

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

Cátedra de inmunología

Sandra Liliana Grenón
Beda Elizabeth Mereles Rodriguez
Carlos Federico Payes Monzón
Marcelo Ceferino Salvi Grabulosa
Jesica Deolinda Benitez
Constanza González

Cátedra: Inmunología

Colección: Cuadernos de Cátedra



**Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales**

Guía de trabajos prácticos : cátedra de inmunología / Sandra Liliana Grenon ...
[et al.]. - 1a ed. - Posadas : Universidad Nacional de Misiones, 2025.
Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-766-259-1

1. Inmunología. 2. Educación Universitaria. 3. Universidades Públicas. I. Grenon, Sandra Liliana
CDD 378

CONTENIDO

PRÓLOGO (Pág.5)

NORMAS DE BIOSEGURIDAD (Pág.6)

TRABAJOS PRÁCTICOS

- **Trabajo Práctico N° 1:** Obtención y Determinación de Antígenos (Pág.8)
- **Trabajo Práctico N° 2** Moléculas que Reconocen al Antígeno: Anticuerpos. (Pág.17)
- **Trabajo Práctico N° 3:** Células que Intervienen en la Respuesta Inmune. (Pág.27)
- **Trabajo Práctico N° 4:** Estudio Funcional de los Polimorfonucleares. (Pág.44)
- **Trabajo Práctico N° 5:** Estudio Funcional del Complemento. (Pág.50)
- **Trabajo Práctico N° 6:** Interacción Primaria ELISA e Inmunofluorescencia (Pág.55)
- **Trabajo Práctico N° 7:** Interacción Secundaria Precipitación. (Pág.64)
- **Trabajo Práctico N° 8:** Interacción Secundaria Aglutinación y Floculación. (Pág.73)
- **Trabajo Práctico N°9:** Titulación de sueros y conjugados. (Pág.79)

CUESTIONARIOS GUÍA

- **Cuestionario Guía N° 1:** Antígenos (Pág.87)
- **Cuestionario guía N° 2:** Moléculas que reconocen al Antígeno (TCR, BCR, Ac) (Pág.89)
- **Cuestionario Guía N° 3:** Células que intervienen en la Respuesta inmune. (Pág.90)
- **Cuestionario Guía N° 4:** Estudio Funcional de los PMN. (Pág.92)
- **Cuestionario Guía N° 5:** Complemento. (Pág.93)
- **Cuestionario Guía N° 6:** Interacción Primaria. (Pág.95)
- **Cuestionario Guía N° 7:** Interacción Secundaria: precipitación. (Pág.97)
- **Cuestionario Guía N° 8:** Interacción Secundaria: Aglutinación y floculación. (Pág.98)

TALLERES

- **Taller N°1:** Moléculas que intervienen en la Respuesta inmune. (Pág. 101)
- **Taller N°2:** Moléculas que reconocen al Ag (TCR, BCR). (Pág.103)
- **Taller N°3:** Órganos linfáticos Primarios y Secundarios. (Pág.105)
- **Taller N°4:** Interacción Antígeno (Ag)-anticuerpo (Ac). (Pág. 107)
- **Taller N°5:** Sistema del Complemento. (Pág.109)
- **Taller N°6:** Respuesta inmune inespecífica. (Pág.111)
- **Taller N°7 (BI):** Respuesta inmune humoral y obtención de antisueros.(Pág. 113)
- **Taller N°8 (BI):** Técnicas Inmunológicas y Algoritmos diagnósticos. (Pág.114)
- **Taller N°9 (BI):** Profilaxis. (Pág.117)
- **Taller N°10 (BI):** Hipersensibilidad. (Pág.119)
- **Taller N°11 (BI):** Respuesta inmune frente a microorganismos. (Pág.119)
- **Taller N°7 (FA):** Técnicas Inmunológicas. (Pág.122)
- **Taller N°8 (FA):** Inmunoproducidos. (Pág.125)
- **Taller N°9 (FA):** Respuesta inmune humoral y obtención de antisueros. (Pág.126)
- **Taller N°10 (FA):** Anticuerpos Monoclonales. Usos y Aplicaciones. (Pág.127)
- **Taller N° 11 (FA):** Profilaxis. (Pág.128)
- **Taller N°12 (FA):** Hipersensibilidad. (Pág.129)

ANEXOS:

- **Anexo 1:** Toma de Muestra. (Pág.131)
- **Anexo 2:** Interacción Antígeno-Anticuerpo: Generalidades. (Pág.135)
- **Anexo 3:** Técnicas Inmunológicas de Precipitación. (Pág.144)
- **Anexo 4:** Otras Técnicas de Interacción Primaria. (Pág.148)
- **Anexo 5:** Técnicas Citomorfológicas para el estudio funcional de los Polimorfonucleares. (Pág.152)

PRÓLOGO

La Inmunología, rama relativamente nueva de las ciencias biomédicas, ha tenido un desarrollo impetuoso en los últimos años, tanto en el conocimiento de sus aspectos esenciales, como en su aplicación en la práctica médica. Enseñarla es, para muchos de nosotros, una tarea compleja.

Los docentes de la Cátedra esperamos que a lo largo de este cuatrimestre, vayan descubriendo la importancia que tiene ésta en la formación del futuro profesional bioquímico y farmacéutico; y que los contenidos teóricos y prácticos aquí impartidos, les brinden las bases para una mejor comprensión de las asignaturas que cursarán con posterioridad.

Esperamos brindarles los conocimientos primordiales para lograr una sólida formación en los aspectos fundamentales de la inmunología y formar criterios para la interpretación y resolución de problemas emergentes en distintas áreas del conocimiento (biomédica, farmacología, biotecnología, medio ambiente, etc.).

Es aspiración de los integrantes de la asignatura darles las herramientas necesarias para la inserción como profesionales Bioquímicos y Farmacéuticos, capacitándolos, en el marco de la inmunología, para desempeñarse en las diferentes esferas de actuación.

Finalmente, creemos necesario aclararles que esta disciplina se encuentra en un constante avance, por lo que esperamos desarrollar en ustedes una genuina comprensión de los contenidos enseñados. Ello les facilitará la incorporación en el futuro de nuevos conocimientos a través de procesos de formación permanente.

PROPÓSITOS DOCENTES

Los propósitos de los docentes responsables del dictado de la materia Inmunología son:

- Proporcionar los conocimientos teóricos y prácticos sobre los contenidos seleccionados para el dictado de la asignatura.
- Posibilitar la integración de las diferentes unidades temáticas teóricas y prácticas.
- Establecer relaciones con disciplinas afines.
- Brindar las herramientas que posibilitan la transferencia de los contenidos a situaciones de la problemática del ejercicio profesional.
- Facilitar el desarrollo de una actitud crítica para que los conocimientos adquiridos se conviertan en el futuro en elementos para un mejor desempeño de su actividad profesional.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

La prevención de accidentes se apoya en el conocimiento de las situaciones potencialmente peligrosas y en las conductas apropiadas para afrontarlas. **La imprudencia, ya sea por ignorancia, por negligencia o por exceso de confianza, es la causa de la mayoría de los accidentes en nuestro ámbito laboral.**

Remitiéndonos al trabajo de laboratorio, consideramos tres tipos de riesgos: A) físico; B) químico; C) biológico. En este breve compendio, consideramos el riesgo de clase C, por pensar que los alumnos se han familiarizado con las medidas elementales de precaución de las otras dos clases de riesgo, en materias previas.

TODO MATERIAL BIOLÓGICO, CUALQUIERA SEA SU ORIGEN, DEBE SIEMPRE CONSIDERARSE COMO POTENCIALMENTE INFECCIOSO Y MANIPULARSE TOMANDO LOS RECAUDOS APROPIADOS.

Modos de infección más frecuentes:

- Autoinfección accidental por pinchazos o cortes con agujas, bisturís, lancetas, pipetas, etc.
- Exposición de la piel o mucosas a sangre, hemoderivados u otros fluidos biológicos.
- Inhalación de aerosoles producidos al agitar muestras, destapar tubos, o durante una incorrecta centrifugación.
- Salpicaduras en ojos, nariz o boca.

Principales normas de bioseguridad:

- Utilizar en el laboratorio ropa protectora (guardapolvo, chaqueta, etc) que debe usarse sólo dentro del recinto.
- Utilizar guantes descartables para la manipulación de materiales. No tocar con las manos enguantadas otros elementos de uso corriente (elementos de escritura, teléfonos, etc) ni el propio cuerpo. El empleo de guantes por lo general reduce la agilidad de aquellos operadores habituados a obrar sin los mismos; por ese motivo es fundamental acostumbrarse a utilizarlos siempre al trabajar.
- Lavarse las manos después de quitarse los guantes, y cada vez que se retire del laboratorio.
- Utilizar protectores oculares (antiparras) y barbijo especial cuando exista riesgo de salpicaduras o formación de aerosoles.
- Jamás pipetear con la boca ni fluidos biológicos ni reactivos. Utilizar siempre pipetas automáticas y propipetas o peras de goma.
- Evitar la formación de aerosoles, los que se producen por el agitado de tubos sin tapa, incorrecta centrifugación (sin tapa, tubos con excesivo volumen, o levantar la tapa de la centrífuga antes de tiempo), etc.

- Utilizar material descartable para la toma de cualquier muestra biológica. En caso de emplear jeringa y aguja, jamás descartar la aguja destapada.
- Al finalizar la tarea, realizar siempre una limpieza del lugar de trabajo. Emplear lavandina diluida al 10%.
- No beber, comer ni fumar en el laboratorio.
- No guardar comestibles ni bebidas en las heladeras del laboratorio.

IMPORTANTE: Todo profesional de salud debe poseer esquema completo en vacunación de las siguientes enfermedades inmunoprevenibles: hepatitis b, tétanos, difteria, tosferina, sarampión, rubeola y paperas, varicela, SARS-CoV-2, influenza (anual). Y en determinadas situaciones se indica cobertura frente a enfermedad meningocócica, fiebre amarilla, tifoidea, hepatitis A y poliomielitis.

CONOCER Y MECANIZAR ESTAS NORMAS CONSTITUYE LA MÁXIMA GARANTÍA DE SU CUMPLIMIENTO.



TRABAJO PRÁCTICO N° 1.

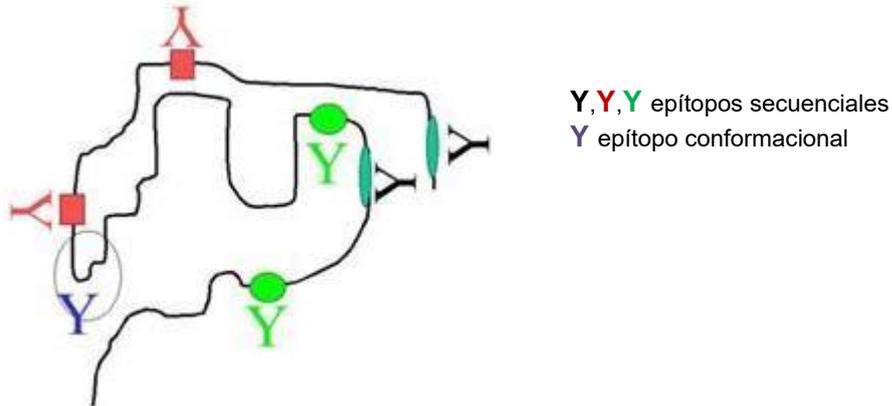
OBTENCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS

MARCO TEÓRICO

DEFINICIÓN DE ANTÍGENO: Se denomina antígeno (Ag) a cualquier organismo, molécula ó partes de una molécula, reconocidas por el sistema inmune (SI) como “extrañas”.

El sitio específico por el cual el antígeno esse une al anticuerpo ó a sus receptores de las células T ó B, se denomina **epitope** o **determinante antigénico**. La valencia de un antígeno, corresponde al número de epítomos que contiene.

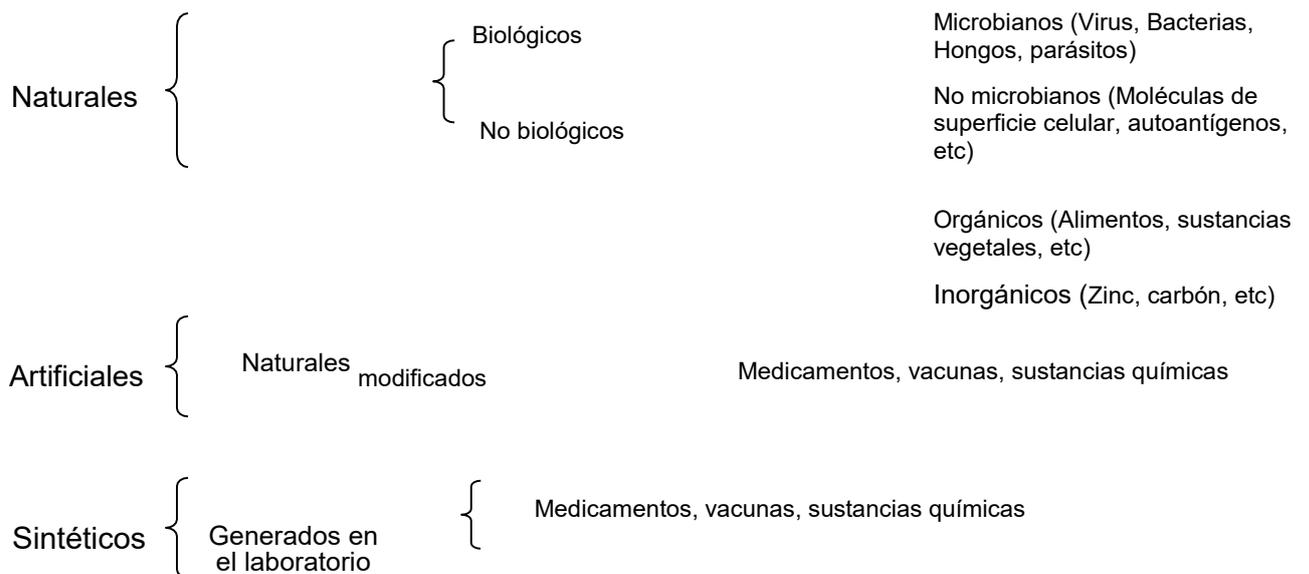
TIPOS DE EPITOPES: Los epitopes pueden ser de dos tipos: a) Determinantes antigénicos lineales o secuenciales: formados por secuencias de aminoácidos continuos y contiguos. b) Determinantes antigénicos conformacionales: constituido por secuencias de aminoácidos continuos o discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido al plegamiento o conformación tridimensional del antígeno.



CLASIFICACIÓN DE ANTÍGENOS: Los antígenos pueden ser clasificados de diferente forma según su origen, variedad o tipo, función, forma de procesamiento, presentación y tipo de respuesta que inducen.



Según su origen por variedad o tipo: naturales, artificiales y sintéticos.



- **Según su función:** inmunógeno, hapteno, tolerógeno.
Inmunógeno: Sustancia capaz de generar una RI y de enlazarse específicamente a los anticuerpos (Acs) y receptores específicos de los linfocitos B y T generados.

Hapteno: molécula de bajo peso molecular, sustancia no-inmunogénica pero que puede reaccionar con los productos de una respuesta inmune específica. Los haptenos son pequeñas moléculas incapaces de inducir una respuesta inmune por sí solos pero cuando se administran acoplados a una molécula acarreadora, sí la inducen. Los haptenos libres, sin embargo, pueden reaccionar con productos de la respuesta inmune después de haber sido inducidos éstos. Los haptenos tienen características de antigenicidad pero no de inmunogenicidad.

Tolerógeno: capaz de inducir una RI, pero las sucesivas exposiciones al Ag provocan respuestas secundarias de cada vez menor intensidad.

- **Según su origen, procesamiento y presentación:** exógenos y endógenos.
Exógenos: Se encuentran en el exterior de una célula. Pueden ser captados por una célula presentadora de antígenos (APC), procesados y presentados en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC II) a los linfocitos T (LT) CD4+.
Endógenos: Son producto del metabolismo celular o provienen de la presencia de microorganismos intracelulares. Una vez procesados pueden ser presentados en el contexto de MHC I a los LT CD8+.

- **Según la respuesta que inducen:** T- independientes y T-dependientes.
Antígenos T-independientes: Son aquellos antígenos que pueden estimular directamente a los linfocitos B para producir anticuerpos sin requerir de la presencia de los linfocitos T cooperadores. En general los lipopolisacáridos son Ags T- independientes. Se produce una respuesta humoral pobre de anticuerpos IgM y no se establece memoria del contacto.
Antígenos T-dependientes: son aquellos que no pueden estimular directamente la producción de anticuerpos sin la ayuda de las células T. Las proteínas son antígenos T-dependientes. Se produce una respuesta primaria de anticuerpos IgM y una secundaria de anticuerpos IgG y se establece un recuerdo del contacto.

FACTORES QUE CONDICIONAN LA INMUNOGENICIDAD: La capacidad que tiene una molécula para generar una respuesta inmune depende tanto de su naturaleza, como de la inherente al individuo en el que actúa.

- **Exogenicidad:** El organismo normalmente no responde frente a lo propio; esta es la primera condición para que un compuesto sea inmunogénico. Cuanto más extraña sea la sustancia (más distancia génica) mayor será su inmunogenicidad. En este sentido podemos clasificar a los inmunógenos en: **a) Xenoantígenos o heteroantígenos:** son aquellos que se encuentran en diferentes especies animales, incluyendo al hombre, Ej.: antígeno de Forssman que no lo tiene el hombre pero sí otras especies inferiores de animales. Otro ejemplo es el de la fiebre reumática; enfermedad inflamatoria sistémica caracterizada por afectar al corazón, las articulaciones, el sistema nervioso central, la piel y el tejido celular subcutáneo, en la cual, en el corazón (y otros órganos) del paciente existen moléculas de estructura similar a la del *Streptococcus beta hemolítico*; por lo que el sistema inmune ya sensibilizado, genera una respuesta que ataca a las estructuras propias que contienen configuración similar a la del estreptococo, causando un daño al tejido cardíaco, esto se denomina "reacción cruzada". **b) Autoantígenos:** son antígenos específicos de cada quien. Son antígenos específicos de cada órgano, por ejemplo: los antígenos tiroideos de una persona, no van a ser lo mismo que en otra. Lo que pasa con estos autoantígenos es que no están expuestos normalmente al sistema inmune, a pesar de que están dentro de

nuestro organismo, debido a que cuando hay organogénesis, existen ciertos órganos que se forman antes que el sistema inmune; entonces, en la formación temprana de estos órganos quedan en su interior ciertos antígenos que el sistema inmune no alcanza a conocer. Esto tiene repercusión a futuro, ya que si se produce una infección, por ejemplo, y hay destrucción del tejido del órgano, los antígenos pueden ser expuestos, y el sistema inmune al no reconocerlos desencadena una respuesta que da como resultado una enfermedad autoinmune. Ej.: Tiroiditis de Hashimoto, Lupus eritematoso, etc. **c) Aloantígenos o antígenos homólogos:** son antígenos que se encuentran en la misma especie, pero en diferentes individuos, por ej.: antígenos de los grupos sanguíneos; así, el antígeno A y el antígeno B son aloantígenos. Otro ejemplo podrían ser los antígenos de histocompatibilidad. Ejemplos de enfermedades que se puedan dar son: enfermedad hemolítica del recién nacido, reacciones de transfusión sanguínea, inmunidad de trasplantes.

➤ **Tamaño:** No hay un tamaño absoluto a partir del cual una sustancia sea determinada como inmunogénica. Sin embargo, en general, mientras más grandes sean las moléculas más inmunogénicas podrán ser.

➤ **Composición química:** En general, mientras mayor sea la complejidad química de las moléculas más inmunogénicas serán. Los determinantes antigénicos son creados por la secuencia primaria de los residuos dentro del polímero y/o por las estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias de la molécula. En general las proteínas son muy buenos inmunógenos.

➤ **Ruta de administración:** Generalmente la vía subcutánea es mejor que la vía intravenosa. La vía de administración de antígeno puede también alterar la naturaleza de la respuesta.

➤ **Dosis:** La dosis de administración de un inmunógeno puede influir en su inmunogenicidad. Hay una dosis de antígeno por arriba o por abajo del umbral en la cual la respuesta inmune no será óptima.

➤ **Número de contactos:** La frecuencia de exposición a las moléculas; se ha visto que es más efectivo administrar al inmunógeno en forma intermitente, con lapsos que permitan la sensibilización, así como la adquisición y el incremento posterior de la memoria inmunológica. Los intervalos dependerán de la naturaleza del inmunógeno y de la vía de administración.

➤ **Factores genéticos:** Algunas sustancias son inmunogénicas sólo en un tipo de especie pero no en otras. Similarmente, algunas sustancias son inmunogénicas en un individuo pero no en otros (hay respondedores y no-respondedores), depende de la expresión de los genes del CMH, del receptor del LT (TcR), de las Inmunoglobulinas y de otros genes regulatorios.

➤ **Condiciones fisiológicas:** La edad del individuo influye en la inmunogenicidad. Usualmente los muy jóvenes y los muy viejos la habilidad para montar una respuesta inmune en respuesta a un inmunógeno se encuentra disminuida. Por otro lado, moléculas con bajo poder inmunogénico se verán potencializadas, si el individuo se encuentra enfermo, desnutrido, sujeto a tratamiento con medicamentos o procedimientos inmunosupresores o bien, sometido a estrés físico, emocional y/o a contaminantes ambientales. Por el contrario, los efectos de un elemento agresor se minimizan en un organismo con integridad bio-psico-social.

En la práctica de laboratorio del presente curso para comprender mejor el concepto de antígeno, desarrollaremos como modelo de “antígeno endógeno” al que encontramos en los glóbulos rojos y permiten clasificar los grupos sanguíneos y de “antígenos exógenos” a los bacterianos específicamente.

1- ANTÍGENOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS

Los grupos sanguíneos están constituidos por aloantígenos presentes en la superficie de la membrana de los eritrocitos o glóbulos rojos, que se transmiten hereditariamente de padres a hijos según las leyes de la genética mendeliana. Su importancia clínica se debe a sus propiedades sensibilizantes, es decir, son capaces de provocar la formación de anticuerpos e inducir una reacción inmune.

El **sistema ABO** fue el primer sistema antigénico que se describió y sigue siendo el más importante en la práctica de transfusión sanguínea. El grupo sanguíneo ABO viene determinado por la presencia o ausencia de dos antígenos diferentes, A o B, sobre la superficie del hematíe y por la presencia constante en el suero de cada individuo de anticuerpos que reaccionan con los antígenos ausentes en sus hematíes.

	Antígeno eritrocitario	Anticuerpo sérico	Frecuencia fenotípica (población blanca)
Grupo A	A	Anti-B	45%
Grupo O	Ni A, ni B	Anti-A, Anti-B, Anti-A+B	43%
Grupo B	B	Anti-A	9%
Grupo AB	A y B	Ninguno	3%

La importancia transfusional del sistema ABO radica en las características de sus anticuerpos: naturales, presentes en todos los individuos, activos a 37°C y capaces de activar el complemento y de provocar una destrucción intravascular de los hematíes, por lo que, si no se respetan escrupulosamente las reglas de compatibilidad, pueden producirse reacciones graves, incluso fatales.

La determinación de los grupos ABO es fundamental en la práctica transfusional, en medicina forense, en genética y junto con la determinación de otros grupos sanguíneos, en antropología y medicina legal.

El **sistema Rh** fue descubierto en 1940 por Landsteiner y Wiener tras investigaciones realizadas con el mono Rhesus. Como resultado de dichas investigaciones se pasó a denominar Rh⁺ (positivos) a los individuos que poseían el antígeno Rh, llamado posteriormente antígeno D, presente en el 85% de las personas, y Rh⁻ (negativos) aquellos que no lo tienen. Su importancia clínica radica en la gran inmunogenicidad del antígeno D. Ello conlleva que toda persona D⁻, deba recibir sangre D⁻.

Por otro lado es el causante de la enfermedad hemolítica del recién nacido D⁺ cuya madre sea D⁻ y que posea anticuerpos anti-D (Eritroblastosis Fetal).

Existen muchos antígenos además de los mayores: A, B y Rh. Estos antígenos menores no se detectan rutinariamente durante la determinación sanguínea. Si no se reconocen, pueden iniciar una reacción a la transfusión sanguínea usualmente de menor magnitud que la de incompatibilidad de un grupo sanguíneo mayor. Estos antígenos menores se pueden detectar por medio de pruebas cruzadas, las cuales consisten en incubar el suero del receptor con los glóbulos rojos (GR) del donante en una solución salina, a la cual se le agrega suero de Coombs (Coombs indirecta). La técnica de la antiglobulina humana directa o Coombs Directo (CD), es una prueba que demuestra la presencia de anticuerpos/fracciones del complemento unido a la membrana del eritrocito *in vivo* cuya positividad se observa principalmente en anemias hemolíticas inmunes, no obstante, se han reportado casos de Coombs Directo positivo, pero sin actividad hemolítica y no siempre con significancia clínica.

Existen otros grupos sanguíneos, también clasificados por letras como, por ejemplo M, N, S y P y otros conocidos por el nombre de las personas en las que se identificaron los anticuerpos por primera vez (Kell, Duffy, etc.).

Un ejemplo de ello es el sistema Kell, descubierto por el Dr. Coombs y colaboradores en 1946, tomó su nombre por identificarse en un niño que presentó enfermedad hemolítica del recién nacido de apellido Kelleher. Está constituido por 36 antígenos, localizados en una proteína integral de la membrana eritrocitaria, homóloga a la endopeptidasa que interviene en el procesamiento de diversas hormonas. Se considera tercero en relevancia clínica por la aparición de reacciones inmunológicas postransfusionales y presencia de enfermedad hemolítica del recién nacido severa.

En las transfusiones sanguíneas uno de los tantos estudios que se deben realizar son las pruebas cruzadas de la sangre, la cual desarrollaremos en el presente trabajo práctico.

La prueba “cruzada” es la que se realiza para asegurar la compatibilidad del receptor con los hematíes del donante. Implica la incubación del suero del receptor con los hematíes del donante, para poner de manifiesto la identificación de cualquier anticuerpo clínicamente significativo que pueda existir en el suero del receptor frente a los hematíes del donante.

DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

OBJETIVO:

Poner de manifiesto los antígenos presentes en los GR y mediante las “pruebas cruzadas”, los anticuerpos que pueden reaccionar con ellos, procedimiento fundamental en la práctica de transfusión sanguínea.

MATERIALES:

- ✓ Jeringa y agujas hipodérmicas de acceso venoso.
- ✓ Algodón y alcohol 96°
- ✓ Anticoagulante EDTA
- ✓ Sangre de distintas personas (donantes y receptores)
- ✓ Antisueros anti A,B, y D
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Tubos de hemólisis
- ✓ Centrífuga
- ✓ Varillas
- ✓ Micropipeta

PROCEDIMIENTO:

A- DETERMINACION DE ANTIGENOS ERITROCITARIOS -ABO y Rh (D) en hematíes:

1. Extraer 5cc de sangre a distintas personas (donante y receptor)
2. Colocar 2,5 cc en un frasco/tubo con una gota de anticoagulante EDTA de cada paciente (donante y receptor)
3. Los 2,5 cc restantes de sangre de cada paciente (donante receptor), colocar en tubo seco, dejar coagular (a temperatura ambiente o baño de agua a 37°C) y luego centrifugar para separar el suero.(Para realizar pruebas cruzadas)

4. Determinar los antígenos de superficie de los GR de c/u de ellos, enfrentando en un portaobjeto una gota de sangre entera con los antisueros como se observa en la figura:

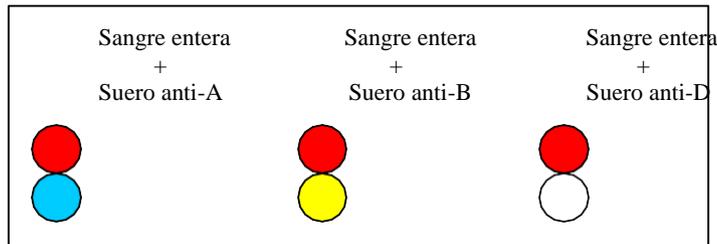


Figura N°1: correcta colocación de reactivos (Fuente: elaboración propia)



Figura N°2 Interpretación: Observar a trasluz presencia o ausencia de aglutinación (Fuente: elaboración propia).

B-PRUEBA CRUZADA-DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS SÈRICOS:

El test examina la compatibilidad entre el suero del receptor con los hematíes del/los donantes.

-Agregar en un tubo de hemólisis 100µl de sangre entera (anticoagulada) del donante con 100µl de suero del receptor, incubar 5min a 37°C.

Interpretación: Observar a trasluz presencia o ausencia de aglutinación. Para considerar apto al donante para la transfusión no debe presentar hemoaglutinación.

2-ANTÍGENOS BACTERIANOS

Las bacterias son microorganismos inferiores, son células procariontas cuya estructura básica puede ser esquematizada como en la figura N°3.

Una bacteria tipo está conformada (desde afuera hacia adentro) por:

-Cápsula: es una estructura de consistencia gelatinosa, que rodea a la pared celular. Son polisacáridos simples (exopolisacáridos) que tienen secuencias repetidas de dos o tres azúcares. En algunas bacterias el material capsular se solubiliza directamente en los medios de cultivos líquidos, mientras que en otras permanece adherido. Son **haptenos** complejos o antígenos y sirven para diferenciar tipos dentro de la especie.

-Pared celular: Les confiere resistencia a las diferentes presiones osmóticas del medio garantizando la supervivencia del microorganismo. Contiene al **antígeno O** somático. Existen diferencias entre la composición de la pared celular de las bacterias Gram positivas, Gram negativas y Micobacterias, confiriéndole por ello capacidad antigénica diferente. Básicamente podemos dividir a las bacterias según su afinidad tintorial en: Gram positivas (por. ej. *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*), y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, entre otras). Las micobacterias (por. ej. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* agentes de la tuberculosis y lepra respectivamente) se tiñen mal con la coloración de Gram, por ello son denominadas **Bacterias Acido Alcohol Resistentes (BAAR)**, por lo que para su estudio se utilizan

otras coloraciones como por. ej: Ziehl-Neelsen. En estas últimas la pared celular es altamente rica en lípidos, llamados micolípidos, algunos de los cuales como los micósidos son altamente **antigénicos**, mientras que los fosfolípidos, también presentes en la pared celular, funcionan como **haptenos**.

-**Flagelos:** están constituidos por una proteína homogénea (flagelina) que ha sido muy utilizada en estudios sobre inducción de respuesta inmune y tolerancia. Contiene al **antígeno H** o flagelar.

-**Toxinas:** pueden ser endotoxinas o exotoxinas. Las bacterias pueden elaborar toxinas y liberarlas al medio (exotoxinas) o por medio de la lisis bacteriana porciones de su pared (LPS) actuar como potentes toxinas (endotoxinas). Un **toxoides** es una toxina bacteriana cuya toxicidad ha sido atenuada o suprimida por un producto químico (formol) o por efectos del calor, mientras que se mantiene su inmunogenicidad. De este modo, cuando se utiliza durante la vacunación se genera una respuesta inmune formando una memoria inmunológica contra los marcadores moleculares del toxoides, sin producir una enfermedad inducida por toxinas.

-**Citoplasma bacteriano:** constituidos por elementos endocelulares: polisomas, cromosomas, etc. que les permitirán sintetizar sustancias diferentes, respirar en sus diferentes formas.

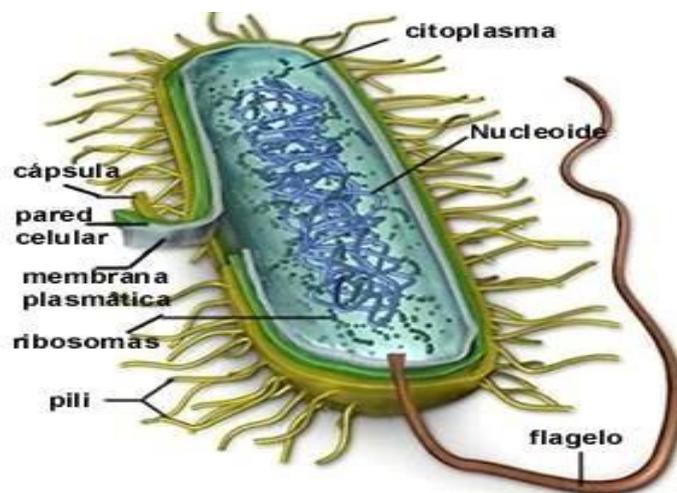


Figura N°3: Elementos de una célula bacteriana (Fuente: Madigan, T y col. Biología de los microorganismos. 2015. Pearson educación, S.A.)

DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

OBJETIVO:

Preparación y obtención de antígenos bacterianos: Antígeno O y antígeno H de bacterias Gram Negativas para uso en serología.

Materiales:

- ✓ Pipetas estériles
- ✓ Tubos de ensayo estériles
- ✓ Placas con agar nutritivo
- ✓ Cepas de estudio: *E. coli*
- ✓ Colorantes para Gram.
- ✓ Erlenmeyer estériles.
- ✓ Solución Fisiológica, y fisiológica fenolada al 5%. (SFF)
- ✓ Alcohol etílico
- ✓ Formol al 40%
- ✓ Tripaflavina al 1/500.
- ✓ Control positivo, antisuero específico.

TÉCNICA:

Cepa en estudio: cepa de *Escherichia coli* (bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*), sembrada en una placa de agar nutritivo por 18–24hs a 35-37°C.

¿Cómo obtenemos los antígenos?

1. Sembrar en placas que contengan agar nutritivo, la cepa en cuestión, incubar por 18-24 hs a 35-37°C.
2. Resuspender los microorganismos en solución fisiológica hasta una concentración de 5×10^9 a 8×10^9 UFC/ml.
3. Comprobar la pureza con coloración de Gram.
4. Comprobar estado en **fase S**, para ello poner una fracción a ebullición durante 2hs., a baño María y observar si hay floculación, o con tripaflavina (1/500) en portaobjetos. No debe haber aglutinación.
5. Fraccionar la suspensión en dos partes iguales.

Obtención de antígenos H

1. Colocar una de las fracciones en un erlenmeyer.
2. Agregar formol al 40% en proporción 4/1.
3. Dejar 2 días en heladera.
4. Hacer control de esterilidad, por siembra de la solución en un medio de cultivo (no debe desarrollar ningún germen).
5. Aprobado el paso anterior (tres días de control) se lleva la suspensión a 9×10^8 UFC/ml (3 de Mac Farland) con solución fisiológica estéril.

Obtención de antígenos O

1. Colocar una de las fracciones en un erlenmeyer.
2. Agregar igual volumen de alcohol etílico absoluto proporción 1/1.
3. Dejar 24hs a 35-37°C, para destruir los flagelos (Ag H).
4. Hacer control de esterilidad igual que en antígeno H.
5. Centrifugar a 3000rpm/15minutos.
6. Resuspender el sedimento en SFF hasta concentración 2.7×10^9 UFC/ml (3 veces más concentrado que el tubo 10 de Mac Farland.)

Conservación de los antígenos

En heladera, no congelados, por 4- 6 meses. Controlarlos periódicamente con sueros positivos de título conocido. Los antígenos obtenidos de esta forma serán utilizados posteriormente en técnicas serológicas, ya sea para la detección de anticuerpos específicos ó para la obtención de antisueros específicos inoculando animales de experimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296- 055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60- 7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición**. Editorial:Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

TRABAJO PRÁCTICO Nº 2

MOLÉCULAS QUE RECONOCEN AL ANTÍGENO: ANTICUERPOS

Introducción

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados y son sintetizados por un tipo de leucocito denominado linfocito B. Estas globulinas séricas particulares tienen la propiedad de combinarse de una manera específica con ciertas sustancias extrañas solubles o celulares, que les corresponden, denominadas antígenos. Los anticuerpos sintetizados por los plasmocitos aparecen generalmente después de la introducción de antígenos en el organismo. Actúan sobre estos últimos inmovilizándolos, aglutinándolos (aglutininas), conduciendo a su destrucción o a su disolución si se trata de elementos figurados (citotoxinas, lisinas, hemolisinas) neutralizándolos si se trata de virus o de toxinas (antitoxinas), o finalmente precipitándolos (precipitinas) si se trata de sustancias albuminoides. Son los agentes de la inmunidad.

En general, se considera que anticuerpo e inmunoglobulina son sinónimos, haciendo referencia el primer término a la función, mientras que el segundo alude a la estructura. El término gammaglobulina se debe a las propiedades electroforéticas de las inmunoglobulinas solubles en suero, donde si bien la mayoría migra como γ globulina hay cantidades significativas en las zonas de las fracciones alfa, beta e incluso con la albúmina. Ver más adelante.

Ciertos anticuerpos (**heteroanticuerpos**) aparecen en el suero después de la introducción, en el organismo, de antígenos provenientes de sujetos de diferentes especies, otros (**isoanticuerpos**), como consecuencia de la penetración de un antígeno procedente de un individuo de la misma especie y, por otro lado, los **autoanticuerpos**, pueden aparecer espontáneamente en el organismo sin aporte de antígeno extraño.

Finalmente, citemos anticuerpos que existen espontáneamente en el suero (anticuerpos naturales): por ejemplo las hemoaglutininas.

Las Ig son extremadamente heterogéneas en lo que se refiere a su enorme diversidad en relación a la unión con el antígeno (Ag) y sus distintas actividades biológicas. Sin embargo tienen una estructura básica en común que comprende cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas idénticas entre sí, llamadas pesadas (H) y otro par de cadenas, asociadas por puentes de sulfuro, idénticas llamadas cadenas livianas (L) de menor tamaño. Existen cinco clases de cadenas H diferenciadas por variaciones estructurales y antigénicas. Las cadenas H se denominan ζ , μ , α , γ , δ y determinan cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD respectivamente.

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy semejante, una pequeña región de la proteína es extremadamente variable. Corresponde a la porción aminoterminal denominada zona variable (V) y es en ésta donde se encuentra el sitio de unión al Ag (paratope). La única parte del antígeno reconocida por el anticuerpo se denomina epítipo.

Marcadores antigénicos de las inmunoglobulinas

Las Ig humanas son excelentes inmunógenos y se puede obtener suero anti Ig humana en una gran variedad de animales (mono, caballo, conejo, oveja, etc.). Con estos antisueros se pueden correlacionar los distintos sitios antigénicos con características estructurales y con aminoácidos específicos.

Los Ag de las Ig se han clasificado en tres grupos:

- 1- **Isotipos:** se hallan presentes en todos los sueros normales y son los que permiten identificar las distintas clases, subclases, tipos y subtipos de Ig. Están relacionadas a las características de los dominios constantes de las cadenas pesadas, preferentemente en el fragmento Fc, por ej. Existen 4 isotipos de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.
- 2- **Alotipos:** están presentes en algunos sueros normales y están gobernados por genes alélicos. Estos Ags denotan diferencias entre las Ig de igual isotipo de distintos individuos, de forma similar a lo que ocurre con los grupos sanguíneos humanos. Así, por ejemplo, dos IgG1 (K) pueden presentar distintos alotipos. Están localizadas en los fragmentos constantes de las cadenas H y L.
- 3- **Idiotipos:** son antígenos relacionados con la zona V de las Ig (cadenas H y L) y corresponden a la estructura única y particular que representa cada sitio específico de unión al Ag. Así, por ejemplo, dos clases distintas de Ig como ser IgM e IgD sobre la membrana de un mismo linfocito, tienen igual especificidad, es decir, tienen igual sitio de unión al Ag, por lo tanto, igual idiotipo. Normalmente, los distintos clones de linfocitos B producen idiotipos distintos entre sí, no compartidos entre ellos, a los que se llama idiotipos privados. También puede ocurrir que determinados determinantes idiotípicos sean comunes a dos o más clones, por lo que en este caso se habla de idiotipos públicos o de reacción cruzada. Debido a que distintos clones de linfocitos B de un mismo individuo pueden usar la misma región génica para construir sus porciones variables.

Actividad biológica de las inmunoglobulinas

Las Ig son moléculas bifuncionales que tienen como actividad primaria la de ligar al Ag, y que, además, presentan una serie de actividades biológicas secundarias relacionadas con la porción Fc.

Las distintas clases y subclases de Ig tienen diversas actividades biológicas y diversos sitios de acción: la IgM y la IgG actúan principalmente en el compartimiento vascular. La IgA en secreciones y la IgE fija en los tejidos.

Para mayor comprensión del tema se sugiere leer y resolver el cuestionario guía N°2 (Moléculas que reconocen al Ag.)

Existen en el ser humano cinco clases distintas de inmunoglobulinas, con estructuras químicas y funciones biológicas características: IgM, IgA, IgG, IgE e IgD; sin embargo, todas ellas se asemejan en su estructura molecular, presentando dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos pesadas, diferentes para cada tipo.

La primera consiste normalmente en un pentámero de unidad básica de cuatro cadenas peptídicas y la segunda puede presentarse en forma de monómero, dímero o trímero; en tanto, las tres últimas aparecen en la naturaleza sólo como monómeros en estas cuatro cadenas peptídicas.

DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO: “TÉCNICAS DE ESTUDIO DE ANTICUERPOS”.

Objetivos:

Estudiar los métodos de cuantificación de proteínas, las distintas fracciones proteicas del suero sanguíneo, los distintos tipos de inmunoglobulinas, los anticuerpos naturales, heterófilos y específicos.

Cuantificación de proteínas Fundamento de la Técnica de Biuret

Es un método colorimétrico descrito por Gornall y Al. Las relaciones peptídicas de las proteínas reaccionan con Cu^{++} en solución alcalina para formar un complejo coloreado del cual la absorbancia, proporcional a la concentración de las proteínas en la muestra, es medida a 550 nm. El reactivo Biuret contiene Tartrato sódico potásico, que acompleja los iones cúpricos y mantiene su solubilidad en solución alcalina.

A) Separación de proteínas Proteinograma electroforético

Fundamento:

El proteinograma electroforético (o electroforesis de proteínas del suero) es una técnica de laboratorio que permite separar las proteínas séricas en distintas fracciones por medio de la aplicación de un campo eléctrico.

Esta prueba es muy usada para evaluar y monitorear distintos cuadros clínicos así como también de gran ayuda en el diagnóstico de distintas enfermedades asociadas a desórdenes proteicos.

El suero contiene muchas proteínas (proteínas transportadoras, enzimas, anticuerpos, etc.). Tanto la carga eléctrica que poseen las proteínas, dada por los aminoácidos que la componen, como su peso molecular y tamaño afectan su movimiento sobre un soporte cuando se aplica un campo eléctrico. Es decir, pequeñas proteínas altamente cargadas migran más rápido que grandes proteínas, lo que permite que se separen durante la corrida electroforética.

La distinta velocidad de migración permite la formación de varias bandas o fracciones en el gel de electroforesis, formadas por grupos de proteínas de tamaño y carga similar.

Por lo tanto la electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla del gel (una red tridimensional de fibras cruzadas), por lo que las pequeñas se moverán mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

Procedimiento:

Soportes tipo 1: acetato de celulosa gelificado o agarosa, donde se observan 5-6 bandas de proteínas plasmáticas (la migración es según relación carga-masa de cada proteína)

Soportes tipo 2: almidón o poliacrilamida, donde se observan 25 o más bandas (la migración es según la relación carga-masa y tamaño).

En los laboratorios clínicos se usa habitualmente los soportes tipo 1 ya que son más fáciles de interpretar.

- Se coloca el soporte en la cuba de electroforesis con un buffer de corrida de pH y fuerza iónica determinados tal que las proteínas posean carga eléctrica negativa y migren hacia el ánodo (polo +) cuando se aplica voltaje.
- Luego de terminada la corrida se retira el soporte y se deja evaporar el solvente.

Se fijan las bandas y se colorean con algún colorante para proteínas (según el soporte usado): - Rojo Ponceau (acetato), - Negro Amido (agarosa), etc.

Las bandas pueden mirarse a simple vista o leerse con un densitómetro (aparato que permite cuantificar la intensidad y el ancho de cada banda para conocer el porcentaje de cada fracción proteica). Por los métodos estudiados en el punto A) se determina la concentración de las proteínas totales del suero, es posible calcular el contenido de cada fracción.

Como se observa en la Fig.1, las proteínas se separan normalmente en 5 fracciones: albúmina, y α_1 , α_2 , β y γ -globulinas

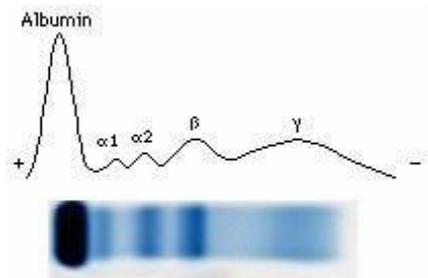


Fig. 1 Gel de un proteinograma de suero normal y lectura por densitómetro

Albúmina: es una proteína que se sintetiza en el hígado, y es la de mayor concentración en el suero. Además de su función de transportadora de algunas sustancias endógenas y exógenas, es de gran importancia en el mantenimiento de la presión coloidosmótica y reservorio móvil de aminoácidos.

α -globulinas: incluye varias proteínas, algunas se mencionan a continuación:

α_1 globulina: incluye principalmente a la α_1 -antitripsina, una proteína de fase aguda.

α_2 globulina: en esta fracción se encuentra la haptoglobina, una proteína que une hemoglobina intravascular evitando su excreción por el hígado. También se encuentran

α_2 -macroglobulina y ceruloplasmina.

En general, los niveles de las proteínas de las fracciones α_1 y α_2 globulina se incrementan en inflamación.

β -globulinas: incluye proteínas de baja densidad involucradas en el transporte lipídico (lipoproteínas), de hierro (transferrina) y factores del complemento (C3 y C4).

γ -globulinas: en esta fracción están incluidos los Ac del isotipo IgG.

Es importante aclarar que no todos los anticuerpos migran electroforéticamente con las γ -globulinas, sino que algunos de ellos lo hacen con las α y β globulinas. (ver fig.2)

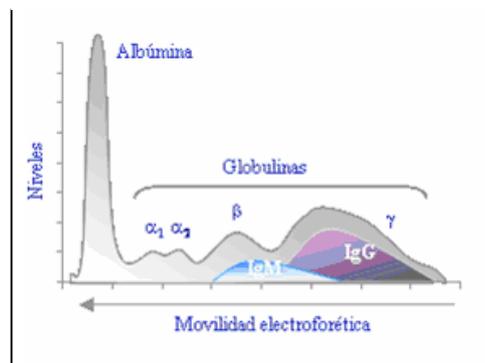


Fig. 2. Proteinograma electroforético.

Técnica del Proteinograma Electroforético (Kohn H.):

Materiales:

- Suero
- Buffers
 - 1) Veronal Sódico 0.4 M (Dietil Barbiturato de Sodio 9,24 g/l)
 - 2) Veronal Sódico 10,30 g -Veronal Ácido 1.34 g/l
- Colorantes-Decolorantes:

Colorantes	Decolorante
1) Colorante: Amido – Schwartz: 0.5 g/l en 45 ml de metanol + 45 ml de agua + 10 ml Ácido Acético	2) 475 ml metanol + 475 ml de Agua + 10 ml Ácido Acético.
3) Ponceau S : 0.5 g en 100 ml de Ácido Tricloroacético al 5%.	Acido Acético 5%

- Solución Eluyente : Ácido Acético 80%
- Baño Deshidratante: Metanol puro
- Baño transparentador: 85 ml de metanol + 14 ml ácido acético + 1 ml de glicerol

Procedimiento:

Sumergir las tiras de acetato de celulosa en el buffer por lo menos 15 min.

- 1) Eliminar el exceso de líquido de las tiras de absorbiendo suavemente entre dos hojas de papel de filtro.
- 2) Extender las tiras sobre el puente de la cámara electroforética.
- 3) La superficie activa (opaco) penetrable por las proteínas debe quedar hacia arriba. La tira debe estar bien estirada sobre el puente.
- 4) Efectuar la migración electroforética durante aproximadamente 1 hora a 200 V (1 mA/cm de ancho de tira) utilizando azul de bromofenol como marcador del frente de la corrida.
- 5) Cuantificación: puede realizarse por Elución o por densitometría.
 - a. Elución:
 - i. Cortar las fracciones coloreadas e introducirlas en tubos de ensayo preparadas en series de cinco.
 - ii. Agregar 6 ml de de solución eluyente para la Albúmina
 - iii. Agregar 3 ml para las otras fracciones.
 - iv. Leer en espectrofotómetro:
 - a) A 620 nm para el amido Schwartz
 - b) A 520 nm para Rojo ponceau S.
 - b. Densitometría:
 - i. Decolorar las tiras hasta obtener un fondo claro.
 - ii. Transparentar la tira: Sumergir las tiras en Metanol puro 30 seg. En cubeta seca y luego en solución transparentadora durante 1 minuto.
 - iii. A continuación se coloca sobre una placa de vidrio sin que queden burbujas de aire y se calienta con lámpara infrarroja durante unos minutos, a unos 5-10 cm de distancia hasta transparencia completa. De lo contrario se pueden colocar las tiras en una estufa a 60-70°C hasta perfecta transparencia.
 - iv. Luego invertir la placa de vidrio sobre papel de filtro, dejando enfriar durante unos 20 min, donde se pueden conservar indefinidamente.

B) Variaciones estructurales de los anticuerpos. Clasificación

Los tipos (y subtipos) de inmunoglobulinas pueden estudiarse por técnicas de interacción primaria (ELISA, Quimioluminiscencia, RIA) o por técnicas de interacción secundaria (precipitación, aglutinación) solamente se pueden estudiar las tres primeras debido a su concentración sérica y por la sensibilidad de la técnica.

Técnica de IDR ver guía TPN^o5: técnicas de interacción 2^o precipitación.

Alotipos:

Son variaciones de las regiones constantes de las cadenas pesadas y livianas presentes solo en algunos individuos sanos de esa especie. Dependen genéticamente de diferentes alelos.

C) Anticuerpos Naturales:

Son aquellos que se encuentran en el suero de individuos sin que estos hayan tenido contacto (aparente) con su antígeno.

Los Acs eritrocitarios AyB son polisacáridos constituyentes de la membrana de los GR de los individuos que poseen los genes A y B, respectivamente. En el suero de las personas cuyos hematíes tienen el Ag A se encuentran anticuerpos naturales antiB y viceversa,

En el suero de personas cuyos hematíes contienen ambos antígenos AB, no se encuentran anticuerpos naturales. En el suero de las personas cuyos hematíes no contienen los Ag A ni B (clasificado como O), contiene ambos Acs antiA y Anti B. Ver Tabla 1.

Tabla 1: Anticuerpos naturales según la composición de Antígenos hemáticos humanos:

Antígenos hemáticos	A	B	AB	O
Anticuerpos naturales	Anti A	Anti B	Ninguno	Anti A y Anti B

Este fenómeno se puede observar realizando pruebas de laboratorio denominadas pruebas cruzadas, por técnicas de AGLUTINACIÓN DIRECTA, los Acs naturales se unen a los hematíes que poseen el correspondiente determinante antigénico produciendo una reacción aglutinación (se observan como pequeños grumos)

Procedimiento

Pruebas cruzadas

- 1) Tomar 5 cc de muestras de sangre, de pacientes con grupo sanguíneos A, B, AB, O.
- 2) Rotular 2 tubos para cada extracción de la siguiente manera: 1 (grupos sanguíneos A), 2 (grupos sanguíneos B), 3 (grupos sanguíneos AB), 4 (grupos sanguíneos O)
- 3) Descargar suavemente por las paredes de uno de los tubos rotulados: 3 cc en los tubos rotulados sin anticoagulante y 2 cc en los frascos rotulados con una gota de anticoagulante EDTA, agitando este último suavemente por inversión sin formar espuma.
- 4) Obtención de Suero:
 - a. Dejar incubar los tubos en baño maría a 37 °C durante 30-60 minutos, hasta la separación del suero.
 - b. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
 - c. Separar el suero del coágulo y descargarlo en tubos rotulados de la misma forma.
- 5) Obtención de glóbulos rojos lavados:
 - a. Agregar 3 cc de solución isotónica fisiológica (CINa 0,85%) a los tubos

que contienen sangre con anticoagulante (sangre entera) agitar suavemente por inversión sin formar espuma.

- b. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.
 - c. Descargar el sobrenadante extrayendo con pipeta pasteur.
 - d. Repetir este procedimiento dos veces más.
- 6) Técnica de la prueba cruzada:
- a. Depositar en una placa de vidrio con pipeta pasteur 1 gota de sangre lavada de cada grupo sanguíneo obtenido (como mínimo A, B, O).
 - b. Depositar al lado de cada gota de sangre una gota del suero 1, en otra placa una gota del suero 2, 3 y 4 sucesivamente.
 - c. Mezclar con una varilla distinta cada gota de suero con su correspondiente gota de sangre.
 - d. Agitar la placa balanceándola suavemente por los cuatro costados, durante 2 minutos.
 - e. Observar aglutinación (formación de grumos)
 - f. Registrar en la planilla de resultados adjunta (cada grupo):

Grupo 1. Alumnos

Grupo Sanguíneo	A	B	AB	O
Suero (ej.)	1	1	1	1
Resultado Aglutinación +/-				

- g. Registrar Interpretación de resultados (cada grupo):
 - i. El suero 1 (2, 3, 4) tiene anticuerpos naturales contra el Antígeno sanguíneo A o B o AyB o contra ningún antígeno
- h. Integrar los resultados en planilla adjunta (cada grupo):
(Marcar con una (+) si aglutino y con un (-) si no aglutino)

Grupo 1. Alumnos

Suero/ Grupo Sanguíneo	A	B	AB	O
Suero 1				
Suero 2				
Suero 3				
Suero 4				

- i. Interpretar los resultados (cada grupo):

D) Anticuerpos Heterófilos:

El suero de una especie determinada aglutina los glóbulos rojos pertenecientes a otras especies, sin haber tenido contacto con esos glóbulos rojos. Estos anticuerpos naturales se denominan heterófilos.

Procedimiento

- 1) Utilizar los sueros obtenidos en el punto anterior.
- 2) Rotular y lavar los glóbulos rojos de las especies animales obtenidas:
 - a. Agregar 3 cc de solución isotónica fisiológica (CINa 0,85%) a los tubos que contienen sangre con anticoagulante de especies animales (sangre entera) agitar suavemente por inversión sin formar espuma.
 - b. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.
 - c. Descargar el sobrenadante extrayendo con pipeta pasteur.
 - d. Repetir este procedimiento dos veces más.
- 3) Técnica de Aglutinación:
 - a. Depositar en una placa de vidrio con pipeta 1 gota de sangre lavada de las especies animales obtenidas.
 - b. Depositar al lado de cada gota de sangre 1 gota del suero 1, en otra placa del suero 2, 3 y 4 sucesivamente.
 - c. Mezclar con una varilla distinta cada gota de suero con su correspondiente gota de sangre.
 - d. Agitar la placa balanceándola suavemente por los cuatro costados, durante 2 minutos.
 - e. Observar aglutinación (formación de grumos)
 - f. Registrar en la planilla de resultados adjunta (cada grupo):

Grupo 1. Alumnos

Grupo Sanguíneo especie				
Suero (ej.)	1	1	1	1
Resultado Aglutinación SI/NO				

- g. Registrar Interpretación de resultados (cada grupo):
 - i. El suero 1 (2, 3, 4) tiene anticuerpos naturales contra el Antígeno sanguíneo de las especies animales obtenidas o contra ningún antígeno
- h. Integrar los resultados en planilla adjunta (cada grupo): (Marcar con (+) si aglutina y con (-) si no aglutina)

Grupo 1. Alumnos

Suero / GR especie animal	GR sp	GR sp	GR sp	GR sp
Suero 1				
Suero 2				
Suero 3				
Suero 4				.

i. Interpretar los resultados (cada grupo):

E) Anticuerpos específicos:

Son aquellos que se encuentran en el suero de individuos que han tenido contacto con su antígeno.

Trabajo Práctico:

- 1) Utilizar los sueros obtenidos en el punto anterior.
- 2) Hacer reaccionar con antígenos vacunales.
- 3) Técnica de Aglutinación:
 - a. Depositar en una placa de vidrio con pipeta 1 gota de los antígenos vacunales.
 - b. Depositar al lado de cada gota del antígeno 1 gota del suero 1, en otra placa del suero 2, 3 y 4 sucesivamente.
 - c. Mezclar con una varilla distinta cada gota de suero con su correspondiente gota de antígeno.
 - d. Agitar la placa balanceándola suavemente por los cuatro costados, durante 2 minutos.
 - e. Observar aglutinación (formación de grumos)
 - f. Registrar en la planilla de resultados adjunta (cada grupo):
Grupo 1. Alumnos
 - g. Registrar Interpretación de resultados (cada grupo):

Grupo Sanguíneo	Ag vacunal	Ag vacunal	Ag vacunal	Ag vacunal
Suero (ej.)	1	1	1	1
Resultado Aglutinación +/-				

El suero 1 (2, 3, 4) tiene anticuerpos específicos contra el Antígeno vacunal o contra ningún antígeno.

- h. Integrar los resultados en planilla adjunta (cada grupo). Interpretar los resultados (cada grupo).

Suero/ Ag vacunal	Ag vacunal	Ag vacunal	Ag vacunal	Ag vacunal
Suero 1				
Suero 2				
Suero 3				
Suero 4				

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros
- Margni R. **Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición**. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros
- Microbiología Biomédica. Coto C, de Torres R. Basualdo J, 2ª Ed. Editorial Atlante. Buenos Aires 2006.
- Inmunología e Inmunoquímica – Fundamentos. Margni, Editorial Panamericana, 5ª Ed.
- Inmunología en línea. Universidad de Córdoba. España. José Peña Martínez
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Año 2005.
- Federico Alquel. Manual de Análisis clínicos. 3º Ed. Panamericana. Universidad Nacional de Tucumán.
- El Laboratorio y su interpretación semiológica. Kalinov. 1984. Ed. Lopez Libros Editores.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. FCEQyN. UNaM. Año 2016.
- Guía de Trabajos Prácticos. Facultad De Ciencias Veterinarias. U.N.C.P.B.A. 2008
- Guía de Trabajos Prácticos Inmunología. Año 2010. Disponible en exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/guia

TRABAJO PRÁCTICO Nº 3

CÉLULAS QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA INMUNE

INTRODUCCIÓN.

Las células que intervienen en la respuesta inmune, al igual que el resto de las células sanguíneas, derivan de un progenitor común, la célula madre hematopoyética. (Figura Nº1)

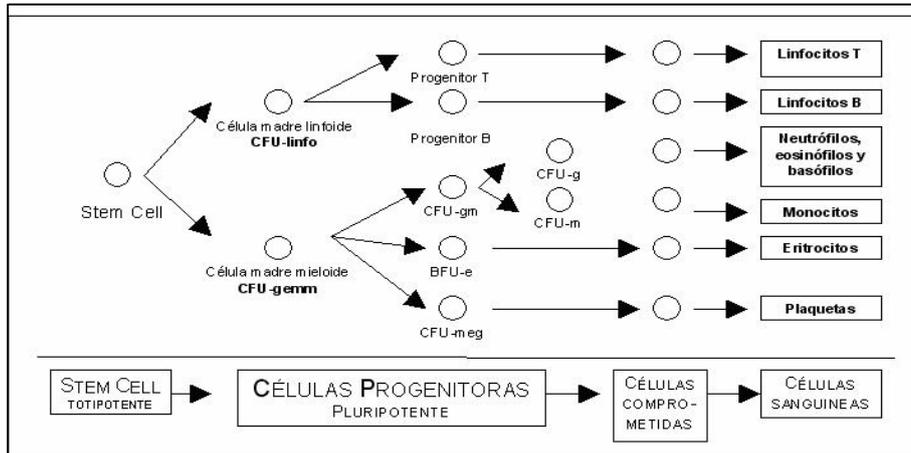


Fig. Nº1. Hematopoyesis (Fuente: elaboración propia)

De este modo podremos establecer 2 líneas celulares, la progenie linfóide y la progenie mielóide.

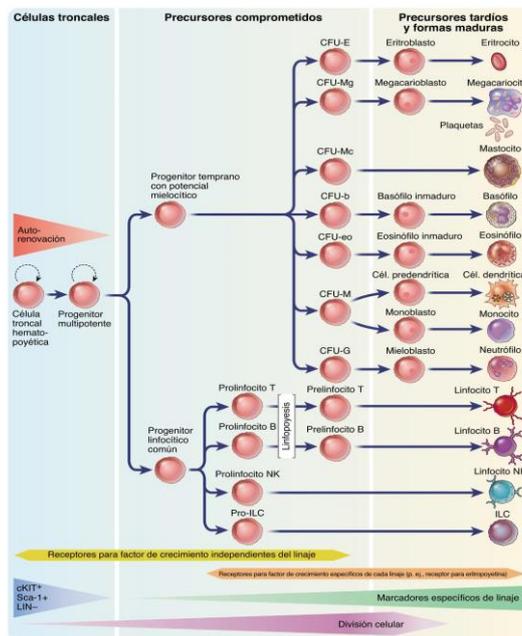


Figura Nº2. Eritropoyesis (Fuente: Abbas. Inmunología celular y molecular)

PROGENIE LINFOIDE.

En sangre, los linfocitos constituyen aproximadamente el 30% del total de los glóbulos blancos. Se pueden encontrar de distintos tamaños, grandes, medianos y pequeños. Los linfocitos pequeños son los que se encuentran más comúnmente y su diámetro es aproximadamente igual o ligeramente mayor al de un hematíe. El núcleo es redondo, basófilo, puede presentar agregados de cromatina y una pequeña escotadura en su contorno. El citoplasma se limita a una estrecha franja que rodea al núcleo de color azul-celeste; en general no se observan granulaciones en él.

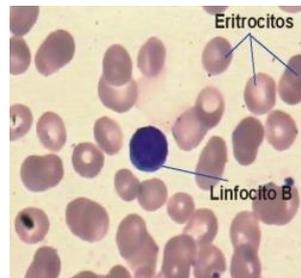


Figura N°3: Linfocito X1000 Giemsa (Fuente: elaboración propia)

Si encontramos linfocitos de tamaño mayor observaremos el núcleo desplazado hacia la periferia, mayor cantidad de citoplasma y algunas granulaciones azurófilas. La basófila del citoplasma de los linfocitos se debe al gran contenido de ARN y se puede tornar en un azul más intenso cuando son estimulados.

Estas morfológicamente indistinguibles, pueden ser sub clasificadas en linfocitos B (LB), T (LT) y natural killer (NK), cada una con aptitudes y marcadores de superficie diferentes. Los linfocitos pequeños (linfocitos B y T) son responsables del reconocimiento específico del antígeno y del inicio de la respuesta inmune adaptativa.

Linfocitos B (LB): Expresan sobre su superficie BCR (IgM⁺/IgD⁺/CD79⁺)

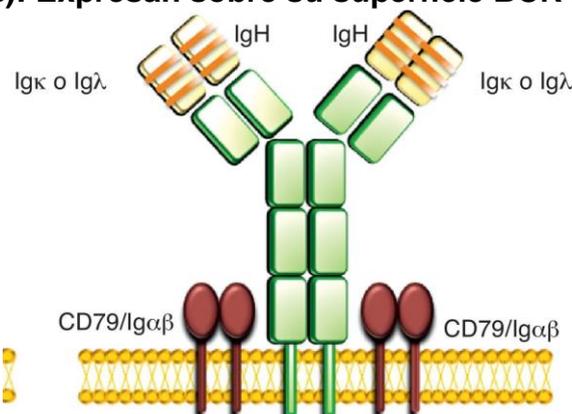


Figura N°4: BCR (Fuente: Garcia Mariscal A. y col. Inmunología, 2013, 32 (2): 57-69. Elsevier)

Se producen y maduran en la médula ósea y terminan de diferenciarse en subpoblaciones efectoras y de memoria en órganos linfoides secundarios, posterior a la estimulación antigénica.

Se encargan de la defensa frente a antígenos exógenos y libres.

El linfocito B estimulado o célula plasmática presenta una morfología diferente a la originaria del linfocito B virgen, más típica de una “célula –factoría” con un núcleo pequeño y un gran citoplasma.

Se distinguen 3 subpoblaciones de Linfocitos B:

Un **LB2** estimulado por un antígeno se transforma en un clon de células plasmáticas que producirán y segregarán anticuerpos en gran cantidad, con la misma especificidad.

LB1 (ubicados el pleura y cavidad peritoneal) producen los “anticuerpos naturales” y Linfocitos

de la zona marginal del bazo con función importante en la inmunidad frente a capsulados.

Linfocitos T (LT).

Expresan sobre su superficie TCR ($\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$, $CD45^+$, $CD3^+$)

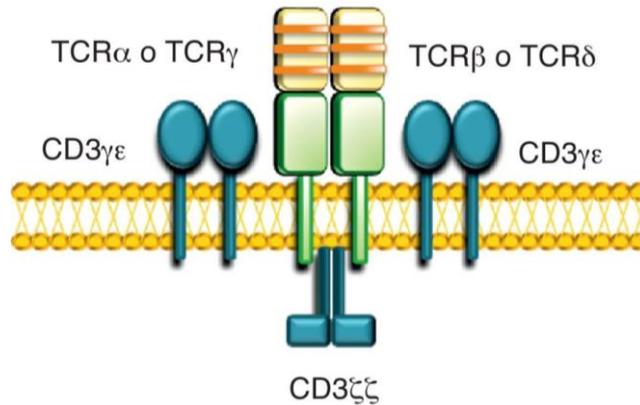


Figura N°6: TCR (Fuente: Garcia Mariscal A. y col. Inmunología, 2013, 32 (2): 57-69. Elsevier)

Se producen en la médula ósea y maduran en el timo y tras la estimulación antigénica específica, terminan de diferenciarse en subpoblaciones efectoras y de memoria en órganos linfoides secundarios. Encargados de la defensa frente a antígenos intracelulares y extracelulares.

Se subclasifican en:

Linfocitos T $CD8^+$ o citotóxicos: encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular, mediante la interacción con un complejo "péptido-CMH-I"; los LTCTX reconocen las células infectadas por el patógeno para el que son específicos o células tumorales, y las destruyen segregando una serie de moléculas (perforina, granzimas, Fas-L o TRAIL-R) que activan la apoptosis de la célula diana.

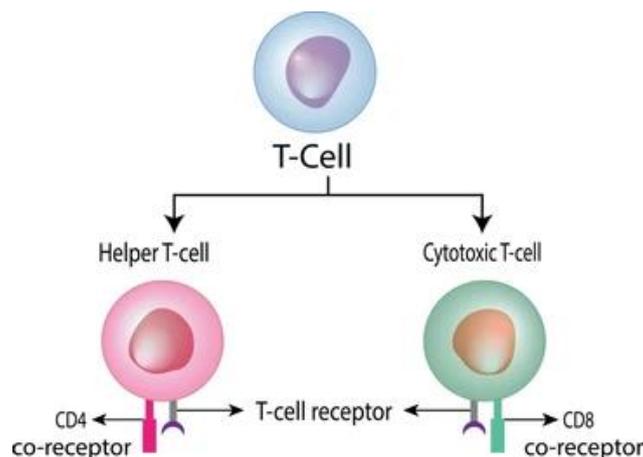


Figura N°7: Poblaciones de Linfocitos T. (Fuente: <https://stock.adobe.com/es/images/t-cell-helper-t-cell-and-cytotoxic-t-cell-cd-antigen-types-cd4-and-cd8-vector-illustration/503983803>)

Linfocitos T CD4⁺ o helper o colaboradores: se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmune coordinada mediante la interacción con un complejo "péptido-CMH-II". Cuando se activan, los linfocitos CD4⁺ se especializan, diferenciándose a su vez en linfocitos efectores, que se distinguen por el tipo de citoquinas que producen, hacia otras subpoblaciones:

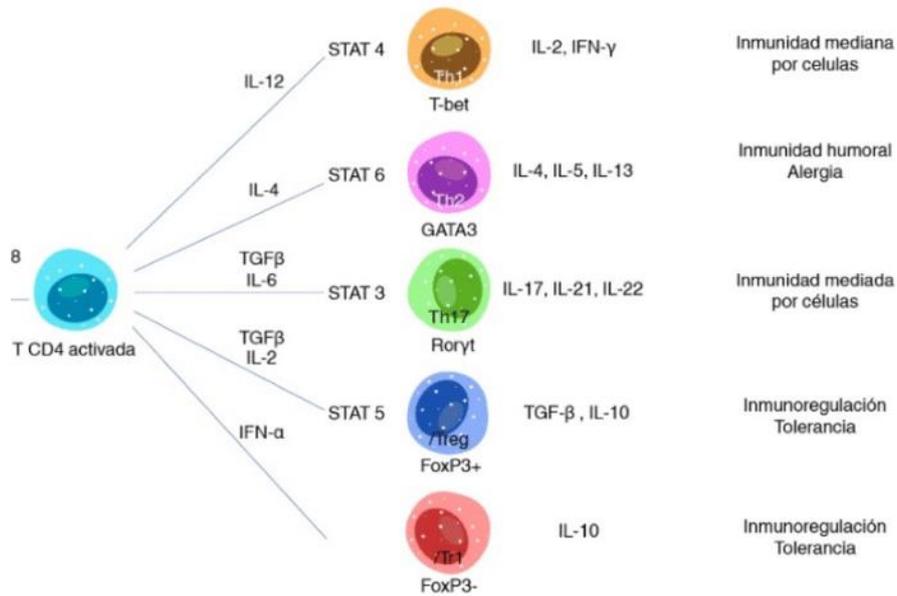


Figura N°8: Perfiles funcionales de Linfocitos T Cd4+ (Fuente: O' Shea y Paul, Mecanismos subyacentes compromiso de linaje y plasticidad ayudante CD4. Ciencia 2010 Feb 26; 327 (5969): 1098-102)

Células Natural Killer (NK).

Expresan sobre su superficie CD16⁺, CD56⁺ CD3⁻.

Son un tipo especial de linfocitos, situados en la respuesta inmune innata (la inflamación). Las células NK provienen del mismo precursor hematopoyético que el resto de los linfocitos T, pero no expresan el TCR.

Se distinguen dos subpoblaciones con funciones efectoras diferentes:

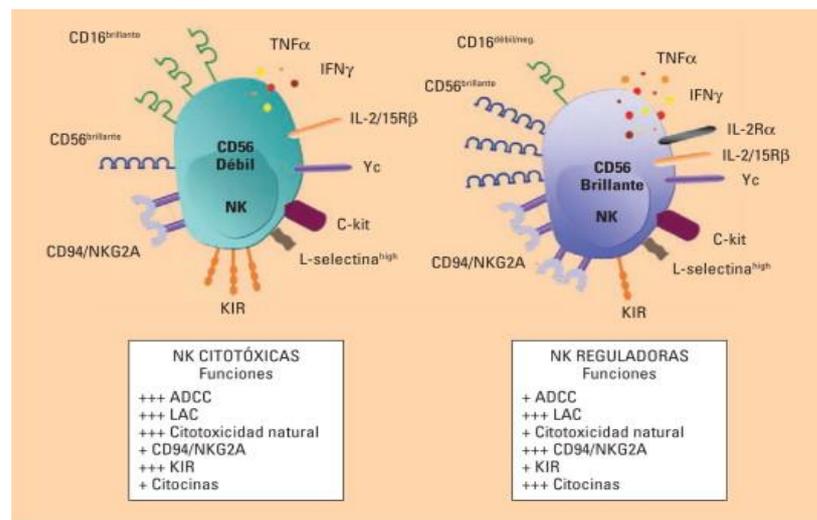


Figura N°9. Subpoblaciones de NK (Fuente: Monserrat Sanz J. y col. Linfocitos asesinos naturales. Medicina. volumen 11, número 28, marzo de 2013, páginas 1728-1736. ScienceDirect)

Éstas células pueden recibir dos tipos de señales:

- **Activadoras:** las células NK expresan las moléculas Fas-L o TRAIL, capaces de detectar la presencia de Fas o TRAIL-R en la célula diana, relacionadas con la apoptosis.

La ausencia de moléculas CMH-I en la superficie de la célula diana, bien por infección viral o desarrollo tumoral (que ha bloqueado la producción de moléculas CMH-I), bien porque se trata de una célula exógena, en el caso de un transplante.

- **Inhibidoras:** mediada por los receptores específicos para las moléculas CMH-I, denominados KIR, por *killer-cells immunoglobulin receptor*. Estos receptores pertenecen a una familia de multigenes similares a las inmunoglobulinas, que han evolucionado recientemente; son los receptores principales tanto para moléculas CMH-I clásicas (HLA-A, HLA-B, HLA-C) y para la molécula CMH-I no clásica HLA-G en primates. Algunos KIR son específicos para ciertos subtipos HLA.

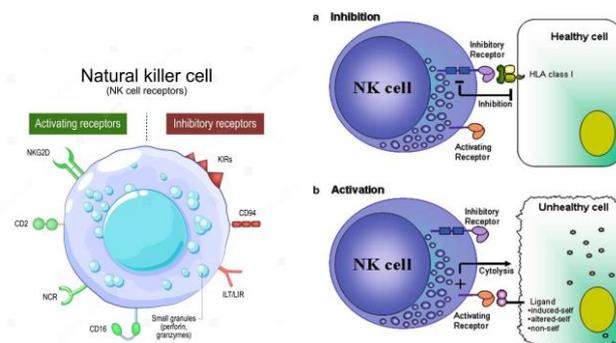


Figura N°10. Células NK y Receptores activadores e inhibidores. (Fuente: Rubén Coscojuela. Histocompatibilidad, 2019. Disponible en <https://rafer.es/innovación-laboratorio-clinico/celulas-nk-y-receptores-kir>)

Recuérdese que las distinciones entre las diferentes poblaciones linfocitarias ($L_T/L_B/NK$) no pueden ser observadas en un frotis sanguíneo. Para ello se utilizan desde microscopía electrónica y/o marcadores de superficie como los CD.

PROGENIE MIELOIDE.

En sangre también circulan otro grupo de células que intervienen en la respuesta inflamatoria como los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células presentadoras de antígeno, con funciones y características propias.

Neutrófilos. Expresan CD45⁺, CD15⁺.

Se llaman neutrófilos porque no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos, por lo que su citoplasma se observa rosa suave.

Los neutrófilos (60-65% del total de los leucocitos) miden entre 10 y 15 μm . Tienen un núcleo con 2 a 5 lóbulos, fuertemente basófilo. Su citoplasma es eosinófilo, claro, y en el podemos observar los gránulos azurófilos primarios (toma el azul) distribuidos irregularmente, de color azul o púrpura intenso. Los gránulos neutrófilos, secundarios o específicos no se observan por ser muy pequeños.

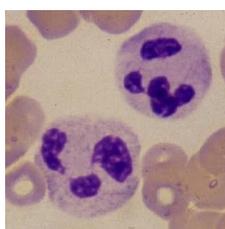


Figura N°11. Neutrófilo X1000– Giemsa (Fuente: elaboración propia)

Los neutrófilos normalmente se encuentran en el torrente sanguíneo. Empero, durante el inicio agudo de la inflamación, particularmente como resultado de infección bacteriana, son unos de los primeros migrantes hacia el sitio de inflamación (primero a través de las arterias, después a través del tejido intersticial), dirigidos por señales químicas como interleucina-8 (IL-8), interferón-gamma (IFN- γ), en un proceso llamado quimiotaxis. (ver inflamación).

Debido a sus funciones fagocíticas, los neutrófilos también se conocen como micrófagos, para diferenciarlos de las células fagocíticas más grandes, los macrófagos.

La respuesta funcional más importante es la fagocitosis y la destrucción intracelular del agente dañino.

Los neutrófilos contienen dos tipos de gránulos:

- Los gránulos específicos (o secundarios), más pequeños, que contienen lisozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador del plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina;
- Los gránulos azurófilos (o primarios) contienen mieloperoxidasa, factores bactericidas (lisozima, defensinas), hidrolasas ácidas y una variedad de proteasas neutras (elastasa, catepsina G y otras).

Ambos tipos de gránulos pueden fusionarse con las vacuolas fagocíticas que contienen el material ingerido, vertiendo su contenido para digerirlo. Los neutrófilos tienen una vida media corta y mueren por apoptosis unas pocas horas después de dejar la sangre, una vez que han llevado a cabo su función de destruir microorganismos. Ello tiene como efecto la formación de pus, en el que se produce la acumulación de leucocitos (sobre todo neutrófilos) y bacterias muertas y líquido extracelular.

Eosinófilos

Expresan CD45⁺, CD15⁺.

Los eosinófilos tienen un tamaño similar al de los neutrófilos, se encuentran en menor cantidad, del 1 al 3% del total de los leucocitos presentes en sangre.

El citoplasma es ligeramente basófilo, pero en general no podemos observarlo debido a la presencia de gran cantidad de granulaciones gruesas que lo cubren totalmente, dejando libre el núcleo. Este presenta en general dos lóbulos.

Los gránulos están formados por un núcleo electrodensito rodeado por una matriz electrotransparente, y contienen cuatro clases principales de proteínas: proteína básica mayor (MBP), proteína catiónica del eosinófilo (ECP), peroxidasa del eosinófilo (EPO) y neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN). Los eosinófilos son capaces de sintetizar de nuevo otros productos, como mediadores lipídicos (PAF, LTC₄), citocinas (IL-3, IL-5, GM-CSF), quimiocinas (eotaxina) y óxido nítrico (NO).

Estas células interactúan con otras células por la expresión de múltiples receptores en su superficie. Son atraídos por quimiotaxis por sustancias liberadas de los basófilos, como la histamina entre otra.

Pueden regular la respuesta alérgica y las reacciones de hipersensibilidad mediante la neutralización de la histamina por la histaminasa, y a su vez producir un factor inhibitorio derivado de los eosinófilos para inhibir la degranulación de las células cebadas o de los basófilos, que contienen sustancias vasoactivas.

Juegan un papel de defensa del huésped frente a microorganismos no fagocitables, poseen una función citotóxica (por sus proteínas granulares), inmunoreguladora (por las citocinas que libera) y son capaces de participar en la reparación y remodelación tisular (liberando TGF- β). Los mecanismos de acción de los eosinófilos mejor estudiados tienen que ver con la alergia y en la defensa contra parásitos. Sus receptores para IgE explican su fijación a los parásitos recubiertos previamente por esta inmunoglobulina, capacitándoles para destruir sus larvas, como acontece en la esquistosomiasis o bilharziasis.

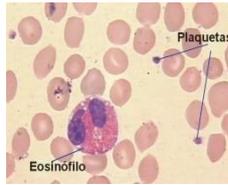


Figura N°12: Eosinófilos X1000 – Giemsa (Fuente: elaboración propia)

Basófilos.

Expresan CD45⁺, CD15⁺

El último tipo de leucocito polimorfonuclear es el basófilo, es el menos abundante, se encuentra en un porcentaje menor al 1%, razón por la cual es difícil encontrarlos en los extendidos de sangre. Son algo más pequeños que los anteriores, con un diámetro promedio de 10 μm . Su citoplasma es acidófilo y está cubierto por granulaciones grandes, irregulares, de color negro purpúreo que cubren también el núcleo. Por esta causa no es posible observar claramente su forma.

Al activarse y pasar a los tejidos, se les llaman células cebadas o mastocitos. Tienen una activa participación en la respuesta inmunitaria, a través de la liberación de histamina, serotonina en bajas concentraciones, y otras sustancias químicas.

Tiene gránulos de dos clases:

- **Gránulos azurófilos:** Contienen lisosomas, que a su vez estos contienen hidrolasas ácidas.
- **Gránulos específicos o secundarios:** Contienen histamina (vasodilatador), heparán sulfato (vasodilatador), heparina (anticoagulante) y leucotrienos (hacen contraer el músculo liso de las vías aéreas).

Los basófilos además de poseer gránulos en su interior, poseen receptores de IgE relacionada con las alergias. Es por eso que el basófilo participa en la respuesta inflamatoria.

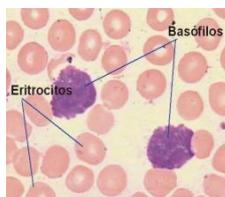


Figura N°13: Basófilo X1000 Giemsa. (Fuente: elaboración propia)

Monocitos.

Expresan CD45⁺, CD14⁺.

Los monocitos son los leucocitos de mayor tamaño, con un diámetro de 15 a 20 μm , casi tres veces el de un eritrocito. El núcleo es grande y presenta polimorfismo, puede ser redondo, oval o en forma de herradura, esta última es la más característica; puede encontrarse central o excéntrico. La cromatina es laxa, reticular, suele decirse que presenta aspecto cerebroide.

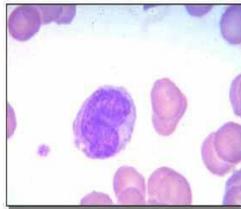


Figura N°14. Monocito X1000 Giemsa(Fuente: elaboración propia)

En el citoplasma no se observa el halo perinuclear característico de los linfocitos, es abundante, levemente basófilo, de un color gris azulado con granulaciones azurófilas dispersas. Podríamos decir que el aspecto del citoplasma es ligeramente "sucio" en contraste con el del linfocito que es "traslúcido".

Su principal función es la de fagocitar diferentes microorganismos o restos celulares. Para fagocitar se tienen en cuenta diversos factores como la presencia de antígenos. No obstante, el procedimiento es sencillo, y consiste en rodear con los pseudópodos la molécula, acción que es inhibida en los casos en que el macrófago reconoce a la célula como integrante de un tejido propio del organismo, por medio de las proteínas del CMH o complejo mayor de histocompatibilidad presentes sobre las membranas celulares.

Al activarse y pasar a los tejidos, se les llaman macrófagos. Entre sus funciones principales encontramos:

- Fagocitosis: la función principal de los macrófagos es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo como las bacterias y sustancias de desecho de los tejidos. Los macrófagos son fagocitos junto con los neutrófilos y otras células. Los macrófagos tienen la capacidad de quimiotaxis, es decir la de ser atraídos y desplazados hacia una determinada localización por la presencia de determinados factores quimiotácticos para monocitos como interleucina-1, trombina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de complemento C5a, fragmentos de colágeno, elastina, fibronectina, calicreína, activador del plasminógeno, inmunoglobulinas y leucotrienos.
- Inflamación: Los macrófagos forman parte de la inmunidad celular innata (la inflamación), es decir, inician una respuesta natural contra los microorganismos, porque los macrófagos expresan receptores de membrana para numerosas moléculas bacterianas, por ejemplo: receptor para lipopolisacárido (CD14), receptores C11b/CD18, receptores para manosas, y receptor para glúcidos entre otros. Los macrófagos de los vertebrados y de los invertebrados participan en gran medida de la respuesta inmune innata a infecciones gracias a sus receptores "scavengers", o barredores, que poseen una especificidad a ligandos muy amplia como: lipoproteínas, proteínas, poli y oligonucleótidos, polisacáridos aniónicos, fosfolípidos y otras moléculas.

- **Presentación de antígenos:** cuando los macrófagos fagocitan un microbio, procesan y sitúan sus antígenos en la superficie externa de su membrana plasmática, donde serán reconocidos por los linfocitos T colaboradores; tras el reconocimiento, los T producen linfoquinas que activan a los linfocitos B. Por eso los macrófagos forman parte de las llamadas células presentadoras de antígenos, ya que poseen en sus membranas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Los linfocitos B activados producen y liberan anticuerpos específicos a los antígenos presentados por el macrófago. Estos anticuerpos se adhieren a los antígenos de los microbios o de células invadidas por virus y así atraen con mayor avidez a los macrófagos para fagocitarlos.
- **Hemostasia:** el macrófago produce una serie de sustancias que participan en la coagulación como son: proteína C, trombomodulina, factor tisular, factor VII, factor XIII y el inhibidor del activador del plasminógeno.

Plaquetas.

Expresan CD45⁺, CD61⁺.

Las plaquetas o trombocito no se tratan de células, sino de porciones escindidas del citoplasma de una célula gigante que se encuentra en la médula ósea y se denomina megacariocito.

Son muy pequeñas, miden entre 2 y 3 μm , de forma irregular, aunque en los extendidos de sangre periférica se observan redondeadas.

Su número en circulación oscila entre 200.000 y 400.000 plaquetas/ml. de sangre.

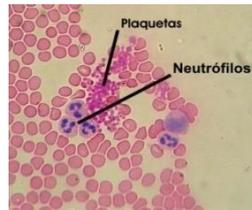


Figura N°15: Plaquetas X1000 Giemsa.(Fuente: elaboración propia)

CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS PROFESIONALES: CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Son un grupo diverso de células del sistema inmunitario cuya función es la de captar, procesar y, como su nombre los indica, presentar moléculas antigénicas sobre sus membranas para que sean reconocidos, en especial por linfocitos T. El resultado de la interacción entre una CPA profesional (células dendríticas) y un linfocito T CD4⁺ maduro virgen correspondiente, inicia las respuestas inmunitarias antigénicas de tipo adaptativo. Estas no son reconocidas en sangre, si en los tejidos.

Es indispensable reconocer a dos líneas celulares previamente descritas que también responden a la denominación de CPA profesionales: macrófagos y Linfocitos B, éstos sin embargo, presentan antígenos a linfocitos T previamente activados, es decir no inician la respuesta inmune adaptativa, como si lo hacen las células dendríticas.

Otras células presentadoras de antígenos NO PROFESIONALES, son el resto de las células nucleadas del organismo, que a través de su CMH-I logran presentar antígenos a las células responsables de respuestas inmunes.

Para el estudio de las diferentes poblaciones celulares presentes en sangre desde el punto de vista morfológico recurrimos a la técnica de observación del frotis sanguíneo. Consiste en la obtención de una gota de sangre, la que a través de procesos intermedios de montaje y coloración, nos permite la observación del material en estudio.

CARACTERÍSTICAS DEL FROTIS SANGUÍNEO.

1. Es una preparación de una monocapa de células entre las cuales no vamos a distinguir sustancia intercelular alguna, no porque no la posea, sino porque no se colorea debido a que está constituida en un 90% por agua.
2. Se realiza con una gota de sangre fresca que se extiende sobre un portaobjeto de vidrio.
3. Se emplea un fijador que es el metanol al 10%.
4. Se pueden utilizar diferentes colorantes por ej.: **May Grünwald-Giemsa** (una solución metélica de eosinato de azul de metileno), o simplemente **Giemsa**. (una solución metélica de azur II y eosina), existiendo otras, las cuales serán estudiadas más adelante.
5. Una vez coloreados se secan y quedan listos para ser observados.

DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO.

Objetivo: Reconocimiento de las diferentes poblaciones celulares.
Se realizará en dos actividades prácticas simultáneas.

1º ELABORACIÓN DEL FROTIS SANGUÍNEO

Objetivo particular: Observación microscópica de elementos celulares.

Materiales necesarios:

- Jeringa y aguja hipodérmica de acceso intravenoso.
- Lazo de goma.
- Guantes de látex.
- Alcohol etílico y algodón.
- Portaobjetos y extensor

Reunir todo el material necesario en la bandeja y llevarlo al lado del paciente.

Realización del frotis.

Frotis de 1º gota: es aquel en el que no hay contacto con anticoagulantes.

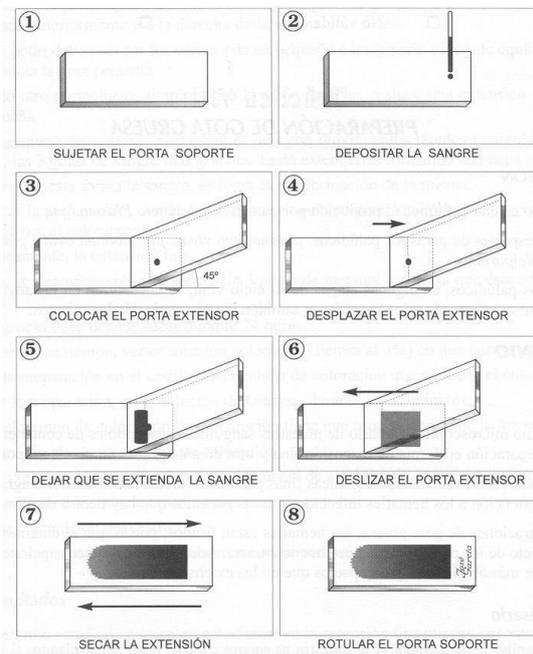
Todas las láminas por usar, sobre todo las nuevas, deben ser limpiadas con algodón y alcohol al 70% para eliminar la grasa que viene adherida.

Fundamento.

Consiste en la extensión de una gota de sangre sobre un portaobjeto (25 x 75), empleando el canto biselado de otro portaobjeto de igual dimensión.

Una vez extraída la sangre con cualquiera de las metodologías, se coloca una pequeña gota sobre un portaobjeto a 2 cm aproximadamente de uno de los extremos. Colocar el canto de otro portaobjeto esmerilado (extensor) sobre la superficie del primer portaobjeto formando un ángulo de 45°.

Deslizar suavemente y a velocidad moderada el portaobjeto sobre el otro en sentido longitudinal, hasta que la gota de sangre quede bien extendida sobre la superficie del primer portaobjeto.



Zona ideal: Corresponde a la región intermedia del frotis y en ella existe un reparto equilibrado de células.

La extensión obtenida será gruesa y corta, si es inferior a 45°, será larga y fina si el ángulo es mayor. El secado del frotis es a temperatura ambiente y en posición horizontal.

Zona excesivamente gruesa: Se halla en la región inmediata al punto de partida de la extensión (cabeza). En ella se aprecia siempre un aumento de linfocitos.

Zona excesivamente fina: Corresponde al final de la extensión y termina en un área donde las células adoptan una posición acartonada (barbas). En esta región existe un exceso de granulocitos y monocitos. Figura N°16. Método de frotis.

COLORACIÓN de GIEMSA.

Una vez seco el frotis, se procede a la tinción hematológica con el colorante de Romanowsky, constituido por la mezcla de eosina y azul de metileno.

1. Colocar el extendido en la batea de coloración, previamente seco.
2. Impregnar con metanol al 10% por 5 minutos.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Cubrir con la solución de Giemsa 10 minutos.
5. Secar al aire.
6. Observar en 100x con aceite de inmersión.
7. Graficar los elementos observados.

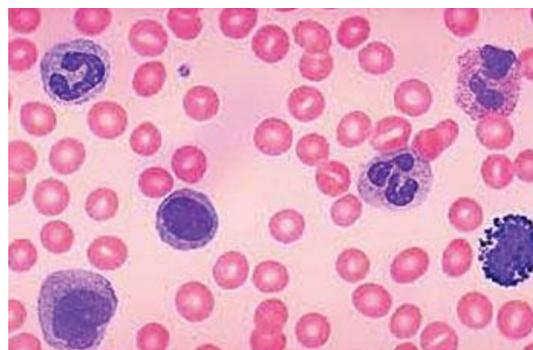


Figura N°17. Observación microscópica 100x de extendido de sangre. (Fuente: <https://labmedica.es>)

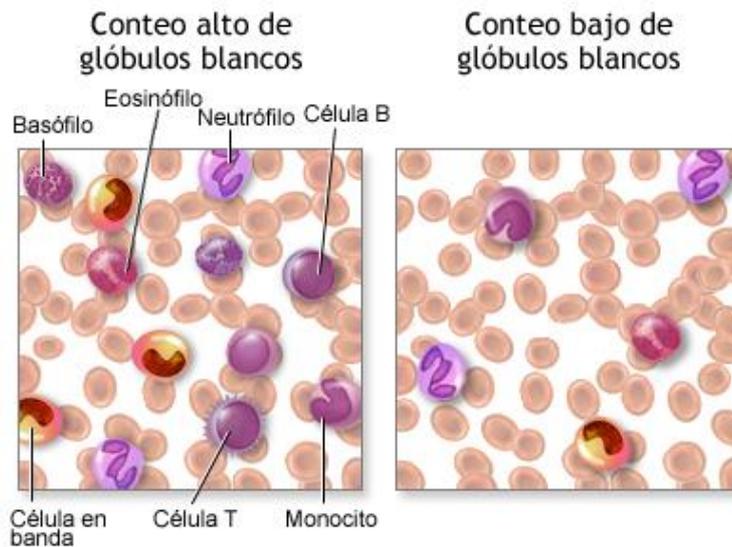


Figura N°18. Recuentos de blancos, microscopía al 100x.
 (Fuente: medlineplus.gov/spanish/ency/esp_presentations/100151_3.htm)

2º SEPARACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS.

El primer paso en los estudios sobre linfocitos consiste en su aislamiento a fin de estudiar su comportamiento *in vitro*.

Las principales fuentes de linfocitos de animales de experimentación son el timo, el bazo y los ganglios linfáticos periféricos. En los estudios llevados a cabo en seres humanos la fuente de linfocitos más cómoda es la sangre periférica, pero también se pueden obtener células del bazo, las amígdalas o los ganglios linfáticos mediante procedimientos quirúrgicos.

La técnica patrón para separar poblaciones linfocitarias es la citometría de fluorescencia (FACS o separador celular con activación de fluoresceína), que se basa en los diferentes marcadores de superficie que presenta cada tipo celular.

Se dispone de otros métodos para separar de forma más rápida linfocitos y subpoblaciones específicas de los mismos. Entre ellos se encuentran la separación en gradiente de densidad en **Ficoll-Hysopaque**, la formación de rosetas, la separación en placa y los procedimientos magnéticos.

Otra posibilidad para obtener linfocitos purificados es la obtención de líneas de células T específicas de antígeno y su cultivo durante períodos prolongados de tiempo. De esta forma resulta innecesario aislar continuamente células a partir de animales.

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

1. TÉCNICA DE SEPARACIÓN DE MONONUCLEARES EN FICOLL-HYPAQUE

Fundamento.

Los linfocitos humanos pueden aislarse de la sangre periférica con relativa facilidad

mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre un cojín con una mezcla de Ficoll, un polímero de carbohidrato y metrizamida, un compuesto denso que contiene yodo. Esta separación en gradiente de densidad se basa en que los linfocitos son menos densos que los eritrocitos y los granulocitos por lo que este procedimiento rinde en la interfase una población de células mononucleares con cantidades muy reducidas de glóbulos rojos y leucocitos polimorfonucleares.

Materiales necesarios

- sangre heparinizada (5 U de heparina sódica/ml de sangre)
- solución salina tamponada (SST).
- Solución de Hanks libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} , a temperatura ambiente.
- Solución de Ficoll- Hypaque. Preparar una solución de densidad 1.077 g/ ml agregando 64.0 gr de Ficoll (PM: 400.000; sigma cat. N° F4375); 99.0 gr. Diatrizoato sódico (sigma cat. N° S4506) y 0,7 gr. De NaCl para 1 Litro de Sn. Filtrar a través de una membrana esterilizante de 0,22 μm y conservar a 4 °C. Alternativamente se puede adquirir la Sn de Ficoll-Hypaque de densidad 1,077g/l (sigma, Histopaque 1077-1 o Pharmacia 17-0840-02)
- Suero fetal bovino (SFB), descomplementado a 56°C durante 30 min.
- Medio RPMI completo adicionado con un 10% de SFB
- Tubos cónicos de plástico para centrifuga de 15 o 50 ml.

Método.

- 1) Diluir la sangre agregando un volumen de SST que deberá estar a temperatura ambiente. Alternativamente, en los casos que interese separar previamente el plasma, centrifugar la sangre a 900 x g, a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente recoger las células ubicadas entre la interfase de los eritrocitos y el plasma y resuspender en dos partes de SST.
- 2) Agregar cuidadosamente la Sn. de Ficoll-Hypaque por debajo de la suspensión celular, o bien a un tubo que contiene la Sn de Ficoll-Hypaque agregar la sangre diluida por la parte superior con extremo cuidado. La proporción de Ficoll-Hypaque usada dependerá de los volúmenes de trabajo para un tubo de 15 ml se dispensarán 3 ml de solución de Ficoll-Hypaque cada 7 ml de sangre diluida. Cuando se trabaja en tubos de 50 ml se agregarán 10 ml de Ficoll-Hypaque y 40 ml de sangre diluida.
- 3) Centrifugar entre 20 y 30 min a 900 x "g" y sin usar el freno de centrifuga. Los gradientes son dependientes de la temperatura, es por ello que se deberá mantener la misma entre 18 y 20 °C durante la centrifugación.
- 4) Recoger la capa de células mononucleares que se encuentra en la interfase entre el Ficoll- Hypaque y el plasma (fig 36-1) cuidando de no arrastrar los eritrocitos que se encuentren en la parte inferior. Transferir las células a un nuevo tubo en el que se han dispensado 2 a 3 volúmenes de Sn, de Hanks por cada volumen de capa de células.
- 5) Lavar las células tres veces con exceso de Sn. de Hanks.
- 6) Resuspender las células en medio RPIM completo. Contar y determinar la viabilidad celular por el método de exclusión del azul tripán.

2. TÉCNICA DE LAS ROSETAS.

Fundamento.

Los LT presentan en sus membranas receptores que interactúan con las superficies de los GRC (glóbulos rojos de carnero), fácilmente identificables por tener la propiedad de formar con ellos rosetas espontáneas llamadas rosetas E. Este fue el primer marcador definido para los LT. Esta unión es muy lábil, por lo que es preciso ser muy minucioso al utilizar esta técnica, y además es dependiente de la temperatura ya que los LT normales de la sangre periférica forman rosetas a los 4 °C, pero no a 37 °C. En cambio los linfocitos tímicos (timocitos) y los LT activados forman rosetas E tanto a 4°C como a 37 °C

Materiales necesarios.

- GRC en solución de Alsever.
- SSBH
- Reactivo para rosetas E.

Preparación del reactivo para rosetas E

1. Lavar los GRC con SSHB, centrifugando 5 minutos a 1000 g.
2. Luego de lavar descartar el sobrenadante con pipeta de Pasteur.
3. En otro tubo, rotulado E, colocar 4,95 ml de SSHB, 50 ul de GRC y 50 ul de solución de gentamicina (3 mg/ml). El reactivo así preparado se encuentra listo para usar, debiéndose conservar tapado y a 4 °C hasta su utilización.

Procedimiento

1. Incubación se toman 100 ul del reactivo para rosetas E y 100 ul de células mononucleares obtenidas por un gradiente de Ficoll-Hypaque que contengan 500.000 células. Se llevan a un baño de 37 ° C durante 5 minutos
2. Centrifugar 5 minutos a 200 g.
3. En este punto se pueden tomar dos caminos diferentes de acuerdo a la temperatura y tiempo de incubación , que nos llevan a la detección de dos poblaciones diferentes:
4. Rosetas E 4 °C: incubar en el refrigerador (4 °C) durante toda la noche (o por lo menos 3 horas)
5. Rosetas E 37 °C : incubar una hora a 37 °C.
6. Lectura : resuspender nuevamente y colocar una gota entre porta y cubreobjetos
7. Observar al microscopio (objetivo 40 x).
8. Contar al menos 200 L y determinar el porcentaje que forma rosetas. Se considera como roseta a todo L que posea 3 ó más GRC adheridos a su membrana.

Expresión de resultados

Sangre periférica el rango normal de rosetas E 4 °C para jóvenes sanos es de 50-75 % observándose una disminución significativa después de los 60 años. Normalmente, los LT de sangre periférica no forman rosetas a 37 °C.

Médula ósea: se considera normal hasta un 10 % de rosetas E 4 °C.

Ganglio linfático: aproximadamente un 70-80 % de los linfocitos de un ganglio normal forman rosetas E 4 °C.

Interpretación de resultados

Un valor disminuido de rosetas E es indicativo de una disminución del número de LT. Sin embargo es necesario confirmar el resultado obtenido , con un estudio en el que se utilice un anticuerpo monoclonal que reconozca a los LT totales (por ejemplo . OKT1, OKT3 u OKT11).

3. IMMUNOFLUORESCENCIA

Fundamento

Los anticuerpos específicos para los antígenos presentes en los linfocitos humanos son utilizados para la identificación de estas células, desarrollando técnicas de Inmunofluorescencia (**Ver práctico de IFI**). Los resultados se expresan en forma cualitativa o semicuantitativa como porcentaje de células positivas expresando un determinado antígeno.

Para realizar esta técnica se procede primero a separar las subpoblaciones con Acs anti-CD4 y Acs anti-CD8, ambos deberán ser monoclonales, después de esto se visualiza en microscopio con luz UV y paralelo a esto se debe hacer hemogramas para determinar GR/ mm³ y se informa en %; es por esto que se dice que es un método indirecto.

4. CITOMETRIA DE FLUORESCENCIA:

Fundamento.

Esta metodología permite la identificación de subpoblaciones de linfocitos humanos mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de la superficie celular. Por ejemplo, los linfocitos B y T se identifican de forma inequívoca y se separan unos de otros mediante anticuerpos contra las regiones constantes de los receptores B y T para antígeno. Las células T se pueden separar a su vez según la expresión de las proteínas co-receptoras CD4 y CD8.

Se utiliza un instrumento llamado citómetro de flujo que analiza individualmente células marcadas con fluorocromos que fluyen a gran velocidad en una corriente de líquido iluminada por un haz de láser.

Materiales.

- Sangre periférica entera, obtenida con anticoagulante (EDTA o heparina) y recogida en condiciones de esterilidad.
- anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo.
- Solución para lisar glóbulos rojos de tris Cloruro de amonio o agua destilada estéril.
- SST (solución salina tamponada) conteniendo 0,1 % de azida
- Solución fijadora, paraformaldehído 1 % en SST.
- Tubos de centrifuga con fondo cóncavo, 12x75 mm.

NOTA: todos los reactivos y las muestras deberán estar en condiciones de esterilidad.

Método.

- 1 para cada muestra mezclar en tubos de centrifuga de 12x75mm, 100ul de sangre entera anticoagulada y 5-20ul de los anticuerpos monoclonales marcados.
- 2 homogeneizar e incubar a temperatura ambiente 15 a 20 min en la oscuridad.
- 3 lisar los glóbulos rojos con dos ml de solución de lisis. Agitar en un vórtex y agitar 5 min en la oscuridad.
- 4 centrifugar a 200 x g, 5 min a 4 °C y aspirar sobrenadante.
- 5 agregar 2ml de SST conteniendo 0,1 % de Azida en cada tubo de reacción y agitar con un vortex. Centrifugar a 300x g, 10 min, a 4 °C. aspirar el sobrenadante y repetir el lavado.
- 6 Para fijar las células resuspender cada sedimento celular en un volumen final de 0,1 ml con paraformaldehído al 1 % en SST azida, pH 7,4. Antes del análisis por citometría agregar SST estéril llevando a un volumen final entre 0,6 y 1,0 ml.
- 7 guardar las muestras en la oscuridad a 4 °C (hasta 7 días) o analizarlas directamente en el citómetro de flujo.

5. TÉCNICAS INMUNOMAGNÉTICAS:

Fundamento:

Se fundamenta en una separación física en un campo magnético, de las células unidas a un anticuerpo específico que se encuentra adherido a microesferas magnéticas de poliestireno. Es una técnica de nivel intermedio ya que los valores obtenidos son comparables a los de citometría de Flujo. Son comparables en la calidad de las células y un alto porcentaje de reproductibilidad de resultados y además porque es superior a la IFI

Materiales.

- Células mononucleares separadas a partir de sangre periférica por medio de un gradiente de Ficoll-Hypaque, o suspensión celular de bazo de nódulos linfáticos, de tumores o de fluido peritoneal.
- Anticuerpos monoclonales específicos para linfocitos B (CD20), monocitos (CD14), células NK (CD16) y glóbulos rojos (antiglicoforinas).
- Solución de Hanks libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} adicionada con 10 % de SFB y buffer HEPES
10 mM (Hanks-10)
- Microesferas magnéticas recubiertas con anti Ig G de ratón obtenido en cabra (aproximadamente 7 microesferas por célula blanco; Dynabeds M-450, Dynal 11005 y 11006).
- Aparato para la separación magnética (Dynal MPC1 12001 o Advanced magnetic 41025)
- Tubos de polipropileno de 15 ml.

Método

Importante: todos los pasos a seguir deberán ser realizados a 4 °C para minimizar fenómenos de clumping y el desprendimiento de los anticuerpos de la membrana celular.

- 1) Determinar la concentración saturante de anticuerpos monoclonales por medio de inmunofluorescencia o citometría de flujo.
Generalmente se logra con una concentración de 1 ug/ml.
- 2) Resuspender las células en una concentración de 2×10^7 cél/ml de Hanks-10.
- 3) Agregar 1 ml de solución de la mezcla de anticuerpos cada 10 ml de suspensión celular. Incubar 30 min. a 4 °C con agitación continua (6-10 rpm) para evitar que las células sedimenten.
- 4) Lavar 2 veces las células con Hanks-10 centrifugando en frío a 150 x g, durante 10 min. Resuspender las células en 10 ml de Hanks -10 frío y transferirlas a un tubo nuevo.
- 5) Agregar 4×10^8 células microesferas (1ml de la suspensión comercial) para 2×10^8 mononucleares totales y lavar con Hanks -10.
- 6) Agregar la suspensión de microesferas a la suspensión celular y agitar suavemente (6- 10 rpm) 1 h a 4 °C.
- 7) Separar las células marcadas con los anticuerpos monoclonales unidos a las microesferas magnéticas colocando el tubo en un campo magnético. Después de 5 min. Transferir las células no marcadas a un tubo nuevo y repetir el procedimiento. Contar las células y resuspenderlas en Hanks-10 en concentración de 2×10^7 cél./ml.
- 8) Repetir los pasos 4-7 en los pasos en que se requiera un mayor grado de pureza.

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

TRABAJO PRÁCTICO Nº 4

ESTUDIO FUNCIONAL DE POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Introducción

El sistema fagocítico es un mecanismo defensivo del organismo constituido por células (fagocitos), que realizan sus funciones en conexión con factores humorales.

Este sistema defensivo innato al comienzo, participa además en la respuesta inmune: inmunovigilancia, alergia y otros procesos, eliminando partículas materiales, detritus celular y microorganismos invasores del huésped una vez que han sido reconocidos como extraños o "no propios".

Componentes del sistema fagocítico

Los componentes más activos del sistema fagocítico los constituyen los leucocitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos y los fagocitos mononucleares: monocitos y macrófagos libres e hísticos (células de Kuffer, macrófagos alveolares, macrófagos peritoneales, macrófagos sinoviales, células de revestimiento de las sinusoides, de médula ósea, ganglios linfáticos y bazo).

Las características de estas células han sido presentadas en prácticos anteriores.

La maquinaria energética difiere en los PMN paralelamente a su madurez, siendo del tipo oxidativo en el inicio, y en sus períodos finales a partir de la glucólisis anaerobia, lo que permite la supervivencia en lugares sometidos a condiciones de anaerobios, tales como focos de pus o tejidos dañados.

En macrófagos (Mc) esta energía la obtienen de su adaptación al tipo de tejido que alberga; de este modo los Mc del alvéolo pulmonar tendrían una fuente energética preferentemente oxidativa, mientras que los del peritoneo serían fundamentalmente glucolítica.

El sistema fagocítico no interviene solo, sino que es una parte de un complejo de reacciones que participan unidas y secuenciadas, con participación de factores de la cascada de la coagulación y/o del complemento y otros elementos importantes como las moléculas de adhesión (ICAM - 1: molécula de adhesión intercelular; y la ELAM-1: molécula de adhesión endotelial de leucocitos), las citoquinas y otras células. Esto conduce finalmente a un estado de inflamación. Ver figura Nº1

La fagocitosis constituye un modo de eliminar al agente agresor y se produce en etapas o fases de: quimiotaxis, reconocimiento, opsonización, ingestión y muerte de los microorganismos

Los fagocitos engloban a las bacterias o partículas de un tamaño adecuado en su cavidad, el fagosoma, que luego se invagina desplazando al núcleo y los gránulos. Los gránulos citoplásmicos fusionan sus membranas con el fagosoma, volcando su contenido en lo que se denomina el fagolisosoma. Ver figura. Nº 2.

Existen dos mecanismos fundamentales para la destrucción del antígeno fagocitado. Uno de ellos consiste en la producción de peróxido de hidrógeno y otros componentes letales y se la denomina vía de destrucción dependiente del oxígeno. El otro, depende de la liberación de componentes tóxicos provenientes de los gránulos liberados del interior del fagosoma denominada vía de destrucción independiente del oxígeno.

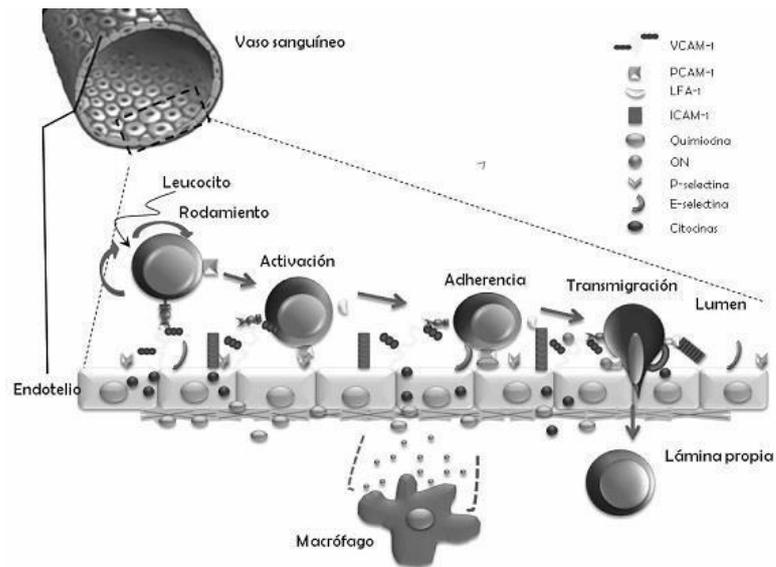


Figura Nº 1 Extravasación vascular de los fagocitos. Imagen tomada de:
<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol23num3/articulos/trypanosoma/index.html>

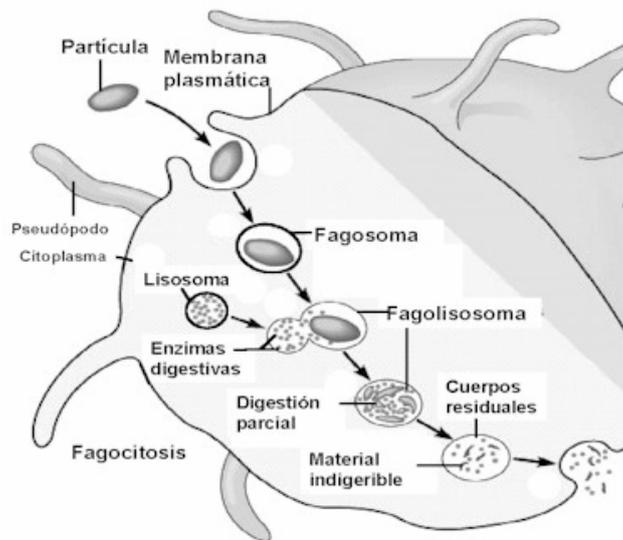


Figura Nº 2 Proceso de fagocitosis y muerte celular.
 Imagen tomada de:
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/REyAG.html>

Quimiotaxis

Una vez en el compartimento de tejido conectivo, los leucocitos migran hacia la zona dañada por un proceso denominado quimiotaxis, que se define como la locomoción dirigida a lo largo de un gradiente químico. Las sustancias que generan dicho gradiente pueden ser exógenas (por ejemplo, toxinas bacterianas) o endógenas, entre las que se encuentran diferentes mediadores químicos:

- citoquinas, sobre todo las de la familia de las quimiocinas (como IL-8);
- componentes del sistema del complemento, sobre todo C5a;
- metabolitos del ácido araquidónico, sobre todo el leucotrieno B4 (LTB4).

Todos estos agentes se unen a receptores transmembrana acoplados a proteína G en la superficie de los leucocitos. Esto desencadena una vía de señalización que resulta en la activación de segundos mensajeros que aumentan el calcio citosólico y activan GTPasas y kinasas. Como consecuencia, se induce la polimerización de la actina, que genera un aumento de actina polimerizada en el extremo celular próximo a la región dañada, y localización de los filamentos de miosina en la parte posterior celular. El leucocito se mueve extendiendo filopodios que tiran de la parte posterior celular en dirección de la extensión, como un coche con tracción delantera. El resultado final es que el leucocito se mueve hacia la zona objetivo.

Reconocimiento

Una vez que se encuentran en la zona objetivo, los neutrófilos deben reconocer de forma específica el agente ofensivo, antes de proceder a eliminarlo. Tanto los neutrófilos como los macrófagos (las células con capacidad fagocítica) presentan receptores de membrana que les permite reconocer el agente externo y activar los procesos de fagocitosis. Los tipos de receptores más importantes son:

Receptores para componentes microbianos: Los receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) reconocen componentes de diferentes tipos de microbios: lipopolisacáridos bacterianos, proteoglicanos bacterianos, nucleótidos CpG no metilados (frecuentes en bacterias) o ARN de doble hebra (producido por algunos virus). Los TLR están presentes en la superficie celular, pero también en los endosomas, de manera que pueden detectar microbios extracelulares y fagocitados. Estos receptores activan kinasas que estimulan la producción de sustancias microbicidas.

Receptores acoplados a proteínas G: Algunos de estos receptores reconocen péptidos que contengan fragmentos de N-formilmetionina (que inician todas las proteínas bacterianas, pero sólo están presentes en las proteínas mitocondriales de mamíferos). Otros receptores reconocen quimioquinas, fragmentos del sistema del complemento, como C5a, y mediadores lipídicos, como PAF, prostaglandinas o leucotrienos, todos los cuales se producen en el contexto de daño celular. Unión del ligando a estos receptores induce la migración y la producción de sustancias microbicidas.

Receptores para opsoninas: Los leucocitos expresan receptores para opsoninas, proteínas de defensa que recubren los microbios mediante el proceso de opsonización. Estas sustancias incluyen anticuerpos, proteínas del sistema del complemento y lectinas. Una de las formas más eficaces de mejorar la fagocitosis de una partícula es recubrirla con anticuerpos tipo IgG específicas para esa partícula. Los IgG son reconocidos por los receptores de alta afinidad para Fc γ de los fagocitos, denominados Fc γ R. Asimismo, C3b (del sistema del complemento) es también una potente opsonina, y los fagocitos expresan un receptor, CR1, capaz de detectarlo. La unión de las opsoninas a sus receptores en los fagocitos promueven la fagocitosis y activan los leucocitos.

Incorporación en la vacuola fagocítica

Una vez que la partícula está unida a los receptores, se forman extensiones del citoplasma (pseudópodo) que la rodean, la membrana plasmática se fusiona y se forma una vesícula (el fagosoma) que contiene la partícula. El fagosoma se fusiona entonces con un lisosoma, que descarga su contenido en el fagolisosoma. Durante este proceso el fagocito puede también liberar el contenido de los lisosomas al espacio extracelular, sobre todo si la partícula que se pretende fagocitar es demasiado grande para ser incorporada en una vesícula.

La fagocitosis (que es un proceso muy complejo) depende de la polimerización de actina, por lo que las mismas señales que activan la quimiotaxis activan también la fagocitosis.

Inmediatamente se produce un aumento de metabolismo celular que se refleja en la variación de parámetros hematimétricos cuando estos se analizan.

Degranulación.

Una vez que ha sido ingerida la partícula, los gránulos citoplasmáticos del fagocito (lisosoma) se aproximan, se funden al fagosoma, liberando en su interior el material enzimático, constituyéndose el denominado fagolisosoma, que puede ir observando en la célula en diferentes estadios de digestión.

Aquellos productos que no son digeribles quedan retenidos en el citoplasma formando copúsculos residuales, ya que en tales células no existe excreción o eliminación de detritus. Este proceso transcurre paralelamente al de la ingestión, cesando cuando esta finaliza, tal vez debido a que el mecanismo desencadenante sea el mismo para los dos.

Muerte microbiana y digestión

El fagocito, para culminar su misión posee varios sistemas de acción antimicrobiana dependientes e independientes del oxígeno:

MECANISMO	CARACTERISTICA	ACCION
Oxígeno dependiente Mediados por Mieloperoxidasa (MPO)	Junto con peróxido de hidrógeno, haluros MPO, pH ácido forman un potente sistema inhibitor altamente tóxico	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Halogenación de la pared: pérdida de integridad (cloraminas). ◆ Descarboxilación y desaminación de aminoácidos de la pared (convertidos en aldehídos, CO_2^-, NH_3). ◆ $^1\text{O}_2$: (oxígeno singlete) altamente reactivo, reacciona con dobles enlaces y podría ser fatal para cualquier sistema biológico que contactara
Oxígeno dependiente Independiente de MPO	H_2O_2 ; O_2^- ; $^1\text{O}_2$; OH^-	Todos son oxidantes altamente reactivos.
Oxígeno independiente	Importante para la eliminación de gérmenes en anaerobiosis	Digestión por medio de: <ul style="list-style-type: none"> ◆ pH ácido: entre 2 y 3. ◆ Hidrolasas: lisozimas, proteasas, arginasas, glicosidasas. ◆ Captación de hierro: lactoferrina (gránulos específicos). ◆ Proteínas catiónicas: altamente tóxica sobre la pared microbiana.

El sistema MPO- H_2O_2 -cofactor, actúa por liberación de MPO al fagosoma, por degranulación, junto con iones halógenos (cofactores de reacción) disminuyendo la cantidad de H_2O_2 disponible pero aumentando ostensiblemente su efecto bactericida.

El mecanismo último por el que este sistema es bactericida parece estar relacionado con la activación del cofactor, fundamentalmente yodo, y posteriormente halogenando proteínas bacterianas y otros de sus componentes necesarios para su subsistencia.

La diferencia entre los granulocitos y los fagocitos mononucleares, en este aspecto, estriba en la carencia de proteínas catiónicas bactericidas y lactoferrina en estos últimos, así como en poseer menor cantidad de MPO, aunque en este caso la catalasa, enzima detoxicante o degradante de H_2O_2 , puede actuar como peroxidasa. Los macrófagos y los monocitos tienen el mecanismo de quimiotaxis, fagocitosis y destrucción microbiana semejante a los PMN. Difieren en otros aspectos, entre ellos, en que los macrófagos junto con los LT y LB constituyen la base celular de la respuesta inmune.

Parte práctica Objetivo:

Estudiar la actividad funcional de PMN referidas a: Adhesividad, fagocitosis y lisis.

Fundamento:

Los PMN están dotados de la capacidad de fagocitosis, que les permite ingerir y posteriormente destruir microorganismos agresores. Constituye un sistema inespecífico pero sumamente importante en defensa contra las infecciones. Para evaluar actividad fagocítica y lítica de PMN utilizaremos una técnica cito morfológica que consiste en enfrentar a levaduras (*Cándida albicans*) a los PMN y otras células fagocíticas presentes en la sangre entera anticoagulada. Luego de un período de incubación se realizan frotis que son teñidos con Giemsa.

Para evaluar la fagocitosis y lisis de las levaduras, se tiene en cuenta que las levaduras vivas se tiñen de violeta y las muertas (lisadas) no toman el colorante (MO 100X).

Para evaluar adhesividad se coloca sobre un portaobjetos de bordes esmaltados sangre entera sin anticoagular incubando en estufa por un período determinado luego del cual se retira por lavado el coágulo y los PMN adheridos al vidrio pueden observarse mediante coloración hematológica.

Existen técnicas estandarizadas para estudiar la actividad funcional de PMN, una de ellas está desarrollada en el Anexo.

Materiales Necesarios

- ◆ Placa de petri de 10 cm. de diámetro
- ◆ Tubos de cultivos de *Candida albicans*
- ◆ Jeringas y agujas descartables de 1, 5 y 10 ml.
- ◆ Anticoagulante EDTA
- ◆ Solución fisiológica
- ◆ Algodón, alcohol
- ◆ Portaobjetos con contornos esmaltados
- ◆ Colorantes de Giemsa
- ◆ Metanol
- ◆ Pipetas Pasteur de 1 ml
- ◆ Papel de filtro de 10 cm de diámetro
- ◆ Varillas de vidrio de 7 cm de largo
- ◆ Microscopio

Procedimiento:

a) Separación de PMN por adhesividad

1. Sobre los portaobjetos de contorno esmaltados depositar 1 o 2 ml de sangre obtenida por punción venosa, sin heparina.
2. Poner en una placa de Petri un disco de papel de filtro de 10 cm de diámetro, disponer sobre él 2 varillas de vidrio (cámara húmeda)
3. Depositar sobre la placa (b) el portaobjeto preparado en (a). Incubar a 37°C por 1-2 hs en estufa.
4. Descartar el coagulo evitando tocar la superficie de adherencia celular.
5. Lavar 1 ó 2 veces con solución fisiológica para eliminar las células no adheridas. (Evitar que se seque el preparado).
6. Colorear agregando 20 gotas de Giemsa cada 10 ml de agua.
7. Observar al microscopio los leucocitos adheridos.

b) Evaluación de la capacidad de fagocitosis y lisis

1. Cultivar *C. albicans* en agar Sabouroud en pico de flauta durante 24 horas a 37°C.
2. Agregar 1 anizada del cultivo de *C. albicans* al frasco que contiene sangre anticoagulada.
3. Incubar 2 hs. en cámara húmeda y a 37°C
4. Homogeneizar y realizar frotis en portaobjetos limpios y desengrasados.
5. Secar al aire, fijar con metanol 5 minutos y lavar (rehidratación) 1 minuto
6. Colorear con Giemsa diluído durante 15 minutos.
7. Observar al microscopio (100x) las levaduras fagocitadas y lisadas dentro de los PMN y otras células fagocíticas..

Interpretación de resultados:

La actividad fagocítica se expresa a través del número de levaduras fagocitadas (muertas y vivas). La capacidad lítica está representada por las imágenes "fantasmas" de las levaduras que se observan como no teñidas con el colorante.

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunológica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición**. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

TRABAJO PRÁCTICO Nº 5 ESTUDIO FUNCIONAL DEL COMPLEMENTO.

Introducción

Se conoce como sistema del complemento a un conjunto de más de 30 proteínas plasmáticas y de membrana que se activan en cascada y cuya finalidad es la eliminación del antígeno, a partir de distintos mecanismos, a saber:

1. Oponización de microorganismos para facilitar la fagocitosis.
2. Destrucción lítica directa (célula infectada, microorganismos, etc) por medio del complejo de ataque a la membrana.
3. Atracción quimiotáctica de Leucocitos fagocitos hacia las zonas de inflamación, y activación de los mismos.
4. Depuración de inmunocomplejos.
5. Inducción de respuestas específicas de anticuerpos, en primer lugar facilitando la localización de los antígenos por parte de los Linfocitos B y de las células presentadoras de antígenos y además reduciendo el umbral para la activación de los Linfocitos B.

Es uno de los mecanismos de defensa más importante con los que cuenta el sistema inmune, colaborando, tanto en la respuesta natural como en la adquirida.

Su activación puede llevarse a cabo por las siguientes vías:

- a) **Vía Clásica:** se inicia por la unión antígeno/anticuerpo, conectando con el sistema inmune adaptativo por medio de su interacción con inmunocomplejos.
- b) **Vía Alternativa:** conecta con el sistema de inmunidad natural o inespecífica, interaccionando directamente con la superficie del microorganismo.
- c) **Vía de las Lectinas:** es una especie de variante de la ruta clásica, pero que se inicia sin la necesidad de anticuerpos, por manosas de polisacáridos presentes generalmente en la superficie de bacterias y por lo tanto pertenece al sistema de inmunidad natural.

Estas tres vías de activación comparten la última fase (llamada vía Terminal o lítica), que consiste en el ensamblaje, sobre la superficie del microorganismo o célula diana, del denominado “Complejo de Ataque a la Membrana”.

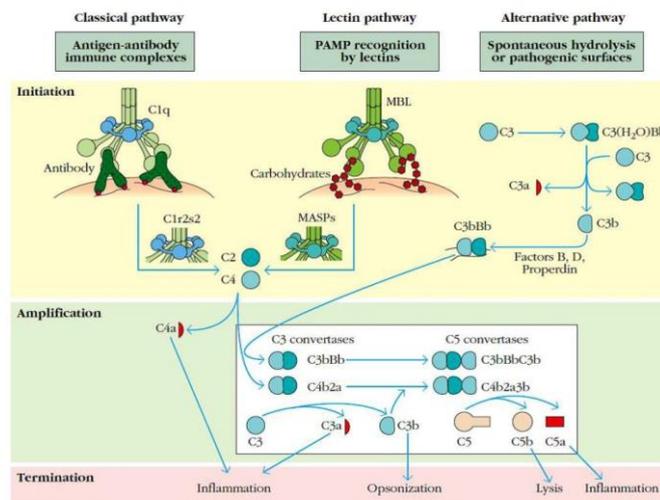


Figura N°1. Vías del sistema del complemento. (Fuente: <https://rafer.es>)

Los líquidos biológicos entre ellos el suero, líquidos intersticiales, linfa contienen proteínas del sistema complemento.

Algunos componentes del complemento son enzimas proteolíticas termolábiles por lo que son susceptibles a la elevación de temperatura que los inactiva. Entre los iones que contribuyen activamente en el desarrollo de la cascada del complemento se encuentra el Ca^{++} que actúa como un importante cofactor.

Con fines didácticos se sugiere consultar y resolver el cuestionario guía N° 5 "Sistema del Complemento".

Parte Práctica

A) ESTUDIO DE LA FUNCIÓN LÍTICA DEL COMPLEMENTO POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA CLÁSICA:

Objetivo: demostrar que la presencia del complemento activo es capaz de destruir al antígeno opsonizado con anticuerpos específicos en condiciones de temperatura y concentraciones iónicas adecuadas.

Objetivos específicos:

- 1) Actividad lítica: **observar hemólisis** de glóbulos rojos, opsonizados con anticuerpos específicos contra los antígenos ABO/rH en presencia de complemento activo en suero.
- 2) Inactivación por temperatura: **observar falta de hemólisis** de glóbulos rojos opsonizados con anticuerpos específicos contra los antígenos ABO/rH en presencia de complemento inactivado por calentamiento a 55°C en suero.
- 3) Acción del ión Ca^{++} : **observar falta de hemólisis** de glóbulos rojos opsonizados con anticuerpos específicos contra los antígenos ABO/rH en presencia de complemento activo en suero, por eliminación de Ca^{++} y Mg^{++} quelado químicamente con EDTA.



Figura N°2. Hemólisis por formación de CAM. (Fuente: <http://enfoco.ffyb.uba.ar/content/banco-de-sangre-los-grupos-sanguineos-en-medicina-transfusional>)

B) CUANTIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES C3 Y C4 Y ESTUDIO DEL CONSUMO DE COMPLEMENTO.

Objetivo: Demostrar el consumo de complemento por cuantificación de las fracciones C3 y C4 mediante la técnica de inmunodifusión radial (IDR).

Material necesario para A y B

- Jeringas de 5 ml
- agujas 21 G1,
- torundas de algodón,
- alcohol,
- lazo de goma,
- guantes, descartador de agujas, descartador de jeringas con lavandina al 10%.

- Micropipetas y Tips 5 ul
- Reactivos Anticuerpos anti A, anti B, anti AB, o anti D, según corresponda.
- Placas de Inmunodifusión Radial x 12 pocillos c/u de Fracciones C3 y C4 del - complemento.

Preparación de reactivos y acondicionamiento de equipos y materiales:

Para separación de componentes sanguíneos: Colocar la sangre extraída en 1 tubo de Khan con Anticoagulante EDTA (rotular W).
1 tubo de Khan sin anticoagulante (rotular S). Gradillas.
Centrifuga.

Para obtención de antígenos: rotular 2 tubos Khan, (GR1, GR2)
Para obtención de componentes del complemento: rotular 5 tubos (S1, S2, S3, S4, S5)
Obtención del complemento activo: Los tubos: S1, S3 y S4 contienen complemento activo.
Inactivación del Complemento: Baño maría, encender y mantener a 55 °C.
Sustracción de iones Ca^{++} y Mg^{++} : Al Tubo S5 agregar una gota de anticoagulante EDTA .
Neutralización del Antígeno y conformación del complejo Ag-Ac: Estudio de la función del complemento: Planilla de registro de resultados.

A) ESTUDIO DE LA FUNCION LÍTICA DEL COMPLEMENTO POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA CLÁSICA:

Procedimiento:

- 1) Extracción de sangre: Obtener por punción sanguínea 5 ml de sangre de los grupos A, B, AB, O+.
- 2) Separación de componentes sanguíneos: Colocar la sangre extraída en
 - a. 2 ml en el tubo W con Anticoagulante EDTA para obtención de antígenos.
 - b. 3 ml en tubo S sin anticoagulante para extraer suero con el complemento.
- 3) Obtención de Antígenos:
 - a) Centrifugar los tubos W con antígenos de los grupos A, B, AB, O+ a 1500 rpm durante 5 minutos.
 - b) Descartar el sobrenadante
 - c) Lavar los glóbulos rojos con 4 ml de solución fisiológica (SF) agitando suavemente hasta homogeneizar la suspensión
 - d) Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.
 - e) Descartar el sobrenadante.
 - f) **Repetir este procedimiento 3 veces.**
 - g) El sedimento de glóbulos rojos separar en los tubos GR1 y GR2.
- 4) Obtención de componentes complemento:
 - a) Centrifugar los tubos S a 3000 rpm durante 5 minutos.
 - b) Separar el suero
 - c) Fraccionar el suero en los tubos S1, S2, S3, S4, S5 depositando 4 gotas en cada uno de ellos.
- 5) Obtención del complemento activo: S1, S3 y S4 contienen complemento activo.
- 6) Inactivación del Complemento: Colocar el tubo S2 en el Baño María a 55°C durante 10 minutos para inactivar el complemento.

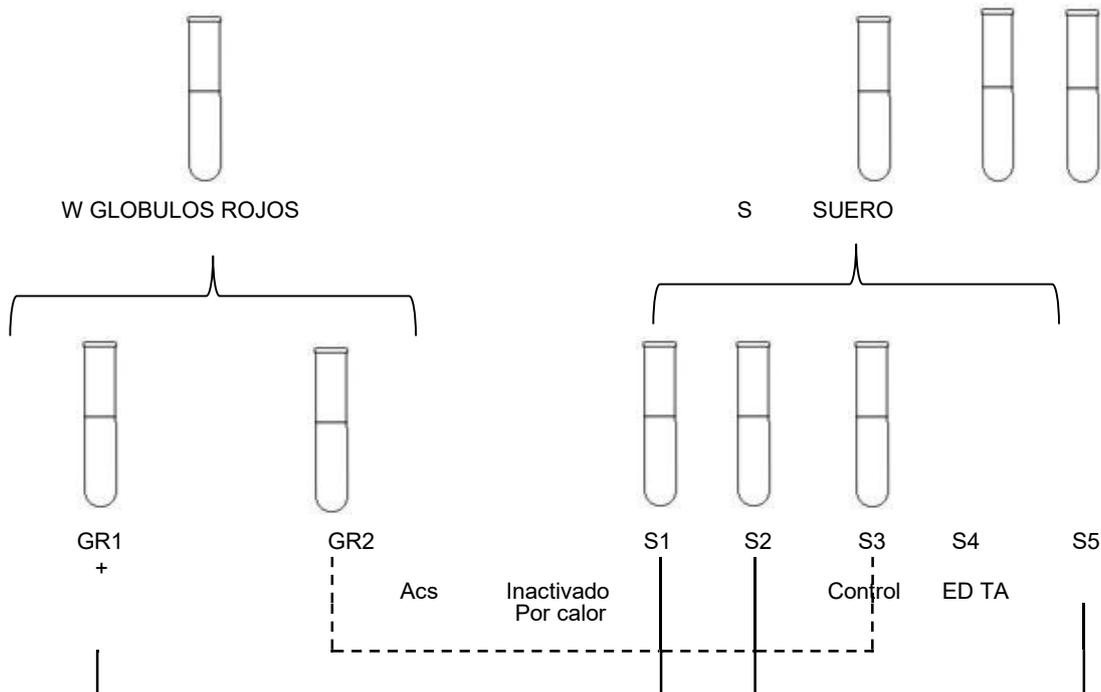
- 7) Sustracción de iones Ca^{++} y Mg^{++} : En el Tubo S5 los iones bivalentes Ca^{++} y Mg^{++} presentes en el suero son acomplejados por quelación con el anticoagulante EDTA por lo que dejan de estar disponibles como cofactores de la cascada del complemento
- 8) Neutralización del Antígeno y conformación del complejo Ag-Ac: Al tubo GR1 agregar 1 gota de Anticuerpos anti A, anti B, anti AB, o anti D, según corresponda.
- 9) Estudio de la función del complemento:
 - a. Agitar el tubo GR1 y agregar 4 gotas a los tubos S1, S2 y S5.
 - b. Agitar el tubo GR2 y agregar 4 gotas al tubo S3.
 - c. Incubar todos los tubos (menos el S4) 30 min. A 37°C .
 - d. Agitar
 - e. Centrifugar a 1500 rpm.
 - f. Observar y registrar con cruces (+) la intensidad de hemólisis y con (-) la ausencia de la misma.
 - g. El tubo S4 es usado para medir la concentración de las fracciones C3 y C4.

Interpretación de Resultados:

Complete el siguiente cuadro:

- a) las cantidades utilizadas en cada caso,
- b) qué se observa en la reacción final y
- c) su interpretación

Tubos	Suero Componentes Complemento	GR Ags. celulares	Complejos Ag ABO-Ac ABO	Suero a 55°C	Suero+ EDTA	Hemólisis Marcar (-) 1+ a 4+	Interpretación
1							
2							
3							
5							



B) CUANTIFICACION DE LAS FRACCIONES C3 Y C4 Y ESTUDIO DEL CONSUMO DE COMPLEMENTO.

Procedimiento:

- 1) Sembrar en las placas de IDR, 5 ul de los sueros de los tubos:
 - b. S4 (control)
 - c. S1 (consumo de complemento por hemólisis)
- 2) Incubar 36 hs. y leer los diámetros obtenidos por Inmunodifusión radial (IDR)
- 3) Observar las diferencias obtenidas.

Registre e interprete los resultados obtenidos:

Tubos	Cuantificación C3 (mm = ug/ml)	Cuantificación C4 (mm = ug/ml)	Interpretación
1			
4			

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA. Carpenter y col. Edición en Ingles. Editorial Sauder.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología. Editorial: Corpus Editorial**. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health**. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

TRABAJO PRÁCTICO Nº 6

INTERACCIÓN PRIMARIA. ELISA E INMUNOFLUORESCENCIA

Interacción Antígeno Anticuerpo: formación del complejo Ag-Ac

La interacción entre un antígeno y un anticuerpo es una reacción química no covalente, reversible entre los epítopes o determinantes antigénicos y los sitios específicos de los anticuerpos o paratopes, por lo que debe alcanzarse un equilibrio de concentraciones entre el complejo Ag-Ac y los reactantes por separado Ag y Ac. Cuando esto ocurre este fenómeno no es visible, por lo que se utilizan distintas técnicas para ponerla de manifiesto, éstas se denominan técnicas de interacción primaria, y para ello se usan distintas sustancias químicas que se unen o conjugan a anticuerpos (conjugados inmunológicos) o a proteínas (conjugados no inmunológicos) que no interfieren con la reacción Ag-Ac.

De acuerdo a las sustancias usadas se definen las técnicas: isótopos, radioinmunoanálisis (RIA), Enzimas, Enzimoimmunoensayo, (ELISA, EIA, EIE), Fluorocromos Inmunofluorescencia (IFI, IFD), etc.

1. TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Fundamentos

Son técnicas que utilizan sustancias fluorescentes como sistema indicador de la interacción primaria o unión Antígeno-Anticuerpo.

Las sustancias fluorescentes absorben energía de radiaciones de onda ultravioleta y la emiten como ondas visibles de distinta longitud de onda, por ello se observan de distinta coloración, a esta característica se le denomina fluorescencia.

La fluorescencia emitida debe ser observada mediante un microscopio de luz ultravioleta o un espectrofotómetro

Son técnicas altamente sensibles y específicas. Son complejas costosas y requieren equipamiento exclusivo así como personal altamente entrenado.

A las técnicas de Inmunofluorescencia, las podemos dividir en Directa o Indirecta.

A) Inmunofluorescencia directa (IFD):

Se usa para la detección de Ag y se basa en la reacción con Ac específicos marcados con una sustancia fluorescente que puede ser el Isotiocianato de Fluoresceína, Rodamina, produciéndose así, la interacción primaria.

B) Inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Sirve tanto para la detección de Ag como para la detección de Ac. Si se busca el Ag (reactante desconocido), el Ac específico debe ser conocido y viceversa.

Después de eliminar el excedente de Ac (o Ag) que no haya formado complejo Ag-Ac, se efectúa una segunda incubación con los complejos formados y un Ac con marca fluorescente y actividad de anti-inmunoglobulina. Es decir, se efectúan dos reacciones Ag- Ac.

Sobre estos dos tipos de reacciones existen distintas variaciones. Por ej. se puede inhibir el reconocimiento efectuado por el Ac marcado a través del agregado previo de un Ac competidor de la misma especificidad.

La IFI tiene algunas ventajas ya que con un mismo Ac conjugado se pueden revelar numerosas reacciones Ag-Ac de especificidad distinta, evitando la tarea de preparar un Ac conjugado para cada uno. Esta misma propiedad implica que el método es mucho más versátil que la IFD. Tiene mayor sensibilidad ya que se ligan varias moléculas marcadas a cada complejo detectado, produciendo un brillo más intenso.

Los posibles usos de las técnicas de fluorescencia son innumerables como en

farmacología, fisiología, etc. La IFD se utiliza para la detección de Linfocitos B reconociendo las Ig de superficie o CD marcadores de linaje y para la búsqueda de complejos inmunes circulantes (se realiza sobre tejido). La técnica de IFI suele usarse para la búsqueda de auto-anticuerpos (en general contra antígenos tisulares o que pueden ser adheridos a algún soporte sólido) y para la detección de Ags de membrana en células en suspensión (por ej. detectados con Acs monoclonales.)

Esquemas:

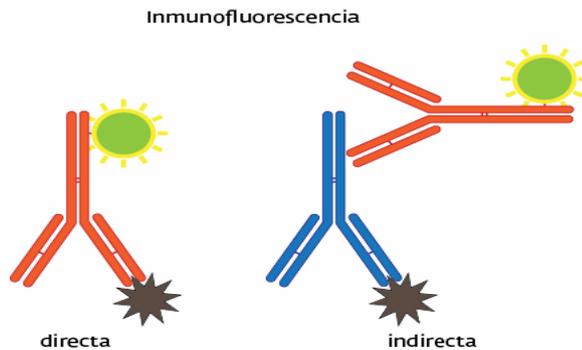


Figura N°1. Inmunofluorescencia. (Fuente: Manual de técnicas en genética y ambiente. Centro de investigación. Universidad autónoma de Tlaxcala)

Otros usos de la IFD:

Ej. de su uso son la detección de Clamydias en moco cervical, virus de la rabia en el cerebro de un animal presuntamente infectado, de Ag del virus sarampión en Linfocitos T, Ag del virus Influenza (o de la gripe) u otros virus respiratorios en el moco respiratorio, de Ag del virus dengue en el cerebro de un mosquito infectado, de Tripanosoma, Leishmanias, Toxoplasma a partir de cultivos o líquido abdominal de animales infectados.

Otros usos de la IFI. Detección de antígenos: son los mismos que para la IFD utilizando una segunda reacción y un conjugado diferente

Detección de anticuerpos: contra parásitos (causantes de toxoplasmosis, Chagas, etc), bacterias (causantes de sífilis, etc), virus (causantes de sarampión, rubéola, HIV, etc).

Consideraciones generales para la aplicación de técnicas de inmunofluorescencia:

Controles para técnicas de inmunofluorescencia:

Controles negativos o positivos: lo que implica la ausencia o presencia de antígenos o anticuerpos, de acuerdo a la técnica empleada..

Control del conjugado: se utiliza para ello solución buffer usada en la técnica para los lavados, y nos indica el estado del conjugado.

Sustancias fluorescentes: se activan al recibir una radiación UV (180 a 380 nm) y de acuerdo a la sustancia fluorescente que se use, emiten una radiación visible de distinta coloración (o longitud de onda). El Isotiocianato de Fluoresceina (FITC) emite una radiación amarillo verdosa (495-595 nm) y la Rhodamina y la Phicoeritrina (PE) anaranjado rojiza a (630-670) nm. Esta emisión se produce por la activación de estas sustancias al recibir la luz UV. La emisión por tanto no es permanente y tampoco es constante ya que tiene un periodo máximo de emisión y luego decrece por agotamiento de la emisión.

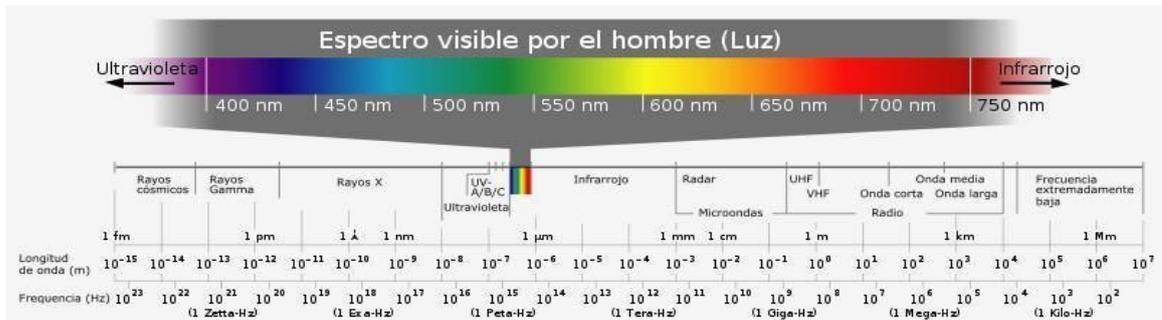


Figura N°2. Espectro de radiación. (Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Espectro-electromagnetico-en-toda-su-amplitud_fig4_262638609)

Interpretación de resultados para técnicas de inmunofluorescencia:

La muestra será REACTIVA en el caso de observar imágenes fluorescentes características. Será NO REACTIVA la ausencia de fluorescencia característica.

Desventajas para la aplicación de técnicas de inmunofluorescencia: Los siguientes aspectos pueden influir en la aplicación de la técnica:

- La observación e interpretación tiene un componente subjetivo que depende del operador.
- La presencia de fluorescencia inespecífica.
- Estabilidad de los reactivos.

Por lo que requiere de un personal experimentado tanto para su procesamiento como para la observación y mucha prudencia en la interpretación de los resultados.

PARTE PRÁCTICA:

Objetivo General:

Implementar una técnica de INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA para la detección de anticuerpos específicos al antígeno usado, a partir de sus componentes.

Objetivos específicos:

- 1) Fijar el antígeno a un soporte sólido.
- 2) Desarrollo de la técnica de IFI.

Materiales necesarios:

- Portaobjetos para inmunofluorescencia
- Cubreobjetos para inmunofluorescencia
- Buffer PBS pH 7,2
- Acetona
- Antigenos
- Conjugado: Antigamaglobulina marcada con fluoresceína
- Suero
- Cámara húmeda (Placa de Petri + papel de filtro humedecido)
- Micropipetas de 10 ul, 100 ul
- Pipetas Pasteur
- Estufa de 37°C

Procedimiento:

- 1) Fijación del Antígeno al soporte sólido
 - a. Obtener la concentración adecuada de Ag por recuento en cámara
 - b. Homogeneizar la suspensión de Ag.
 - c. Depositar 5 ul del homogenato en cada una de las celdas del portaobjetos
 - d. Dejar secar durante 15 min en estufa a 37°C
 - e. Sumergir el portaobjetos en acetona fría durante 10 min.
- 2) Desarrollo de la técnica de IFI
 - a. Depositar sobre el antígeno 10 ul de suero
 - b. Incubar en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C
 - c. Lavar con PBS durante 10 min
 - d. Agregar 10 ul del conjugado sobre cada celda impregnada.
 - e. Incubar 1 hora a 37 °C en cámara húmeda.
 - f. Lavar con PBS durante 10 min
 - g. Observar con microscopio de inmunofluorescencia
 - h. Registrar las imágenes observadas.
 - i. Interpretar los resultados obtenidos.

ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA, EIE)

Fundamentos:

Las técnicas de inmunoensayo utilizan conjugados enzimáticos para evidenciar la unión antígeno–anticuerpo (Ag-Ac). Se utilizan tanto para la detección de anticuerpos como de antígenos (inmunorreactantes). Son técnicas de alta especificidad y de alta sensibilidad (debido a la característica de la actividad enzimática). Independientemente de su clasificación los EIE comprenden dos etapas generales:

- 1) La reacción Antígeno-Anticuerpo.
- 2) La demostración de esa unión mediante el uso de un conjugado enzimático.

Los EIE se clasifican en:

- a) Homogéneos: se desarrollan en fase líquida.
- b) Heterogéneos: se emplea un soporte sólido para inmovilizar uno de los inmunorreactantes.

Los más desarrollados y usados son los heterogéneos, estos se dividen en:

- 1) EIE de amplificación de actividad o no competitivos.
- 2) EIE de modulación de actividad o competitivos.

C. Se forman una o más capas de complejos inmunes sobre la fase sólida

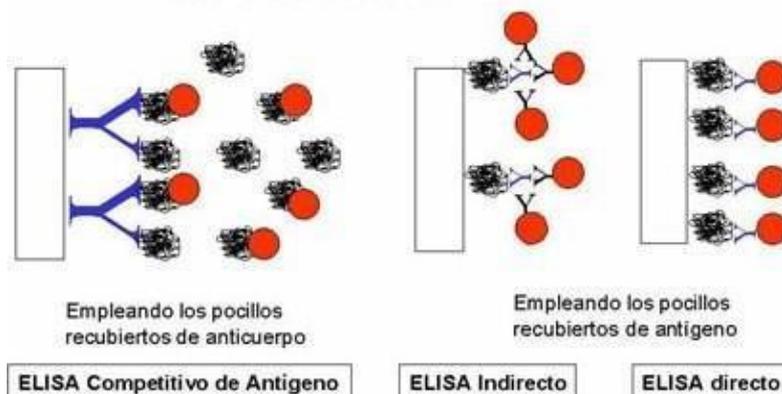


Figura N°3

✓ **EIE de amplificación de actividad o no competitivos:**

Se subdividen de acuerdo a que inmunorreactante (Ag o Ac) este unido a la fase sólida

- a) Inmovilización del inmunorreactante a la fase sólida.
- b) Reacción Ag-Ac: se agrega la muestra (en una concentración variable) a la fase sólida que contiene el otro inmunorreactante y se deja incubar durante un tiempo de reacción o incubación variables y a temperaturas también variables que dependerán de cada técnica.
- c) Lavados para eliminar el exceso del inmunorreactante agregado en la muestra, utilizando para ello bufferes, con un número variables de lavados en general entre 3-5, mecanico o manual. Finalmente se deja escurrir por unos minutos.
- d) Demostración de la unión Ag-Ac: se agrega el conjugado enzimático, que detectará la unión Ag-Ac., uniéndose al inmunorreactante agregado con el suero. Los tiempos de reacción o incubación son variables. El Conjugado enzimático puede ser inmunológico o no inmunológico.
- e) Lavados para eliminar el exceso del conjugado agregado.
- f) Visualización de la actividad enzimática: por agregado del sustrato y cromógeno se puede visualizar o medir espectrofotometricamente una reacción coloreada y que demostrará la unión Ag-Ac.
- g) Finalización de la reacción (parada, stop): mediante el agregado de ácidos o álcalis que modifican el pH del medio en el que se desarrolla la acción enzimática impidiendo su actividad.
- h) Lectura: la lectura puede ser visual o por lector espectrofotométrico de EIE.
- i) Interpretación de resultados: una reacción coloreada implica detectar la unión Antígeno-Anticuerpo, por lo que el inmunorreactante (ej. El anticuerpo específico contra un antígeno determinado) se encuentra en la muestra.
- j) Reacción Ag-Ac: se agrega la muestra (en una concentración variable) a la fase sólida que contiene el otro inmunorreactante y se deja incubar durante un tiempo de reacción o incubación variables y a temperaturas también variables que dependerán de cada técnica.

✓ **EIE de modulación de actividad o competitivos:**

Se subdividen de acuerdo a que inmunorreactante (Ag o Ac) este unido a la fase sólida

- a) Inmovilización del inmunorreactante a la fase sólida.
- b) Reacción Ag-Ac: se agrega la muestra (en una concentración variable) a la fase sólida y a su vez en el mismo momento o después de un periodo de incubación variable, el inmunorreactante que se desea detectar marcado con una enzima. (se desarrolla una competencia entre el inmunorreactante marcado y el no marcado de la muestra).
- c) Lavados para eliminar el exceso de inmunorreactantes.
- d) Visualización de la actividad enzimática: por agregado del sustrato y cromógeno se puede visualizar una reacción coloreada que será producto de la acción enzimática producto de la unión del inmunorreactante marcado (no el de la muestra), implica la ausencia de la unión Ag-Ac específica..
- e) Detención de la reacción: mediante el agregado de ácidos o álcalis que modifican el pH de acción enzimática impidiendo su actividad.
- k) Lectura: la lectura puede ser visual o por lector espectrofotométrico de EIE.
- l) Interpretación de resultados: una reacción no coloreada o una disminución de la intensidad de coloración (absorbancia

espectrofotométrica) implica detectar la unión Antígeno-Anticuerpo, por lo que el inmunorreactante (ej. El anticuerpo específico contra un antígeno determinado) se encuentra en la muestra.

Soportes:

Pueden ser variados: se aprovecha la capacidad de las proteínas de adherirse a pH 9-10 a tubos, esferas, discos, o concavidades de placas de poliestireno o polipropileno.

Enzimas:

a) Peroxidasa: la más usada se obtiene del rabanito o HRP (Horse-Radish), son hemoproteínas que transfieren Hidrogeno (H) desde un donante a un aceptor como el agua oxigenada u otros sustratos usados. Funciona a pH neutro. Otras usadas son la Fosfatasa Alcalina.

Sustratos usados con la peroxidasa: peroxido de hidrogeno (H₂O₂) o peroxido de urea. Otros son los fosfatos.

Cromógenos usados con la peroxidasa: Tetrametilbencidina (TMB), Ortofenilendiamina (OPD); 3 metil-2-benzotiazolinona hidrazona conocido como (MBTH); 2,2-azino-di-(3 -etil-benzotiazolina)6-sulfonato de diamonio conocido como (ABTS).

b) Fosfatasa alcalina: se obtienen del intestino de bovinos o de *Echerichia coli*, hidrolizan una amplia gama de ésteres fosfatos tales como la de alcoholes primarios o secundarios, fenoles, aminos. Funciona a pH 9 alcalino, se usan buffers a base de dietanolamina y cofactores de Mg y Zn.

Sustratos usados con la fosfatasa alcalina: el para-nitrofenilfosfato (p-NPP).

Conjugados:

- a) Inmunológicos cuando se usan Ac anti Inmunoglobulinas los cuales serán específicos de especie y de clase.
- b) No inmunológicos se usan los sistemas avidina-biotina o estreptavidina-biotina o el sistema de la proteína A del *Staphylococcus aureus*, lectinas como la concanavalina A.

Usos:

Controles de calidad en la industria farmacéutica: ensayo sobre materias primas, medicamentos, reactivos de diagnóstico, productos médicos y cosméticos.

Caracterización de la capacidad inmunogénica de proteínas obtenidas en la industria farmacéutica (insulina, citoquina, etc.)

Detección y cuantificación de antígenos presentes en fluidos biológicos.

Detección y cuantificación de anticuerpos en laboratorio y de diagnóstico.

En biotecnología

PARTE PRÁCTICA

TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

Objetivo General:

Implementar una técnica de ELISA no competitiva para la detección de anticuerpos específicos al antígeno usado, a partir de sus componentes.

Objetivos específicos:

- ✓ Fijar el antígeno a un soporte sólido.
- ✓ Obtención de la enzima peroxidasa.
- ✓ Conjugación enzimática de inmunoglobulinas
- ✓ Desarrollo de la técnica de ELISA no competitiva

Materiales necesarios:

- | | |
|---------------------------------|-------------------------|
| - Suspensión Antigénica | - Cromógeno |
| - Albúmina bovina | - Estufa de 37 °C |
| - Policubetas (soporte sólido) | - Centrífuga |
| - Buffer de lavado | - Rabanito |
| - Pipetas de 10ml, 5 ml | - Rallador |
| - Micropipetas de 10 ul, 100 ul | - Antiglobulinas humana |
| - Pipetas Pasteur | - Suero |
| - Conjugado enzimático | |
| - Sustrato | |

Procedimiento:

- 1) Fijar el antígeno a un soporte sólido:
 - a. Fijar el Antígeno a la policubeta por adsorción. Se usará como antígeno a la vacuna antigripal, depositar 50 ul en cada pocillo, dejando un pocillo sin cubrir con el antígeno (control) y se dejará estabilizar durante toda la noche a 4 C° o 2 hs a 37°C.
 - b. Lavar 3 veces con 300 ul PBS pH 7,2.
 - c. Homogenizar la superficie del soporte sólido: para ello se usarán 200 ul de una solución al 5% de albúmina humana o bovina, dejar 30 min a 37°C.
- 2) Obtención de Enzima Peroxidasa de rábano picante
 - a. Cortar un rábano por mitades y rallar sobre un vaso de precipitados.
 - b. Agregar 10 ml de solución ClNa 0,85 %. Agitar con magnetos durante 2 hs.
 - c. Trasvasar a tubos y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 3) Conjugación de la enzima peroxidasa a una inmunoglobulina
 - a. Mezclar 1 ml de la suspensión de peroxidasa con 1 ml de anti inmunoglobulina humana.
 - b. Dejar incubar a 37 °C durante 2 hs.
- 4) Reacción ELISA
 - a. Reacción Ag- Ac:
 - i. Agregar 100 ul de una dilución 1/1 – 1/5 – 1/10 del suero en estudio.
 - ii. Dejar incubar 1 h a 37 °C.
 - iii. Lavar 5 veces con 200 ul de buffer fosfatos durante 30 seg cada lavado.
 - iv. Dejar escurrir el buffer poniendo la policubeta boca abajo durante 3 minutos.
 - b. Conjugado:
 - v. Agregar 50 ul de anti inmunoglobulina humana conjugado a peroxidasa.
 - vi. Dejar incubar 30 min a 37°C.
 - vii. Lavar 5 veces con 200 ul de buffer fosfatos durante 30 seg cada lavado.
 - viii. Dejar escurrir el buffer poniendo la policubeta boca abajo durante 3 minutos.
 - b. Revelado de la unión Ag-Ac:
 - i. Agregar 50 ul de solución al 5% de H₂O₂
 - ii. Agregar 50 ul de una solución al 5% de TMB (tetrametilbencidina).
 - iii. Dejar incubar 15 min.
 - c. Parada de la reacción enzimática:
 - i. Agregar 50 ul de una solución de HCl 1 N.
 - d. Medir la concentración de anticuerpos
 - i. Medir con lector de ELISA.
 - ii. Registrar los valores de absorbancia obtenidos

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Año 2005.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. FCEQyN. UNaM. Año2006.
- Guía de Trabajos Prácticos. Facultad De Ciencias Veterinarias. U.N.C.P.B.A. 2008
- Guía de Trabajos Prácticos Inmunología. Año2010.
Disponible en: exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/guia
- INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA. Carpenter y col. Edición en Ingles. Editorial Sauder.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296- 055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60- 7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición**. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

TRABAJO PRÁCTICO Nº 7: TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE INTERACCIÓN SECUNDARIA. TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN

MARCO TEÓRICO

Las técnicas inmunológicas de precipitación se basan en la aparición de un **precipitado** visible cuando se enfrentan **antígenos solubles** con sus anticuerpos específicos. Los precipitados que se originan se visualizan como nítidas bandas de precipitación, que permanecerán estables mientras un mayor aflujo de moléculas de los reactivos no provoque redisolución.

Las pruebas de precipitación se pueden realizar en medios sólidos ó en medios líquidos, y en ambos casos pueden ser cualitativas o cuantitativas. Las más utilizadas son las de precipitación en medios sólidos. Las macromoléculas pueden difundir libremente a través de geles; esta difusión está limitada por la concentración del mismo y otros factores. Empleando soportes adecuados, en especial aquellos que como base tienen agar disuelto en electrolitos, es posible hacer migrar antígenos y anticuerpos de modo que al encontrarse interaccionen. Pueden utilizarse también geles con base de pectina, alginatos, poliacrilamida y aun tiras de acetato de celulosa gelatinizado (ver Anexo).

1.1. Precipitación en medio líquido

Técnica clásica, de uso infrecuente en la actualidad, detecta la presencia de antígenos o anticuerpos en una muestra, cuando se mezclan en fase líquida. Esta reacción se produce en dos etapas. En la inicial, que se desarrolla rápidamente y es influida muy poco por la temperatura y los electrolitos, se forman los complejos Ag-Ac primarios. A medida que el tiempo transcurre, esos complejos iniciales se agregan, originando micelas de diferentes tamaños las que finalmente precipitan. Su reacción se estudia gráficamente mediante la “curva de precipitación cuantitativa” (Figura Nº1)

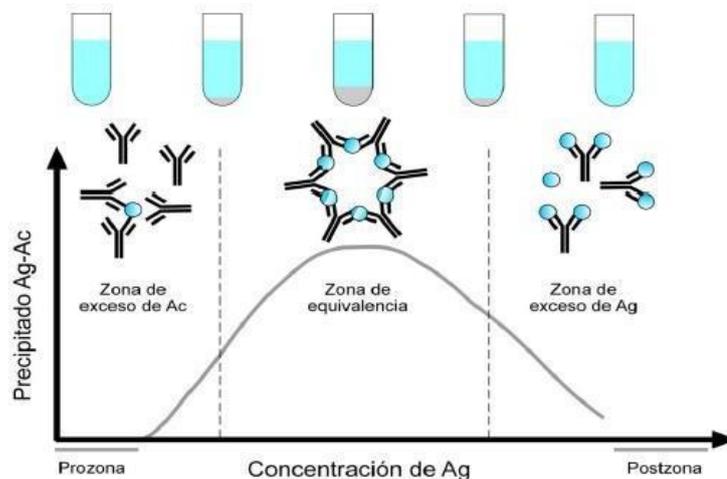


Figura Nº1: Curva de precipitación cuantitativa

La precipitación en medios líquidos pueden ser utilizados con fines cuantitativos y constituye un buen método para la medida de la concentración de los anticuerpos presentes en un suero. Se usa también para determinar la presencia de Ags disponiendo de los antisueros específicos (Ej. diagnóstico de carbunco en animales muertos, determinación de grupos serológicos bacterianos, identificación de manchas de sangre en medicina legal).

1.2. Precipitación en medios sólidos

Estas técnicas utilizan un soporte sólido gelificado en el que difunden el Ag y Ac. Se agrupan dentro de dos categorías: inmunodifusión y técnicas inmunolectroforéticas.

Los Ags y Acs pueden incorporarse a un medio gelificado por adición de agar purificado o agarosa. En estos medios las moléculas se mueven en todas las direcciones a través de los poros del gel. A medida que se alejan de su lugar de origen se genera un gradiente de concentración. En el lugar donde se encuentran los Ags y Acs a una concentración óptima (zona de equivalencia inmunológica) aparece una línea de precipitación blanquecina visible que corresponde a la interacción secundaria. En el cuadro N° 1 puede observarse las ventajas y desventajas de las técnicas de precipitación.

Cuadro N°1. Ventajas y desventajas de las técnicas de p.p. en geles	
Ventajas	Desventajas
Alta especificidad	Baja sensibilidad.
Pruebas cuantificables	Detectan solo Acs por lo menos bivalentes
Bajo costo	No detectan presencia de Acs incompletos.

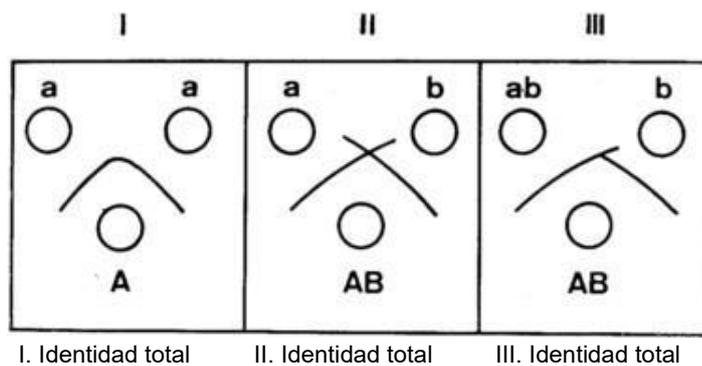
Hay distintas variantes de técnicas de precipitación en medios gelosados, entre otras encontramos:

- Inmunodifusión doble (IDD)
- Inmunodifusión radial (IDR)
- Inmunolectroforesis (IEF)
- Contrainmunolectroforesis (CIEF)

1.2.1. Inmunodifusión doble (IDD) o método de Outcherlony

Consiste en sembrar, el Ac y el Ag, en pocillos realizados sobre una superficie de agar solidificado separados a una distancia adecuada. Luego de unas horas de incubación se observarán una o varias bandas de precipitación entre los dos pocillos en la zona de equivalencia inmunológica.

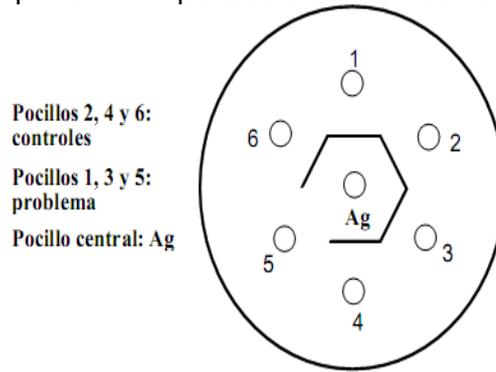
Con esta técnica se puede estudiar cualitativamente los grados de similitud entre varios Ags enfrentados a un mismo Ac, produciéndose bandas de precipitación que indicarán si existe identidad total, parcial o no existe identidad entre los Ags en estudio, comparados entre si o comparados con una Ag conocido (Figura N° 2).



a y b: antígenos
A y B: anticuerpos

Figura N°2. Esquemas de reacciones de IDD

Del mismo modo pueden compararse distintos Acs frente a un mismo Ag (Figura N°3)



Pocillos 2, 4 y 6:
controles
Pocillos 1, 3 y 5:
problema
Pocillo central: Ag

Figura N° 3: Comparación de distintos Acs frente a un mismo Ag.

1.2.2. Inmunodifusión radial (IDR)

En esta técnica se incorpora por Ej una solución determinada de Acs al gel fundido, que luego se deposita sobre una placa de Petri o un portaobjetos. Luego de su solidificación se realizan pequeños pocillos en donde se introduce la solución de Ags a investigar. Las moléculas de Ags difunden en todas direcciones a través del agar. Tras un periodo de incubación de varias horas aparece una banda de precipitación circular alrededor del pocillo donde fue sembrado el Ag. El diámetro del círculo de precipitación es proporcional a la cantidad de Ag sembrada. Por lo tanto es posible cuantificar a partir de sembrar concentraciones conocidas del Ag, medir los diámetros de los círculos de precipitación y compararlos con el Ags en estudio. (Figura N° 4).

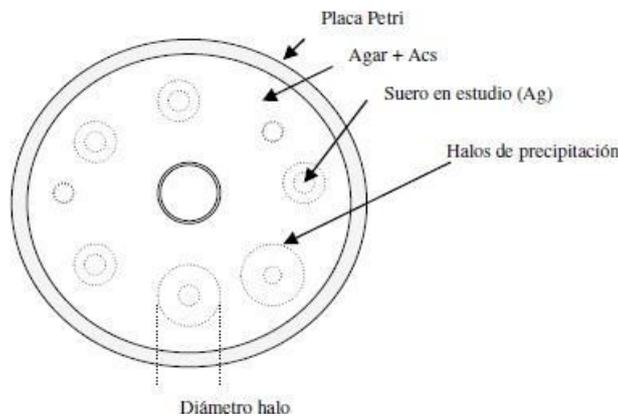
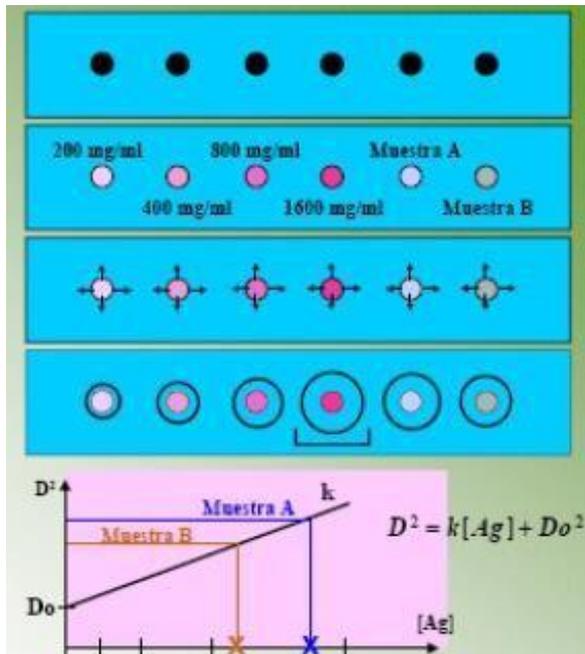


Figura N°4. Técnica de inmunodifusión radial

Para la determinación cuantitativa del antígeno se realiza una curva con los valores experimentales (Figura N°5) la cual sigue la ecuación derivada de la **Ley de Fick: $D_2 = D_0 + k [Ag]$** . Una vez establecida una curva de referencia con cantidades conocidas del Ag se puede interpolar los valores de las muestras desconocidas.

La IDR suele utilizarse para las cuantificaciones de Inmunoglobulinas A, M y G; fracciones del complemento C3 y C4, fibrinógeno, etc.



D = diámetro del halo de precipitación obtenido experimentalmente. Ordenada de la curva.
 D₀ = representa el diámetro del reservorio. Es la ordenada al origen de la curva que se obtiene experimentalmente.
 K= representa la pendiente de la curva obtenida
 [Ag] = abscisa de la curva

Figura N°5. Cuantificación del antígeno mediante una curva que sigue la ecuación derivada de la Ley de Fick

1.2.3. Inmunoelectroforesis (IEF)

Esta técnica combina las propiedades de la electroforesis (Ver Anexo) con la precipitación en medio sólido. Se realizan en dos etapas:

a) En la primera se aplica una electroforesis a los Ags proteicos (Ej. Suero humano) que se han sembrado en un pocillo realizado sobre una superficie de agar solidificado. Estas proteínas al ser sometidas a un campo eléctrico se separarán según su movilidad electroforética, que dependerá de la carga eléctrica que posean las mismas según el pH, la fuerza iónica del medio en el que fueron sembradas y el agar utilizado.

b) En la segunda etapa se coloca en forma paralela a la línea de migración de las proteínas (Ags), un antisuero total (Ej. antisuero humano). Luego de un período de incubación de varias horas el antisuero habrá difundido a través del gel hasta encontrar a su Ag correspondiente; observándose tantos arcos de precipitación como Ag haya en la muestra, correspondientes a la zona de equivalencia inmunológica. (Figura N° 6).

Aplicaciones de esta técnica se encuentran en el estudio de proteínas plasmáticas y en la identificación de inmunoglobulinas.

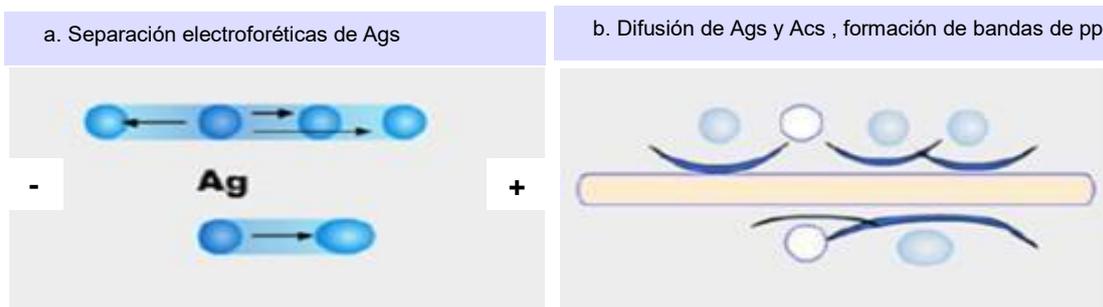


Figura N° 6. Técnica de Inmunoelectroforesis

1.2.4 Contrainmunolectroforesis (CIEF)

Esta técnica utiliza una superficie de agar con dos pocillos enfrentados a una distancia determinada, en uno de ellos se coloca el Ag y en el otro se coloca el Ac. El buffer que se utiliza deja al Ag cargado negativamente y al Ac en su punto isoeléctrico. Al aplicar una corriente eléctrica continua, el Ag migrará hacia el polo positivo y el Ac (neutro) será arrastrado por el movimiento del agua en el gel hacia el polo negativo por el fenómeno de electroendósmosis (Ver Anexo). De esta manera ambos reactantes, Ag y Ac, se mueven uno hacia el otro y al encontrarse en la zona de equivalencia inmunológica se producirá una banda de precipitación (Figura N° 7). Esta técnica es muy rápida (minutos) y de mayor sensibilidad que las anteriores. Es ampliamente aplicada en el diagnóstico de hepatitis B, enfermedades meningocócicas, micosis sistémicas, etc.

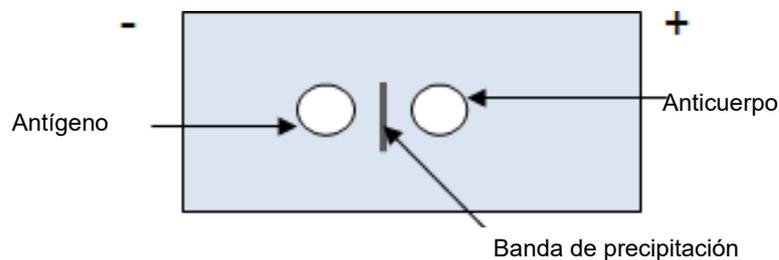


Figura N° 7. Técnica de Contrainmunolectroforesis

DESARROLLO DEL PRÁCTICO

Objetivo: Aplicación de las técnicas de precipitación IDD, IEF, CIEF e IDR para la detección y cuantificación de antígenos y anticuerpos.

INMUNODIFUSIÓN DOBLE

Se procederá a la detección de antígenos o de anticuerpos de acuerdo a la disponibilidad de los mismos.

Materiales necesarios

- Gel de agar alta pureza al 1,2% en SF estéril
- Baño María
- Portaobjetos limpios y desengrasados- Pipetas de 5ml
- Micropipetas (15µl) y tips
- Antígenos y sus correspondientes antisueros
- Sacabocados
- Cámara húmeda (Placa de Petri + papel de filtro humedecido)

Procedimiento

- Se funde el agar en baño María
- Se vierte 2,5 ml del agar sobre el portaobjetos y se deja solidificar.
- Se realizan pocillos sobre el mismo con sacabocados (0,3-0,5 cm de separación entre pocillos)
- Se depositan los Ags y los Acs según una distribución planteada previamente
- (según se quiera detectar Ag o Ac).
- Se deja difundir en cámara húmeda durante 24-48 hs a temperatura ambiente

Interpretación

Entre los pocillos que haya habido reacción Ag-Ac se observará una línea de precipitación blanquecina visible a simple vista.

2. INMUNOELECTROFORESIS

Se procederá al estudio de las fracciones proteicas del suero humano mediante esta técnica inmunológica

Materiales necesarios

- Antígeno: suero humano
- Anticuerpos: anti-suero humano (antiglobulina humana)
- Suero patrón
- Gel agarosa 1%
- Baño María
- Buffer veronal (pH = 8.6)
- Solución colorante: a) Amido Schwartz 0.5% P/V
- Solución decolorante: metanol y ácido acético
- Portaobjetos
- Micropipetas y tips
- Papel de filtro
- Equipo de electroforesis: cuba, fuente de poder
- Sacabocados
- Molde para perforar el agar y perforador de 0,2 cm de diámetro y 6,5 cm de longitud.
- Cámara húmeda

Procedimiento

- Mezclar 1g de agarosa con 100ml de buffer veronal.
- Luego de fundir a Baño María colocar 2-3 ml sobre el portaobjetos. Dejar solidificar.
- Marcar como (-) el extremo que se dispondrá del lado del cátodo y como (+) el del lado del ánodo.
- Practicar los pocillos para el antígeno del lado del cátodo.
- Marcar un canal de 2 mm de ancho para el suero que estará paralelo a las proteínas separadas (no retirar el agar hasta tanto termine la corrida electroforética).
- Llenar ambos compartimientos de la cuba con el buffer.
- Colocar 15µl del antígeno en su pocillo y llevar el portaobjetos sobre el aparato de electroforesis.
- Colocar una tira de papel del filtro a modo de puente para que la solución buffer de la cuba haga contacto con el gel de agar sobre el portaobjetos.
- Tapar la cuba y conectar la fuente de poder aplicando una corriente de 10mA y realizar la corrida electroforética. hasta que la albúmina marcada esté a 2cm del punto de siembra.
- Retirar el portaobjetos de la cuba, extraer el agar del canal con espátula y colocar al ras el antisuero correspondiente.
- Incubar a temperatura ambiente durante 24-48hs. Dejar difundir y leer los resultados.

Interpretación

Luego del período de incubación, los Acs habrán difundido a través de la agarosa hasta encontrarse con sus Ags correspondientes separados previamente por electroforesis; observándose arcos de precipitación en la zona de equivalencia inmunológica.

3. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Se procederá a la detección de antígenos o de anticuerpos de acuerdo a la disponibilidad de los mismos

Materiales necesarios

- Agarosa al 0,9% en buffer veronal sódico (pH= 8-8,6 s/Ag utilizado)
- Baño María
- Portaobjetos limpios y desengrasados
- Pipetas de 5ml
- Micropipetas (15 μ l) y tips
- Antígenos y sus correspondientes antisueros
- Cuba electroforética y fuente de poder
- Buffer veronal sódico pH (8-8,6 s/Ag utilizado)

Procedimiento

- Se funde el agar tamponado y se vierte 2,5 ml sobre el portaobjetos y se deja solidificar.
- Se realizan dos pocillos (0,3- 0,5 cm de separación) sobre el agar con sacabocado, hacia el centro del portaobjeto.
- Marcar como (-) el extremo que se dispondrá del lado del cátodo y como (+) el del lado del ánodo.
- Se realiza la siembra del Ag del lado (-) y el Ac del lado (+) con la micropipeta (15 μ l).
- Llevar el portaobjetos sobre el aparato de electroforesis.
- Colocar una tira de papel del filtro a modo de puente para que la solución buffer de la cuba haga contacto con el gel de agar sobre el portaobjetos.
- Tapar la cuba y conectar la fuente de poder aplicando un voltaje de 3mA por portaobjeto y realizar la corrida electroforética por aprox. 1 h.
- Retirar el portaobjetos de la cuba y luego observar las bandas de precipitación.

Interpretación

En estas condiciones el Ag migrará hacia el polo positivo y el Ac por electroendosmosis hacia el polo negativo y al encontrarse en la zona de equivalencia inmunológica se producirá una banda de precipitación visible a simple vista.

4. INMUNODIFUSION RADIAL

En el laboratorio, se puede preparar las placas para IDR, tal como se detalla a continuación, o bien utilizar placas comerciales.

Materiales necesarios

- Agar purificado para uso en inmunodifusión. Con él se prepara una solución al 2% en buffer veronal sódico pH 8,4 o en buffer borato pH 8,6 (utilizado para electroforesis de proteínas).
- Antisueros específicos.
- Antígenos patrones comerciales o pool de sueros humanos normales de concentración conocida.
- Placas de vidrio de 3 x 10 cm o similares, también pueden utilizarse portaobjetos.
- Pipetas 1 ml y 5 ml.
- Micropipetas de 5 μ l
- Sacabocados de 2 mm de diámetro o matrices especiales para la confección de los orificios sobre las placas de agar.

Procedimiento

- Fundir el agar al 2% en un baño de agua a ebullición.
- Añadir 5-10% del antisuero específico al agar fundido y enfriado a 50 °C, procurando que la mezcla sea lo más homogénea posible.
- Homogeneizar la mezcla por inversión suave; cubrir inmediatamente la placa con una cantidad de la mezcla capaz de producir una capa de gel de 1 mm de espesor y dejar solidificar. Debe obtenerse una placa uniforme.
- Mediante el empleo del sacabocados efectuar sobre el gel una serie de orificios, los que deben estar a una distancia de 1cm aproximadamente, para evitar interferencias entre los halos de precipitación.
- Colocar en 3 reservorios de la placa, 5 µl de diluciones apropiadas de la solución patrón (pura, 1/2, 1/4)
- En los reservorios restantes colocar 5 µl de las muestras a ser evaluadas.
- Dejar difundir en cámara húmeda a temperatura ambiente hasta que el diámetro de los halos no varíe (48-72hs).
- Medir con regla milimetrada el diámetro de los halos, elevarla al cuadrado y graficar la curva colocando en las abscisas mg% del antígeno standard y en las ordenadas el valor de los diámetros obtenidos. Determinar en base al diámetro obtenido con los sueros en estudio, la concentración del componente proteico.

REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Año 2005.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. FCEQyN. UNaM. Año 2016.
- Guía de Trabajos Prácticos. Facultad De Ciencias Veterinarias. U.N.C.P.B.A. 2008
- Guía de Trabajos Prácticos Inmunología. Año 2010. Disponible en: exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/guia
- INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA. Carpenter y col. Edición en Ingles. Editorial Sauder.
- Inmunología en línea. Universidad de Córdoba. España. José Peña Martínez. Disponible en <http://inmunologiaenlinea.es/>
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología. Editorial: Corpus Editorial**. 2016. **ISBN:** 978-15-1296- 055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway. ISBN:** 978-60- 7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. **ISBN:** 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health**. 2013. **ISBN:** 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

TRABAJO PRÁCTICO Nº 8: TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE INTERACCIÓN SECUNDARIA. TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN

MARCO TEÓRICO

Las técnicas inmunológicas de aglutinación son de mucha utilidad para los diagnósticos de laboratorio. Se fundamentan en la interacción secundaria, se basan en la aparición de una aglutinación visible a simple vista cuando se enfrentan antígenos (Ags) particulados con sus anticuerpos (Acs) específicos. Son más sensibles que las técnicas de precipitación y pueden utilizarse como ensayos cualitativos o semicuantitativos de la cantidad de Ac.

Cuando consideramos las técnicas de aglutinación, hay variantes como las que mencionamos a continuación:

1. Aglutinación directa (AD)
2. Aglutinación pasiva o indirecta (AP o AI)
3. Aglutinación reversa pasiva (ARP)
4. Inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

1. Aglutinación Directa (AD)

Esta técnica inmunológica se puede llevar a cabo si los **antígenos son partículas en forma nativa**. Puede ser cualitativa o cuantitativa. La aglutinación directa cualitativa se realiza en medio líquido enfrentando anticuerpos conocidos con un antígeno desconocido, luego de unos minutos de agitación (favorece el fenómeno) se observa la aglutinación.

1.1 **AD cualitativa:** Consiste en mezclar Ag particulado (en forma nativa) y su Anticuerpo específico y observar la aglutinación. Ej. Prueba de aglutinación para la brucelosis, test de Coombs para la anemia hemolítica autoinmune, determinación de grupos sanguíneos, etc (Figura Nº1).

1.2 **AD cuantitativa:** permite una estimación aproximada de los Acs. Se realiza en medio líquido procediendo a la "titulación del suero", para el cual se diluye el suero y se enfrenta a una cantidad fija de Ag (particulado). Pueden presentar problemas del "fenómeno de prozona", es decir que debido al exceso de Ac no se forma la red tridimensional que permite la aglutinación. Ej detección de anticuerpos antisalmonellas para el diagnóstico serológico de fiebre tifoidea, detección de Acs antíbrucelas en el de brucelosis, detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*.

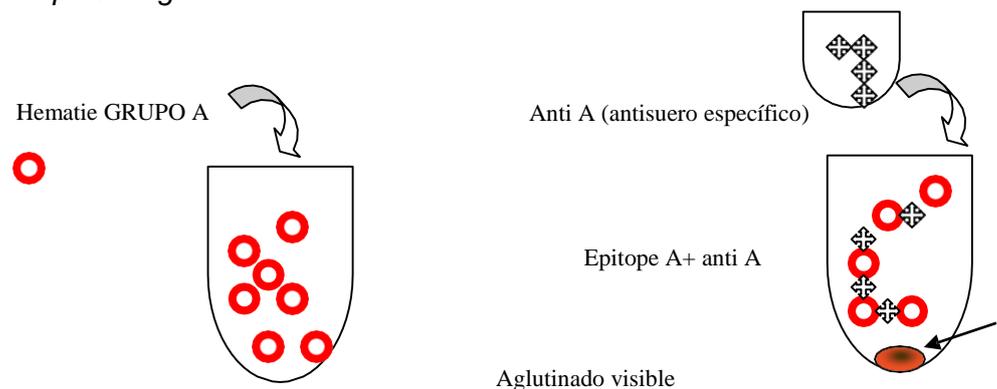


Figura Nº1. Aglutinación directa cualitativa

2. Aglutinación Indirecta (AI) o Pasiva (AP)

Esta técnica inmunológica se basa en que los Ags solubles pueden fijarse sobre partículas más grandes ej. glóbulos rojos, partículas de látex, etc (Figura N°2).

Muchos Ags se unen espontáneamente a los glóbulos rojos de distintas especies, otros Ags pueden ser absorbidos a los glóbulos rojos mediante técnicas especiales (usando ácido tánico o glutaraldehído). Estos GR recubierto o sensibilizados se utilizan en muchas técnicas de aglutinación pasiva para la detección de Acs contra hongos, bacterias, protozoos. También los Ags pueden pegarse a partículas inertes de bentonita o de látex. Esta técnica es más sensible que la aglutinación directa. Ejemplos de estas técnicas tenemos en la detección del factor reumatoideo, proteína c reactiva, antígenos meningococcicos, anticuerpos anti-*Tripanosoma cruzi*.

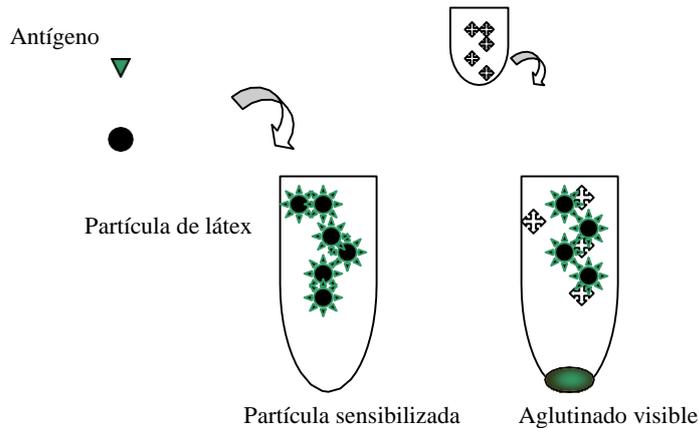


Figura N°2. Aglutinación indirecta o pasiva

3. Aglutinación reversa pasiva (ARP)

Es una técnica similar a la AP, pero se utiliza para detectar Ags, por lo que los glóbulos rojos o las partículas inertes son sensibilizadas o pegadas con los Acs específicos (Figura N°3). Es una técnica altamente sensible. Ej detección del Ag de superficie del virus de la Hepatitis B.

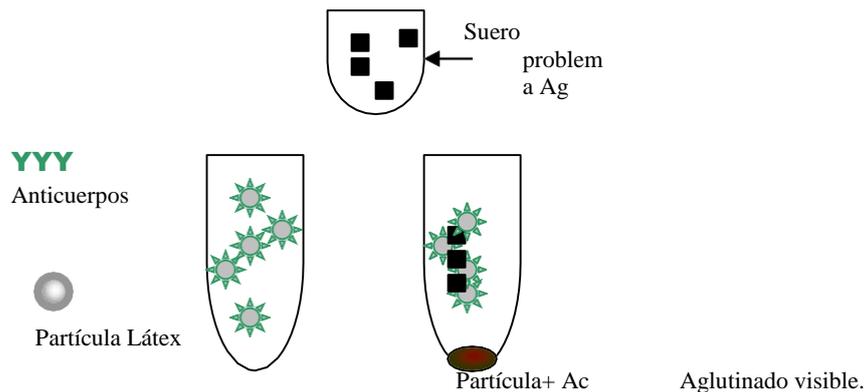
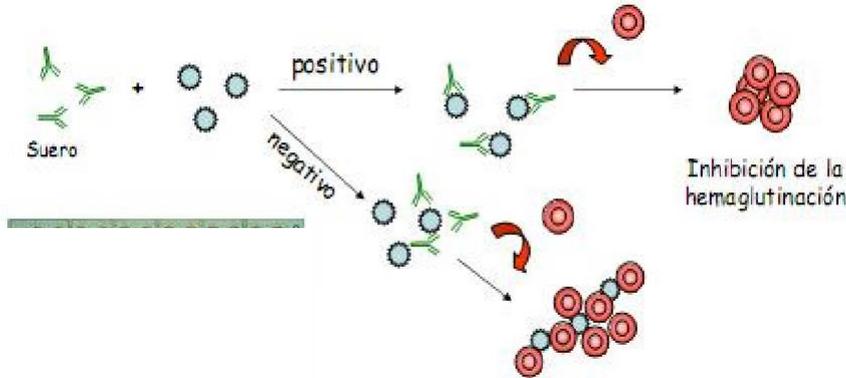


Figura N°3. Aglutinación reversa pasiva

4. Inhibición de la hemaglutinación

Estas pruebas se basan en la capacidad de algunos patógenos (p.ej. ciertos virus) para causar la aglutinación de los eritrocitos. Se utilizan para detectar los anticuerpos en el suero del paciente, dirigidos contra las hemaglutininas del microorganismo. De existir los Acs específicos en el suero problema, el microorganismo perderá su capacidad de aglutinar los glóbulos rojos; es decir se inhibe la hemaglutinación (Figura N°4). Ejs: la detección de Acs anti rubéola, sarampión y otros. Esta técnica también puede ser utilizada para la detección de antígenos como la hormona gonadotrofina coriónica humana, utilizando partículas de látex sensibilizadas con la β GCH y antisueros específicos.



DESARROLLO DEL PRÁCTICO

Objetivo: Aplicación y comprensión del fundamento de las técnicas de aglutinación y floculación.

1. Hemaglutinación Directa

Para desarrollar esta técnica realizaremos la determinación de antígenos eritrocitarios (Grupo sanguíneo- Sistema ABO), siguiendo la técnica descrita anteriormente en el Práctico N°1 "Obtención y determinación de Antígenos".

2. Hemaglutinación Indirecta Cuantitativa (HAI)

Para poner en marcha esta técnica realizaremos la detección de Acs específicos anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-*Toxoplasma gondii*, etc.

Materiales necesarios

- Policubetas de poliestireno de 96 pocillos en U.
- Micropipetas automáticas de 25 ul.
- Microdiluidores para 25ul o pipetas automáticas multicanal.
- Globulos rojos de carnero o pollo, estabilizados con formol y sensibilizados con el Ag. En caso de presentarse liofilizado, se debe resuspender en la solución estabilizadora 2 hs antes de su uso, mezclando por inversión cada 30 min.
- Solución salina estabilizadora. (SSE).
- Sueros testigo reactivo y no reactivo

Procedimiento

1. Colocar 25 ul de SSE en todos los pocillos de la policubeta.
2. Colocar 25 ul de cada muestra de los sueros, testigos y problemas, en la primera fila (A) de la policubeta (dilución inicial $\frac{1}{2}$). Inactivar los sueros problema

previamente a 56°C durante 30 min por razones de seguridad.

3. Colocar los microdiluidores en los 12 pocillos de la fila A, rotándolos no menos de 15 veces y pasándolos progresivamente a las filas subsiguientes (B, C, D, etc.), efectuando cada vez el mismo número de rotaciones, se completan así las diluciones dobles (1/4, 1/8, etc). Es necesario controlar la carga del microdiluidor al comenzar y terminar las diluciones, en un papel absorbente.
4. Estas mismas diluciones sucesivas dobles, pueden hacerse con la pipeta multicanal, de 25 µl.
5. Efectuados los pasos 3 y 4 se coloca 25 ul de la suspensión antigénica en cada pocillo, Agitando luego con suaves golpes en los bordes de la placa.
6. Dejar en reposo en una superficie plana, sobre un papel húmedo (evita las cargas electrostáticas) y en una mesada libre de vibraciones.
7. La lectura se realizará en el tiempo estipulado del fabricante.

Interpretación de los resultados

La falta de reactividad se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón. La reactividad del suero se manifiesta por la formación de un manto de bordes irregulares que cubre el 50-100% del fondo del pocillo (Figura N° 5).



Figura N°5. Técnica de HAD. La reactividad se manifiesta por la formación de un manto

3. Inhibición de la Aglutinación

Como ejemplo de esta técnica realizaremos la detección de la hormona gonadotrofina coriónica (HGC). La HGC es una hormona glicoproteína secretada por la placenta en desarrollo, luego de una fertilización. En un embarazo normal, HGC puede ser detectada en el suero a los siete días de la concepción, pero el día de la primera falta menstrual la concentración es de alrededor de 100 mIU/ml y los niveles máximos de 100.000- 200.000 mIU/ml se alcanzan al final del primer trimestre. La aparición de HGC inmediatamente después de la fertilización y el posterior incremento en concentración hacen de esta hormona un excelente marcador para la detección temprana de embarazo. No obstante, niveles elevados de HGC (comparados a aquellos observados en el embarazo temprano) pueden estar asociados con neoplasias trofoblásticas y no trofoblásticas tales como la mola hidatiforme, coriocarcinoma, etc. Esta hormona desaparece luego de la extirpación de la placenta o del aborto. El máximo de eliminación se produce a los 60-80 días de la amenorrea y luego está presente en cantidades ínfimas durante todo el resto del embarazo.

Materiales necesarios

- Placas de vidrio
- Pipetas Pasteur o goteros
- Varillas de vidrio o palillo mezclador

- Suero anti HGC
- Partículas de látex sensibilizados con HGC
- Cronómetro
- Orina completa

Procedimiento

- Colocar una gota de orina (primera de la mañana) en la placa de vidrio
- Agregar una gota de suero anti-HGC, mezclar
- Agregar una gota de látex- HGC, mezclar
- Balancear la placa durante 2 min.
- Observar la aglutinación o la falta de esta al microscopio.

Interpretación de los resultados

- La ausencia de aglutinación indica un resultado POSITIVO.
- La presencia de aglutinación indica un resultado NEGATIVO.

4. Floculación Directa

Para la práctica utilizaremos, la prueba de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) como ejemplo de técnica de floculación.

La purificación de dos sustancias reactivas a partir del músculo de corazón de buey, cardiolipina y lecitina, condujeron al Ag mas específico usado en la actualidad en la prueba de VDRL. Además se incorpora colesterol, el que proporciona los centros de absorción de tal forma que las partículas interactuantes específicas pueden visualizarse.

Materiales necesarios

- Sueros de pacientes
- Policubetas De Kline
- Antígeno de VDRL
- Microscopio
- Pipeta de 50 μ l

Procedimiento. Ensayo cualitativo

- Colocar 50 μ l de cada una de las muestras de suero sin diluir en un pocillo de la placa y distribuirla en toda la superficie del círculo.
- Agitar la suspensión antigénica para homogeneizar y colocar una gota sobre cada muestra usando la pipeta que trae el equipo.
- Homogeneizar 4 min.
- Leer inmediatamente en un microscopio usando aumento 10 X.

Interpretación de resultados

- No reactiva (no hay floculación)
- Reactiva (floculación presente).

REFERENCIAS.

- ✓ Microbiología Biomédica. Coto C, de Torres R. Basualdo J,.2ª Ed. Editorial Atlante. Buenos Aires 2006.
- ✓ Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Margni Margni R.A. 5ta Edición. Editorial. Panamericana. 1996.
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Inmunología. FCEQyN. UNaM. Año 2016.
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Inmunología. FCEQyN. UNaM. Año 2011.
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Año 2005.
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos. Facultad De Ciencias Veterinarias. U.N.C.P.B.A. 2008.
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos Inmunología. Año 2010. Disponible en exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/
- ✓ Reduca (Recursos Educativos) Serie Veterinaria. 3 (15): 94- 121, 2011. ISSN: 1989- 5003. Disponible en <http://www.revistareduca.es/index.php/reduca/article/view/721/883>

TRABAJO PRÁCTICO N°9.

TITULACIÓN DE SUEROS Y CONJUGADOS

INTRODUCCIÓN

Las técnicas serológicas pueden emplearse con fines cualitativos o cuantitativos. En el primer caso, se pretende conocer solamente la presencia o no, de un Ac o un Ag. En el segundo se pretende dosificar los Acs o Ags existentes en la reacción.

La determinación cuantitativa se expresa en forma convencional con el título de la reacción serológica o "título del suero".

Las titulaciones de sueros son métodos semicuantitativos y consisten en determinar cuál es la máxima dilución del suero (Ac) capaz de reaccionar con una cantidad constante del Ag correspondiente previamente titulado, en forma tal que se manifiesta su presencia con una determinada técnica inmunológica.

Para establecer el título de un suero se hacen diluciones dobles seriadas del mismo, se enfrenta al Ag conocido titulado observándose hasta la última dilución que resulta positiva y éste será el título del suero para dichas pruebas serológicas.

En forma práctica, para proceder a "titular" un suero se realiza una serie de diluciones dobles cada vez mayores del mismo. Las diluciones generalmente se hacen en razón de 2 y el título se expresa por la inversa de la máxima dilución reaccionante. Ej: si la dilución 1/1024 reacciona y no lo hace la dilución 1/2048, el título será 1024. Los valores obtenidos son groseros y pueden aproximarse realizando diluciones intermedias. No obstante ello, es una metodología de singular importancia diagnóstica, ya que pueden servir para:

- a) Dar un resultado (+) o (-)
- b) Correlacionar con la gravedad de la patología
- c) Monitoreo de terapia o seguimiento
- d) Establecer período: agudo o crónico

Se denomina "conjugado" a aquellos reactivos anticuerpos o antígenos que tienen adheridos en su estructura sustancias fluorescentes, estado que se logra mediante procesos químicos o físicos. Se los titula para controlar la concentración del conjugado para la obtención de un resultado que no se vea afectado ni por un exceso ni por un defecto del mismo. El control del conjugado se aplica en todas las técnicas de inmunofluorescencia que utilizan anticuerpos o antígenos.

DESARROLLO DEL PRÁCTICO:

Se utilizará como "modelo" las técnicas de detección de Enfermedad de Chagas y otras parasitosis. Tomado del Manual de Laboratorio del Instituto Nacional de Chagas. Dr Mario Fatała Chaben. Bs As .Argentina

HEMOAGLUTINACION INDIRECTA CUANTITATIVA (HAI)

Materiales:

- Policubetas de poliestireno de 96 pocillos en U
- Micropipetas automáticas de 25ul.
- Microdiluidores para 25ul o pipetas automáticas multicanal.

Reactivos:

1-Gl6bulos rojos de carnero o de pollo, estabilizados con formol y sensibilizados con ant6geno. En caso de presentarse liofilizado, se debe resuspender en la soluci6n estabilizadora 2 horas antes de su uso, mezclando por inversi6n cada 30 minutos.

2-Soluci6n salina estabilizadora (SSE).

3-Sueros testigo reactivo y no reactivo.

T6cnica:

1-Colocar 25ul. de SSE en todos los pocillos de la policubeta.

2-Colocar 25ul. de cada muestra de los sueros, testigos y problemas, en la primera fila (A) de la policubeta (diluci6n inicial 1/2). Inactivar los sueros problemas previamente a 56°C durante 30 minutos, por razones de seguridad.

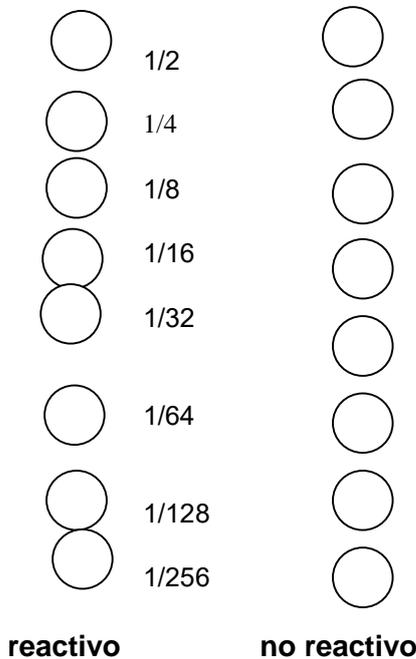
3-Colocar los microdiluidores en los 12 pocillos de la fila A, rot6ndolos no menos de 15 veces y pas6ndolos progresivamente a las filas subsiguientes (B, C, D, etc.), efectuando cada vez el mismo numero de rotaciones, se completan as6 las diluciones dobles (1/4, 1/8, etc.). Es necesario controlar la carga del microdiluidor al comenzar y terminar las diluciones, en un papel absorbente calibrador.

4-Estas mismas diluciones sucesivas dobles, pueden hacerse con la pipeta multicanal, de 25ul.

5-Efectuados los pasos 3 y 4 se coloca 25ul. de la suspensi6n antig6nica en cada pocillo, agitando luego con suaves golpes en los bordes de la placa. Dejar en reposo en una superficie plana, sobre papel h6medo (evita las cargas electrost6ticas) y en una mesada libre de vibraciones.

6-La lectura se realizar6 en el tiempo estipulado por el productor.

7-La falta de reactividad se manifiesta por la sedimentaci6n del ant6geno en forma de bot6n. La reactividad del suero se manifiesta por la formaci6n de un manto de bordes irregulares que cubre el 50-100% del fondo del pocillo, como se muestra a continuaci6n:



INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CUANTITATIVA (IFI)

Materiales:

- 1-Microscopio de epifluorescencia con tubo binocular, ocular 10x, objetivos acromáticos de 10x y 40x y cubo de filtros para luz azul. Debe estar equipado con óptica de buena calidad, un condensador de campo oscuro e iluminación de luz ultravioleta. La fuente luminosa debe contar con filtros excitadores que dejen pasar selectivamente la luz azul y debe tener un filtro barrera que impida que el exceso de luz no absorbida por el objeto llegue al ojo del observador.
- 2-Estufa de Incubación a 37°C.
- 3-Heladera.
- 4-Calventor.
- 5-Cámara húmeda.
- 6-Portaobjetos de vidrio no fluorescente y espesor no mayor de 1,2mm marcados con 12 divisiones indelebiles de forma circular de 8mm de diámetro y cubreobjetos de 24x48mm.
- 7-Matracas aforados de 1000ml.
- 8-Probetas de 100ml.
- 9-Pipetas automáticas de 20ul. y 200ul.
- 10-Jarras de Koplín.
- 11-Frasco gotero para líquido de montaje.
- 12-Cajas plasticas con tapa para almacenar portaobjetos.

Reactivos:

- 1-Solución salina estabilizadora (SSE) pH 7,2
 - a) Solución madre (10x)
 - Fosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 17.0gr
 - Fosfato monosódico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 2.2gr
 - Cloruro de sodio (NaCl) 81.7gr
 - Agua destilada c.s.p. 1000ml.
 - b) Solución salina estabilizadora (SSE) pH 7,2 (1x)

De la solución madre se toman 100ml y se lleva a un volumen final de 1000ml con agua destilada.
- 2-Antígeno:
 - a) Diluir la suspensión antigénica de acuerdo al título, en SSE 1x, hasta que se pueda visualizar de 20 a 40 parásitos por campo microscópico de 400 aumentos.
 - b) Colocar en los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados, 25ul de dicha suspensión en cada una de las divisiones marcadas.
 - c) Secar las improntas así preparadas por medio de aire caliente.
 - d) Fijar a la llama flameando el preparado suavemente.
 - e) Lavar los portaobjetos con agua destilada.
 - f) Secar con aire frío.
 - g) Conservar en congelador a -20°C , en cajas de plástico con tapa, bien protegidas de la humedad.
- 3-Antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (conjugado). Determinar el título de la antigamaglobulina marcada para cada lote y para cada equipo microscópico, pues depende del sistema óptico a utilizar.
- 4-Azul de Evans:

Preparar una solución stock de azul de Evans al 1% en agua destilada. Dejar estabilizar durante 1 mes y titular.

5-Líquido de montaje

Glicerina bidestilada neutra	9 partes
SSE 10x	1parte

Dilución de sueros:

-Sueros testigo: Regenerar si son liofilizados y preparar diluciones dobles en SSE 1x. Preparar 2 portaobjetos conteniendo diluciones de sueros testigo desde 1/16 a 1/512, reactivo (arriba) y no reactivo (abajo). Disponer estos portaobjetos, uno al comienzo y otro al final de la tanda de cada día. Si se analizan más de 10 portaobjetos, disponer otros testigos intermedios.

-Sueros problema: Inactivar los sueros a 56°C durante 30 minutos, por razones de seguridad. Preparar diluciones dobles del suero en SSE 1x. Se recomienda utilizar como mínimo tres diluciones diagnósticas (1/32, 1/64, 1/128) en SSE 1x.

REACCION PROPIAMENTE DICHA:

- Tomar los portaobjetos con antígenos de la congeladora y secarlos a temperatura ambiente sobre papel de filtro.
- Colocar en cada división 25ul de cada dilución de suero problema.
- Trabajar cada vez con los siguientes controles: testigo de fluorescencia inespecífica, Testigo no reactivo y Testigo reactivo de título conocido.
- Incubar los portaobjetos con los sueros controles y problemas en cámara húmeda, durante 30 minutos en estufa a 37°C.
- Lavar los portaobjetos colocándolos en una jarra de Koplín primero con agua destilada y luego con SSE 1x durante 5 minutos, por 2 veces consecutivas. Finalmente enjuagar con agua destilada.
- Secar los preparados con papel de filtro y corriente de aire frío.
- Cubrir los preparados con la antigamaglobulina humana marcada, diluida de acuerdo al título, en Azul de Evans según el título. Colocar 25ul en cada división e incubar a 37°C en estufa, en cámara húmeda por 30 minutos.
La dilución del conjugado debe ser preparada en el momento y utilizada dentro de las 2 horas de su preparación (conservada en heladera y al abrigo de la luz).
- Lavar los portaobjetos como se indica en punto e) y secarlos como en f).
- Colocar los cubreobjetos con una gota de líquido de montaje.
- Leer en microscopio de fluorescencia.

Lectura:

Leer los testigos antes que los sueros problemas.

- Testigo de fluorescencia inespecífica: al microscopio los parásitos deberán presentar una coloración rojiza y no mostrar fluorescencia.
- Testigo no reactivo: el suero control no reactivo debe presentar una coloración parduzca sin fluorescencia.
- Testigo reactivo: el suero control reactivo debe presentar los parásitos teñidos con el fluorocromo de un color verde fluorescente. La fluorescencia es particularmente intensa en la membrana y el flagelo del parásito. Deberá observarse fluorescente hasta la dilución de su título.

TITULACIÓN DEL CONJUGADO:

Denominamos conjugado a aquellos reactivos anticuerpos o antígenos que tienen adheridos en su estructura sustancias fluorescentes, estado que se logra mediante procesos químicos o físicos.

Objetivos:

Controlar la concentración del conjugado para la obtención de un resultado que no se vea afectado ni por un exceso ni por un defecto del mismo.

Aplicaciones:

El control del conjugado se aplica en todas las técnicas de inmunofluorescencia que utilizan anticuerpos o antígenos.

Materiales necesarios para la titulación de antiqamma globulina:

- a) Sueros testigo de concentración (título) conocido.
- b) Sueros no reactivos.
- c) Conjugado antiqamma globulina a titular.
- d) Buffer PBS pH 7,4
- e) Tubos de khan.
- f) Portaobjetos para Inmunofluorescencia con antígenos específicos.
- g) Camara Húmeda.
- h) Líquido de montaje (glicerina con buffer PBS pH 8)
- i) Cubroobjetos de 18x 24 mm

Procedimiento:

- a) Preparar diluciones dobles del suero testigo de concentración conocida.
- b) Numerar correlativamente los portaobjetos (armar tantos juegos de portabojetos como diluciones del conjugado se quieran realizar).
- c) Agregar a cada portaobjetos 20 ul del suero testigo en las diluciones efectuadas, numerarlos correlativamente.
- d) Agregar en una celda de cada portaobjetos, 20 ul del suero no reactivo.
- e) Agregar en una celda de cada portabojetos, 20 ul de buffer PBS.
- f) Incubar durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- g) Lavar con buffer PBS (tres lavados de cinco minutos cada uno) y dejar secar a temp. ambiente..
- h) Preparar diluciones dobles del conjugado (si se sabe por el fabricante hacer varias alrededor de este valor)
- i) Agregar 20 ul de la primera dilución del conjugado a todas las celdas del portaobjetos N° 1, 20 ul de la segunda dilución del conjugado a todas las celdas del portaobjetos N° 2 y así sucesivamente.
- j) Repetir el punto f).
- k) Repetir el punto g).
- l) Agregar 3-4 gotas del líquido de montaje a los portaobjetos y colocar los cubroobjetos.
- m) Mirar al microscopio de inmunofluorescencia.
- n) Registrar los resultados en la planilla de trabajo.

PLANILLA DE TRABAJO

Dilución N° 1 del conjugado: _____ Operador: _____ Fecha: __/__/__

SNR	Dil 1 S	Dil 2 S	Dil 3 S	Dil 4 S	Dil 5 S
PBS	Dil 6 S	Dil 7 S	Dil 8 S	Dil 9 S	Dil 10 S

Título: _____

Dilución N° 2 del conjugado: _____ Operador: _____ Fecha: __/__/__

SNR	Dil 1 S	Dil 2 S	Dil 3 S	Dil 4 S	Dil 5 S
PBS	Dil 6 S	Dil 7 S	Dil 8 S	Dil 9 S	Dil 10 S

Título: _____

Dilución N° 3 del conjugado: _____ Operador: _____ Fecha: __/__/__

SNR	Dil 1 S	Dil 2 S	Dil 3 S	Dil 4 S	Dil 5 S
PBS	Dil 6 S	Dil 7 S	Dil 8 S	Dil 9 S	Dil 10 S

Título: _____

Dilución N° 4 del conjugado: _____ Operador: _____ Fecha: __/__/__

SNR	Dil 1 S	Dil 2 S	Dil 3 S	Dil 4 S	Dil 5 S
PBS	Dil 6 S	Dil 7 S	Dil 8 S	Dil 9 S	Dil 10 S

Título: _____

Dilución N° 4 del conjugado: _____ Operador: _____ Fecha: __/__/__

SNR	Dil 1 S	Dil 2 S	Dil 3 S	Dil 4 S	Dil 5 S
PBS	Dil 6 S	Dil 7 S	Dil 8 S	Dil 9 S	Dil 10 S

Título: _____

Título del suero testigo conocido Ej. 1/1

EJEMPLO DE TITULACION (Para un título estimado de 1/500)

Diluciones del conjugado	Control positivo Dilución seriada	Control negativo (1/32)	Control inespecificidad
1/200	1/1024+	(+)	(-)
1/400	1/512+	(+)ó(-)	(-)
1/600	1/256+	(-)	(-)
1/800	1/128+	(-)	(-)
1/100	1/64+	(-)	(-)

El título del conjugado corresponde a la máxima dilución que da fluorescencia con el suero positivo en su título conocido. En el ejemplo del esquema donde el suero control positivo tiene un título de 1/128, la dilución adecuada del conjugado, es decir su título, es de 1/800. El conjugado diluido no debe teñir inespecíficamente a los parásitos.

Titulación de la solución de Azul de Evans:

Efectuar diluciones a partir de la solución madre al 1% en SSE 1x. Realizar una titulación semejante a la descripta para la antigamaglobulina humana marcada utilizando un conjugado de título conocido. Dado que el Azul de Evans, es utilizado como colorante de contraste, su óptima titulación ayudará a una mejor discriminación de los sueros en estudio. El rango de títulos hallados habitualmente, es de 1/10.000 a 1/20.000.

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros
- Margni R. **Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición**. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros
- Microbiología Biomédica. Coto C, de Torres R. Basualdo J., 2ª Ed. Editorial Atlante. Buenos Aires 2006.
- Inmunología e Inmunoquímica – Fundamentos. Margni, Editorial Panamericana, 5ª Ed.
- Inmunología en línea. Universidad de Córdoba. España. José Peña Martínez
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Año 2005.
- Federico Alquel. Manual de Análisis clínicos. 3º Ed. Panamericana. Universidad Nacional de Tucumán.
- El Laboratorio y su interpretación semiológica. Kalinov. 1984. Ed. Lopez Libros Editores.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. FCEQyN. UNaM. Año 2016.
- Guía de Trabajos Prácticos. Facultad De Ciencias Veterinarias. U.N.C.P.B.A. 2008
- Guía de Trabajos Prácticos Inmunología. Año 2010. Disponible en exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/guía

CUESTIONARIOS GUÍA

CUESTIONARIO GUIA Nº1

TEMA: ANTÍGENOS

1. ¿Qué son los antígenos?
2. ¿Cómo se denomina la capacidad de una molécula extraña al organismo que puede inducir una respuesta inmune y unirse específicamente a un anticuerpo (Ac) o a un receptor de células T o B?
3. ¿Cómo se denomina a la capacidad de una determinada sustancia para unirse a receptores específicos presentes en las células inmunes?
4. ¿A que llamamos haptenos?
5. ¿Qué nombres recibe la zona donde el antígeno se une al anticuerpo?
6. ¿Qué tipos de epítopes pueden encontrarse en una molécula de antígeno?
7. ¿Cómo se denomina un epítope cuya especificidad reside en la naturaleza espacial de la molécula?
8. ¿Cómo se pueden clasificar a los antígenos según su origen, variedad o tipo? Dé ejemplos de cada uno de ellos.
9. Explique en qué consiste la diferenciación de los antígenos según su origen, procesamiento y presentación, en exógenos y endógenos.
10. Se pueden diferenciar los antígenos según la respuesta que inducen, en T-independientes y T-dependientes. Describa respuesta inducida y características de ambos tipos de antígenos.
11. ¿Cuáles son los factores que pueden condicionar la inmunogenicidad? Diga cómo influyen c/u de ellos.
12. ¿En qué consiste el sistema ABO de los grupos sanguíneos?
13. ¿Qué características poseen los antígenos de superficie de los eritrocitos?
14. ¿Que son los adyuvantes? ¿Cómo actúan? ¿Cómo se clasifican?
15. Defina mitógenos y superantígenos.
16. Defina toxina y toxoide.

Referencias

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª

Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.

- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros
- Páginas internet: Curso de inmunología general
www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_09.htm - 40k

CUESTIONARIO GUIA Nº 2

TEMA: MOLÉCULAS QUE RECONOCEN AL ANTÍGENO (TCR, BCR, Ac)

Comenzaremos a conocer, entre las moléculas que intervienen en la respuesta inmune específica, aquellas capaces de reconocer específicamente al antígeno. Investigue:

- 1) ¿Qué son las Inmunoglobulinas (Igs)?
- 2) Detalle la estructura de los anticuerpos, señalando cuales son los dominios y zonas importantes de la molécula.
- 3) Establezca las Clases y subclases de anticuerpos, señalando sus características diferenciales.
- 4) Investigue la estructura, constitución y composición de los distintos dominios de las inmunoglobulinas
- 5) Detalle las funciones de las moléculas de inmunoglobulinas.
- 6) Receptores para las porciones Fc de la Igs. Tipos existentes, estructuras que presentan, funciones que median.
- 7) ¿Qué son los receptores de antígenos de linfocitos T y B? ¿Cómo se los denomina?
¿Cuál es su estructura?

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros
- Páginas internet: www.inmunologiaonline.es, www.inmunologiaenlinea.com

CUESTIONARIO GUIA N° 3
TEMA: CÉLULAS

1. Complete el siguiente cuadro:

Tipo celular	Tamaño (um)	Núcleo	Contenidos de gránulos	vida media	Funciones	Ppales moléculas de superficie	Fns de Rcs esp.	Rta inmune en la que participa (Innata o adaptativa)
Neutrófilos								
Eosinófilos								
Basófilos								
Linfocitos T CD4								
Linfocitos T CD8								
Linfocitos B								
Monocitos								
NK								
Cel. Dendritica								
Plaquetas								

2. Mastocitos: ¿cuáles estímulos desencadenan su degranulación?

3. Células NK: importancia funcional y su mecanismo de destrucción

4. Complete los siguientes valores normales (habituales) que podemos encontrar en un hemograma de un adulto normal (expresado en nº de células/ mm³).

	Valores relativos (%)	Valores Absolutos (cel/mm ³)
Plaquetas		
Leucocitos:		
Neutrófilos		
Basófilos		
Eosinófilos		
Monocitos		
Linfocitos		

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 7ª y 8ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2012, 2015. ISBN 978-84-8086- 311-7 y 978-84-9022-894-4.
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 7ª y 8ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier-Moby. 2.007 y 2012.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Se recomienda además ver los siguientes videos de la Universidad de Valladolid:
- 2.1 CELULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO Y DIFERENCIACION CELULAR:
https://www.youtube.com/watch?v=DTAK8rGEO2g&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=6
- 2.2 CELULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO Y DIFERENCIACION CELULAR:
https://www.youtube.com/watch?v=noAfaolvntw&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=7
- 2.3 CELULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO Y DIFERENCIACION CELULAR:
https://www.youtube.com/watch?v=x3gZnULZt9I&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=8
- 2.4 CELULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO Y DIFERENCIACION CELULAR:
https://www.youtube.com/watch?v=FbFmS_r9ZCA&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=9
- 2.5 CELULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO Y DIFERENCIACION CELULAR:
https://www.youtube.com/watch?v=4E8_WbRtaBo&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=10
- 2.6 CELULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO Y DIFERENCIACION CELULAR:
https://www.youtube.com/watch?v=Hk3dJ6Bk08&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=11
- 7.1 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y EL RECEPTOR PARA EL ANTIGENO DEL LINFOCITO T: <https://www.youtube.com/watch?v=yA-y9DkJdDI>
- 7.2 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y EL RECEPTOR PARA EL ANTIGENO DEL LINFOCITO T: <https://www.youtube.com/watch?v=y79tTAuCfAk>
- 7.3 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y EL RECEPTOR PARA EL ANTIGENO DEL LINFOCITO T:
https://www.youtube.com/watch?v=b0sTUp7cyyY&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=32
- 7.4 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y EL RECEPTOR PARA EL ANTIGENO DEL LINFOCITO T:
https://www.youtube.com/watch?v=hMt8zDU_wzQ&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=33

CUESTIONARIO GUÍA N°4

TEMA: ESTUDIO FUNCIONAL DE POLIMORFONUCLEARES.

1. ¿A qué se denomina célula PMN? Haga una descripción breve de las características morfológicas y funciones de éstas.
2. Explique brevemente el rol de los neutrófilos en el proceso de fagocitosis.
3. Neutrófilos: describir los mecanismos bactericidas que ocurren en la célula
4. ¿Que son las NETs o trampas extracelulares de los neutrófilos? Desarrolle su conformación y función.
5. Detalle las vías de procesamiento y eliminación del antígeno.
6. Mencione las moléculas de superficie que participan en la adherencia (laxa y firme), identificando a las moléculas con quienes interactúan y sobre qué elementos celulares (o no) se ubican éstas.

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología. Editorial: Corpus Editorial**. 2016. **ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9**. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. **ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1**. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. **ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6**. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición**. **Editorial: Wolters Kluwer Health**. 2013. **ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3**. e-libros

CUESTIONARIO GUIA Nº 5

TEMA: SISTEMA DEL COMPLEMENTO

1. Defina el sistema del complemento. Señale y explique sus funciones biológicas más importantes.
2. ¿Cómo está conformado el sistema del complemento?
3. ¿Cómo actúa?
4. ¿Cuáles son las vías de activación?
5. ¿Cuándo actúa cada una de ellas? (estímulo antigénico inicial)
6. Identifique los reguladores solubles y de membrana.
7. ¿Cómo interactúa con otros sistemas, para llevar a cabo sus funciones inmunológicas?
8. ¿Qué y cuáles son las anafilotoxinas?
9. ¿Cuáles son las funciones principales de las anafilotoxinas?
10. ¿Qué receptores para porciones del complemento conoce?

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología. Editorial: Corpus Editorial**. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.

- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición.** Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. **ISBN:** 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros
 - Se recomienda ver los siguientes videos de la Universidad de Valladolid:
 - 11.1. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES: https://www.youtube.com/watch?v=9Wxlkaikh8&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=54
 - 11.2. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES: https://www.youtube.com/watch?v=PYIEDKfVDzM&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=55
 - 11.3. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES: https://www.youtube.com/watch?v=993kD2kAn2c&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=56
 - 11.4. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES: https://www.youtube.com/watch?v=wTRvHrFagXc&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=57
 - 12.1. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES (II): https://www.youtube.com/watch?v=FY2zrf95jg&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=58
 - 12.2. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES (II): https://www.youtube.com/watch?v=t5jYsMMXsnE&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=59
 - 12.3. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES (II): https://www.youtube.com/watch?v=1HM9yFQPq40&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=60

CUESTIONARIO GUÍA N°6

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE INTERACCIÓN PRIMARIA

1. ¿En qué etapa de la interacción Ag-Ac se basan las técnicas inmunológicas de interacción primaria?
2. ¿Cómo se ponen de manifiesto las interacciones Ag-Ac, al implementar técnicas de interacción primaria para la detección de un determinado analito?
3. Clasificar los inmunoensayos de interacción primaria en función del tipo de marcador empleado en cada uno de ellos.
4. Indique la diferencia entre Inmunoensayos competitivos y no competitivos.
5. Indique la diferencia entre inmunoensayos homogéneos y heterogéneos.
6. ¿En qué consisten las técnicas de radioinmunoanálisis?
7. Diga cuál es el fundamento de las técnicas de quimioluminiscencia.
8. ¿Cuál es el fundamento de las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA)?
9. ¿Cuál es la diferencia entre ELISA competitivo y no competitivo?
10. Diga cuál es el fundamento de las técnicas de inmunofluorescencia (IF)
11. ¿Cuál es la diferencia entre las técnicas de IF directa e IF indirecta?
12. ¿Cuál es el fundamento de las técnicas de inmunocromatografía?
13. Diga brevemente para qué sirve y en qué se basa la técnica de citometría de flujo.
14. ¿Cuál de estas técnicas conllevan mayor riesgo al ser ejecutada? justifique su elección:
 - Químico Inmunoensayos
 - Inmunofluorescencia
 - Radioinmunoanálisis
 - Enzimoimmunoensayo
15. La alta sensibilidad y especificidad de las técnicas inmunológicas hacen factible su aplicación en varios campos. Haga un listado de los posibles usos de las mismas.

Referencias bibliográficas

1. Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Inmunología. FCEQyN. UNaM. Grenón S, Mereles Rodríguez BE, Payes Monzón F, Salvi Grabulosa M. Ed. 2016, 2024.
2. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Margni R. 5ª Ed. Editorial. Panamericana.
3. Técnicas de inmunodiagnóstico. Montes Barqueros. Ed. SÍNTESIS, S. A.
4. Manual de Métodos Inmunológicos. Lomonte, B. (2007), 138 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>
5. Citometría de flujo <http://inmunologia.eu/tecnicas-experimentales/citometria-de-flujo>
6. Manual de laboratorio de inmunología clínica. Marroquin Seguro y cols. (2017). Disponible en https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/14Manual_Inmunologia_Clinica.pdf
7. Inmunología. Kölliker Frers, Rodolfo. (2016). Editorial: Corpus Editorial

Observación: Bibliografías 1 y 2 se encuentran disponibles en Aula virtual Moodle fceqyn

CUESTIONARIO GUÍA N°7

TEMA: TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE INTERACCIÓN SECUNDARIA: Precipitación

1. Las propiedades que tienen las Igs para unirse a un Ag específico, permiten que esta unión pueda visualizarse directamente mediante la utilización de técnicas denominadas de "Interacción secundaria". Cuál es la clasificación general de este tipo de técnicas.
2. ¿Cómo se denominan las técnicas en las que se requiere que tanto el Ac como el Ag se encuentren en un medio fluido?
3. ¿Qué ocurre si en una reacción de precipitación se utiliza un suero con elevada concentración de Acs? ¿Cómo se denomina este fenómeno?
4. Las pruebas de precipitación son ampliamente utilizadas en el laboratorio y permiten observar la precipitación espontánea del complejo Ag-Ac cuando la proporción de Ags y Acs es equivalente.
 - 4.1. Enumere según grado de sensibilidad de menor a mayor las distintas técnicas de precipitación en medios gelosados.
 - 4.2. ¿Cuál de ellas utilizará si desea estudiar una mezcla antigénica compleja?
 - 4.3. Al aplicar electroforesis en las técnicas de precipitación, ¿por qué cree que se recomienda colocar las sustancias a analizar hacia el centro del portaobjeto y no en un extremo?

Referencias bibliográficas

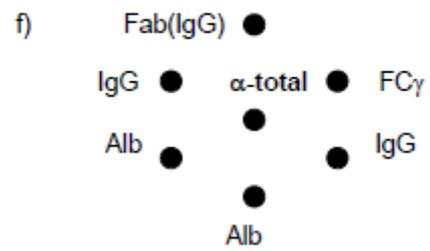
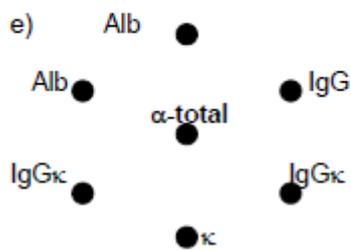
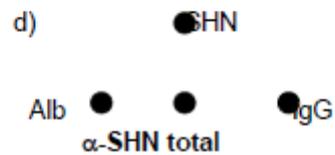
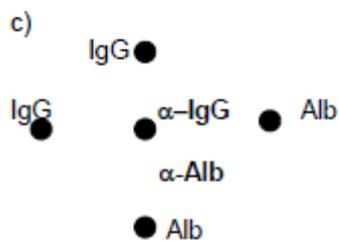
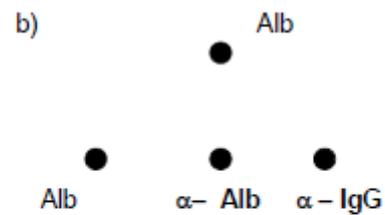
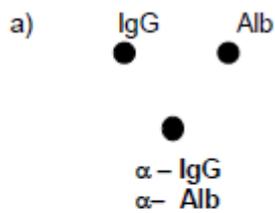
1. Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Inmunología. FCEQyN. UNaM. Grenón S, Mereles Rodríguez BE, Payes Monzón F, Salvi Grabulosa M. Ed. 2016.
2. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Margni R. 5ª Ed. Editorial. Panamericana.
3. Técnicas de inmunodiagnóstico. Montes Barqueros. Ed. SÍNTESIS, S. A.
4. Manual de Métodos Inmunológicos. Lomonte, B. (2007), 138 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>
5. Citometría de flujo <http://inmunologia.eu/tecnicas-experimentales/citometria-de-flujo>
6. https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/14Manual_Inmunologia_Clinica.pdf
7. Inmunología. Kölliker Frers, Rodolfo. (2016). Editorial: Corpus Editorial

CUESTIONARIO GUÍA N°8

TEMA: TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE INTERACCIÓN SECUNDARIA: Aglutinación y Floculación

1. ¿Cuáles son las condiciones necesarias para que se produzca una reacción de aglutinación?
2. ¿Cuáles son las condiciones necesarias para que se produzca una reacción de floculación?
3. ¿Cuáles son las técnicas de precipitación más utilizadas?
4. ¿Cuáles son las técnicas de aglutinación más utilizadas?
5. ¿Qué es y cómo se calcula el título de un suero?
6. En el procedimiento de obtención de un antisuero anti-toxina HI, se desea conocer si se ha alcanzado un título estable, y que el procedimiento de inmunización del animal pueda detenerse. Qué métodos de interacción secundaria utilizaría Ud. para determinarlo.
7. En el proceso de obtención de un antisuero anti-T, ¿qué técnicas de interacción secundaria podría utilizarse para evaluar la respuesta hacia inmunógenos T solubles?

8. Resuelva los siguientes problemas de Ouchterlony:



Bibliografía

- Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Inmunología. FCEQyN. UNaM. Grenón S, Mereles Rodríguez BE, Payes Monzón F, Salvi Grabulosa M. Ed. 2016.
- Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Margni R. 5ª Ed. Editorial. Panamericana.
- Técnicas de inmunodiagnóstico. Montes Barqueros. Ed. SÍNTESIS, S. A.
- Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo y clasificación antigénica eritrocitaria. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/ims051c.pdf>
- Lomonte, B. (2007) Manual de Métodos Inmunológicos, 138 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>

TALLERES

TALLER Nº 1.

MOLÉCULAS QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA INMUNE.

Entre las moléculas que van a participar en el desarrollo de la respuesta inmune (RI), tanto específica como inespecífica, encontraremos mediadores solubles y moléculas expresadas sobre la superficie de las células. Con el fin de ir conociéndolas trabajaremos con los siguientes grupos:

- Antígenos de diferenciación leucocitaria (**CD**)
- Moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas
- Complejo mayor o principal de Histocompatibilidad (**CMH o CPH**) o Antígeno linfocitario humano (**HLA**).
- Moléculas de adhesión celular
- Citoquinas y quimioquinas
- Receptores de reconocimiento de patrones (**RRP**) o Receptores de la inmunidad innata

Para cada una de las moléculas anteriormente mencionadas investigue:

- Definición y estructura
- Clasificación
- Ubicación
- Modos de acción
- Receptores

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.

- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

✓ Ver además para CMH los siguientes videos de la Universidad de Valladolid:

EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (I):
https://www.youtube.com/watch?v=3mg-SrE7v24&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=46

EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (I):
https://www.youtube.com/watch?v=rteJPxlyxxw&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=47

EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (I):
https://www.youtube.com/watch?v=WnINz8bsUSY&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=48

TALLER N°2.

TEMA: MOLÉCULAS QUE RECONOCEN AL ANTÍGENO: ANTICUERPOS, RECEPTOR DE LAS CÉLULAS B (BCR) Y RECEPTOR DE LAS CÉLULAS T (TCR)

- 1) Receptores para las porciones Fc de la Igs. Tipos existentes, estructuras que presentan, funciones que median.
- 2) ¿Qué son los receptores de antígenos de linfocitos T y B? ¿Cómo se los denomina?
¿Cuál es su estructura?
- 3) ¿Qué estructuras asociadas tienen y cuáles son sus funciones?
- 4) Cómo se originan los receptores de antígeno B y T.
- 5) Investigue acerca del origen genético de las:
 - ✓ Cadenas livianas, mecanismos de diversidad, idiotipos
 - ✓ Cadenas pesadas, mecanismo del cambio isotópico.
 - ✓ Cambios alotípicos.
 - ✓ ¿Qué otros mecanismos de variabilidad genética para asegurar la diversidad existen?
- 6) ¿Cómo se originan los receptores de antígeno B (BCR) y T (TCR)? ¿Qué diferencias presentan los mecanismos antes investigados?

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998

- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

✓ Cualquier libro de inmunología disponible de edición actualizada.

✓ Se recomienda además ver videos de la Universidad de Valladolid disponibles en moodle.

TALLER N°3

TEMA: ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

- 1) ¿A qué denominamos Órganos y tejidos del sistema inmune? ¿Cómo se clasifican de modo funcional y anatómico? ¿Cuáles son y qué funciones se desarrollan en ellos?
- 2) ¿Cómo es la organización de la médula ósea y qué procesos ocurren en ella?
- 3) Diagrame la Ontogenia de Linfocitos B, ¿cuál es el proceso más importante que ocurre durante la maduración de estos linfocitos? ¿En qué estadio salen las células B y a dónde se dirigen?
- 4) Diagrama la organización del Timo, señalando que procesos ocurre en él
- 5) Señale la Ontogenia T, ¿cuál es el proceso más importante que ocurre durante la maduración de los Linfocitos T? ¿En qué estadio salen las células T y a dónde se dirigen?
- 6) ¿Cuál es la distribución y la organización de los ganglios linfáticos? ¿Cómo se interconectan los mismos?
- 7) ¿Qué poblaciones celulares y en qué estadio encontramos en su interior?
- 8) ¿Cuál es la organización del Bazo y qué poblaciones celulares encontramos en su interior?
- 9) ¿A qué denominamos tráfico linfocitario?
- 10) ¿A qué denominamos Tejidos Linfoides Asociados a Mucosas? ¿Cuál es su organización?

REFERENCIAS:

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Margni R. Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial

Médica Panamericana; 2006.

Se recomienda además ver los siguientes videos de la Universidad de Valladolid:

3.1 TEJIDOS DEL SISTEMA INMUNITARIO:
https://www.youtube.com/watch?v=7ETyDIzhw4c&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=12

3.2 TEJIDOS DEL SISTEMA INMUNITARIO:
https://www.youtube.com/watch?v=aWcHRumYew0&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=13

3.3 TEJIDOS DEL SISTEMA INMUNITARIO:
https://www.youtube.com/watch?v=eMy_KmyOfnM&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=14.

TALLER N°4.

TEMA: INTERACCIÓN ANTÍGENO – ANTICUERPO

1. ¿A qué denominamos interacción antígeno (Ag) –anticuerpo (Ac)?
2. ¿Cuáles son las etapas de la interacción Ag-Ac?
3. Defina los siguientes términos: especificidad, afinidad, avidéz.
4. ¿Cuáles son los factores/mecanismos que regulan las distintas etapas de la interacción Ag-Ac?
5. ¿Cómo se ponen de manifiesto las interacciones primarias?
6. ¿Cómo se ponen de manifiesto las interacciones secundarias?
7. Señale las diferencias entre: aglutinación, precipitación y floculación.
8. ¿Qué es el fenómeno de zona?
9. ¿Qué son las técnicas inmunológicas, cuáles son sus utilidades?
10. ¿Cuándo se dice que una técnica inmunológica es sensible y cuándo es específica?
11. ¿A qué denominamos técnicas serológicas?
12. ¿Cómo se puede valorar la calidad y precisión de los resultados que un laboratorio emite al aplicar una técnica inmunológica?
13. ¿Qué diferencias hay en la aplicación de técnicas inmunológicas que permitan realizar una valoración cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa de un mismo analito?
14. ¿Cómo pueden expresarse los resultados de un inmunoensayo?

Referencias bibliográficas

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Guía de Trabajos prácticos. Catedra de Inmunologica. Carreras de Bioquímica y Farmacia. FCEQyN-UNaM. 2016.
- Curso de inmunología general www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_09.htm - 40k

- www.inmunologiaonline.es
- Técnicas de inmunodiagnóstico. Montes Barqueros. Ed. SÍNTESIS, S. A.
- Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo y clasificación antigénica eritrocitaria. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/ims051c>

TALLER N°5

TEMA: COMPLEMENTO

1. Defina el sistema del complemento. Señale y explique sus funciones biológicas más importantes.
2. ¿Cómo está conformado el sistema del complemento?
3. ¿Cómo actúa?
4. ¿Cuáles son las vías de activación?
5. ¿Cuándo actúa cada una de ellas? (estímulo antigénico inicial)
6. Identifique los reguladores solubles y de membrana.
7. ¿Cómo interactúa con otros sistemas, para llevar a cabo sus funciones inmunológicas?
8. ¿Qué y cuáles son las anafilotoxinas?
9. ¿Cuáles son las funciones principales de las anafilotoxinas?
10. ¿Qué receptores para porciones del complemento conoce?

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. **Inmunología. Biología y patología del sistema inmune**. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. **Inmunología. Segunda Edición**. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

Se recomienda ver los siguientes videos de la Universidad de Valladolid:

- 11.1. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES:
https://www.youtube.com/watch?v=9Wxlkaikh8&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=54
- 11.2. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES:
https://www.youtube.com/watch?v=PYIEDKfVDzM&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=55
- 11.3. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES:
https://www.youtube.com/watch?v=993kD2kAn2c&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=56
- 11.4. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES:
https://www.youtube.com/watch?v=wTRvHrFagXc&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=57
- 12.1. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES (II):
https://www.youtube.com/watch?v=FY2zrjf95jg&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=58
- 12.2. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES (II):
https://www.youtube.com/watch?v=t5jYsMMXsnE&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=59
- 12.3. EL SISTEMA DE COMPLEMENTO Y SUS RECEPTORES (II):
https://www.youtube.com/watch?v=1HM9yFQPq40&list=PLSbo9kXA_Lcwc1ouBQcafihsdvEmW2dng&index=60

TALLER N°6

TEMA: RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA

1. ¿Con qué mecanismos cuenta la inmunidad innata para actuar?
2. ¿Cuándo actúa cada uno de ellos?
3. ¿Cómo actúan?
4. Profundice el proceso de inflamación.
5. Señale cada una de los actores que forman parte de estos procesos
6. Interrelaciónelo con lo aprendido en clases anteriores.

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. **ISBN:** 978-15-1296- 055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. **ISBN:** 978-60- 7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- Parham, Peter. **Inmunología**. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. **ISBN:**
- **Páginas internet: Curso de inmunología general**
www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_09.htm - 40k
- Cualquier libro de inmunología disponible de edición actualizada

CONTINUACIÓN TALLERES - BIOQUÍMICA

TALLER N°7 (BI)

TEMA: RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y OBTENCIÓN DE ANTISUEROS

1. Señale las diferencias entre los anticuerpos producidos ante el primer contacto con el antígeno y los contactos posteriores. Esquematice respuesta inmune (RI) primaria versus respuesta inmune secundaria.
2. Explique la RI en un neonato ante una infección intrauterina.
3. ¿Cómo sería la RI en una infección adquirida en los primeros meses de vida.
4. Señale las diferencias de una respuesta humoral ante un antígeno T- dependiente y un Ags T- independiente.
5. ¿Qué son los antisueros?
6. Señale las diferencias entre antisuero monoespecífico y poliespecífico; monoclonal y policlonal.
7. ¿Cómo se obtienen los antisueros policlonales?
8. ¿Cómo se obtienen los anticuerpos monoclonales?
9. ¿Cuáles son los posibles usos de anticuerpos monoclonales y policlonales?
10. Ventajas y desventajas de utilizar anticuerpos monoclonales y policlonales.

REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60-7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.
- **Páginas internet: Curso de inmunología general**
www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_09.htm - 40k

TALLER N°8 (BI)

TEMA: TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS

1) ¿Cuándo se dice que una técnica inmunológica es altamente sensible y cuándo es específica?

2) ¿Qué tipos de errores se cometen al aplicar una técnica diagnóstica y cómo se pueden corregir?

3) ¿Qué buscamos al pasar de una técnica de floculación para diagnosticar sífilis como la VDRL a otra como ELISA?

4) ¿Cuándo realizamos una técnica de IFI:

- ¿Cuántos controles se deben largar?
- ¿Qué significan cada uno de ellos?
- ¿Cómo se interpretan los resultados positivos?
- ¿Cómo se controla el conjugado?
- ¿Qué se detecta con esta técnica?
- ¿El conjugado es importante para identificar los distintos Acs?
- ¿Esta técnica es de screening o confirmatoria?

5) A.M., paciente con signos y síntomas características de enfermedad de Chagas. Su médico solicita varios estudios complementarios y entre ellos un análisis de laboratorio para arribar al diagnóstico de la enfermedad.

- Ud. extrae sangre del paciente y realiza el estudio.

- El fundamento del método serológico que utiliza dice que el mismo se basa en la propiedad que tienen los Acs anti-Tripanosoma cruzi para producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos (GR) sensibilizados con los correspondientes Ags.

-Ud. realiza en la policubeta del equipo las diluciones seriadas a partir del 1º pocillo (dil ½) y todos los pasos indicados.

-Una vez finalizado el tiempo de incubación observa presencia de un manto que cubre el 50% o más del fondo del pocillo, hasta el nº 8.

6) En base a los datos anteriores conteste las siguientes preguntas:

- ¿Qué método serológico está utilizando para diagnosticar la enfermedad de Chagas?

- ¿Cuál es el título de esta reacción?
- ¿Cómo detectamos reacciones heterofilas?
- ¿Qué observaría a partir del pocillo N° 9? ¿Por qué?
- ¿Este método utilizado es de screening o confirmatorio?
- Si se detecta reacción heterofila, ¿cuál sería el procedimiento a seguir para confirmar el diagnóstico?

7) ¿Qué grado de influencia tienen los distintos factores a tener en cuenta a la hora de elegir una técnica inmunológica para estudios de campo o estudios poblacionales, como los que aparecen en la tabla?

	Bajo / Medio	Alto
SENSIBILIDAD		
ESPECIFICIDAD		
COSTO		
PRACTICIDAD		

8) Ud necesita detectar IgM contra el virus Dengue:

- Diseñe una técnica de enzoinmunoensayo (EIE) para tal fin
- Diseñe cómo aumentaría su sensibilidad
- Diseñe cómo aumentaría su especificidad.

9) Diseñe una técnica de inmunofluorescencia (IF) para la detección de un antígeno viral a partir de una muestra de aspirado nasofaríngeo(moco).

- ¿Cómo aumentaría su especificidad?
- ¿Cómo disminuiría costos?

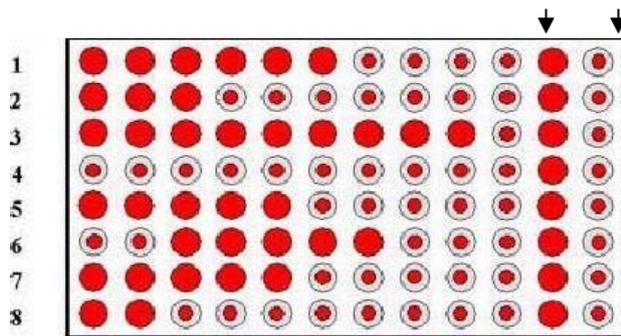
10) ¿Cómo se determinaría el “valor de corte” de una técnica de IFI para la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*?

11) A un paciente recientemente infectado por un virus se le practica una técnica de ELISA para efectuar el diagnóstico de certeza.

- ¿Qué anticuerpos podemos detectar?
- ¿Cómo podemos detectar IgM específica? Diseñe el método.
- ¿Cómo podemos detectar IgG específica? Diseñe el método.
- ¿Qué antígenos usaría para diseñar una técnica muy sensible?
- ¿Qué antígenos usaría para aumentar su especificidad?

12) El siguiente esquema muestra los resultados obtenidos al detectar y cuantificar Acs Ig G contra el *Toxoplasma gondii* mediante una técnica de hemoaglutinación indirecta. Diga a) Que características deben presentar los GR utilizados b) qué título presenta cada uno de los 8 sueros estudiados.

C(+) C(-)



REFERENCIAS:

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. **Inmunología**. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la inmunología humana**. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Año 2005.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. FCEQyN. UNaM. Año2016.
- Guía de Trabajos Prácticos. Facultad De Ciencias Veterinarias. U.N.C.P.B.A. 2008
- Guía de Trabajos Prácticos Inmunología. Año2010. Disponible en: exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/guia
- INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA. Carpenter y col. Edición en Ingles. Editorial Sauder.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. **Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad**. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. **Inmunología**. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296- 055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. **Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos**. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Mowat, Allan; Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. **Inmunología de Janeway**. ISBN: 978-60- 7448-776-3, 978-60-7448-767-1. Editorial El Manual Moderno. 2019. e-libros.

TALLER N°9 (BI)

TEMA: PROFILAXIS. INMUNIDAD ARTIFICIAL: ACTIVA Y PASIVA.

- 1) Defina Inmunobiológico.
- 2) Establezca las diferencias entre inmunidad Activa y pasiva identificando: tipo de inmunobiológico; objetivo de aplicación, formas de producción e interacción con el sistema inmunológico del paciente.
- 3) Inmunidad pasiva: detalle las diferencias entre sueros homólogos y heterólogos.
- 4) ¿Qué es una vacuna? ¿Cuál es el objetivo de la vacunación?
- 5) ¿Qué características, inmunológicas y de aplicación, debe reunir una vacuna para ser efectiva?
- 6) Una vacuna debe ser: segura, inmunogénica, efectiva, eficaz y eficiente. Justifique.
- 7) ¿Qué factores se evalúan en la elaboración de una vacuna?
- 8) Identifique los tipos de vacuna y ejemplifique basándose en el Calendario de Inmunización Nacional Argentino.
- 9) Las vacunas a virus vivo atenuado vs vacunas a virus muerto (inactivados), presentan diferencias de producción, estabilidad, tipo de inmunidad, entre otros. Desarrollar éstas diferencias, aplicando las bases inmunológicas – respuesta inmune frente a éstos antígenos.
- 10) ¿Qué es la anafilaxia y a que se debe?
- 11) Identifique los diferentes modelos de vacunas frente a COVID-19, disponibles en el mercado, reconociendo su componente principal y los mecanismos inmunológicos que se activan tras su aplicación, según la naturaleza del antígeno.
- 12) ¿Qué modelos se utilizan para elaborar las vacunas antigripales?

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Curso de actualización en Inmunización activa. Hospital Ricardo Gutierrez – MSAL. Edición 2022. Disponible en aula virtual.
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.

- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald.
Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

TALLER N°10 (BI)

TEMA: HIPERSENSIBILIDAD (HS).

De acuerdo al mecanismo inmunitario involucrado en la reacción de Hipersensibilidad, desarrolle el poster siguiendo las siguientes preguntas guías:

- 1) ¿Cuál es el componente o elemento (anticuerpos, células, complemento) inmune que actúa como reactante en la reacción de HS?
- 2) ¿Qué características posee el o los antígenos que desencadenan ésta HS?
- 3) Desarrolle el mecanismo inmunológico efector de la HS.
- 4) Correlacione el punto anterior con las lesiones patológicas presentes en el paciente.
- 5) ¿La apariencia de daño es localizada o afecta múltiples tejidos? (considerar afectación directa e indirecta)
- 6) Mencione otras enfermedades que posean el mismo mecanismo fisiopatológico.

TALLER N°11 (BI)

TEMA: RESPUESTA INMUNE FRENTE A MICROORGANISMOS.

Según la naturaleza antigénica del patógeno designado, desarrolle el poster siguiendo las siguientes preguntas guías:

1. ¿Cuál es la vía de ingreso del patógeno?
2. En función al ítem anterior: ¿Qué mecanismos de la inmunidad innata se activan?
3. Identifique el tipo de procesamiento antigénico (endógeno y exógeno – CMH-I / CMH –II).
4. Detalle la activación de la respuesta inmune adaptativa, identificando perfiles funcionales de Linfocitos T cd4+, respuesta inmune humoral o respuesta inmune celular, según corresponda.

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-

8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).

- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros.
- Publicaciones actualizadas o review de patologías designadas.

CONTINUACIÓN TALLERES - FARMACIA

TALLER N° 7 (FA)

TEMA. Técnicas Inmunológicas.

1. Las pruebas de precipitación son ampliamente utilizadas en el laboratorio y permiten observar la precipitación espontánea del *complejo Ag-Ac* cuando la proporción de *Ags* y *Acs* es equivalente.

- Enumere según grado de sensibilidad de menor a mayor las distintas técnicas de precipitación en medios gelosados.
- ¿Cuál de ellas utilizará si desea estudiar una mezcla antigénica compleja?
- Al aplicar electroforesis en las técnicas de precipitación, ¿por qué cree que se recomienda colocar las sustancias a analizar hacia el centro del portaobjeto y no en un extremo?

2. Se ha sembrado una placa de IDR para cuantificar el componente 3 del complemento (C3); luego de la difusión a temperatura ambiente los sueros controles dieron los siguientes diámetros de precipitación:

Suero control	Concentración(mg/dl)	Diámetro(mm)
S1: de baja concentración	33	4,2
S2: de media concentración	155	6,7
S3: de alta concentración	300	8,8

Con estos datos calcule las concentraciones de C3 en las siguientes muestras de pacientes teniendo presente los halos de precipitación:

Muestra	Diámetro(mm)
M1	6,0
M2	7,2
M3	9,1
M4	3,8
M5	7,7

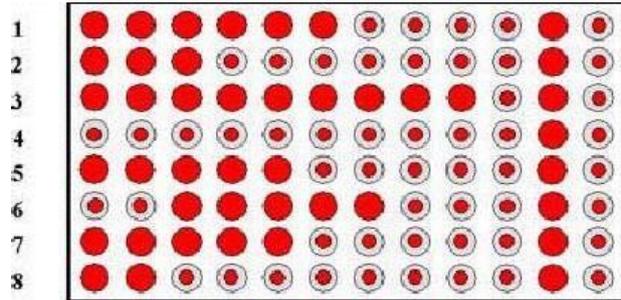
3. Qué métodos de interacción secundaria utilizaría Ud. para detectar:

- a) Acs Ig G contra *Tripanosoma Cruzi*
- b) Hormona gonadotrofina coriónica humana
- c) Antígenos somáticos de *Escherichia coli*
- d) Antígenos capsulares de neumococo en LCR
- e) Cuantificar IgM
- f) Determinar las propiedades de los alergenos en cuanto a su contenido proteico en el desarrollo de su proceso de fabricación

g) Determinar efectividad de un suero antiofidico en el proceso de fabricación

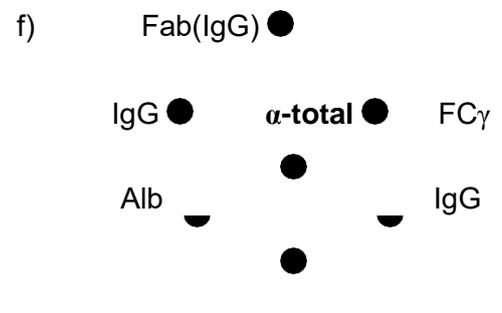
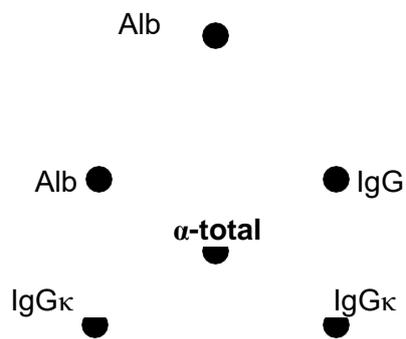
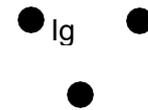
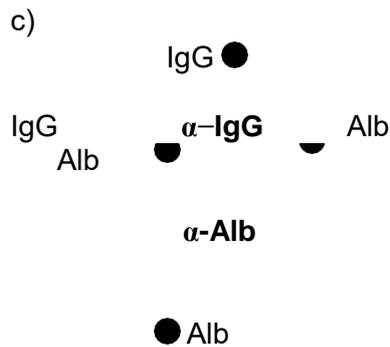
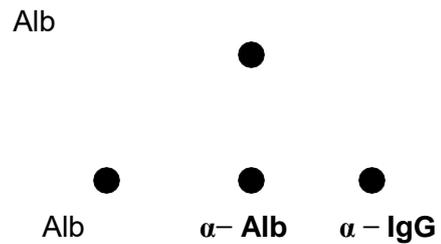
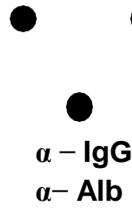
4. El siguiente esquema muestra los resultados obtenidos al detectar y cuantificar Acs Ig G contra el *Toxoplasma gondii* mediante una técnica de hemoaglutinación indirecta. Diga a) Que características deben presentar los GR utilizados b) qué título presenta cada uno de los 8 sueros estudiados.

C(+) C(-)



5) Resuelva los siguientes problemas de Ouchterlony:

a) IgG Alb b)



REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores.
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de inmunología. FCEQyN. UNaM. Año2016

TALLER N° 8 (FA)

TEMA: INMUNOFARMACOS: ACCIONES SOBRE EL SI.

MODALIDAD: **Presentación en forma de video o PPT con audio (no más de 10 minutos de duración)**

Relacionar estos inmunofarmacos (asignados previamente) con la respuesta inmune, señalando y explicando donde actuarían y cuáles serían sus efectos.

1-Corticoides

2-Inmunoestimuladores sintéticos, bacterianos y fúngicos.

3-Probióticos.

4-Citoquinas recombinantes.

5-Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Situación actual. Tecnología de producción y mejora de anticuerpos monoclonales

6-Inmunoterapia pasiva (Igs heterólogas: Sueros). Usos y modos de obtención.

7-Inmunoglobulinas polivalentes específicas (Igs homólogas) usos y modos de obtención como agentes terapéuticos.

8-Inmunosupresores que intervienen en la transmisión de señales

9-Inmunosupresores con función inductora de la citotoxicidad

REFERENCIAS.

- Farmacopea Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/farmacopea-argentina>.
- Foltz, I. N., Karow, M., & Wasserman, S. M. (2013). Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know *Circulation*, 127(22), 2222–2230. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002033>
- García Ramos SE, García Poza P, Ramos Díaz F. Utilización terapéutica de los anticuerpos monoclonales. *Ars Pharm*. 2011; 52(3): 46-57.
- Guadalupe Melgarejo-Rubio, Sonia M. Pérez-Tapia, 2 Emilio Medina-Rivero y Marco A. Velasco-Velázquez. Anticuerpos conjugados a fármaco: la nueva generación de terapias biotecnológicas contra el cáncer. *Gaceta medica de Mexico*. 23-01-2020. DOI: 10.24875/GMM.20005572
- Jiménez Jaramillo, Aldo. Los anticuerpos monoclonales como estrategia terapéutica. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO. 2021
- Publicaciones recomendadas, disponibles en la web:
<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-inmunonutricion-probioticos-prebioticos-simbioticos-X0212047X11247515>
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=294770#:~:text=Los%20probi%C3%B3ticos%20son%20capaces%20de,y%20la%20adaptativa%20%5B3%5D>
https://anestesar.org/WP/uploads/2012/12/2002_01_02_revision.pdf
<https://www.fbbva.es/alergia/el-tratamiento-de-las-enfermedades-alergicas/los-corticoides/>
<http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v34n2/0121-0793-iat-34-02-137.pdf>
<https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/4247205.pdf>

TALLER N° 9 (FA)

TEMA: RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y OBTENCIÓN DE ANTISUEROS

- 1) Señale las diferencias entre los anticuerpos producidos ante el primer contacto con el antígeno y los contactos posteriores. Esquematice respuesta inmune (RI) primaria versus respuesta inmune secundaria.
- 2) Explique la RI en un neonato ante una infección intrauterina.
- 3) ¿Cómo sería la RI en una infección adquirida en los primeros meses de vida?.
- 4) Señale las diferencias de una respuesta humoral ante un antígeno T- dependiente y un Ags T- independiente.
- 5) ¿Qué son los antisueros?
- 6) Señale las diferencias entre antisuero mono específico y poliespecífico; monoclonal y policlonal.
- 7) ¿Cómo se obtienen los antisueros policlonales?
- 8) ¿Cómo se obtienen los anticuerpos monoclonales?
- 9) ¿Cuáles son los posibles usos de anticuerpos monoclonales y policlonales?
- 10) Ventajas y desventajas de utilizar anticuerpos monoclonales y policlonales.

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores.
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_09.htm - 40k
- Cualquier libro de inmunología disponible de edición actualizada

TALLER N°10 (FA)

TEMA: ANTICUERPOS MONOCLONALES: USOS Y APLICACIONES.

- 1) ¿Qué son los anticuerpos monoclonales (AcM –mAB)?
- 2) Describa brevemente las características fenotípicas en función del potencial de inmunogenicidad de los 4 tipos de anticuerpos monoclonales según su origen.
- 3) ¿En qué consiste la tecnología del hibridoma?
- 4) ¿Cuáles son las aplicaciones generales de los anticuerpos monoclonales?
- 5) Describa las características fenotípicas, inmunogénicas y aplicaciones de los anticuerpos quiméricos. Detalle brevemente la forma de obtención.
- 6) Describa las características fenotípicas, inmunogénicas y aplicaciones de los anticuerpos humanizados. Detalle brevemente la forma de obtención.
- 7) Describa las características fenotípicas, inmunogénicas y aplicaciones de los anticuerpos humanos. Detalle brevemente la forma de obtención.
- 8) ¿Qué detalla la nomenclatura CETUXIMAB? Ejemplifique

REFERENCIAS.

- Bermúdez Carvajal, K.; Hidalgo Carrillo, G.; Mora Mata, R.; Rodríguez Mora, K.; Ysmael-Acle Sánchez, B. & Mora Román, J.J. (2019). Anticuerpos monoclonales biespecíficos: desarrollo, producción y uso como terapia anticancerígena. <https://doi.org/10.15517/rmucr.v13i1.37573>
- Foltz, I. N., Karow, M., & Wasserman, S. M. (2013). Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know *Circulation*, 127(22), 2222–2230. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002033>
- García Ramos SE, García Poza P, Ramos Díaz F. Utilización terapéutica de los anticuerpos monoclonales. *Ars Pharm.* 2011; 52(3): 46-57.
- Guadalupe Melgarejo-Rubio, Sonia M. Pérez-Tapia, 2 Emilio Medina-Rivero y Marco A. Velasco-Velázquez. Anticuerpos conjugados a fármaco: la nueva generación de terapias biotecnológicas contra el cáncer. *Gaceta medica de Mexico.* 23-01-2020. DOI: 10.24875/GMM.20005572
- Jiménez Jaramillo, Aldo. Los anticuerpos monoclonales como estrategia terapéutica. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO. 2021
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., & Laustsen, A. H. (2018). Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins*, 10(6), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins10060236>
- MACHADO, N. P., TELLEZ, G. A. & CASTAÑO, J. C. (2006, 6 julio). Monoclonal antibodies: physical development and therapeutic perspectives. *Scientific Electronic Library Online.* <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v10n3/v10n3a06.pdf>
- Shankar, V. & Vafai, A. (2015, 16 diciembre). Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7093874/>

TALLER N°11 (FA)

TEMA: PROFILAXIS. INMUNIDAD ARTIFICIAL: ACTIVA Y PASIVA.

- 1) Defina Inmunobiológico.
- 2) Establezca las diferencias entre inmunidad Activa y pasiva identificando: tipo de inmunobiológico; objetivo de aplicación, formas de producción e interacción con el sistema inmunológico del paciente.
- 3) Inmunidad pasiva: detalle las diferencias entre sueros homólogos y heterólogos.
- 4) ¿Qué es una vacuna? ¿Cuál es el objetivo de la vacunación?
- 5) ¿Qué características, inmunológicas y de aplicación, debe reunir una vacuna para ser efectiva?
- 6) Una vacuna debe ser: segura, inmunogénica, efectiva, eficaz y eficiente. Justifique.
- 7) ¿Qué factores se evalúan en la elaboración de una vacuna?
- 8) Identifique los tipos de vacuna y ejemplifique basándose en el Calendario de Inmunización Nacional Argentino.
- 9) Las vacunas a virus vivo atenuado versus vacunas a virus muerto (inactivados), presentan diferencias de producción, estabilidad, tipo de inmunidad, entre otros. Desarrollar éstas diferencias, aplicando las bases inmunológicas – respuesta inmune frente a éstos antígenos.
- 10) ¿Qué es la anafilaxia y a que se debe?
- 11) Identifique los diferentes modelos de vacunas frente a COVID-19, disponibles en el mercado, reconociendo su componente principal y los mecanismos inmunológicos que se activan tras su aplicación, según la naturaleza del antígeno.
- 12) ¿Qué modelos se utilizan para elaborar las vacunas antigripales?

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Curso de actualización en Inmunización activa. Hospital Ricardo Gutierrez – MSAL. Edición 2022. Disponible en aula virtual.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.

TALLER N°12 (FA)

TEMA: HIPERSENSIBILIDAD.

De acuerdo al mecanismo inmunitario involucrado en la reacción de Hipersensibilidad, desarrolle el poster siguiendo las siguientes preguntas guías:

- 1) ¿Cuál es el componente o elemento (anticuerpos, células, complemento) inmune que actúa como reactante en la reacción de HS?
- 2) ¿Qué características posee el o los antígenos que desencadenan ésta HS?
- 3) Desarrolle el mecanismo inmunológico efector de la HS.
- 4) Correlacione el punto anterior con las lesiones patológicas presentes en el paciente.
- 5) ¿La apariencia de daño es localizada o afecta múltiples tejidos? (considerar afectación directa e indirecta)
- 6) Mencione otras enfermedades que posean el mismo mecanismo fisiopatológico.

REFERENCIAS.

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Décima Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier; 2022. ISBN: 978-1382-206-8, y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2012); 8° Edición (2015) ISBN: 978-84-9022-894-4; 9° Edición (2018).
- Brostoff Jonathan, Male David, Roth y Roitt Ivan. Inmunología. 8° Edición (2013) y 9ª Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier Health Sciences 2.021 ISBN; 978-8413820309; y/o ediciones anteriores. 7° Edición (2007).
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2013.
- Janeway Charles A. Jr.; Travers Paul; Walport Mark; Capra J. Donald. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 5ª Edición. Barcelona, España. Editorial Masson S.A. 2003.
- Kölliker Frers, Rodolfo. Inmunología. Editorial: Corpus Editorial. 2016. ISBN: 978-15-1296-055-6, 978-98-7186-031-9. e-libros.
- Margni R. Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. 1.998
- Parham, Peter. Inmunología. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno. 2015. ISBN: 978-60-7448-560-8, 978-6074-48-564-6. E-libros
- Regueiro González J, López Larrea C, González Rodríguez S. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana; 2006.
- Viselli, Susan; Doan, Thao; Melvold, Roger. Inmunología. Segunda Edición. Editorial: Wolters Kluwer Health. 2013. ISBN: 978-84-1584-096-1, 978-84-1584-063-3. e-libros

ANEXOS

ANEXO 1: TOMA DE MUESTRA

Procedimiento para la Obtención de sangre por punción venosa

Punción venosa. Es el procedimiento que posibilita la recolección de sangre venosa para posteriores análisis de laboratorio.

Ubicar al paciente sentado en una posición segura y cómoda.

Nunca practique una punción sanguínea en un paciente que se encuentre de pie (La posición de pie es inestable y en caso que el paciente pierda el conocimiento o se desmaye, será más difícil evitar que se lesione).

No elija una extremidad en donde esté colocada algún tipo de venoclisis (Se conoce con el término de venoclisis a aquella inyección de inserción lenta que puede contener medicamentos, suero o cualquier otra sustancia que el paciente en cuestión o **tratamiento** requiera, en una vena)

Inspeccione la vena que se va a punzar.

PROCEDIMIENTO:

Antes de acceder a punzar se debe considerar una serie de parámetros relevantes para el éxito de la punción, tales como:

Las condiciones físicas y psicológicas que trae el paciente.

Considerar un tiempo adecuado para explicar el procedimiento (lo que es esencial para disminuir la ansiedad).

Considerar las condiciones en que será tomada la muestra, sentado o en camilla. Necesidad de pedir ayuda antes de iniciar el procedimiento.

Verificar que en el sitio a punzar se encuentra indemne y lejos de focos de infección. Así estaremos en condiciones de realizar la actividad.

Descripción de la técnica.

-Identificación positiva del paciente. Nombre y apellido, coincidente con solicitud.

-Revisar la petición de analítica.

-Sentar o acostar al paciente.

-Lavado de manos.

-Colocarse los guantes.

-Colocar el lazo de goma, liga, 7 a 10 cm por encima del punto de punción.

Tensión del torniquete o lazo: asegurar con la tensión suficiente para que ponga las venas prominentes pero que no comprometa la circulación. Si está muy apretado la piel se pondrá blanca alrededor y si está muy flojo se escurrirá, suéltelo y asegúralo otra vez.

El uso prolongado del torniquete obstruye el flujo de la sangre y causa la acumulación anormal de fluidos y elementos de la sangre (éstasis) afectando el resultado del análisis.

No debe ponerse más de 1 minuto.

Se puede pedir al paciente que cierre la mano, esto hace que la vena sea más prominente.

En caso de trastorno de la piel o excesivo vello la ligadura se puede poner encima de la manga de la ropa.

-Colocar el brazo hiperextendido, de manera que la mano esté más baja que el codo; si es necesario ayudarse con una toalla o rodillo.

-Seleccionar la vena por palpación cuidadosamente.

Recordar que las venas más utilizadas para la venopunción se localizan en el área antecubital ver **figura 1**.

Vena cubital: es la más larga y gruesa de todas y es la preferida por bordear la musculatura del brazo.

Vena cefálica: tiene iguales características que la anterior, pero es un poco menos gruesa.

Vena basilíca: es más pequeña que las anteriores. Esta vena está cerca de la arteria braquial, por lo que su punción supone más riesgo y su área es más sensible y dolorosa para el paciente.

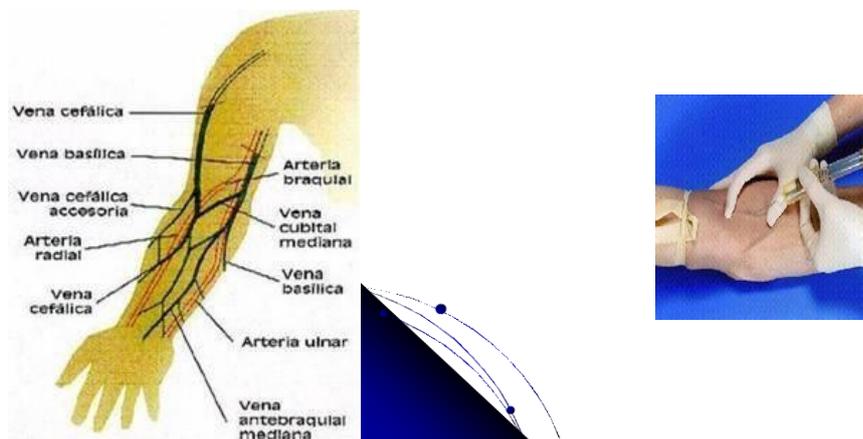


Figura 1.

Al finalizar el procedimiento, indíquelo al paciente que debe hacer presión en el sitio punzado por lo menos durante cinco (5) minutos.

Asegúrese de que los recipientes que contengan las muestras del paciente estén debidamente rotulados, marcados o identificados antes de atender a un nuevo paciente o realizar cualquier tarea.

La palpación se hará con el dedo índice, palpando con suavidad y firmeza. **Las venas** tienen una consistencia esponjosa y rebotará bajo la presión del dedo. **Las arterias** se encuentran a mayor profundidad y palpitan; **los tendones** están duros, son como cuerdas, resistentes a la presión. **Las venas trombosadas** sobresalen como vasos normales pero no poseen elasticidad.

Antes de elegir una vena hay que ver su tamaño, dirección y profundidad. Con la experiencia se desarrolla un buen sentido del tacto para escoger la más adecuada. Nunca asuma que una línea azul es una vena que le dará sangre.

-Desinfectar la zona elegida:

Limpieza con alcohol u otro antiséptico para evitar la contaminación bacteriana o química. Hacerse con una torunda en forma circular, desde dentro hacia fuera.

Dejar secar el alcohol o secarlo antes de punzar, ya que si se deja húmeda el paciente sentirá quemazón durante la punción y si el alcohol penetra en el sistema de extracción de sangre se producirá una hemólisis que alterará los resultados.

Si tiene que volver a palpar la vena, limpie su dedo con alcohol pero no toque la zona de punción.

-Inmovilice la vena seleccionada colocando el pulgar debajo de la zona de punción y tense la piel; así se impide que la vena se escurra en el momento de la punción, el resto de los dedos se ponen detrás del codo para evitar que éste se doble o prevenir cualquier movimiento.

Con el bisel hacia arriba punce la piel con un suave y rápido movimiento. La pared superior del vaso debe ser atravesada por el sistema.

Retraiga el embolo y la sangre comenzara a fluir.

Desligue.

Ponga el algodón sobre la aguja.

Retire el sistema.

Coloque el material extraído en los tubos correspondientes.

Descarte el material.

Verifique normas de bioseguridad.

Procedimientos de extracción de sangre por vacío

1. Verificar que la zona de extracción está limpia y equipada para iniciar las extracciones.
2. Solicitar al paciente que diga su nombre completo para confirmar la petición del médico y las etiquetas.
3. Comprobar y ordenar todo el material a utilizar con el paciente, de acuerdo con la petición del médico (tubo, gasa, torniquete, etc.). La identificación de los tubos se debe realizar frente al paciente.
4. Informar al paciente del procedimiento.
5. Abrir el precinto de la aguja de extracción múltiple de sangre al vacío frente al paciente.



6. Enroscar la aguja al adaptador del sistema de vacío.
7. Limpiarse las manos y colocarse los guantes.
8. Colocar el brazo del paciente, inclinándolo hacia abajo, a la altura del hombro.
9. Si se utilizó el torniquete para seleccionar la vena de forma preliminar, pedir al paciente que abra y cierre la mano, a continuación, aflojar el torniquete y esperar 2 minutos para utilizarlo nuevamente.
10. Realizar la antisepsia.
11. Aplicar el torniquete al brazo del paciente
12. Retirar la protección que cubre la aguja de extracción múltiple de sangre por vacío.



13. Realizar la punción en un ángulo oblicuo de 30°, con el bisel de la aguja hacia arriba. Si es necesario, para ver mejor la vena, estirar la piel con la otra mano (lejos de la zona donde se ha realizado la antisepsia).



14. Insertar el primer tubo de vacío. Cuando la sangre empiece a fluir dentro del tubo, quitar el torniquete del brazo del paciente y pedirle que abra la mano.
15. Realizar el cambio de tubos sucesivamente. Homogeneizar por inversión inmediatamente después de retirar cada uno en forma suave, de 5 a 10 veces.
16. Después de retirar el último tubo, sacar la aguja y comprimir la zona de punción con algodón o gasa secos, de 1 a 2 minutos, evitando así la formación de hematomas y sangrados. Si el paciente está en condiciones de hacerlo, oriéntelo adecuadamente para que realice la presión hasta que el orificio de la punción deje de sangrar.
17. Tirar la aguja inmediatamente después de sacarla del brazo del paciente en un recipiente para materiales punzantes.



Bibliografía consultada.
www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion2/capitulo33/capitulo33.htm

ANEXO 2: INTERACCION ANTIGENO-ANTICUERPO -GENERALIDADES-

Introducción

Para una adecuada comprensión de muchos de los aspectos que se discuten es conveniente la lectura previa en detalle de los capítulos concernientes a estructura de las inmunoglobulinas y antígenos.

La reacción entre el antígeno (Ag) y el anticuerpo (Ac) es una reacción química usual, por la cual se forma un complejo Ag-Ac que es reversible (o sea, puede disociarse). Sin embargo esta reacción puede tener lugar en condiciones diferentes del medio, pudiendo estar ambos reactantes libres en solución, o fijos sobre células u otras partículas, y en presencia o no de mecanismos amplificadores y/o efectores (por ej.: el complemento). Por todas estas variables, se pueden definir didácticamente tres niveles:

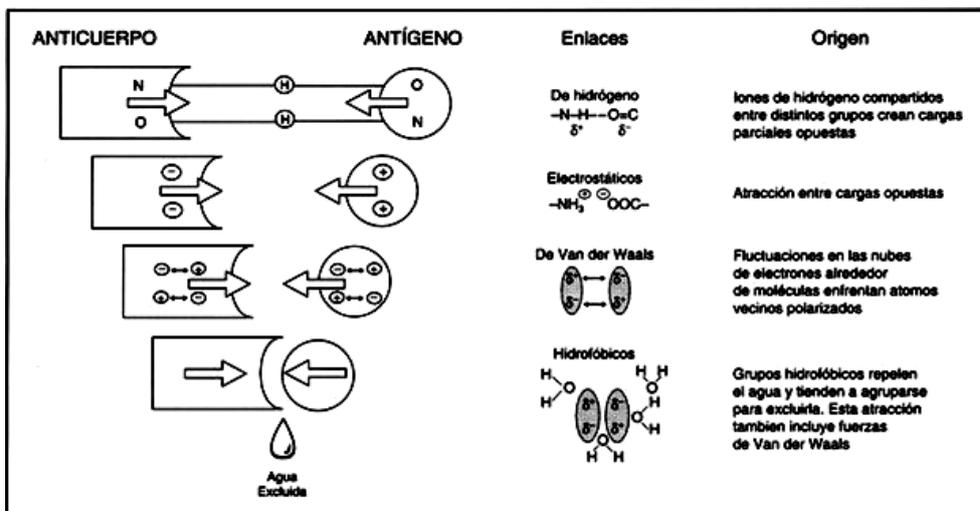
- Reacción primaria: determinada exclusivamente por el balance de fuerzas de interacción, tanto atractivas, como repulsivas, entre el determinante antigénico y el anticuerpo
- Reacción secundaria: producto de interacciones posteriores a la formación del complejo Ag-Ac, entre componentes de los complejos ajenos al sitio de reconocimiento mutuo entre ambos.
- Reacción terciaria: resultante de la interacción de los complejos con sistemas ajenos a los mismos.

Interacción Primaria: Incluye estrictamente la formación del complejo Ag-Ac de acuerdo a la ley de acción de masas. En esta reacción se pueden definir varias propiedades. La **especificidad** de la misma depende en forma exclusiva de la complementariedad geométrica entre la estructura espacial del determinante antigénico y del sitio de combinación del anticuerpo (paratope); en un sentido amplio podemos decir que es el aspecto cualitativo de la reacción. La **afinidad** en cambio es la atracción termodinámica entre el Ag y el Ac, resultando de la suma algebraica entre las fuerzas moleculares atractivas y repulsivas, de corto radio de acción; constituye un aspecto cualitativo de la reacción

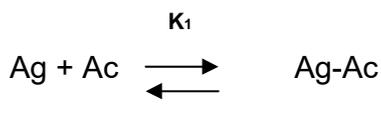
El complejo Ag-Ac se forma por una unión electrostática débil (no covalente) que involucra interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Es por lo tanto una unión reversible, y esto implica que una cierta cantidad de los complejos formados es capaz de disociarse espontáneamente (Figura 1).

Dado que estas interacciones son reversibles, las asociaciones Ag-Ac pueden ser disociadas en condiciones particulares. La valencia de los Acs (multi, bi o monovalencia), las características fisicoquímicas y número de epitopes del Ag, así como el rango de concentraciones (pg, µg o mg) en el que se encuentran ambos reactantes y las condiciones del medio son factores fundamentales que condicionan la visualización o no del complejo inmune formado. Así, un sistema Ag-Ac simplificado e ideal podría estar constituido por: una solución de un Ag que presenta un único epitope por molécula y una solución que contenga moléculas de Ac idénticas y específicas para ese epitope. Tras un período de contacto de ambas soluciones, la velocidad de formación de complejos Ag-Ac se iguala a la velocidad de disociación de los mismos, alcanzando un estado de equilibrio dinámico. Esta interacción, que no se visualiza, es conocida como **interacción primaria**, y para ponerla de manifiesto se utilizan distintas técnicas inmunológicas.

Figura 1. Fuerzas de unión intervinientes en la interacción epítope-paratopo.



El estudio experimental de esta reacción suele realizarse mediante la técnica de diálisis de equilibrio, separando el antígeno (usualmente un hapteno marcado con colorante o con isótopos radiactivos) del anticuerpo con una membrana semipermeable. La reacción se puede expresar como:



Donde:

$$\frac{[\text{Ag-Ac}]}{[\text{Ag}] [\text{Ac}]} = \frac{K_1}{K_2} = K_{1,2}$$

$K_{1,2}$ es la constante de equilibrio del sistema. K_1 se emplea para estimar la afinidad del anticuerpo por el antígeno, siendo más confiable su determinación cuando se emplean anticuerpos y haptenos monovalentes.

Cuando se determina $K_{1,2}$ usando como ligando un hapteno simple se habla de afinidad y si para ello se utiliza un antígeno se considera que el valor obtenido expresa **avidez**, ya que las fuerzas de unión en este caso están aumentadas (constante de asociación múltiple)

En el punto de equilibrio de la reacción Ag-Ac, se pudo determinar a través de estudios cinéticos que la velocidad de asociación de los complejos es muy alta en relación a su velocidad de disociación. Esto explica que la constante de equilibrio está determinada fundamentalmente por la estabilidad del complejo. La avidez está muy relacionada a la afinidad, de la cual depende parcialmente, así como de otros factores, por ej. la posibilidad de unión multivalente.

Frente a un mismo determinante antigénico, el organismo es capaz de responder formando Acs varios, todos ellos específicos. Esta capacidad se denomina

heterogeneidad. No debe confundirse con **diversidad** que se refiere al conjunto de especificidades distintas que el organismo produce frente a los estímulos antigénicos naturales (que portan usualmente numerosos determinantes).

Las reacciones primarias son detectadas por algunas de las técnicas inmunológicas más sensibles que se conocen, como la inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo y el enzimoimmunoensayo. Todas estas técnicas se describirán en la guía de TP N° 4 –Interacción Primaria-

Interacción Secundaria: involucra los cambios en los complejos que tienen lugar después de la unión primaria. Sus manifestaciones dependen de las condiciones en que se realiza, del tipo de anticuerpo y del antígeno. Sin embargo, si los Acs son al menos bivalentes y el Ag es soluble y multivalente (con repetición de un mismo o diferentes epitopes por molécula), y ambos reactantes están en concentraciones del orden de mg/ml, las reacciones producidas pueden visualizarse macroscópicamente por formación de un agregado. Estas reacciones visualizables son consecuencia del fenómeno de **interacción secundaria**, en el que los complejos inmunes primarios se asocian entre sí dando lugar a complejos secundarios de mayor tamaño.

El tipo más conocido de reacción secundaria, y al mismo tiempo una de las herramientas que más ha aclarado el mecanismo de la reacción Ag-Ac es la **inmunoprecipitación o precipitación inmune**. La misma consiste en la formación de un precipitado a raíz de la pérdida de solubilidad de determinados complejos en condiciones apropiadas. (figura 2)

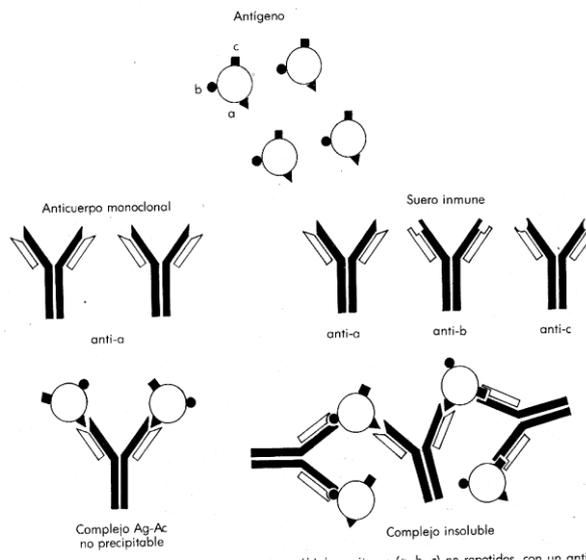


Figura 2. Interacción de un antígeno que presenta múltiples epitopes (a, b, c) no repetidos, con un anticuerpo monoclonal (anti-a) y con un suero inmune que contiene anticuerpos anti-a, anti-b y anti-c. Sólo el suero inmune puede originar complejos Ac-Ag insolubles

En la realidad del organismo, los anticuerpos son al menos bivalentes, de modo que al unirse con antígenos de más valencia pueden formarse enrejados constituidos por varias moléculas de cada especie. Las distintas combinaciones posibles se pueden establecer a través de una matriz como la presentada en las figuras 2 y 3. Las concentraciones relativas de cada tipo de complejo dependerán de las concentraciones

de antígenos y de anticuerpos reactantes; la formación de complejos muy grandes es autolimitante con respecto al tamaño de los mismos (ver más adelante).

Para un antígeno soluble, los complejos en exceso real de anticuerpo (por ej. los de fórmula $Ag-Ac_v$, donde v es la valencia del antígeno) suelen ser intrínsecamente insolubles (parte inferior figura 3). Esto explica porque, por un lado, el anticuerpo enmascara determinantes antigénicos que pueden contribuir a la solubilidad, y por otro lado, porque los anticuerpos sufren modificaciones estructurales después de reaccionar, adoptando conformaciones hidrofóbicas que disminuyen la solubilidad del complejo en su conjunto.

Si bien no es posible determinar experimentalmente todos estos tipos de complejos, existe bastante acuerdo entre las diversas teorías que se ocupan de su formación sobre algunos aspectos. En primer lugar, se acepta que cuanto más pequeño sea el complejo, mayor es su probabilidad de formarse, y por ende, que a medida que aumenta el tamaño de los complejos, su concentración va disminuyendo. Además, en condiciones de exceso de Ag , se considera más probable la formación de complejos ricos en Ag (presentados en la fila media de la figura 3) mientras que en condiciones de exceso de Ac se facilita la aparición de los complejos ricos en Ac (fila inferior de la figura 3)

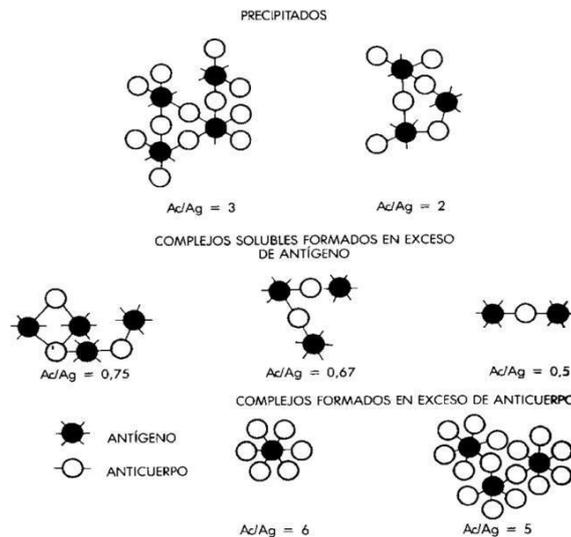


Figura 3.: Formación de precipitados o complejos solubles según las concentraciones de antígenos y anticuerpos presentes en la mezcla.

La reacción de precipitación inmune se conoce desde 1897, por los trabajos de Kraus, teniendo posteriormente desarrollo cuantitativo, debido a Heidelberg en la década del 30.

Esta, tiene varias características importantes. Una de ellas es el denominado fenómeno de zona; el mismo consiste en que la cantidad máxima de precipitado se obtiene en una relación de antígeno y anticuerpo que no es la máxima, ni la mínima, sino intermedia, en la denominada zona de equivalencia de la concentración de antígeno (figura 4). Tanto en la zona de exceso de antígeno (postzona) como en la zona de exceso de anticuerpo (prozona) la cantidad de precipitado formado es menor, pudiendo incluso desaparecer. Experimentalmente se demostró que en exceso de Ac el Ag precipita totalmente. También se demostró que en la precipitación inmune juegan un papel sustancial las interacciones por el Fc .

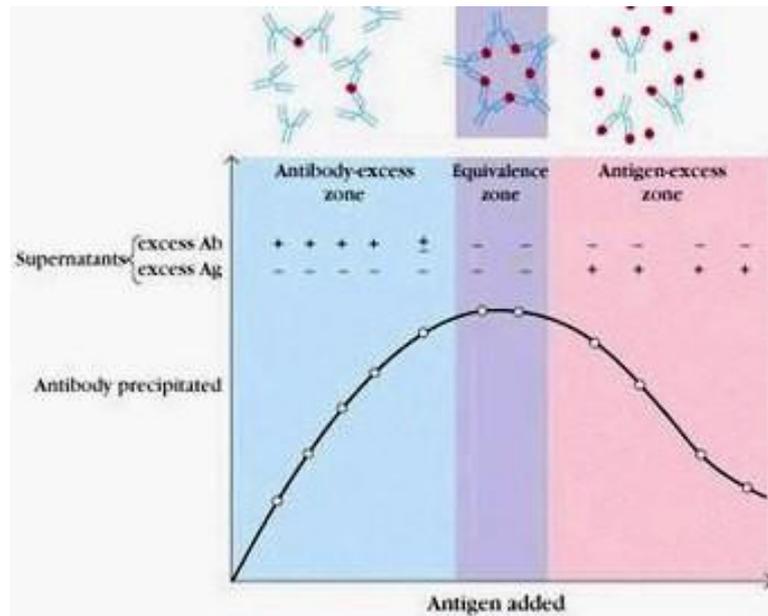


Figura 4: La formación de la red depende de la relación molecular entre Ag. y Ac La precipitación es máxima allí donde la proporción entre ambos es óptima (parte central de la curva,(complejos formados según fila superior Figura 3), pero va disminuyendo a medida que predomine el Ag o el Ac (complejos formados según fila media e inferior Figura 3, respectivamente)

La primera teoría explicativa y consistente de la precipitación inmune fue propuesta por Heilderberg y Marrack en 1938, y la misma solo recientemente ha sido cuestionada y superada en algunos aspectos.

Esta teoría, también denominada del “enrejado”, plantea que los complejos Ag-Ac que precipitan son enormes enrejados formados por Ag y Ac en orden alternativo, unidos únicamente por uniones entre los sitios de reconocimiento del Ac (paratope) y los determinantes antigénicos del Ag (epitope) (figura 2). En estos términos, la precipitación sería un caso más de lo que hemos englobado como reacciones primarias. Sin embargo, actualmente se dispone de una serie de evidencias experimentales y de consideraciones teóricas que hacen esta explicación muy poco probable.

Para explicar los hechos experimentales (por ej. las interacciones extraparatópicas) y las limitaciones teóricas (improbabilidad termodinámica de formar complejos muy grandes, debido a la autolimitación de éstos que ya se explicó). Steensgaard y colaboradores plantearon en 1979 un modelo alternativo. Según este modelo, el precipitado tiene un núcleo formado por grandes complejos intrínsecamente insolubles, formados por la reacción primaria, junto con una muy importante coprecipitación de complejos que, “per se”, son solubles, pero a través de las interacciones extraparatópicas adquieren configuraciones hidrofóbicas. La explicación del fenómeno de zona surge de los complejos intrínsecamente insolubles (los que tienen exceso real de Ac) aparecen sólo en relaciones Ac/Ag altas, estando determinado el precipitado total por el agregado del coprecipitado, que es máximo en las relaciones intermedias. Por supuesto, en relaciones Ac/Ag bajas no hay complejos intrínsecamente insolubles, y por lo tanto, no hay precipitado.

Esta explicación brinda respuesta además a otros interrogantes planteados por diversas técnicas de uso corriente, y por observaciones experimentales. Por ej la

diferencia en la actividad de precipitación de una misma Ig en distintas especies animales puede deberse a diferencias en las propiedades de solubilidad de las porciones no ligadas directamente al reconocimiento del Ag. Permite comprender también la facilitación que representa para el organismo disponer, en un mecanismo específico, de la posibilidad de un cambio de estado frente a un reconocimiento múltiple; por ej.: para que se forme un complejo intrínsecamente insoluble, el Ag debe ligar simultáneamente un mínimo de 3 moléculas de Ac. (Parte superior Figura 3)

Dentro de la aplicación técnica, se explica que ciertas moléculas inertes de gran tamaño, como el polietilenglicol (PEG) y el agar, aumentan en forma inespecífica la precipitación inmune. Esto se debe a que estas sustancias aumentan la tendencia hidrofóbica de los complejos Ag-Ac por ocupar buena parte del volumen y del agua disponible. Esto determina a su vez una agregación inespecífica de los complejos preformados. La importancia obvia de esto surge del empleo del PEG en las técnicas de detección de complejos inmunes, y de los geles de agar en diversas técnicas de inmunodifusión.

Cuando en vez de utilizar antígenos solubles se emplean antígenos particulados, se puede observar que la interacción de los Ac produce **aglutinación** de los mismos. Este fenómeno se presenta con diversos tipos de partículas: corrientemente se usan eritrocitos, bacterias, partículas de látex, bentonita, etc. Un ejemplo de la utilidad de la técnica de aglutinación fue el descubrimiento de los grupos sanguíneos.

Sucintamente, la aglutinación implica la formación de agregados macroscópicos de partículas, a través del puenteo establecido por los Ac. Cuanto mayor sea la valencia del Ac, mayor será su eficacia para establecer puentes entre las partículas; por ej. La IgM es aproximadamente 750 veces más efectiva que la IgG. Desde ya, se requiere que la atracción inducida por la tendencia del puenteo supere la repulsión electrostática entre las células (debido a su potencial eléctrico negativo, el potencial Z), que espontáneamente tiende a separarlas. Esto hace que además del reconocimiento específico del Ag por el Ac, existan otras variables capaces de influenciar la producción o no de la aglutinación. Entre éstas figura la viscosidad del medio, su fuerza iónica, etc. Cuando a pesar de un reconocimiento Ag-Ac exitoso no se produce el puenteo y agregado de partículas, el fenómeno se denomina **aglutinación incompleta**

En forma análoga a la precipitación inmune, existe una relación Ag/Ac que produce aglutinación máxima, en tanto que en exceso de antígeno o de anticuerpo la aglutinación disminuye. También se puede facilitar en forma inespecífica, como en la precipitación, la aparición del agregado de partículas mediante cambios en las cualidades de los reactantes o del medio. Por ej. El agregado de albumina u otras moléculas pequeñas cargadas, modificando la fuerza iónica del medio, disminuye el potencial Z y por ende la repulsión, aumentando la aglutinación. Otro mecanismo usual de facilitación es el agregado de moléculas polimerizadas, como el dextrán, que aumentan la viscosidad.

Un hecho no bien entendido es la **reacción de floculación** esta se caracteriza por no formar precipitados hasta que la cantidad de antígeno añadido no exceda ciertos límites, cosa que no ocurre con la precipitación. Aquí hay formación de agregados que sedimentan con cantidades mínimas de antígeno.

En la floculación los complejos formados se agregan y sedimentan en un rango muy estrecho de la relación Ac/Ag; en la zona de exceso de Ag y de Ac solo se forman complejos solubles. (Figura 5)

Pareciera que es una propiedad dependiente más de los anticuerpos que de los Ags. Los sueros que dan floculación son los que se obtienen por inmunización de caballo con algunos tipos de proteínas, en especial toxinas microbianas. Los sueros de los

mismos animales inoculados con polisacáridos se comportan como precipitantes y no como floculantes.

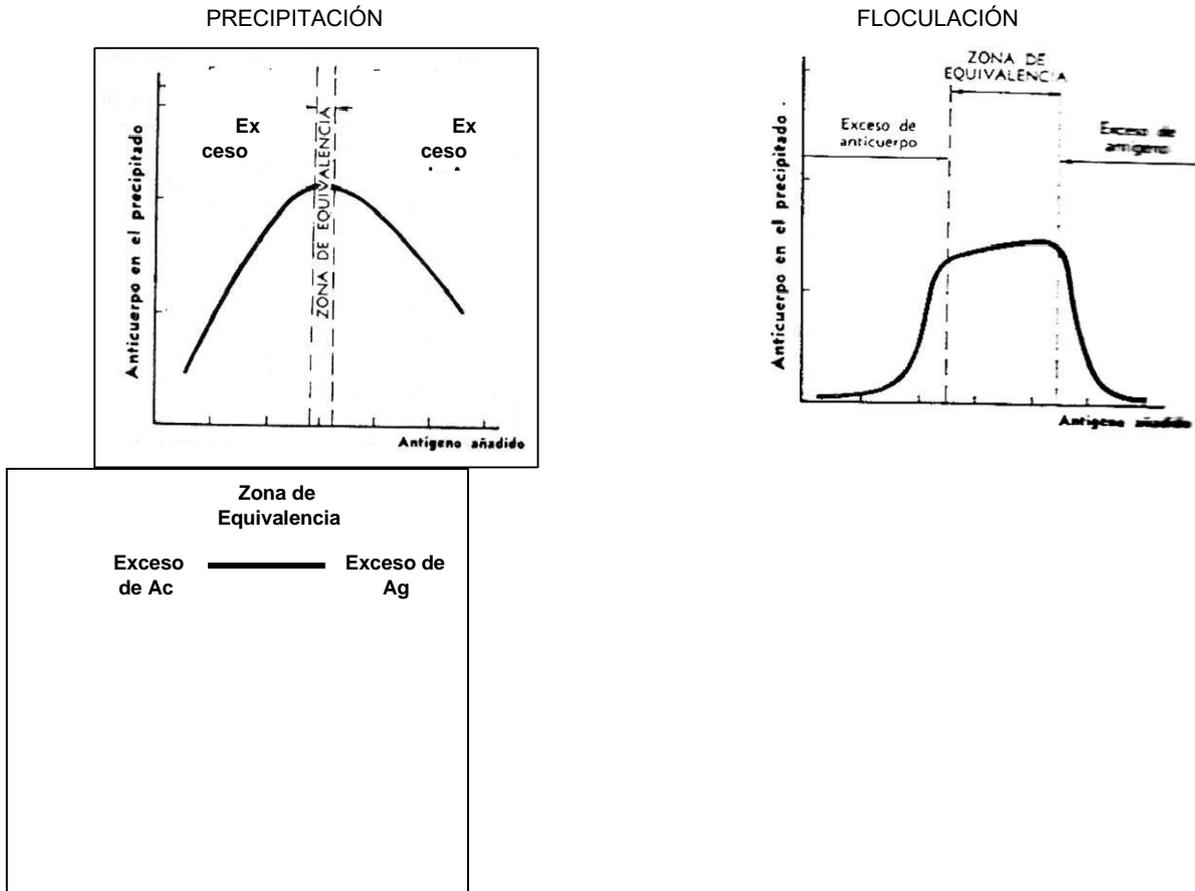


Figura 5. Curvas de precipitación y floculación. En la Precipitación sólo hay formación de complejos solubles en exceso de antígeno, en tanto que en la floculación ello ocurre en exceso de antígeno y de anticuerpos

Entre las técnicas que emplean estas reacciones secundarias figuran la inmunodifusión en geles, las pruebas de aglutinación directa e indirecta, las reacciones de Coombs, VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), etc. Las mismas se describen más adelante.

Interacción Terciaria: Estas reacciones son responsables de la mayoría de las consecuencias biológicas del reconocimiento específico del antígeno por el anticuerpo, ya que son la expresión del complejo Ag-Ac con el resto de los sistemas presentes en el organismo y/o en el antígeno. Son por naturaleza heterogéneas, y exceden en su mayoría los límites de este capítulo.

Ejemplos de estas lo constituirían la unión del complejo a receptores Fc de las inmunoglobulinas sobre la superficie celular que mediaría fagocitosis o lisis (intra o extracelularmente), activación del complemento, modulación antigénica, etc

Las Técnicas Inmunológicas (TI) *in vitro* pueden dividirse en dos grandes grupos:

1. TI utilizadas para medir la inmunidad humoral (Acs) o la presencia de Ags o moléculas de la respuesta inmune (citoquinas)
2. TI para medir la inmunidad celular

Estos ensayos pueden tener un papel fundamental en el diagnóstico de enfermedades, el monitoreo del nivel de respuesta inmune, o la identificación y cuantificación de moléculas de interés médico, veterinario o de producción. En el campo específico de la

Microbiología, las TI son frecuentemente claves en el diagnóstico, evolución, control de tratamientos, así como también la epidemiología de las enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos.

Las TI tienen tanta diversidad como las respuestas inmunes que tratan de medir, difieren entre ellos en velocidad y sensibilidad y pueden ser cuali o cuantitativos. Su tecnología se ha desarrollado enormemente en los últimos años, introduciéndoseles múltiples variantes y perfeccionamiento a las ya numerosas técnicas básicas. La confiabilidad y reproductividad de las mismas dependen de la calidad de los reactivos utilizados y del estricto control y valoración de los elementos y variables que intervienen en las pruebas. Cuanto más compleja y sofisticada, mayores y más rigurosos deberán ser los controles de calidad de su realización.

A las técnicas que miden la inmunidad humoral en suero (búsqueda de Acs) o la presencia de Ags se las ha denominado **técnicas serológicas**, pero tanto Ac como Ag pueden buscarse en otros fluidos corporales (Líquido Cefalorraquídeo-LCR, moco respiratorio, saliva, lágrimas, flujo vaginal, tisulares etc). Estas técnicas pueden ser cualitativas, cuando se intenta demostrar presencia o ausencia de Acs o Ags; o cuantitativas, cuando se busca establecer la cantidad o concentración de lo que se quiere determinar.

Cuando se utilizan técnicas inmunológicas, hay que considerar dos variables fundamentales:

- **Especificidad:** es la capacidad de una TI de identificar únicamente el Ac o ag para el que fue diseñada. Una técnica poco específica podría arrojar falsos resultados positivos.
- **Sensibilidad:** es la capacidad de una técnica de poner de manifiesto determinadas concentraciones de Acs o Ags en una muestra dada. Las TI altamente sensibles detectan concentraciones extremadamente bajas de los que se está buscando; en cambio las poco sensibles pueden arrojar resultados falsos negativos (no detectan el elemento buscado).

Tabla 1. Sensibilidad de algunas pruebas inmunológicas

Prueba	Cantidad de Ac (ug N/ml)
Precipitación en tubo	0.1
Inmunodifusión	0.1-0.3
Aglutinación (cualitativa)	0.05
Hemaglutinación pasiva	0.001
Inhibición de la hemaglutinación	0.001
Reacción de Coombs	0.01
Fijación de complemento	0.05
Inmunofluorescencia cualitativa	1-10 ⁻³
Radioinmunoensayo (RIA)	0.001
Enzimionmunoensayo	0.001

Las TI humorales pueden dividirse en 2 grandes grupos. Las pruebas que se basan en la interacción primaria solamente (pruebas de lectura indirecta, no se pueden observar a simple vista) y las que se basan en la interacción 1° y 2°(pruebas de lectura directa, por la aparición de un agregado o precipitado visible a simple vista).

Las técnicas inmunológicas que se basan en la interacción 1° solamente incluyen la técnicas de Enzimoinmuensayo (ELISA), Radioimnoanálisis (RIA), Inmunofluorescencia (IFI) Quimioluminiscencia, Inmunocromatografía, Inmunoblotting o Western Blotting (WB) entre otras.

Dentro de las TI que se basan en la interacción 1°y 2°se cuentan con las técnicas de precipitación y aglutinación. Aquellas que evidencian la interacción Ag-Ac a través de una reacción secundaria son, generalmente, más económicas y sencillas que aquellas que permiten visualizar la interacción primaria. Las técnicas serológicas pueden ser agrupadas en “generaciones”, clasificación que contempla su aparición en el tiempo, las de 1° generación son las más antiguas y las 4° las más recientes y además se correlaciona con su grado de sensibilidad: las últimas son las más sensibles

Tabla 2. Clasificación de pruebas inmunológicas según generación

1ª generación	IDD
2ª generación	CIEF-FC-IEF-IF
3ª generación	RIA - ELISA
4ª generación	WB

Cabe destacar que los métodos serológicos se han desarrollado enormemente en los últimos años y cada vez aparecen técnicas más perfeccionadas.

REFERENCIAS:

- Microbiología Biomedica. Coto C, de Torres R. Basualdo J, 2ª Ed. Editorial Atlante. Buenos Aires 2006.
- “Inmunología e Inmunoquímica – Fundamentos” Margni, Editorial Panamericana, 5ª Edición. Capítulos 9 y 35.
- Inmunología en línea. Universidad de Córdoba. España. José Peña Martínez
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Año 2005.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Inmunología. FCEQyN. UNaM. Año 2006.
- Guía de Trabajos Prácticos Cátedra de Inmunología. FCEQyN. UNaM. Año 2011.
- Guía de Trabajos Prácticos. Facultad De Ciencias Veterinarias. U.N.C.P.B.A. 2008

ANEXO 3: TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE PRECIPITACIÓN

Tipos de medios de soporte:

Los medios de soporte pueden clasificarse en particulados y continuos. Los primeros incluyen perlas de vidrio o fibras de celulosa.

Los soportes continuos comprenden poliacrilamida, almidón y geles de agar y agarosa, los geles son redes de fibras interaccionantes, o polímeros que son capaces de atrapar grandes cantidades de solvente en poros o canales interiores, es decir son sólidos gelatinosos en los cuales está incluido el solvente. Por ejemplo, cuando las suspensiones de almidón se calientan y se enfrían las fibras de almidón interaccionan y se entretajan atrapando al solvente, de modo que existen grandes espacios o poros en las fibras. Geles similares pueden prepararse a partir de agar, agarosa y algunos polímeros químicos. Los geles pueden obtenerse también por polimerización de acrilamida con un pequeño porcentaje de un derivado funcional de la acrilamida que forma uniones cruzadas con polímeros de acrilamida.

Almidón: Los geles de almidón no son tan ampliamente utilizados como los de agarosa o acrilamida. La solución de almidón debe calentarse a 100 °C y luego desgasificarse, proceso engorroso. Los geles de almidón tienden a proveer mayor resolución que los de agar o de agarosa es decir tienen unas propiedades exclusivas que permiten una mejor separación electroforética de proteínas. Sin embargo la inconveniencia de prepararlos ha limitado su uso.

Agar: El agar se compone de por lo menos dos fracciones principales: agarpectina y agarosa. La agarpectina posee grupos sulfato y carboxilo que aportan carga a la molécula y son responsables de la considerable endósmosis por lo que generalmente se su usa en técnicas de inmunodifusión y no en las de inmunoelectroforesis.

Agarosa: La agarosa es el agar sin agarpectina y se prefiere al agar por ser esencialmente una molécula neutra, exhibe pocos de los problemas del agar no purificado y por tener menor endósmosis. El tamaño del poro de la agarosa es mucho mayor que el de poliacrilamida. Esta es la razón por la cual la agarosa se emplea en las técnicas inmunoelectroforéticas, ya que el antígeno y el anticuerpo deben difundir libremente a través del gel. Otra ventaja de la agarosa es que puede fundirse recalentándose solo a 50 °C; de este modo proteínas tales como los anticuerpos pueden ser mezcladas sin desnaturalizarse.

Con el advenimiento de las placas de gel comerciales, el método de electroforesis en gel de agarosa comenzó a utilizarse ampliamente para una diversidad de separaciones.

Poliacrilamida: Los geles de poliacrilamida son utilizados rara vez en los laboratorios clínicos, pero muy comúnmente en los laboratorios de investigación. Son transparentes fáciles de preparar y exhiben una razonable resistencia mecánica sobre el intervalo de concentraciones de la acrilamida normalmente empleada para proteínas. Además poseen baja endósmosis y un tamaño de poro que se adapta muy bien a la separación de proteínas "promedio", moléculas de ARN y fragmentos de restricción más pequeños de ADN, es decir este medio de soporte separa las moléculas más discretamente que los otros geles.

ELECTROFORESIS

Fundamentos:

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con una carga eléctrica neta son colocadas en un campo eléctrico, éstas experimentarán una fuerza de atracción hacia el polo que posea carga opuesta:

Así, si se deja transcurrir un cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente lo harán hacia el ánodo (el polo positivo).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; por un lado, la fricción con el solvente dificultará este movimiento (es decir, al moverse los solutos chocarán con las moléculas de solvente que están en su camino), lo que genera una fuerza que se opone al movimiento (Fig 1); por otro lado, las moléculas tienen a moverse en forma aleatoria (movimiento browniano) debido a que poseen energía cinética propia. Esto se denomina difusión y sigue la llamada ley de Fick. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de la solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo (Fig 2).

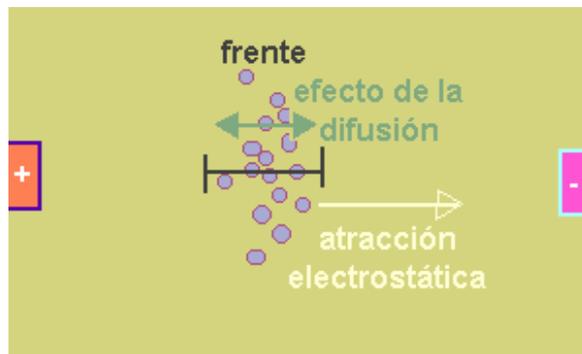
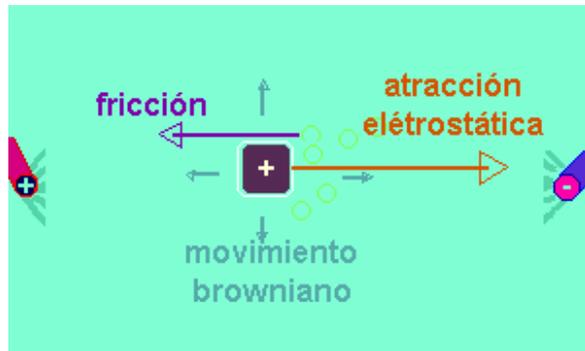
Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz molecular que dificulta el movimiento de los solutos.

Consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también. Si ahora aumentamos la intensidad del campo eléctrico, podemos acelerar la migración molecular, pero no por ello variará la difusión y nuestro frente migrará de un modo cada vez más compacto. Así, podemos mejorar la definición del frente aumentando la diferencia de potencial entre los polos y esto estará limitado tan sólo por la capacidad de la solución para disipar el calor generado por el paso de la corriente eléctrica. Esto último, debido a que si el calor se acumula se puede hacer hervir a la solución, e incluso descomponer el gel y/o los solutos.

La presencia del gel tiene una consecuencia adicional, ya que aquellas moléculas de mayor tamaño hallarán mayor resistencia al avanzar a través de los poros del gel que aquellas moléculas pequeñas. Por lo tanto, la fricción que se observa durante el movimiento electroforético en un gel depende de la masa y la forma de la molécula, en adición a su carga eléctrica.

Aunque el solvente puede, por sí solo, producir una fricción diferente sobre diversas moléculas, su efecto es muy poco apreciable cuando no existe el entramado del gel.

Figuras 1 y 2



Efecto del pH sobre la movilidad

Cada ión posee carga y movilidad particulares. Sin embargo, una **solución** de una sustancia cuyo pK es cercano al pH de la solución, contiene una población de especies de la sustancia, algunas con su carga particular otras sin ellas.

La fracción de especies con carga depende del pK de la sustancia y del pH de la solución. Cuando el pH es igual al pKa de un ácido débil, solo el 50% de las partículas están cargadas. A una unidad de pH por debajo del pKa, el 90 % no posee carga. A una unidad por encima del pKa el 90 % tiene carga. Se puede decir asimismo que la carga efectiva (promedio) de una sustancia varía con el pH. Por lo tanto su "movilidad efectiva" varía con el pH.

Esto es particularmente cierto para sustancias tales como las proteínas. Estas son sustancias obviamente "anfóteras", es decir, contienen grupos ácidos y básicos. Su carga (neta) es altamente positiva a pH bajo, cero (isoeléctrica) a un pH particular más elevado y negativa a un pH más alcalino. Dado que la movilidad es directamente proporcional a la magnitud de la carga, Q , la movilidad efectiva es en gran medida función del pH.

La consecuencia práctica más importante de esto es que las soluciones de electroforesis deben ser tamponadas para tener su pH estabilizado. El pH del buffer se elige a fin de lograr una óptima carga neta para lograr una máxima separación.

Para proteínas se utiliza generalmente un intervalo de pH de 7 a 9, el buffer se emplea para mantener este pH y por consiguiente la carga proteica neta a través del proceso electroforético.

Electroendósmosis:

El medio de soporte no debe absorber las moléculas, dado que ello inhibe o detiene la migración. El problema habitual de interacción no proviene de la absorción real del material. Más comunes son las interacciones electrostáticas de los grupos cargados fijados al medio.

El agar utilizado comúnmente como medio de soporte en electroforesis, es una mezcla de agarosa y agarpectina. La agarpectina posee un grupo relativamente elevado de grupos carboxilo, que a pH neutro tienen cargas negativas. Al aplicar un voltaje, las cargas se mueven, pero no sucede lo mismo con los grupos carboxilo fijados a la matriz del polisacárido. Los grupos carboxilo arrastran suficiente solvente como para generar un flujo *neto* de solvente en *una* dirección. Esto se denomina "electroósmosis" o "endósmosis".

El efecto de endósmosis es más marcado cuando el medio de soporte posee grupos cargados, pero ocurre siempre en cierto grado. Si dos sustancias diferentes (fases) se ponen en contacto se desarrolla un potencial eléctrico (voltaje), dado que los potenciales químicos de ambas fases suelen ser diferentes.

Si se aplica un voltaje externo, existe siempre una tendencia de una fase a moverse con respecto a la otra.

ANEXO 4: OTRAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS DE INTERACCIÓN PRIMARIA

RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

El RIA es una técnica de alta sensibilidad que permite la cuantificación de sustancias que se encuentran a muy bajas concentraciones en los líquidos biológicos como hormonas proteicas, anticuerpos, drogas, etc. El radioinmunoanálisis se basa en una reacción *antígeno-anticuerpo* en la que la cantidad de centros de unión en el anticuerpo (aceptor) es inferior a la cantidad total de antígeno (ligando), quedando saturado por él. En la reacción interviene también una cantidad constante del antígeno marcado (Ag^*) que compite con el antígeno no marcado (Ag) por los centros de unión disponibles en el anticuerpo.

Fundamento del RIA:

Los reactantes que intervienen son:

- a) El Ligando o Ag , que es la sustancia por valorar, presente en las muestras incógnitas y en los standards de concentración conocida.
- b) El Radioligando o Ag^* , que se trata de la misma especie molecular del Ag al cual se le ha incorporado un átomo radiactivo.
- c) El Aceptor o Ac
- d) El sistema de separación.

En el sistema ponemos una cantidad fija del trazador (Ag^*) y una cantidad fija y limitada del anticuerpo (Ac) tal que el número de sitios de unión al Ac se encuentre en defecto, por ejemplo, el 30 al 50 % del trazador (Ag^*) se une al Ac , - Figura 1-.

Al agregar a dicho sistema cierta cantidad de Ag frío (Ag), se establecerá una competencia entre el Ag y el Ag^* por ese número limitado de sitios de unión del Ac . -Figura 2-. Siendo las concentraciones del antígeno marcado y del anticuerpo constantes, la única variable del sistema es la concentración de antígeno no marcado. Así pues la formación de complejos radiactivos (Ag^*Ac) variará en función de la concentración de antígeno no marcado: a mayor concentración de antígeno no marcado, mayor formación de complejos antígeno-anticuerpo no marcados, y menor formación de complejos radiactivos, y viceversa. La reacción antígeno-anticuerpo se rige por la ley de acción de masas, según la cual la velocidad de formación de los productos a partir de los reactivos es directamente proporcional a la concentración de los reactivos, y la velocidad de disociación directamente proporcional a la concentración del producto en ese momento. Después de cierto tiempo de reacción se alcanza una situación de equilibrio en la que la velocidad de asociación y de disociación se iguala.

En el radioinmunoanálisis la presencia de antígeno no marcado provoca un desplazamiento del antígeno marcado de los centros de unión disponibles en el anticuerpo, que es proporcional a la concentración del antígeno no marcado. Como en la mayoría de los procedimientos de medida usados en bioquímica clínica, mediante una serie de calibradores de concentraciones diferentes, incluida la concentración cero, se puede establecer la curva de calibración.

La curva de calibración es la representación gráfica del desplazamiento de la radiactividad ligada debido a concentraciones crecientes de patrón. En el modelo básico la concentración de los patrones se sitúa en el eje de abscisas, y la radiactividad medida habitualmente en la fracción ligada, en el eje de ordenadas Figura 3

Figura 1. En ausencia de antígeno frío (no radioactivo), todos los complejos Ag-Ac serán radioactivos. La radioactividad medida es máxima

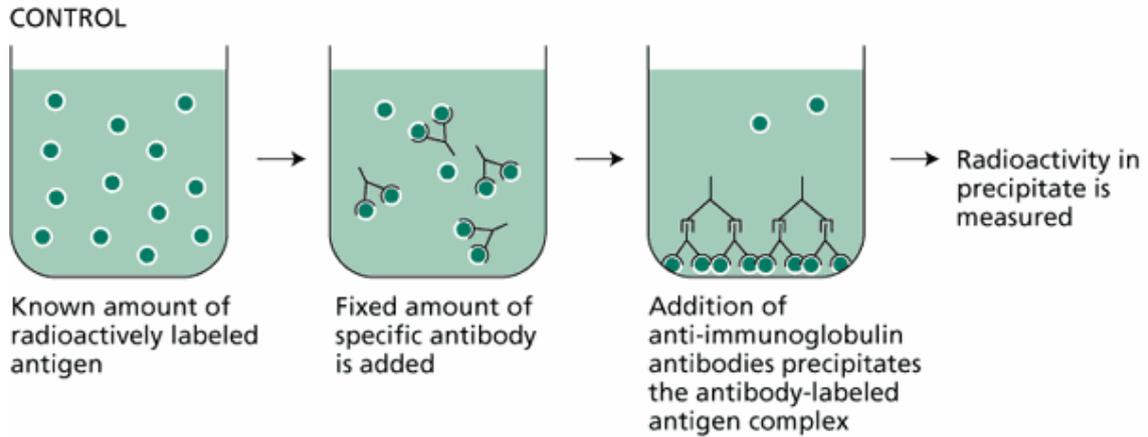


Figura 2
En presencia de antígeno frío (no radioactivo), éste compite con el antígeno radioactivo para unirse al anticuerpo. Por tanto la radioactividad medida es menor. El descenso es proporcional a la concentración de Ag frío presente en la muestra

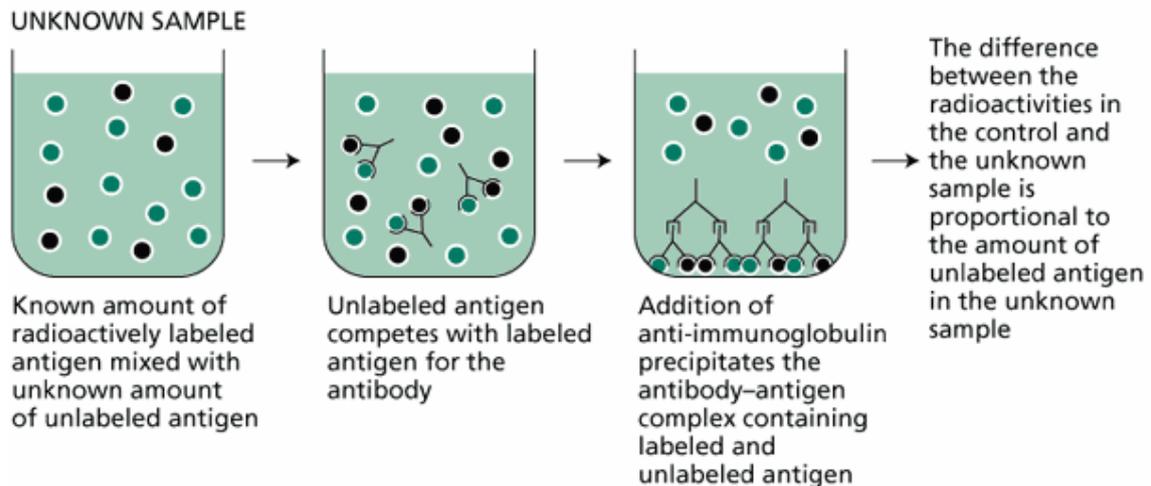
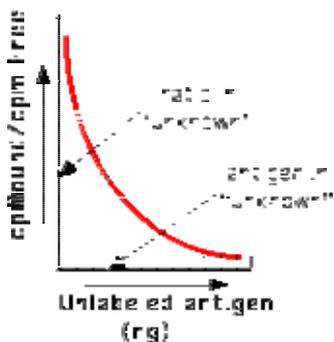


Figura 3 Curva de calibración



Se construye una curva de calibrado (color rojo) que relacione la medida de radioactividad (cpm) con la concentración de antígeno frío en la muestra. Si se realiza el ensayo con una muestra que contiene una cantidad desconocida del antígeno no marcado y se mide la radioactividad asociada a los anticuerpos, por interpolación sobre la curva de calibrado se puede estimar la concentración del antígeno frío en la muestra.

Requerimientos para el RIA:

Los **componentes de un sistema** de reacción de radioinmunoanálisis son básicamente la sustancia cuya concentración se desea medir (antígeno no marcado), esa misma sustancia marcada con un isótopo radiactivo (los más utilizados son el I^{125} y más raramente el I^{131}), el anticuerpo y el medio en que tiene lugar la reacción.

La sustancia a analizar es el sistema de reacción sobre el que el investigador tiene un menor control. Su unión al anticuerpo puede verse alterada por numerosos factores, unos inherentes a su propia naturaleza y otros debidos a efectos de la matriz en que se hallan. La sustancia en estudio suele hallarse en la muestra a concentraciones muy bajas mezclada con multitud de otras sustancias, algunas de las cuales pueden tener una estructura muy parecida. En ocasiones la sustancia en estudio circula unida a una o más proteínas de transporte específicas o bien puede formar agregados moleculares, siendo todo ello causa de heterogeneidad con relación a su unión al anticuerpo.

a) Requerimientos de las sustancias por valorar (analito)

- 1) La sustancia por valorar debe ser antigénica en alguna especie animal, es decir, debe inducir la producción de anticuerpos específicos.
- 2) Se debe disponer de la sustancia en condiciones adecuadas para ser utilizada como standard de concentración conocida.
- 3) La sustancia por valorar debe poder obtenerse altamente purificada para su posterior marcación.
- 4) El standard y el analito, presente en suero, plasma, orina, etc., deben comportarse de la misma manera frente al Ac.

b) Requerimientos del compuesto marcado (trazador)

Se debe disponer del compuesto marcado radioquímica y químicamente puro y por lo general, se requiere que posea una alta actividad específica.

c) Requerimientos del anticuerpo

- 1) Debe poseer alto título
- 2) Debe poseer alta especificidad
- 3) La afinidad del Ac por el antígeno debe ser un tanto más elevada cuanto más sensible se requiera que sea el método.

d) Requerimientos de la reacción

- 1) No deben existir efectos alostéricos ni cooperativos, la reacción entre el Ag y el Ac seguiría una cinética de primer orden
- 2) Debe alcanzarse el equilibrio de la reacción.
- 3) Debe existir un método apropiado para separar el antígeno libre del antígeno unido al Ac en forma cuantitativa y sin perturbar el equilibrio
- 4) Debe poder determinarse la radioactividad de la fracción unida y/o de la fracción libre.

El patrón de calibración debería cumplir idealmente dos requisitos: ser idéntico inmunológicamente a la molécula en estudio y estar en forma pura. En la actualidad muchas sustancias biológicamente importantes se pueden sintetizar mediante técnicas de ingeniería genética.

Respecto al antígeno marcado radiactivamente (Ag^*), lo más importante a tener en cuenta es que su comportamiento inmunológico debe ser idéntico al del antígeno no marcado, es decir, ambos antígenos deben ser inmunológicamente indistinguibles. Los isótopos más utilizados como **marcadores** son el 3H y el ^{125}I (radioisótopos); la utilización de este último ofrece ciertas ventajas, ya que posee mayor actividad específica, su semivida es de 60 días (en el caso del 3H es de 12 años), y es un emisor β cuya actividad se puede medir directamente del tubo de ensayo sin necesidad de utilizar otros medios ni correcciones, estando al alcance de laboratorios menos especializados. Por otra parte el ^{125}I tiene el inconveniente de que al ser un átomo de gran tamaño es probable que su incorporación como marcador de haptenos (moléculas de bajo peso molecular) produzca cambios en la afinidad de éstos por el anticuerpo.

Utilidades

El Ría es una técnica que se utiliza para valorar sustancias como

- Anticuerpos (IgE, IgM)
- Hormonas proteicas (FSH, Prolactina, T_4)
- Hormonas esteroideas (progesterona, testosterona, estradiol)
- Drogas (morfina, barbitúricos)
- Marcadores tumorales, antígeno de hepatitis B <vitamina B_{12} , ferritina, etc.

ANEXO 5: TECNICAS CITOMORFOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO FUNCIONAL DE POLIMORFONUCLEARES

Se utiliza una técnicas cito morfológicas que consiste en enfrentar a los PMN separados por adherencia a portaobjetos con una suspensión de "*Candida albicans*" y "*Candida pseudotropicalis*".

Luego de la incubación con las *Candidas*, los preparados se tiñen y se evalúa la fagocitosis y lisis de las levaduras al microscopio, teniendo en cuenta que las levaduras vivas se tiñen de azul con la coloración de Giemsa mientras que las *Candidas* muertas no toman el colorante.

La razón por la que se utilizan dos especies de "*Candidas*" en este ensayo es que ambas son destruidas por distintos mecanismos microbicidas: "*C. Albicans*" por mecanismos microbicidas oxígeno dependiente, mieloperoxidasa dependiente, mientras que las "*Candidas pseudotropicalis*" es destruída por mecanismos oxígeno dependiente, mieloperoxidasa independiente.

Método

1) Separación de PMN por adhesividad

- a) Sobre los portaobjetos de contorno esmaltados depositar 1 o 2 ml de sangre obtenida por punción venosa, sin heparina.
- b) Poner en una placa de Petri un disco de papel de filtro de 10 cm de diámetro, disponer sobre él 2 varillas de vidrio (cámara húmeda)
- c) Depositar sobre la placa (b) el portaobjeto preparado en (a). Incubar a 37°C por 2 hs en estufa.
- d) Descartar el coagulo evitando tocar la superficie de adherencia celular.
- e) Lavar 1 ó 2 veces con solución de Hanks tibia para eliminar las células no adheridas. (Evitar que se seque el preparado).

2) Preparación de la suspensión del germen problema (*Candida pseudotropicalis* u otra)

- a) Cultivar *C. pseudotropicalis* en agar sabouroud en pico de flauta durante 8 a 10 horas a 37°C.
- b) Se lavan con solución de Hanks para eliminar residuos de agar, centrifugando a 400X g durante 10 minutos.
- c) Hacer la dilución del cultivo en solución de Hanks y determinar su concentración en ml(Hacer dilución en líquido de Turk y contar en cámare de Neubauer, como cualquier célula).
- d) Se resuspende las levaduras en solución de Hansk, agitando en vórtex con el objeto de obtener microorganismos aislados en suspensión homogénea y se ajustan a la concentración de 5.106 *Candidas*, llevar a 1 ml en medio TC 199, con 10% de suero AB, sin inactivar (sin descomplementar). Conservar a 4°C hasta utilizar. Es conveniente preparar 3 ml.

3) Determinación de fagocitosis y lisis

- a) Agregar 1 ml de suspensión de *Candidas* al preparado que tiene los Neutrófilos adheridos (evitar que se desequen)
- b) Incubar cada preparado 30' y 60' en cámara húmeda y a 37°C
- c) Lavar con solución de Hanks 1 ó 2 veces con pipeta Pasteur
- d) Secar al aire

4) Coloración y recuento

- a) Colorear con Giemsa diluido por 7'. (20ml de buffer fosfato + 40 gotas de Giemsa , 15'. Enjuagar con H2O
- b) Dejar secar
- c) Observar la fagocitosis con microscopio por inmersión.

5) Resultado:

La actividad fagocítica se expresa como el número de levaduras engolfadas o ingeridas por 100 PMN.

La actividad lítica está representada por las imágenes "fantasmas" de las candidas que se observan como no teñida con Giemsa y se expresa numéricamente en porcentaje, teniendo en cuenta las ingeridas (fagocitadas no lisadas).

Por lo tanto, el porcentaje de actividad lítica de *Candidas* lisadas queda definido por una relación entre las lisadas y las engolfadas por 100 PMN.

Valores Normales en Sangre Periférica

En adultos jóvenes y sanos, el rango de actividad fagocítica de PMN es de 300 - 400 *Candidas* fagocitadas por 100 PMN para ambas especies de *Candidas*. En cuanto a la actividad de PMN, está en sujetos normales de 10-15% para *C. Pseudotropicalis* y de 12 - 17% para *C. Albicans*.

Interpretación de los resultados

Valores disminuidos de actividad fagocítica indican un defecto severo en la función de los PMN, generalmente asociados a una inmunodeficiencia primaria o secundaria. Valores disminuidos de actividad lítica contra *C. Pseudotropicalis* indican un defecto en los mecanismos de actividad lítica contra *C. Albicans* indican un defecto en los mecanismos microbicidas oxígeno-dependiente y mieloperoxidasa - independiente.

Solución de Hank

1.- ClNa	8 gr	
2.-ClK	400 mg	
3.-PO ₄ HNa ₂	60 mg	
4.-PO ₄ H ₂ K	60 mg	
5.-SO ₄ Mg7H ₂ O	100 mg	
6.-Cl ₂ Ca Anh	140 mg	
7.-Cl ₂ Mg	100 mg	
8.-Glucosa	1 gr	
9.-CO ₃ Hna	350 mg	
10.-Rojo Fenol	2,5 mg	
11.- H ₂ O bidestilada csp	1000 ml	

Preparación: disolver cada droga en el orden mencionado colocando todo en un frasco erlenmeyer con agitador magnético durante 1 hora. PH final 7 a 7,2.

GLOSARIO

Activación. Proceso por el que se induce a una célula en reposo, a que exprese una o más propiedades fisiológicas latentes.

Adyuvante. Sustancia que intensifica inespecíficamente la respuesta inmunitaria frente a un inmunógeno cuando se inoculan conjuntamente.

Afinidad. Medida de la fuerza de unión entre un determinante antigénico (epitope) y un sitio de combinación del anticuerpo (paratope).

Alelo. Cualquiera de las formas alternativas de un gen o locus génico que puede heredarse.

Alergeno. Antígeno, por ejemplo, polen, polvo o caspa animal, que induce reacciones alérgicas (mediadas por IgE).

Alergia (hipersensibilidad de tipo I). Reacción causada por la producción de IgE en la respuesta inmune frente a alérgenos se caracteriza porque produce reacciones inflamatorias.

Alotipo. Diferencias entre inmunoglobulinas del mismo subtipo, que provienen de individuos distintos de la misma especie, debidas a variantes alélicas del gen de cadena pesada. Puede ser reconocido como antígeno por otro miembro de la misma especie.

Anafilotoxina. Péptidos del complemento (C3a, C4a y C5a) que originan la degranulación de los mastocitos y la contracción del músculo liso.

Anafilaxia. Reacción aguda de hipersensibilidad mediada por IgE que provoca vasodilatación y contracción de la musculatura lisa (incluida la bronquial) y que puede causar la muerte.

Anergia. Estado celular de no respuesta a un Ag. Definida clínicamente como la incapacidad para responder a Ags comunes en pruebas cutáneas. En el caso de los LT y LB se dice que son anérgicos cuando no pueden responder a su Ag específico en condiciones óptimas de estimulación.

Anticuerpo. Glicoproteínas solubles que se unen específicamente a una sustancia particular, el antígeno. Son producidas por los plasmocitos originados por la activación de los LB. Cada molécula de anticuerpo tiene una región única y particular que le permite unirse a su correspondiente antígeno, pero todas las moléculas de Ac tienen una estructura general y son conocidas colectivamente como inmunoglobulinas. Se denomina repertorio de anticuerpos a la totalidad de las especificidades que un individuo puede sintetizar.

Anticuerpos monoclonales. Población de Ig con estructura y especificidad idénticas. Proceden de un único clon de linfocitos B. Pueden producirse experimentalmente en el laboratorio por fusión de linfocitos B y células de mieloma.

Anticuerpos monoespecíficos. Población de anticuerpos que sólo pueden interactuar con un antígeno, perteneciente a una mezcla particular.

Anticuerpos naturales. Anticuerpos presentes en el suero sin que se conozca una exposición previa al antígeno correspondiente.

Antígeno. Cualquier molécula que reacciona específicamente con anticuerpos o receptores de linfocitos T (TcR). Su nombre deriva de la propiedad de generar anticuerpos.

Antígenos T-dependientes. Requieren la colaboración de LT CD4 para que se produzca la respuesta mediada por anticuerpos.

Antígeno T-independiente. Estimulan directamente a los LB para que produzcan anticuerpos específicos.

Antisuero. Suero que contiene los anticuerpos producidos frente a un antígeno determinado. Los antisueros contienen una colección heterogénea de Acs, que pueden unirse con diferente afinidad a la sustancia usada en la inmunización; cada molécula tiene su propio sitio de combinación y reacciona con un único determinante antigénico. Esta heterogeneidad hace que cada antisuero sea único.

Atopía. Estado de hiperreactividad a alérgenos ambientales comunes, determinado genéticamente.

Autoanticuerpos. Anticuerpos producidos frente a antígenos propios.

Autoantígeno. Antígenos del propio sujeto.

Autoinmunidad. Respuesta del sistema inmunitario frente a antígenos propios (autoantígenos).

Autólogo. Perteneciente al mismo individuo.

Avidez. Fuerza de unión entre un anticuerpo y un antígeno y que depende de la afinidad y de la valencia del anticuerpo.

Bence-Jones (proteína de). Cadenas livianas (L) monoclonales de Ig que se eliminan en la orina de pacientes con gammopatía monoclonal.

Blasto. Cualquier célula con tamaño aumentado y cambios nucleares y citoplasmáticos previos a una división mitótica.

Cambio de clase de las Ig (switch). Proceso por el que un linfocito B que expresa Ig de una clase puede comenzar a expresar las de otra clase, sin que esto afecte a la especificidad. Es un cambio irreversible que ocurre durante la expansión clonal.

CD (Cluster de Diferenciación). Moléculas de la superficie celular de leucocitos y plaquetas, que diferencian las distintas poblaciones celulares. Pueden detectarse con anticuerpos monoclonales. La nomenclatura utiliza las iniciales CD seguido por un número de orden.

CDR (Complementary Determining Regions). Porciones de la región variable (V) de las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas y del receptor de las células T, que configuran el sitio de unión al antígeno. Se les conoce también como regiones hipervariables y hay tres regiones en las cadenas pesadas, otras tres en las livianas y tres en el TCR.

Células accesorias. Células no linfoides que cooperan con los linfocitos para el desarrollo de las reacciones inmunes e inflamatorias.

Célula plasmática. Célula B que ha llegado al final de su vía de diferenciación y secreta anticuerpos.

Células de Langerhans. Células de la dermis que, tras endocitar y procesar antígenos, migran hacia los ganglios linfáticos locales para convertirse en células dendríticas interdigitadas que presentan los antígenos a los linfocitos T.

Células NK (Natural Killer). Población linfocitaria con capacidad intrínseca para reconocer y destruir algunas células tumorales o infectadas.

Centro germinal Serie oligoclonal de linfoblastos y linfocitos B que se desarrolla en un folículo linfoide durante la respuesta secundaria de anticuerpos. Es el lugar donde se desarrolla la memoria B, el cambio de clase de las Inmunoglobulinas y la maduración de la afinidad de los anticuerpos.

Citoquinas. Término genérico para designar a las moléculas solubles que median las interacciones entre las células.

Citotóxico. Que tiene la capacidad de destruir células.

Clon. Células de constitución genética idéntica derivadas de una única célula.

CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad). Región genética presente en todos los mamíferos, cuyos productos intervienen en la presentación antigénica a los linfocitos T (restricción CMH) y en el reconocimiento de lo propio.

Coestimulación. Señal distinta a la del reconocimiento del antígeno que debe producir la célula presentadora para que se produzca la activación correcta del linfocito T.

Complemento. Grupo de proteínas séricas que se activan en cascada de reacciones enzimáticas y que llevan a la lisis de células extrañas, a la formación de opsoninas y a la de mediadores de la inflamación.

Conjugado. Reactivo formado por acoplamiento covalente de dos moléculas, como por ejemplo la fluoresceína unida a una molécula de inmunoglobulina.

CPA (Célula Presentadora de Antígenos). Cualquier célula capaz de presentar antígenos. Expresan moléculas de Clase II del CMH e incluyen macrófagos, células dendríticas y linfocitos B.

CR1, CR2, CR3, CR4. Receptores para los fragmentos C3 del complemento presentes en las superficies de algunas células.

Degranulación. Exocitosis de gránulos a partir de células tales como mastocitos y basófilos.

Desnaturalización. Pérdida de la estructura tridimensional de una macromolécula, generalmente por calor o tratamiento químico.

Determinante antigénico (epitope). Región del antígeno que se combina con el sitio de unión de los receptores linfocitarios.

Epitope conformacional (discontinuo). Formado por aminoácidos separados en la estructura primaria y que forman un grupo al aproximarse por acción de las estructuras secundaria o terciaria.

Epitope lineal (continuo). Formado por unidades contiguas en la estructura primaria.

Dominio C. Dominios constantes de las inmunoglobulinas y del receptor de las células T. Estos dominios no contribuyen al sitio de unión con el antígeno y presentan una variabilidad relativamente escasa.

Dominio V. Dominios NH-terminales de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas y de las cadenas del TCR; varían entre los productos de los distintos clones y conforman el sitio de unión con el antígeno.

Edema. Hinchazón del tejido debida a la acumulación de líquidos vasculares en el compartimiento extravascular.

Endocitosis. Proceso por el que el material extracelular es internalizado en vesículas citoplásmicas. Las tres formas principales son: Fagocitosis, Pinocitosis y Endocitosis propiamente dicha.

Eritema. Zona de color rojo debida al aumento del flujo sanguíneo local.

Exclusión alélica. Fenómeno por el cual se expresa fenotípicamente una de las dos copias existentes de un gen en la célula diploide. Se observa en los genes de las inmunoglobulinas y de los TcR de los linfocitos.

Factor reumatoideo (FR). Anticuerpos contra las IgG, presentes en el suero de pacientes con artritis reumatoide u otras enfermedades reumáticas.

Fagocitosis. Endocitosis de una sustancia particulada; la partícula queda encerrada en una vesícula denominada fagosoma.

FcR. Receptor que se halla en la superficie de algunas células y que liga fragmentos Fc de inmunoglobulinas.

Fenotipo. Las características expresadas en un individuo (ver Genotipo).

Filogenia. Historia evolutiva de un grupo de animales o sistemas como, por ejemplo, el sistema inmunitario.

Folículo primario. Folículo linfoide formado por linfocitos B en reposo y sin centro germinal.

Folículo secundario. Folículo linfoide que contiene un centro germinal.

Gammaglobulinas. Grupo de proteínas séricas que migran conjuntamente y de modo característico en la electroforesis; incluye a la mayoría de las inmunoglobulinas.

Genoma. Material genético total contenido dentro de una célula.

Genotipo. Material genético heredado; no necesariamente se expresa toda esta información.

Granuloma. Reacción inflamatoria mediada por células en la que predominan los macrófagos activados y en la que se forman agregados celulares alrededor del inmunógeno.

Graft vs Host Disease (GVH). Proceso causado por linfocitos donantes alogénicos que reaccionan contra los tejidos del huésped (receptor).

Haplotipo. Grupo de alelos situados en dos o más locus de un cromosoma en un individuo dado. Como los alelos están genéticamente ligados suelen heredarse conjuntamente.

Hapteno. Molécula pequeña que puede actuar como epítope, pero es incapaz de provocar por sí misma una respuesta de anticuerpos.

Heterólogo. Término que se refiere a las diferencias entre especies.

Hibridoma. Línea celular creada *in vitro* mediante fusión de dos tipos de células diferentes, habitualmente linfocitos, uno de los cuales es tumoral.

Hipermutación somática. Tasa alta de mutación que tiene lugar durante la proliferación de células somáticas.

Histamina. Importante amina vasoactiva liberada a partir de los gránulos de los mastocitos y de los basófilos.

Histocompatibilidad. Grado de compatibilidad inmunológica entre tejidos de individuos distintos.

HLA. ver CMH.

Homólogo. Término que se refiere a la misma especie.

Humoral. Relativo o perteneciente a los líquidos extracelulares, incluyendo el suero y la linfa.

Idiotipo. Conjunto de determinantes antigénicos presentes en el sitio de combinación de una inmunoglobulina particular (o de un TCR).

Inmunoglobulina. ver Anticuerpo.

Inmunoglobulinas (Clases o isotipos). División basada en grandes diferencias de aminoácidos en las regiones constantes de las cadenas H. En el hombre hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD.

Inmunoglobulinas (Subclases). Subdivisión de las clases basada en pequeñas diferencias de las secuencias de aminoácidos en las regiones constantes de las cadenas H. En el hombre hay cuatro subclases de IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) y dos de IgA (IgA₁ e IgA₂).

Inmunidad mediada por células. Término usado para referirse a las reacciones inmunes mediadas por células, en vez de anticuerpos u otros factores humorales. **Inflamación.** Proceso caracterizado por rubor (vasodilatación capilar), tumor (salida de agua y albúmina al compartimiento extravascular debido al aumento de la permeabilidad vascular), calor y dolor. Se produce siempre que hay daño tisular o infección y se acompaña de infiltración de neutrófilos (inflamación aguda), macrófagos y linfocitos (inflamación crónica).

Inmunización. Inducción natural o artificial de una respuesta inmune.

Inmunocomplejo. Complejo antígeno-anticuerpo, que puede contener también componentes del sistema del complemento.

Inmunodominancia. Cualidad de un epítope de ser más inmunogénico que los demás, en un antígeno determinado.

Inmunógeno. Cualquier sustancia que, introducida en un animal, provoca una respuesta inmune.

Inmunosupresión. Estado en el cual el individuo se encuentra con su respuesta inmune disminuida o suprimida. Puede ser causado por una patología o por una terapia.

Inmunoterapia. Tratamiento cuyo objetivo es modular el sistema inmune.

Inmunovigilancia. Capacidad del sistema inmune de monitorear la aparición de antígenos celulares anormales.

Interleuquinas. Grupo de moléculas que median las interacciones entre las células del sistema inmune.(ver citoquinas)

Isohemaglutininas. Anticuerpos dirigidos contra los antígenos de un grupo o factor sanguíneo.

Isotipos. Sinónimo de isoformas. Se refiere a la variación genética dentro de una familia de proteínas o péptidos, en la que todas las formas están presentes en todos los individuos de la especie.

Lectinas. Proteínas que se unen específicamente a los carbohidratos.

Línea celular. Células producidas por crecimiento continuo *in vitro* de un determinado tipo celular. Las líneas celulares suelen contener varios clones.

Línea germinal. Material genético transmitido a través de las gametas, antes de que sea modificado por recombinaciones somáticas o mutaciones.

Linfocito. Subcategoría de leucocitos, responsables de la inmunidad específica.

Locus. Sitio del cromosoma en el que se encuentra un determinado gen.

Macrófago. Célula fagocitaria madura de los tejidos que deriva de los monocitos sanguíneos.

Mastocito. Célula residente en los tejidos y derivada de la médula ósea que tiene receptores de alta afinidad para IgE; es la célula efectora de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo 1)

Mieloma. Neoplasia de células del linaje B.

Mitógeno. Sustancia que provoca que las células en reposo se dividan de modo inespecífico.

Monoclonal. Derivado de un solo clon.

Seroneutralización. Inactivación biológica de toxinas u otros ligandos como resultado directo de su unión a anticuerpos.

Oncogen. Cualquier gen que puede contribuir a la transformación maligna de las células cuando muta o se expresa anormalmente.

Ontogenia. Proceso de crecimiento y desarrollo de un tipo celular, tejido u organo durante la vida del individuo.

Opsonina. Cualquier sustancia capaz de facilitar la fagocitosis de la partícula a la que está unida, como por ejemplo los anticuerpos o C3b.

Opsonización. Proceso por el que se facilita la fagocitosis mediante el depósito de opsoninas sobre una partícula antigénica.

Órganos linfoides primarios. Órganos en los que se forman y maduran los linfocitos. En el hombre son la médula ósea y el timo.

Órganos linfoides secundarios. Órganos en los que los linfocitos desarrollan la respuesta inmune: ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a las mucosas.

Paratope (Sitio de Combinación). Región de la molécula del anticuerpo que establece contacto con el determinante antigénico (epitope).

Pinocitosis. Endocitosis de una sustancia líquida o partículas muy pequeñas.

Placas de Peyer. Pequeños focos de tejido linfoide que se encuentran en la submucosa del intestino delgado.

Policlonal. Derivado de muchos clones.

Pro-B. Progenitor B inmaduro capaz de reordenar sus genes de inmunoglobulina pero que todavía no expresa Ig.

Quimiotaxis. Aumento de la migración direccional de las células, en respuesta a gradientes de concentración de ciertos factores químicos.

Receptor. Molécula de la superficie celular que se une específicamente a un ligando.

Receptor de células T (TCR). Receptor de las células T que consta de un dímero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, asociado al complejo molecular CD3.

Regiones hipervariables (ver CDR). Las tres regiones más variables en los dominios V de las cadenas H y L y de las cadenas α y β del TCR. Estas regiones forman parte del sitio de unión al antígeno.

Regiones constantes. Parte relativamente invariable de las cadenas de inmunoglobulinas pesadas y livianas, y de las cadenas peptídicas del TCR.

Respuesta primaria. Es la respuesta inmune (celular o humoral), que se produce después de un encuentro inicial con un determinado antígeno.

Respuesta secundaria. Respuesta inmune que sigue a un segundo o subsiguiente encuentro con un determinado antígeno.

Singénico. Miembro genéticamente idéntico.

Timo. Órgano linfoideo primario situado en el mediastino anterior, donde maduran y se seleccionan los linfocitos T.

Timocito. Células linfoides que están madurando en el timo para transformarse en linfocitos T.

Tolerancia inmunológica. Estado de falta de respuesta inmunológica específica contra un antígeno determinado.

Transgénico. Cualquier organismo en cuyo genoma se ha introducido un gen extraño funcional.

Vacunación. Inmunización artificial con antígenos para prevenir enfermedades infecciosas.

Xenogénico. Miembro genéticamente diferente, de otra especie.

