares	-Regulación ciclo celular -Ciclo celular de poblaciones específicas
	Parámetros no basados en ADN	-Receptores nucleares -Expresión de genes indicadores ("reporteros") -Morfología nuclear -Componentes nucleares	
Parámetros de superficie	Estructuras de la superficie celular	-Receptores de superficie -Sitios de unión a lectinas -Densidad de superficie -Pared celular	
	Dinámica de la superficie celular	-Unión de ligandos -Transporte/internalización de ligandos -Eflujo de solutos -Exposición de receptores -Potencial de membrana	
Parámetros citoplasmáticos	Componentes intracelulares	-Proteínas totales -Proteínas estructurales -Proteínas funcionales -Glicoproteínas intracelulares -Lípidos intracelulares -Tioles libres	
	Funciones intracelulares	-Actividad enzimática -Síntesis de proteínas -Potenciales de membrana	
	Entorno intracelular	-Concentración de iones -Movimiento de iones -Lípidos y proteínas oxidados	
Parámetros extracelulares	Dinámica de la secreción celular	-Captura de proteínas secretadas -Ensayos de cuantificación en suero	-Activación celular -Diferenciación celular

Tabla 1- Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo. Barrera Ramirez, L.M., (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *InstNalEnfRespMéx* 2004; Vol. 17(1):42-55.

Si bien la citometría de flujo se emplea en numerosos campos de la biomedicina, tales como la hematología, microbiología, farmacología y oncología; en inmunología es de gran utilidad para el recuento de subpoblaciones linfocitarias, así como también en pruebas funcionales, como la linfoproliferación, apoptosis o el estudio de citoquinas.

Citómetro de flujo

Se define como **citómetro de flujo** al instrumento que es capaz de medir componentes y propiedades de las células y organelas celulares (partículas biológicas) que fluyen en una suspensión celular. Los *cellsorters* tienen las mismas prestaciones y posibilidades que los citómetros de flujo pero con la capacidad adicional de separar partículas o células selectivamente a partir de la suspensión líquida (Figura 1).

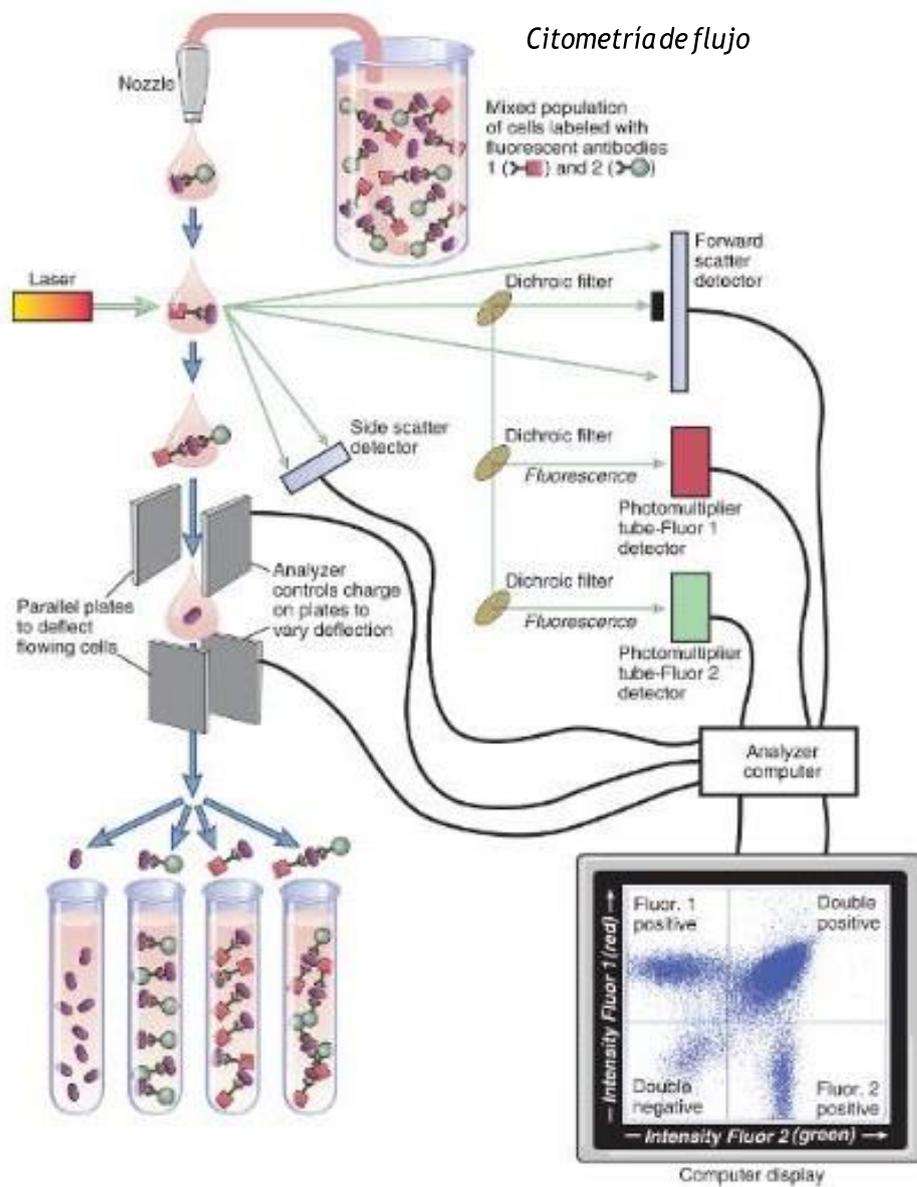


Figura 1- Esquema de un citómetro de flujo. Fuente: Abbas, K. Inmunidad celular y molecular (7º ED)-2012.

Debido a las características especiales de los citómetros de flujo, la muestra a analizar debe encontrarse en forma de suspensión monodispersa. Hay muestras como la sangre periférica, médula ósea u otros fluidos biológicos que precisan de un mínimo procesamiento; mientras que los tumores sólidos o las muestras parafinadas necesitan de una disgregación más o menos intensa (mecánica, enzimática, etc.).

Para su análisis, las células en suspensión son forzadas a pasar, de a una por vez, a través de un capilar muy delgado. Un haz de rayo láser incide sobre cada célula lo que resulta en la dispersión de la luz en distintas direcciones. Una serie de tubos fotomultiplicadores (FM) detectan la luz dispersada brindando información acerca del tamaño, la granularidad o complejidad celular, así como de la emisión de fluorescencia en el caso de que la célula esté unida a un anticuerpo marcado con un fluorocromo o bien que la misma presente autofluorescencia.

Análisis y presentación de los resultados:

Las señales de luz son convertidas a pulsos electrónicos y luego a valores concretos, para finalmente ser almacenados por el sistema informático. Una vez que los datos se han guardado, las poblaciones celulares se pueden mostrar y analizar en diferentes formatos empleando un *software* específico y se presentan como gráficos. A continuación, se muestran ejemplos de los gráficos más comúnmente utilizados para representar los datos obtenidos en la CF.

Gráfico “dotplot” de tamaño vs. granulosidad:

Los “dotplot” son gráficos de puntos, en los que cada uno de los puntos representa una célula o evento que fue interceptado por el láser. Cada uno de estos puntos, muestra un valor determinado para cada parámetro estudiado.

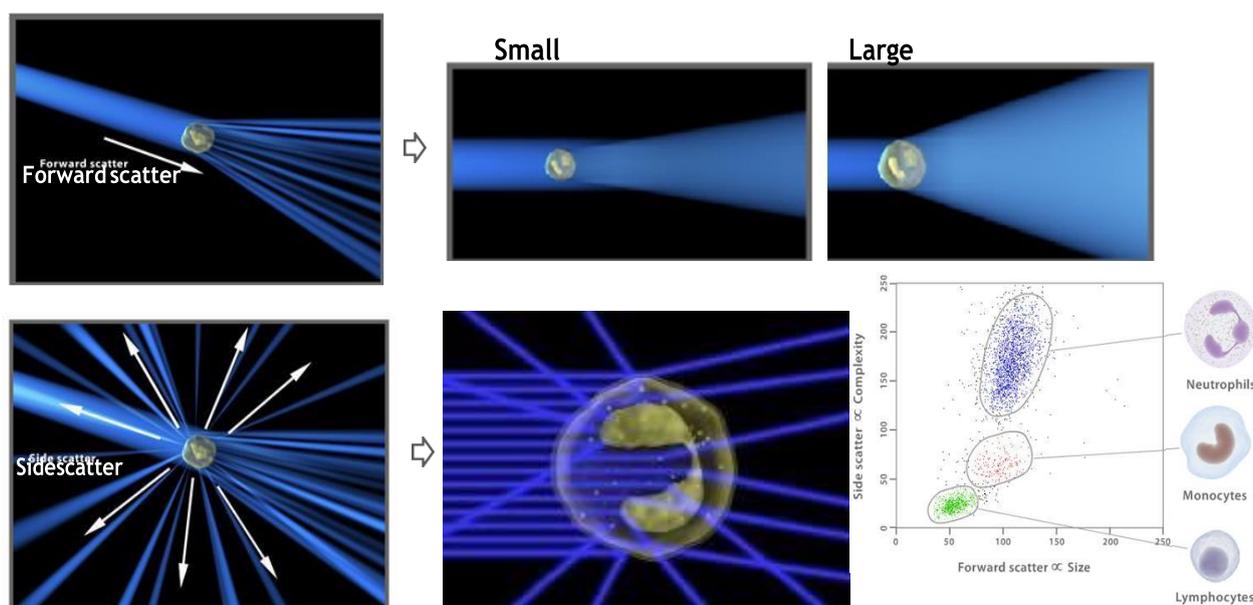


Figura 2- Gráfico de *Dotplot* de tamaño vs granulosidad.
<http://regmed.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html>

En la figura 2, se muestra un ejemplo de leucocitos de sangre periférica humana en el que pueden diferenciarse claramente las regiones correspondientes a los granulocitos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos (de mayor complejidad granular por la presencia de lisosomas), monocitos (de tamaño y complejidad intermedia) y linfocitos (pequeños y sin gránulos en el citoplasma). En este caso no se utilizó ningún anticuerpo para marcar las células, debido a que el análisis realizado contempla únicamente el tamaño y la complejidad celular.

Histograma de fluorescencia:

Los histogramas son gráficos que muestran un solo parámetro (fluorescencia relativa o intensidad de luz) en el eje “x” y el número de eventos (células) en el eje “y”. En este caso, idealmente, la CF producirá un único pico simple, el cual puede ser interpretado como población positiva. Sin embargo, en algunas situaciones, el análisis de la CF revela una mezcla de poblaciones celulares exhibiendo varios picos en un mismo histograma. Con el propósito de identificar la población positiva, la CF debe efectuarse, realizando un control adecuado de isotipo negativo.

En el ejemplo (Figura 3), se muestra el estudio de células de estirpe monocítica marcadas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD18. El anticuerpo está conjugado con FITC (fluorescencia verde), cuyo isotipo es IgG1 murino. Como control de reactividad inespecífica, las células se incuban, por otro lado, con IgG1 murina marcada con FITC pero que no está dirigida contra ningún antígeno celular (control de isotipo). De esta manera, las células que expresen el marcador celular CD18 conforman la población celular positiva y se visualizan como un pico diferente al control negativo de isotipo, exhibiendo una intensidad de fluorescencia verde (FL1) superior a la del control.

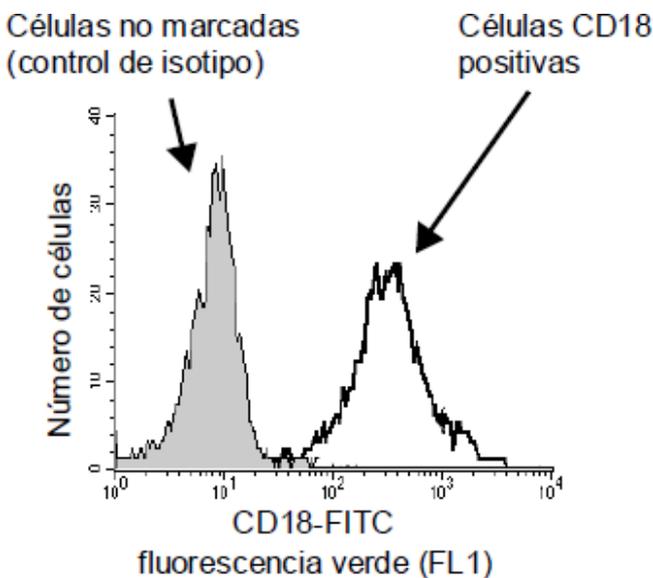


Figura 3- Histograma del análisis de la marcación de células monocíticas con anticuerpo anti-CD18-FITC (fluorescencia verde, FL1) medido por CF.

Existen otros gráficos en los que se realizan dos medidas paramétricas, una en el eje X y la otra en el eje Y, y la cantidad de células se representa mediante densidad de puntos. Los parámetros pueden ser SSC, FSC o fluorescencia. De esta forma, es factible analizar dos fluorescencias simultáneamente.

En la figura que se muestra a continuación (Figura 4), se hace referencia a una citometría de flujo realizada con leucocitos de sangre periférica de un paciente con leucemia linfática crónica de células B, que fueron marcados simultáneamente con 2 anticuerpos: anti-CD4 marcado con FITC (fluorescencia verde, FL1) y anti-CD8 marcado con ficoeritrina (PE) (fluorescencia roja, FL2). Se distinguen 3 poblaciones: en el cuadrante superior izquierdo se encuentran los linfocitos T CD8 positivos, en el cuadrante inferior derecho, los LT CD4 positivos y en el cuadrante inferior izquierdo las células que no expresan ni CD8 ni CD4 (linfocitos B y células NK). La ausencia de puntos en el cuadrante superior derecho indica que no hay células que expresen simultáneamente ambos antígenos CD4 y CD8. Si se hubiesen marcado células del timo, la mayoría de los puntos se encontrarían en el cuadrante superior derecho.

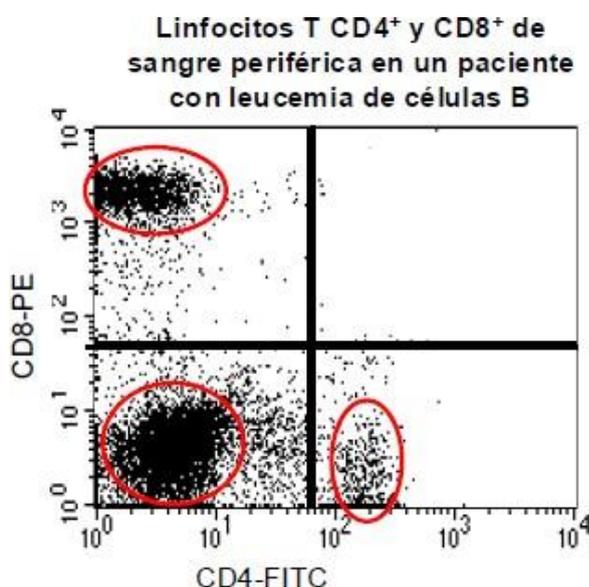


Figura 4: DotPlot de linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica en un paciente con leucemia de células B. Fuente: Guía de Técnicas Inmunológicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

4.3.2 PRUEBAS FUNCIONALES.

Las pruebas funcionales, como su nombre lo indica, permiten evaluar la actividad biológica celular. Previo a evaluar la funcionalidad, es menester conocer la viabilidad celular. Uno de los métodos más comúnmente empleados es el método de exclusión del colorante Azul Tripan, al observar las células bajo microscopio (típicamente, empleando una cámara de Neubauer para contarlas). Las células vivas, al tener intacta su membrana celular, no permiten el ingreso del colorante y por tanto no se colorean. Por el contrario, las células muertas por tener alterada la permeabilidad de la membrana citoplasmática, el Azul Tripan penetra en ellas, tiñéndolas de azul.

Dado que hay un sinnúmero de pruebas funcionales, a modo de ejemplo, es posible analizar la funcionalidad de los macrófagos midiendo la capacidad que poseen de ingerir y destruir un patógeno (fagocitosis). Por otra parte, si se desea determinar la funcionalidad de LT y/o LB se puede evaluar su capacidad de responder a un estímulo antigénico o mitogénico.

4.3.2.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DE CÉLULAS FAGOCÍTICAS (MACRÓFAGOS Y POLIMORFONUCLEARES)

Los macrófagos de pacientes que padecen la enfermedad granulomatosis crónica son incapaces de producir metabolitos del oxígeno (ej.: peróxido de hidrógeno). Por tal motivo, al presentar defecto

bactericida sufren infecciones recurrentes. La activación de los metabolitos del oxígeno es utilizada para evaluar los procesos de ingestión de dichas células.

Existen métodos cuantitativos directos para medir el peróxido de hidrógeno en medio de cultivo y otros indirectos como la reducción del NBT (*Nitro Blue-Tetrazolium*), o bien la lisis de microorganismos. El NBT es un compuesto amarillo en el medio extracelular que es incorporado a las vacuolas fagocíticas y reducido por los aniones superóxido, transformándose en un compuesto púrpura insoluble (Formazan) que se visualiza como gránulos en el citoplasma. Para evaluar la fagocitosis y lisis de macrófagos, se los incuban con levaduras (*Candida albicans*), las que se visualizan en la vacuola fagocítica de color azul al ser teñidas con Giemsa, o como una imagen fantasma cuando ya han sido lisadas.

4.3.2.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS:

Varios ensayos son utilizados para evaluar las funciones tempranas, intermedias y tardías de los LT “*ex vivo*” o “*in vitro*”. Dentro de las tempranas, que ocurren a los pocos segundos o minutos de producido el contacto celular, podemos estudiar el flujo de Ca^{++} fluorométricamente o por citometría de flujo, utilizando colorantes sensibles al Ca^{++} , como así también la fosforilación, por medio de ensayos de *Western Blot* o citometría de flujo utilizando, en ambos casos, Ac específicos para la especie fosforilada.

Las funciones intermedias pueden ser evaluadas aplicando metodologías que permitan, por ejemplo, analizar degranulación, citotoxicidad y/o producción de citoquinas en las células. La degranulación y la citotoxicidad pueden ser detectadas midiendo:

- a- La liberación de Cr^{51} que las células blanco producen al ser lisadas por linfocitos específicos
- b- La liberación de colorantes por las células blanco
- c- Marcadores celulares (ej.: CD107)
- d- La producción de granzimas por parte de los LTc
- e- La producción de citoquinas. En este último caso se puede realizar la cuantificación de estas moléculas por medio de técnicas de ELISA, RT-PCR, ELISPOT o citometría de flujo.

Para analizar las funciones celulares tardías se pueden emplear aquellas técnicas que evalúen proliferación linfocitaria y apoptosis.

Evaluación de la proliferación linfocitaria

La transformación o proliferación linfocitaria, constituye uno de los métodos más utilizados por ser simple, reproducible y semicuantitativo. La transformación de linfocitos es un término utilizado para describir los cambios morfológicos que se presentan cuando, linfocitos pequeños y en reposo, se transforman en linfoblastos en respuesta a antígenos específicos o a mitógenos inespecíficos. Entre estos últimos se encuentran aquellos compuestos extraídos de plantas como la fitohemaglutinina (FHA), concavalina A (ConA), productos bacterianos, como los LPS (lipopolisacáridos), citoquinas, como así también Acs monoclonales específicos para receptores de superficie (CD3, CD2). La FHA y la ConA son lectinas capaces de unirse a hidratos de carbono presentes en las glicoproteínas expresadas en la superficie de las células y de esta manera, desencadenan una serie de señales intracelulares que culminan en la división celular.

Mediante la proliferación celular **específica**, inducida por un determinado antígeno, a diferencia de la

inespecífica, solamente proliferan aquellas células linfocitarias efectoras y/o de memoria con especificidad para el Ag correspondiente.

Las células linfocitarias a evaluar se cultivan en un medio que posea todos los nutrientes esenciales. Para inducir la proliferación linfocitaria se añade al medio de cultivo el mitógeno elegido, para luego incubar en una atmósfera enriquecida en CO₂. Para que las células crezcan se requieren condiciones estrictas de cultivo, de modo de reproducir de la mejor manera posible las condiciones fisiológicas. Para esto, se deben tener en cuenta una serie de requerimientos:

Nutricionales: los medios de cultivo deben tener una composición determinada en aminoácidos, hidratos de carbono, iones inorgánicos y vitaminas. En la mayoría de los casos, el medio es suplementado con suero, que aporta factores de crecimiento, hormonas y otros compuestos que contribuyen al crecimiento y mantenimiento de las células. Los más utilizados son los sueros fetales y, entre ellos, el suero fetal bovino (SFB).

Fisiológicos: el cultivo debe realizarse en condiciones establecidas de temperatura, pH, presión osmótica, humedad y presión de CO₂. Para esto, se utilizan estufas gaseadas, que mantienen la temperatura (37°C) en condiciones de máxima humedad (100%) y con aporte de un 5% de CO₂.

Cuantitativos: es necesario determinar, para cada sistema, la relación óptima entre el número de células a cultivar y las concentraciones de nutrientes presentes en el medio de cultivo.

La proliferación linfocitaria puede ser determinada por:

- Evaluación morfológica: consiste en el recuento de linfoblastos presentes en el cultivo.
- Incorporación al ADN de un marcador radioactivo. La timidinatriada (³H-Tdr) es un nucleósido que se incorpora al ADN que se está sintetizando. La cantidad de ³H-Tdr incorporada, que será proporcional a la velocidad de síntesis del ADN, se determina en un contador de centelleo líquido.
- Incorporación al ADN de marcadores no radioactivos. Se basa en la incorporación de 5´bromo-2´deoxiuridina (BrdU) al ADN sintetizado. La BrdU es cuantificada mediante ELISA, empleando un anticuerpo anti-BrdU, marcado con peroxidasa o con un fluorocromo.
- Determinación colorimétrica no radioactiva. El reactivo utilizado es el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenilo)-2-(4-sulfofenilo)-2H-tetrazolium (MTS) junto a un copulador de electrones: metasulfato de fenazina (PMS). El MTS es clivado por enzimas mitocondriales, virando de un color amarillo claro a un producto soluble (formazán) de mayor intensidad, que puede ser evaluado a 490 nm. La cantidad de formazán desarrollada es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

Actualmente, estas determinaciones son ampliamente utilizadas en los diferentes campos de la medicina. Pueden ser aplicadas para:

- Determinar y controlar estados de inmunodeficiencia genética o adquirida
- Determinar el origen de una deficiencia linfocitaria
- Determinar si un individuo ha estado expuesto a un determinado Ag
- Determinar el grado de compatibilidad entre dos individuos, por ejemplo, dador y receptor de un tejido u órgano. En este caso, el método utilizado es el denominado cultivo mixto linfocitario, donde se evalúa la capacidad que presentan los linfocitos del receptor de proliferar en respuesta a los Ags MHC expresados en las células mononucleares del dador. Éstas últimas se irradian para evitar su proliferación.