

Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales

Esencialmente cualquier vertebrado podría ser una fuente válida de anticuerpos para el desarrollo de inmunoensayos.

Por ejemplo, los conejos, cabras y ovejas, entre otros, son fuentes muy utilizadas en biotecnología debido a su tamaño, fácil acceso vascular y por la naturaleza y robustez de su respuesta inmune, a partir de la cual generan altos títulos de anticuerpo por mililitro de suero.

Un solo antígeno puede presentar diferentes epitopes en su superficie, es decir, puede estimular la producción de diferentes anticuerpos, cada uno de los cuales es específico para un epítopo concreto.

Una sustancia extraña que contenga diferentes epitopes al entrar en un organismo provocará la producción de anticuerpos procedentes de diferentes clones de linfocitos B. Este conjunto de anticuerpos con diferente capacidad de reconocer y unirse a distintos epitopes del antígeno se denomina como “**anticuerpos policlonales**”.

Mientras que los anticuerpos monoclonales son específicos para un solo epítopo y están producidos por un único clon celular.

Los anticuerpos derivados de un suero de un animal convenientemente inmunizado conforman una población heterogénea de anticuerpos capaces de reconocer una variedad de determinantes antigénicos con varios grados de afinidad y especificidad y por esta razón son **anticuerpos policlonales**.

Los anticuerpos policlonales son fácilmente producidos a partir de procesos de inmunización animal que involucran administraciones reiteradas del antígeno en soluciones que contienen adyuvantes.

ADYUVANTE

Los adyuvantes son sustancias ó procedimientos que incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Los adyuvantes pretenden aumentar la

inmunogenicidad de antígenos altamente purificados y así poder reducir la cantidad de antígeno que se administra y el número de inmunizaciones necesarias, aumentando los títulos producidos de anticuerpos.

En términos teóricos el adyuvante ideal no debe ser tóxico, debe estimular la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, debe promover la respuesta inmunológica a largo plazo, lo que denominamos memoria inmunológica, no debe inducir autoinmunidad, no debe ser mutagénico, carcinogénico o teratogénico, no debe ser pirógeno y debe ser estable en condiciones de temperatura, pH y tiempo.

Tipos de adyuvantes.

Sales minerales:

- Hidróxido de aluminio
- Fosfato de aluminio

Partículas lipídicas:

- **Liposomas** (Son microesferas huecas con 1 o varias bicapas lipídicas. La membrana está constituida por colesterol y fosfolípidos semejantes a las membranas celulares, por lo que al ser introducidos en el huésped no hay rechazo)

Adyuvantes inmunoestimuladores:

- Saponinas.
- Muramil dipéptido (MPD).
- DNA bacteriano
- Lipopolisacáridos (LPS).
- Lipopéptidos.

Micropartículas:

- Microesferas de partículas biodegradables.

Adyuvantes mucosales:

- Toxina colérica.
- Toxina lábil de E. coli.

Emulsiones:

Las emulsiones son dispersiones de un líquido en otro líquido, inmiscibles entre sí, como por ejemplo, aceite y agua, cada una de las cuáles puede ser la fase dispersa o la continua, con lo que se obtiene una emulsión hidrooleosa u oleoacuosa respectivamente.

- **Adjuvante completo de Freud:** Solución hidrooleosa con aceite de parafina y micobacterias muertas.
- **Adjuvante incompleto de Freud:** Sin micobacterias.

Inmunización en animales

Son procesos que involucran administraciones reiteradas del antígeno.

Por este mecanismo se promueve el desarrollo de respuestas adaptativas que dan lugar a la proliferación de linfocitos B con secreción de anticuerpos específicos para ese antígeno administrado. Esos Ac pasan por eventos de cambio de clase y maduración de la afinidad.

Si los tiempos de inmunización son respetados, es esperable que al final del proceso se obtengan sueros con anticuerpos de alta afinidad por el antígeno y en el que predominen anticuerpos de clase IgG por sobre los anticuerpos IgM (típico perfil de Ac de una respuesta inmune Secundaria).

Los bajos costos y la rapidez de producción combinado con las buenas especificidades y sensibilidad alcanzada hacen que los anticuerpos policlonales jueguen un rol importante como herramientas de diagnóstico en la industria y comercialización de inmunoensayos.

Sin embargo, los lotes de anticuerpos policlonales son finitos y se limitan a la cantidad de suero extraído del animal. Esto de por sí es una gran desventaja ya que la “calidad” de los anticuerpos puede

variar entre lotes diferentes, aunque incluso provengan de un mismo animal.

El cambio de lote obliga a realizar reiteradas puestas a punto de los inmunoensayos, las cuales no siempre son sencillas de transitar, y muchas veces se ven afectadas por la presencia de anticuerpos no específicos capaces de generar altos ruidos de fondo en el inmunoensayo.

Los anticuerpos monoclonales se descubrieron en la primera mitad de los años setenta por Milstein y Köhler en el laboratorio de biología molecular de Cambridge (Reino Unido).

Estos autores investigaban los mecanismos moleculares de la generación de diversidad de los anticuerpos y necesitaban producir una célula B inmortal con especificidad conocida, para así poder analizar en detalle las mutaciones de los genes de las Ig.

Para ello fusionaron una línea de células de **mieloma murino (de ratón)** con células (Linfocitos B) procedentes del bazo de un animal inmunizado.

El mieloma es un cáncer de células plasmáticas. Las células plasmáticas normales se encuentran en la médula ósea y son un componente importante del sistema inmunitario.

Cuando las células plasmáticas se vuelven cancerosas y se multiplican fuera de control producen cantidades elevadas de anticuerpos (inmunoglobulina monoclonal).

Mediante esta técnica, es posible obtener poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único antígeno.

El primer paso necesario para la generación de hibridomas consiste en la inmunización de un ratón (u otro receptor animal) con el antígeno de interés al que posteriormente se le han de extraer los clones de células que sintetizan el Ac contra ese antígeno específico.

Estas células productoras de anticuerpos contra el antígeno inyectado mueren tras pocos días en cultivo in vitro, de tal manera que para obtener una fuente continua de anticuerpos, se fusionan con células que tienen elevada sobrevivencia, como son las células plasmáticas procedentes de un mieloma.

La célula que surge de fusión entre los Linfocitos B del ratón inmunizado y las células de mieloma, se denominan **Hibridomas**.

Los hibridomas proceden de un mismo clon de Linfocitos B, por lo cual son productores de Ac altamente específicos para el Ag que se usó en la inmunización del ratón (Ac. Monoclonales) y por otro lado, esos hibridomas tienen una alta tasa de multiplicación y sobrevivencia, lo que permite disponer de cantidades ilimitadas de anticuerpos con especificidades precisas.

El agente que facilita la fusión de ambas líneas celulares es el polietilenglicol, que actúa secuestrando moléculas de agua permitiendo la interacción y fusión de las membranas plasmáticas de los Linfocitos B y de las células de mieloma. Se emplea al 40-50 % (P/V).

Las células B provenían de ganglios linfáticos o del bazo de ratones inmunizados repetida y eficazmente con el antígeno deseado.

Estas células se cultivaban con las de mieloma y el agente fusionante en un medio de cultivo de composición especial que no permite la supervivencia de las de mieloma no hibridadas y tampoco permite la sobrevivencia de los linfocitos B no fusionados, sólo son viables las células fusionadas (hibridomas).

Los hibridomas creados pueden conservarse indefinidamente en dimetil sulfóxido y los anticuerpos monoclonales se purifican a partir de los sobrenadantes.

ENSAYOS INMUNOCROMATOGRAFICOS

Los ensayos de inmunocromatografía están diseñados para confirmar la presencia o ausencia de un determinado soluto en una muestra.

Estos ensayos son de detección visual y de fácil lectura y, en general, se denominan como "Test POC" (de la sigla Point-Of-Care).

Los requisitos que debe reunir un Test inmunocromatográfico se pueden resumir en los ítems siguientes:

- 1.- **Económico**, permitiendo el fácil acceso teniendo en cuenta que son Ensayos de Orientación o Screening.
- 2.- **Sensible**: con capacidad para detectar bajas concentraciones del analito de interés, es decir baja probabilidad de tener resultados Falsos Negativos y requiere bajo volumen de muestra.
- 3.- **Específico**: baja probabilidad de tener resultados Falsos Positivos, es decir, que se tendrá un resultado positivo si y sólo si el analito de interés está presente.
- 4.- **Simple Operación**: los usuarios requieren un entrenamiento mínimo ya que no se requiere equipamiento complejo para su uso y el ensayo es en un solo paso.
- 5.- **Rápido**: diseñado para generar un resultado en pocos minutos.
- 6.- **Robusto**: permite su uso en ambientes de recursos limitados y se conserva apto por largos períodos de tiempo sin cadena de frío.

Los test inmunocromatográficos más conocidos son los test de embarazo y los test de detección de estupefacientes, pero existen otros como los utilizados para detectar tóxicos presentes en el medioambiente como los pesticidas en general, para la detección de hemoglobina humana en manchas de sangre y para la detección del antígeno prostático específico en muestras de sangre y semen.

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:

- **Zona de siembra de la muestra:** es el lugar donde se deposita la muestra a analizar.
- **Zona del conjugado:** en esta zona se encuentra un Bioreactivo conjugado a nanopartículas coloreadas, por ejemplo con metales pesados (oro o selenio coloidal, color rosa o azul respectivamente). Este Anticuerpo 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 Bioreactivo 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 valida 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