

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales**  
***Carrera de Bioquímica***

## ***Cátedra de Inmunología***

---

# **GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS**

---

Edición 2006

### **AUTORES**

Bqca. Esp. **Sandra L. Grenón**  
Bqca. Esp. **Beda E. Mereles Rodríguez**  
Bqco. Esp. **Federico Payes Monzón**  
Bqco. Esp. **Marcelo Salvi Grabulosa**

### **COLABORADORES**

María Laura Robledo  
Laura Cecilia Klein  
María Del Carmen Kerber



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

**San Luis 1870**

Posadas - Misiones – Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:

edunam-admini@arnet.com.ar

edunam-direccion@arnet.com.ar

edunam-produccion@arnet.com.ar

edunam-ventas@arnet.com.ar

**Colección:** Cuadernos de Cátedra

**Coordinación de la edición:** Nicolás Capaccio

**Armado de interiores:** Sebastián Franco

**Corrección:** Hedda Giraudo y Sebastián Franco

Guía de trabajos prácticos : cátedra inmunología - 1a ed. - Posadas : EdUNaM -  
Editorial Universitaria de la Univ. Nacional de Misiones, 2006.  
64 p. ; 30x21 cm.

ISBN 950-579-044-9

1. Inmunología. 2. Bioquímica-Trabajos Prácticos.  
CDD 616.079

Fecha de catalogación: 16/02/2006

ISBN 950-579-044-9

ISBN-13: 978-950-579-044-9

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Universidad Nacional de Misiones

Posadas, 2006

# ÍNDICE

---

PRÓLOGO.....	5
PROPÓSITOS DOCENTES.....	5
NORMAS DE BIOSEGURIDAD.....	6
TRABAJO PRÁCTICO N° 1: Antígenos.....	8
TRABAJO PRÁCTICO N° 2: Técnicas de precipitación en medios gelosados.....	14
TRABAJO PRÁCTICO N° 3: Técnicas de aglutinación y floculación.....	19
TRABAJO PRÁCTICO N° 4: Estudio funcional de PMN.....	26
TRABAJO PRÁCTICO N° 5: Técnicas de interacción primaria.....	30
TRABAJO PRÁCTICO N° 6: Titulación de sueros y conjugados.....	36
 ANEXO: Material bibliográfico de apoyo para la mayor comprensión de los trabajos prácticos y talleres.	
- Técnicas inmunológicas de precipitación.....	41
- Otras técnicas serológicas de interacción primaria.....	44
- Separación de poblaciones linfocitarias.....	47
- Técnica citomorfológica para el estudio funcional de los PMN.....	52
 GLOSARIO.....	 54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## LOS AUTORES

**GREÑÓN, Sandra Liliana:** Bioquímica. Especialista en Microbiología Clínica.

### ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Auxiliar Docente de segunda y primera, JTP y Profesor Adjunto en las Cátedras de Matemática I y II, Microbiología General, Microbiología e Inmunología y Práctica Hospitalaria de las Carreras de Bioquímica y Licenciatura en Genética (FCEQyN). Profesor Adjunto a cargo de la Cátedra de Inmunología de la Carrera de Bioquímica (FCEQyN). Tareas de docencia de post-gradado y de coordinación en la Carrera de Especialización en Microbiología Clínica.

### ACTIVIDADES EN INVESTIGACIÓN

Investigador Categoría II en el Programa Nacional de Incentivos.

Integrante y Directora en distintos proyectos de investigación en su especialidad.

### PUBLICACIONES

En revistas científicas con y sin referato, nacionales e internacionales.

**MERELES RODRÍGUEZ, Beda Elizabeth.** Bioquímica. Especialista en Microbiología Clínica.

### ACTIVIDADES ACADÉMICAS

JTP en la Cátedra de Inmunología de la Carrera de Bioquímica (FCEQyN).

JTP en la Cátedra de Micología de la Carrera de Bioquímica (FCEQyN).

Tareas de docencia de post-gradado en la Carrera de Especialización en Microbiología Clínica.

### ACTIVIDADES EN INVESTIGACIÓN

Investigador Categoría III en el Programa Nacional de Incentivos.

Integrante y Directora de Área Temática en distintos proyectos de investigación en su especialidad.

### PUBLICACIONES

Publicación del libro "Micosis superficiales y cutáneas" (en co-edición con otras autoras). Editorial Universitaria de la UNaM. Año 2003.

Publicaciones en revistas científicas.

**PAYES MONZÓN, Federico.** Bioquímico. Especialista en Microbiología Clínica.

### ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Auxiliar Docente en la Cátedra de Microbiología e Inmunología de la Carrera de Bioquímica (FCEQyN).

Tareas de docencia de post-gradado en la Carrera de Especialización en Microbiología Clínica.

PUBLICACIONES en revistas científicas.

**SALVI GRABULOSA, Marcelo.** Bioquímico. Especialista en Microbiología Clínica.

### ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Auxiliar Docente en las Cátedras de Microbiología de la Carrera de Farmacia y de Inmunología de la Carrera de Bioquímica (FCEQyN).

PUBLICACIONES en revistas científicas.

## PRÓLOGO

---

Los docentes de la Cátedra de Inmunología esperamos que, a lo largo de este cuatrimestre, ustedes vayan descubriendo la importancia que tiene esta materia en la formación del profesional bioquímico, y que los contenidos teóricos y prácticos aquí impartidos les brinden las bases para una mejor comprensión de los temas y de las materias relacionadas que cursarán con posterioridad.

Esperamos brindarles los conocimientos básicos para facilitar la comprensión de la inmunología humana y la aplicación de los mismos al diagnóstico de las patologías que afectan al individuo, y darles las herramientas necesarias para la inserción como profesionales Bioquímicos en el área biomédica capacitándolos para desempeñarse en el campo de orientación médico-clínica en el marco de la inmunología.

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 entender 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, bisturíes, 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 dentro del laboratorio ropa protectora (guardapolvo, chaqueta, etc.), que debe usarse sólo dentro del laboratorio.
- 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 trabajar sin estos; por ese motivo, es fundamental acostumbrarse a trabajar siempre con guantes.
- 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 fluidos biológicos ni reactivos con la boca. Utilizar siempre pipetas automáticas y propipetas o peras de goma.
- Evitar la formación de aerosoles, que se producen por el agitado de tubos sin tapa, incorrecta centrifugación (centrífuga sin tapa, tubos con excesivo volumen, o levantar la tapa 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, tomar mate, ni fumar en el laboratorio.
- No guardar comestibles ni bebidas en las heladeras del laboratorio.

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

## TRABAJO PRÁCTICO N° 1: ANTÍGENOS

### INTRODUCCIÓN

Toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a este como un **antígeno**. Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno. Por una parte la **inmunogenicidad** o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado, y la **antigenicidad** o particularidad del antígeno que hace que este sea reconocido por el producto de esta respuesta (anticuerpo y/o célula sensibilizada).

Los antígenos pueden ser clasificados por su origen en dos tipos:

a. **Exógenos:** son los que vienen de afuera; puede haber de varios tipos como polen, polvo, heces de ratas, proteínas de la leche, bacterias, etc. Como producto de estos podemos padecer de una enfermedad clínica con sintomatologías, como diarrea, asma, tifoidea, etc.

b. **Endógenos:** son aquellos antígenos que se encuentran dentro de los individuos; estos se subdividen a su vez en:

b.1. **Xenógeno o heterólogo:** dentro de este grupo encontramos a los xenoantígenos o heteroantígenos, que 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 la fiebre reumática, enfermedad inmune, en la cual, en el corazón del niño existen moléculas de estructura similar a la del *Streptococcus B hemolítico*, el sistema inmune del niño ya sensibilizado, lo que hace es atacar a estructuras de su corazón que contienen configuración similar a la del Streptococo, causando un daño al tejido cardíaco; esto se denomina "reacción cruzada".

b.2. **Autólogo:** en este encontramos al tipo autoantígeno, que 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.

b.3 **Alógenos u homólogos:** aquí se encuentran los tipos aloantígeno o isoantígeno; estos 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, inmunidad de transplantes.



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)
<b>Grupo A</b>	A	Anti-B	45%
<b>Grupo O</b>	Ni A, ni B	Anti-A, Anti-B, Anti-A+B	43%
<b>Grupo B</b>	B	Anti-A	9%
<b>Grupo AB</b>	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.

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).

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
- ❖ 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
- ❖ Micropipetas

### **Procedimiento**

1. Extraer 5cc de sangre a distintas personas (donante y receptor).
2. Colocar 2,5 cc en un frasco con 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 y luego centrifugar para separar el suero.
4. Determinar los antígenos de superficie de los GR de c/u de ellos. Si el receptor puede recibir sangre de su donante realizar las pruebas cruzadas transfusionales.
5. Prueba cruzada mayor: agregar en un tubo de hemólisis 100µl de sangre entera (anticoagulada) del donante con 100µl de suero del receptor, incubar 5 min. a 37°C. Interpretación: observar a trasluz presencia o ausencia de aglutinación. Para considerar apto al donante para la transfusión no debe presentar hemoaglutinación.
6. Prueba cruzada menor: agregar en un tubo de hemólisis 100µl de suero del receptor con igual cantidad de glóbulos rojos del donante(al 2% en solución salina), agregar suero de Coombs, incubar a 37°C 30 min. Examinar presencia o ausencia de aglutinación.

## **2-ANTÍGENOS BACTERIANOS**

Las bacterias son microorganismos inferiores, son células procariotas, a diferencia de los considerados superiores (eucariotas) (ver Tabla 1).

**Tabla 1:** muestra algunas de las diferencias que se pueden establecer entre ambas células

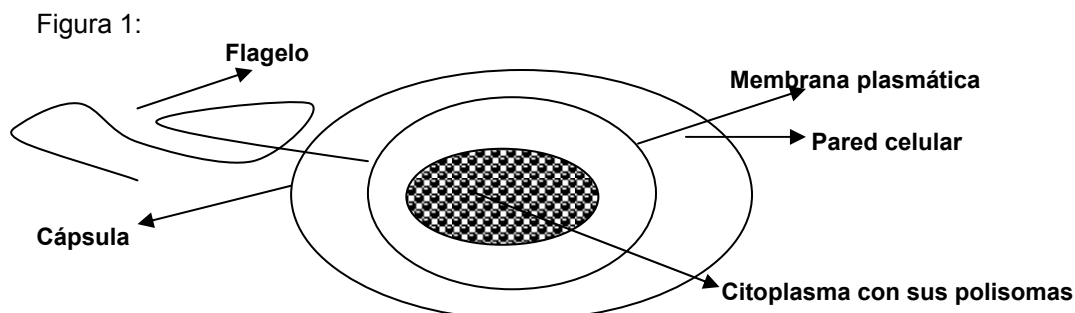
Componentes	Células procariotas	Células eucariotas
Núcleo	Ausente	Verdadero núcleo (griego). Incluye a protozoos, plantas, animales, hongos y la mayoría de las algas.
Tamaño celular	Menor	Mayor
Membrana nuclear	Ausente	Presente
Aparato mitótico	Ausente	Presente
Mitocondrias	Ausente	Presente
Sustancias esteroides	Ausente	Presente
Almacén de Hidratos de carbono como	Poli-B-hidroxitirato	Glucógeno

En la Figura 1 se muestra la estructura básica de una bacteria tipo, presentando por fuera de la membrana citoplasmática una pared celular rígida que les permite soportar las condiciones adversas del medio externo. 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 Ácido 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**.

#### ¿Cómo está integrada una bacteria tipo?

- **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 sobrevivencia del microorganismo. Contiene al **antígeno O** somático.
- **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:** las bacterias pueden elaborar sustancias que difunden al medio (exotoxinas) y otras que forman parte del soma y solo pueden ser liberadas por medio de lisis bacteriana (endotoxinas). Ambas pueden provocar daño en los órganos y tejidos de un huésped susceptible.

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



### Objetivos del práctico e implementación técnica

#### **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, suero

#### Técnica

Cepa en estudio: es una cepa de **Escherichia coli** (bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia de las **Enterobacteriaceae**), sembrada en una placa de agar nutritivo por 18–24 hs. a 35–37°C. Buscamos con lupa las colonias de bordes lisos (S) y hacemos una suspensión en solución fisiológica.

#### **¿Cómo obtenemos los antígenos?**

- Sembrar en placas que contengan agar nutritivo, la cepa en cuestión, incubar por 18-24 hs. a 35-37°C.
- Resuspender los M.O. en solución fisiológica hasta una concentración de  $5 \times 10^9$  a  $8 \times 10^9$  UFC/ml.
- Comprobar la pureza con coloración de Gram.
- Comprobar estado en **fase S**. Para ello poner una fracción a ebullición durante 2 hs. a baño de María o tratar con tripaflavina (1/500) y observar en portaobjetos si hay floculación (grumos). Las cepas en fase S no presentan aglutinación.
- Fraccionar la suspensión en dos partes iguales.

#### **Obtención de antígenos H**

- Colocar una de las fracciones en un erlenmeyer.
- Agregar formol al 40% en proporción 1/4.

- Dejar 2 días en heladera.
- Hacer control de esterilidad, por siembra de la solución en un medio de cultivo (no debe desarrollar ningún germen).
- Aprobado el paso anterior (tres días de control) se lleva la suspensión a  $9 \times 10^8$  UFC/ml (3 de Mac Farland) con solución fisiológica estéril.

### **Obtención de antígenos O**

- Colocar una de las fracciones en un erlenmeyer.
- Agregar igual volumen de alcohol etílico absoluto proporción 1/1.
- Dejar 24 hs a 35-37°C, para destruir los flagelos (Ag H).
- Hacer control de esterilidad igual que en antígeno H.
- Centrifugar a 3000rpm/15 min.
- Resuspender el sedimento en SFF hasta concentración  $2.7 \times 10^9$  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.

## **TRABAJO PRÁCTICO Nº 2: TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN EN MEDIOS GELOSADOS**

### **INTRODUCCIÓN**

Las técnicas inmunológicas de precipitación se basan en la aparición de un precipitado visible cuando se enfrentan antígenos (Ags) solubles con sus anticuerpos (Acs) específicos. Se fundamenta en la interacción primaria y secundaria. Los precipitados que se originan se visualizan como nítidas bandas de precipitación, que permanecerán estables mientras no se modifique la concentración de los reactantes.

Las pruebas de precipitación se pueden realizar en medio sólido o en medio líquido. Pueden ser cualitativas o cuantitativas. Las más utilizadas son las de precipitación en medios sólidos. 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 apéndice).

### **Ventajas y desventajas de las técnicas de precipitación en geles**

- Alta especificidad
- Pruebas cuantificables
- Bajo costo
- Baja sensibilidad
- Detectan Ag o Acs. (por lo menos bivalentes)
- No detectan presencia de Acs. incompletos

### **1.1) PRECIPITACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO**

Son técnicas poco utilizadas, se emplean generalmente 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**

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 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.

Hay distintas variantes de técnicas de precipitación en medios gelosados:

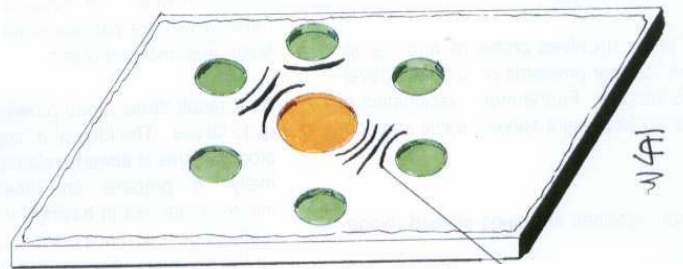
- 1.2.1) Inmunodifusión doble (IDD)
- 1.2.2) Inmunodifusión radial (IDR)
- 1.2.3) Inmunolectroforesis (IEF)
- 1.2.4) Contrainmunolectroforesis (CIEF)

### **1.2.1) INMUNODIFUSIÓN DOBLE (IDD) O MÉTODO DE OUTCHERLONY**

Consiste en sembrar en pocillos realizados sobre una superficie de agar solidificado separados a una distancia adecuada el Ac. y el Ag. 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 frente 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 sí o comparados con una Ag. conocido.

Fig.1 IDD



Bandas de precipitación

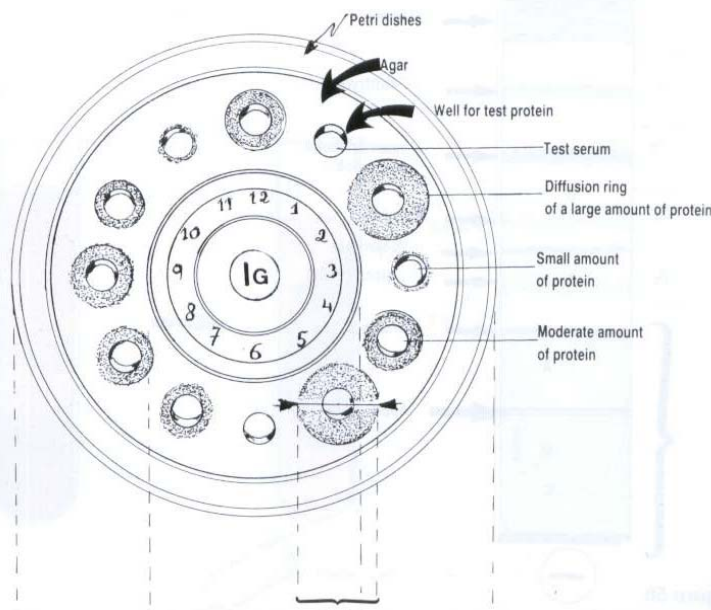
### **1.2.2) INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)**

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 cuantificarla a partir de sembrar concentraciones conocidas del Ag, medir los diámetros de los círculos de precipitación y compararlos con el Ags en estudio.

Ej. de aplicación de esta técnica son la determinaciones de Inmunoglobulinas A, M y G; fracciones del complemento C3 y C4, fibrinógeno, etc.

Fig.2. IDR

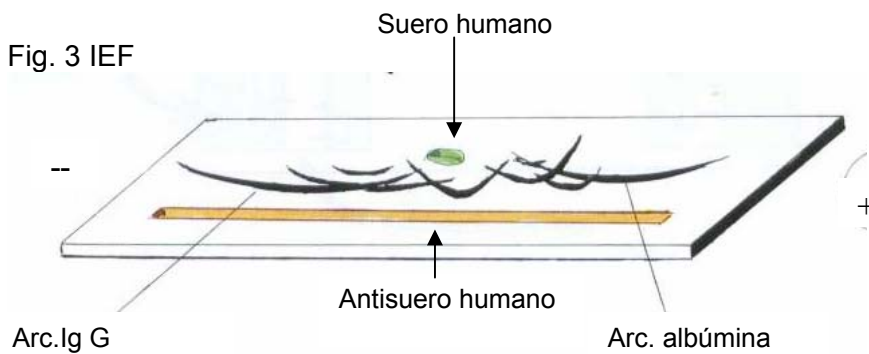


### **1.2.3) INMUNOELECTROFORESIS (IEF)**

Esta técnica combina las propiedades de la electroforesis (ver apéndice) con la precipitación en medio sólido. Se realiza en dos etapas:

- A. En la primera se aplica una electroforesis a los Ags. proteicos (por 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; esta 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.
- B. En la segunda etapa se coloca en forma paralela a la línea de migración de las proteínas (Ags.), un antisuero total, por 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.

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



### **1.2.4 CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF)**

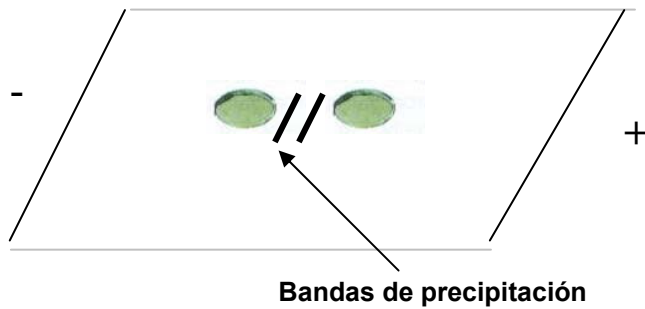
Esta técnica utiliza una superficie de agar con dos pocillos enfrentados a una distancia determinada; en uno de ellos se coloca el Ag y en el otro se coloca el Ac. Luego se aplica una corriente eléctrica continua. El *buffer* que se utiliza deja al Ag. cargado negativamente y al Ac. en su punto isoeléctrico.

Al aplicar la corriente eléctrica el Ag. migrará hacia el polo positivo y el Ac. (neutros) será arrastrado por el movimiento del agua en el gel hacia el polo negativo por el fenómeno de electroendósmosis (ver apéndice).

De esta manera ambos se mueven uno hacia el otro y al encontrarse en la zona de equivalencia inmunológica se producirá una banda de precipitación. Esta técnica es muy rápida (minutos) y de mayor sensibilidad que las anteriores. Es ampliamente aplicada en el diagnóstico de hepatitis B, en enfermedades meningocóccicas, micosis sistémicas, etc.



Fig. 4 CIEF



## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

### OBJETIVO

***Aprendizaje de técnicas de precipitación para inmunodiagnóstico: IDD. CIEF, IEF, IDR.***

### Materiales necesarios

- ❖ Agar alta pureza al 1,2% en SF estéril
- ❖ Agarosa al 0,9% en *buffer* veronal sódico pH= 8,6
- ❖ Portaobjetos limpios y desengrasados
- ❖ Pipetas de 5 ml
- ❖ Antígenos y sus correspondientes antisueros
- ❖ Cuba electroforética y fuente de poder
- ❖ *Buffer* veronal sódico pH 8,6
- ❖ Papel de filtro

### Procedimiento

#### Inmunodifusión doble

En un portaobjetos se vierten 2,5 ml de agar alta pureza (1,2% en solución fisiológica); se realizan pocillos sobre el mismo con sacabocados, y se depositan el Ag y los Ac según una distribución planteada previamente, se deja difundir en cámara húmeda. A las 24 hs. observar presencia o ausencia de bandas de precipitación.

#### Inmunoelectroforesis

Esta técnica combina las propiedades de la electroforesis con la precipitación en medio geloso; se realiza en dos etapas:

- a) En la primera se aplica una electroforesis a los antígenos proteicos que se han sembrado en el pocillo realizado sobre una superficie de agarosa al 0,9% (en *buffer* Veronal sódico pH 8,6). Estas proteínas, al ser sometidas al campo eléctrico, se separarán según su movilidad electroforética; esta dependerá de las cargas eléctricas que posean las mismas según el pH, la fuerza iónica del medio en que fueron sembradas y el agar. El *buffer* utilizado es Veronal sódico pH 8,6; se aplica un voltaje de 3mA por porta durante 1 hora.

- b) En la segunda etapa se coloca en forma paralela a la línea de migración de las proteínas (Ags) los Acs. Luego de un período de 24 hs en cámara húmeda los anticuerpos habrán difundido a través de la agarosa hasta encontrarse con sus antígenos correspondientes; observándose arcos de precipitación en la zona de equivalencia inmunológica.

#### Contrainmunolectroforesis

Esta técnica utiliza una superficie de agarosa al 0,9 % (en *buffer* veronal sódico pH 8,6) con dos pocillos a una distancia determinada. En el pocillo próximo al ánodo se coloca el Ac, y en el próximo al cátodo el Ag. Se aplica un voltaje de 3mA por porta durante una hora. En estas condiciones el Ag migrará hacia el polo positivo y el Ac será arrastrado por el movimiento del agua que embebe el gel hacia el polo negativo por el fenómeno de electroendósmosis.

De esta manera ambos, Ag y Ac, se mueven uno hacia el otro y al encontrarse en la zona de equivalencia inmunológica se producirá una banda de precipitación.

## TRABAJO PRÁCTICO Nº3: TÉCNICAS SEROLÓGICAS DE AGLUTINACIÓN

Las técnicas serológicas de aglutinación son de mucha utilidad para los diagnósticos de laboratorio. Se basan en la aparición de una aglutinación visible a simple vista cuando se enfrentan antígenos particulados con sus anticuerpos específicos.

Se fundamentan en la interacción primaria y secundaria.

Cuando consideramos un diagnóstico de laboratorio, este puede ser directo o indirecto. Será directo cuando nuestra incógnita es el antígeno e indirecta cuando la incógnita son los anticuerpos correspondientes. Cuando consideramos las técnicas, hay variantes como las que mencionamos a continuación:

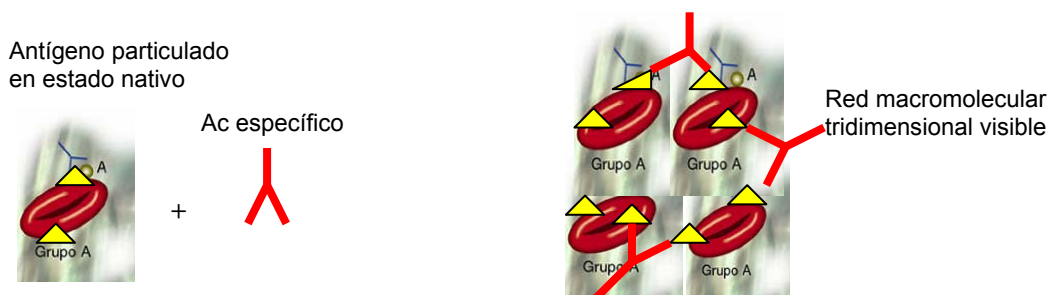
1. Aglutinación directa (AD)
2. Aglutinación pasiva o indirecta (AP o AI)
3. Aglutinación reversa pasiva (ARP)
4. Inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

### 1- AGLUTINACIÓN DIRECTA (AD)

Puede ser cualitativa o cuantitativa. La aglutinación directa cualitativa se realiza en medio líquido enfrentando anticuerpos conocidos con un **antígeno particulado** en forma nativa con su Ac específico, luego de unos minutos de agitación (favorece el fenómeno) se observa la aglutinación. Por ej. detección de grupos sanguíneos (hemoaglutinación).

La aglutinación directa cuantitativa solo permite una estimación aproximada de los Acs. Se realiza en medio líquido procediendo a la titulación del suero. Por ej. detección de anticuerpos antisalmonellas para el diagnóstico serológico de fiebre tifoidea, detección de Acs antibrucelas en el de brucelosis, detección de Acs antitoxoplasma gondii. Pueden presentar problemas del fenómeno de prozona.

Figura 1: AD



### 2. AGLUTINACIÓN INDIRECTA (AL) O PASIVA (AP)

Esta técnica inmunológica se basa en que los Acs. solubles pueden fijarse sobre partículas más grandes, por ej. glóbulos rojos, partículas de látex, etc.

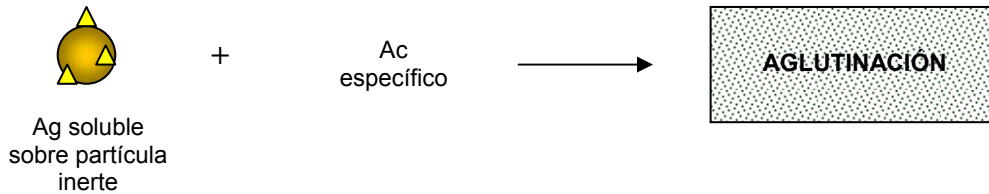
Muchos Acs se unen espontáneamente a los glóbulos rojos de distintas especies, otros Acs. pueden ser absorbidos a los glóbulos rojos mediante técnicas especiales (usando ácido tánico o glutaraldehído). Estos GR recubiertos o sensibilizados se utilizan en muchas técnicas de aglutinación pasiva para la detección de Acs. contra hongos, bacterias, protozoos.

También los Acs pueden pegarse a partículas inertes de bentonita o de látex.

Ej. de estas técnicas tenemos en la detección del factor reumatoideo, proteína

c reactiva, antígenos meningococcicos, anticuerpos anti *Tripanosoma cruzi*.  
Esta técnica es más sensible que la aglutinación directa.

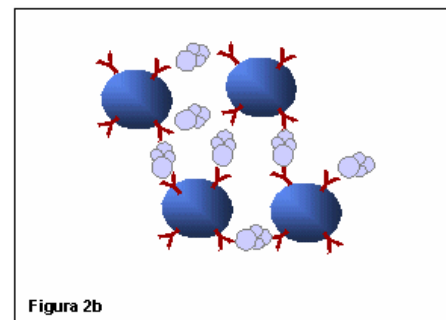
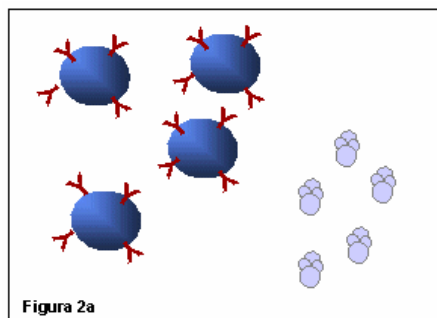
Figura 2: AI o AP



### **3 AGLUTINACIÓN REVERSA PASIVA (ARP)**

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

Figura 3: ARP



### **4- INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN:**

Existen virus que pueden aglutinar los glóbulos rojos de ciertas especies. Esta cualidad permite detectar Acs específicos contra ese virus en el suero del paciente, ya que este se unirá específicamente al virus y este perderá así su capacidad de aglutinar los glóbulos rojos, es decir se inhibe la hemoaglutinación viral, lo que indica la presencia del anticuerpo respectivo. Por ej. en la detección de Acs anti rubéola, sarampión y otros.

### **DESARROLLO DEL PRÁCTICO**

Se realizarán las siguientes pruebas de aglutinación y floculación:

#### **REACCIÓN DE VDRL**

##### **Prueba de floculación directa**

La purificación de dos sustancias reactivas a partir del músculo de corazón de buey, cardiolipina y lecitina, condujeron al Ag. más 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 y reactivos:**

- ❖ Polocubetas de Kline
- ❖ Microscopio
- ❖ Pipeta de 50ul
- ❖ Antígeno de VDRL

### **Ensayo cualitativo (prueba rápida de floculación en placa para suero o plasma)**

#### **Procedimiento**

Colocar 50 ul de cada una de las muestras de suero o plasma 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 10X.

#### **Interpretación de resultados**

Los resultados de la prueba sobre portaobjetos se clasifican en:

- ❖ No reactiva (no hay floculación)
- ❖ Débilmente reactivas (ligera floculación)
- ❖ Reactiva (floculación definitiva, definida, nítida)

### **Prueba de VDRL cuantitativa**

Todos los sueros reactivos deben diluirse en forma seriada al  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ , y así sucesivamente. Esta reacción detecta reaginas (Acs) que son características de la sífilis, pero no específicas. En diversos casos pueden existir personas sanas, o que cursen alguna otra enfermedad "falsos reactivos biológicos". Por ej. mujeres embarazadas, pacientes con hepatitis, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas agudas. En estos casos se recomienda confirmar con una prueba específica como la FTA.

## **DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO**

### **Prueba de Hemaglutinación directa**

#### **Sistema ABO: Fundamentos**

Los Ags eritrocitarios A y B son polisacáridos constituyentes de la membrana de los GR de los individuos que poseen los genes A y B, respectivamente. Ac antiA y antiB se hallan en el suero de personas cuyos hematíes no tiene el Ag correspondiente. Estos Acs se unen a los hematíes que poseen el correspondiente determinante antigénico produciendo una aglutinación directa.

Las reacciones con suero antiA o antiB o con ambos, determinan e identifican los grupos sanguíneos A, B, o AB respectivamente. La ausencia de aglutinación con antiA, antiB determinan el grupo O.

### **Materiales y reactivo**

- ❖ Suero antiA y antiB
- ❖ Placas de vidrio
- ❖ Pipetas Pasteur
- ❖ Varillas de vidrio

### **Prueba en placa de vidrio**

Colocar dos gotas de sangre entera (sin coagular) o suspensión de GR al 35-45% en una placa de vidrio. Agregar una gota de suero de grupo sanguíneo específico (antiA, antiB) sobre cada una de las gotas de sangre. Mezclar con una varilla de vidrio. Efectuar movimientos rotatorios lentos de la placa. Examinar la presencia de aglutinación durante un tiempo que no exceda los dos minutos.

Todos los resultados de las muestras de los GR probados deben ser confirmados con la prueba indirecta o inversa, usando suero del paciente y células conocidas del grupo A y B.

### **Interpretación de los resultados**

Anti A	Anti B	grupo sanguíneo	Frecuencia %
-	-	O	45
+	-	A	40
-	+	B	1
+	+	AB	4

### **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-Tripamosoma cruzi (ENFERMEDAD DE CHAGAS)**

#### **Hemoaglutinación indirecta cuantitativa (HAI)**

### **Materiales y reactivos**

- ❖ Policubetas de poliestireno de 96 pocillo en U
- ❖ Micropipetas automáticas de 25 ul
- ❖ Microdiluidores para 25 ul o pipetas automáticas multicanal
- ❖ Glóbulos rojos de carnero o pollo, estabilizados con formol y sensibilizados con antígeno. 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 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 calibrador.
- 4- Estas mismas diluciones sucesivas dobles pueden hacerse con la pipeta multicanal, de 25 ul. 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. Dejar en reposo en una superficie plana, sobre un papel húmedo (evita las cargas electrostáticas) y en una mesada libre de vibraciones.
  - 5- La lectura se realizará en el tiempo estipulado del productor.
  - 6- 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.

## **DETECCIÓN DE HORMONA GONADOTROFINA CORIONICA (HGC)**

### **Prueba de inhibición de la aglutinación en látex**

La HGC es una hormona glicoprotéica 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 neoplasmas trofoblásticos y no trofoblásticos 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 embarazo.

La prueba conocida como gravindex es una **Inhibición de la aglutinación**.

### **Materiales y reactivos**

- ❖ Placas de vidrio
- ❖ Pipetas Pasteur o goteros
- ❖ Varillas de vidrio o palillo mezclador
- ❖ Suero anti HGC
- ❖ Partículas de látex-HGC
- ❖ Cronómetro
- ❖ Orina completa

### **Procedimiento**

Colocar una gota de orina (primera de la mañana) en la placa de vidrio y agregar una gota de suero anti-HGC, mezclar y agregar una gota de látex- HGC, mezclar y balancear la placa durante 2 min. De ser necesario 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.

## **DETECCIÓN DE FACTOR REUMATOIDEO**

### **Prueba de aglutinación indirecta**

El Factor Reumatoideo (FR) es una IgM que reacciona con la porción Fc de la IgG. Por técnicas más sensibles se halló esta misma actividad en IgG e IgA.

Las reacciones más comunes para determinación del FR son: a) Aglutinación de partículas inertes (látex) cubiertas con gamma globulina humana y b) Aglutinación de eritrocitos de carnero cubiertos con IgG de conejo (Reacción de Rose Ragan, Waaler Rose).

La globulina se obtiene por fraccionamiento alcohólico, lo que hace que el grado de pureza en IgG sea variable. El FR reacciona mejor con moléculas alteradas de IgG humana y además reacciona en forma cruzada con IgG de conejo.

### **Materiales y reactivos**

- ❖ Tubos de Kahn
- ❖ Pipetas de 1ml
- ❖ Micropipetas de 20ul
- ❖ Placa de vidrio
- ❖ Varillas o palillos mezcladores
- ❖ *Buffer* de reacción y partículas de látex con IgG humana
- ❖ Cronómetro
- ❖ Suero del paciente

### **Procedimientos**

Preparar en tubo de Kahn una dilución del suero en estudio, colocar 20 ul de esta dilución en la placa de vidrio y agregar 20 ul del reactivo de látex. Mezclar con los palillos, balancear durante 2 min. y mirar contra una fuente de luz.

### **Interpretación de los resultados**

**La presencia de aglutinación indica una reacción positiva.** Todos los sueros que den resultados positivos, se deben titular, pues solo los títulos mayores de 1/60 tienen significado clínico reumatológico. Así el 80% de las artritis reumatoideas son ceropositivas. El mayor porcentaje de los resultados positivos (hasta el 95%) se observa en la enfermedad avanzada. Los pacientes normales presentan una baja incidencia de FR (de 2 a 4%) que aumenta con la edad, de forma que las personas de edad mayor de 60 años tienen una incidencia de resultados positivos del orden del 5 al 10%.

## **TIPIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS**

### **Aglutinación en lámina**

El procedimiento siguiente es un método general para realizar la prueba de aglutinación en lámina.

- a) Usar láminas de vidrio marcadas con lápiz en cuadrados de 2,5 cm.
- b) Colocar una gota de 0,025 ml de cada antisuero polivalente somático.
- c) Agregar una gota de 0,025 ml del antígeno preparado de acuerdo con las especificaciones ya enunciadas en el práctico "preparación de antígenos bacterianos". Mezclar con varilla (cada mezcla debe tener un área de 5x20 mm aproximadamente), inclinar continuamente la lámina y leer al minuto.
- d) Leer las mezclas con una buena luz indirecta con fondo oscuro. El grado de aglutinación se informa del modo siguiente:  
4+: 75-100 % de organismos aglutinados



- 3+: 75% aproximadamente de organismos aglutinados
- 2+: 50% aproximadamente de organismos aglutinados
- 1+: menos del 25% de organismos aglutinados

Conviene tener en cuenta que:

- 1) Los sueros se entregan diluidos al uso
- 2) se han determinado para todos ellos las reacciones heterólogas y se ha establecido la absorción requerida para la eliminación de su inespecificidad.

Si se observa aglutinación en un suero polivalente, se utilizan los sueros monovalentes correspondientes a ese polivalente, uno de los cuales responderá con aglutinación francamente positiva. Una aglutinación fina y débil con todos los antisueros hace sospechar la condición de rugosidad de la cepa; por lo tanto, siempre es indispensable realizar la aglutinación de un testigo con solución fisiológica o suero normal de conejo para demostrar que la cepa no aglutina.

La lectura debe ocurrir dentro del minuto. El tiempo debe ajustarse ya que pueden aparecer reacciones tardías que presten a confusión.

## **PRÁCTICO Nº4: 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 celulares y microorganismos invasores del huésped una vez que han sido reconocidos como extraños o "no propios".

### **Componentes más activos del sistema fagocítico**

Leucocitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos.

Fagocitos mononucleares: monocitos y macrófagos libres e hísticos (células de Kuffer, macrófagos alveolares, macrófagos peritoneales, macrófagos sinoviales, células de revestimiento de los sinusoides, de médula ósea, ganglios linfáticos y bazo).

Los polimorfonucleares contienen en su citoplasma dos tipos de gránulos:

- 1) Gránulos primarios o azurófilos: producidos en los primeros estadios de maduración, electrónicamente densos, contienen enzimas diversas: grandes cantidades de mieloperoxidasa (MPO), lisozimas, elastasas, proteínas catiónicas con gran capacidad bactericida.
- 2) Gránulos secundarios: de aparición posterior, menos densos electrónicamente, carecen de peroxidasa y enzimas digestivas, pero contienen lactoferrina (proteína microbicida), varios tipos de fosfatasa, colagenasa y proteínas que se unen a la vitamina B<sub>12</sub>.

La maquinaria energética difiere en los PMN paralelamente a su madurez, siendo del tipo oxidativo en el inicio, y en sus períodos finales puede obtenerla 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) hasta llegar o no al lugar de encuentro (tejido o sangre) con el agresor, conduciendo finalmente a un próximo estado de inflamación donde se localicen las acciones del huésped vs. agresor.

La fagocitosis en secuencia se traduce 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, constituyendo el fagolisosoma y de esta manera vuelca su contenido en el fagosoma.

Existen dos mecanismos fundamentales para la destrucción de la bacteria fagocitada. 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.

**Quimiotaxis:** por esta propiedad los fagocitos se dirigen hacia zonas afectadas o invadidas por microorganismos, atraídos por la acción de productos bacterianos, mediadores químicos de células defensivas, factores séricos del huésped.

La membrana de los PMN y otros fagocitos expresan receptores para quimiotaxinas y opsoninas. Después de unirse a las quimiotaxinas, las moléculas receptoras son internalizadas y reemplazadas por nuevos receptores. Las opsoninas son moléculas que, adheridas a la superficie de las bacterias, facilitan su fagocitosis. Cuando la membrana hace contacto con las bacterias a través de estos ligandos, se activan los mecanismos de destrucción bacteriana.

**Reconocimiento:** el reconocimiento que se establece entre el fagocito y la partícula ingerible con su superficie "nueva", modificada, estimula su ingestión. De esta manera son capaces de diferenciar, por ejemplo, hematíes seniles o dañados de los normales.

Las opsoninas más importantes (aunque no las únicas) son la IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> con sus fracciones Fab y Fc intactas, fracciones de C3 y C5. Las bacterias también activan la vía de la properdina provocando una mayor actividad opsonizante. Una vez unidos se interrelacionan con un receptor de membrana del fagocito estimulando de esta manera la ingestión.

**Ingestión:** el fagocito, cuando ha contactado y reconocido a la partícula, emite prolongaciones pseudopódicas de su citoplasma alrededor de ella, engloba la partícula en una vesícula, el fagosoma, tapizada por parte de la membrana celular del fagocito que ahora delimita esta vesícula. 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 con el fagosoma, liberando en su interior el material enzimático y constituyéndose el denominado fagolisosoma, que puede ir observándose en la célula en diferentes estadios de digestión.

Aquellos productos que no son digeribles quedan retenidos en el citoplasma formando corpúsculos 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 que libera el fagosoma:

- 1- El pH ácido propio del fagosoma, conseguido posiblemente por la producción de ácido láctico y carbónico.
- 2- Lactoferrina.
- 3- Ácidos orgánicos.
- 4- Compuestos granulares enzimáticos (lisozima) y no enzimáticos, proteínas catiónicas.
- 5- Peróxido de hidrógeno.
- 6- Sistema mieloperoxidasa (MPO)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-cofactor (iones halógenos).

El sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-cofactor, actúa por liberación de MPO al fagosoma, por degranulación, junto con iones halógenos (cofactores de reacción) disminuyendo la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 Linfocitos T (LT) y Linfocitos B (LB) constituyen la base celular de la respuesta inmune.

## **DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO**

### **OBJETIVOS**

***Implementación práctica: estudiar la actividad funcional de PMN referidas a: adhesividad, fagocitosis y lisis.***

***Preparación y obtención de PMN de distintas personas.***

***Observaciones microscópicas con Giemsa. Conclusiones.***

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 de *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 al microscopio, teniendo en cuenta que las levaduras vivas se tiñen de violeta y las muertas (lisadas) no toman el colorante.

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:**

- ❖ 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

### **Métodos**

1) Separación de PMN por adhesividad

- a) Sobre los portaobjetos de contorno esmaltados depositar 1 ó 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 1-2 hs. en estufa.
- d) Descartar el coágulo evitando tocar la superficie de adherencia celular.
- e) Lavar 1 ó 2 veces con solución fisiológica para eliminar las células no adheridas (evitar que se seque el preparado).
- f) Colorear agregando 20 gotas de Giemsa cada 10 ml de agua.
- g) Observar al microscopio los leucocitos adheridos.

## 2) Evaluación de la capacidad de fagocitosis y lisis

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

### **Interpretación de resultados**

La capacidad 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.

## **TRABAJO PRÁCTICO Nº 5: TÉCNICAS DE INTERACCIÓN PRIMARIA**

Existe una serie de métodos de interacción primaria para la detección de antígenos y anticuerpos, de gran sensibilidad y marcada especificidad, entre los que merecen destacarse el enzimoimmunoanálisis (ELISA), la inmunofluorescencia directa e indirecta (IFD e IFI), el radioinmunoanálisis (RIA), entre otros. Todas estas técnicas se caracterizan porque la identificación del antígeno o del anticuerpo tiene lugar por una interacción simple, sin la participación de fenómenos asociados, como ocurre en las reacciones de interacción secundaria.

En el presente práctico desarrollaremos las técnicas de ELISA, IFD e IFI.

### **1. TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA**

Son técnicas que utilizan sustancias fluorescentes como sistema indicador de la interacción primaria o unión Antígeno-Anticuerpo. Son altamente sensibles y específicas. Son complejas, requieren equipamiento adecuado, por lo que son costosas.

Podemos dividir las técnicas de Inmunofluorescencia en: Directa e Indirecta.

#### **A) Inmunofluorescencia directa**

Se usa para la detección de Ag. y se basa en la marcación de Acs. específicos con una sustancia fluorescente que puede ser la Rodamina o el Isotiocianato de fluoresceína que, al reaccionar específicamente con el Ag. en estudio, produce la interacción primaria, la que es puesta de manifiesto a través de la observación con el microscopio de fluorescencia.

El procedimiento tiene una fase de:

- a) Preparación de la muestra (que puede ser tejido, puede ser moco respiratorio o vaginal, tejido de necropsia, etc.), que se depositan sobre un portaobjeto (improntas).
- b) Proceso de fijación al vidrio.
- c) Formación del complejo Ag-Ac: Tinción con el Ac. específico marcado con la sustancia fluorescente que tiene un tiempo de incubación variable.
- d) Lavado: con él se elimina el exceso de Acs. marcados que no se han unido.
- e) Secado.
- f) Montaje: se adiciona líquido de montaje (que le da un índice de refracción adecuado para la observación microscópica), se protege con un cubreobjetos (montaje).
- g) Observación al microscopio de fluorescencia. Se observan imágenes fluorescentes características según el Ag. en estudio.

#### **Usos**

Por ej., detección de Clamydias en moco cervical, virus de la rabia en el cerebro de un animal presuntamente infectado, de Ag. del virus sarampión en el moco respiratorio, de Ag. del virus dengue en el cerebro de un mosquito infectado, Ag. de virus respiratorios en secreciones respiratorias.

#### **B) Inmunofluorescencia indirecta:**

Sirve tanto para la detección de Ag. como para la detección de Acs.

### **B1) Detección de Antígenos**

- a) Preparación de la muestra que puede ser tejido moco-respiratorio o cérvico-vaginal, tejido de necropsia, etc.
- b) Proceso de fijación del Antígeno al vidrio: la muestra se deposita sobre un portaobjeto (improntas) y se fija mediante acetona o calor.
- c) Formación del complejo Ag-Ac: la reacción del Ag. con el Ac. específico tiene un tiempo de incubación variable.
- d) Lavado: se lava con soluciones *buffer* para eliminar el exceso de Ac. específicos que no se han unido al Ag.
- e) Secado: este paso se realiza a temperatura ambiente o se puede realizar para acelerarlo en estufa de 37°C.
- f) Conjugación: se hace reaccionar por incubación con el conjugado (anti-gamma globulina, específica de especie) marcada con la sustancia fluorescente.
- g) Se lava para eliminar el exceso de anti-gamma globulina marcada (conjugado).
- h) Se realiza el montaje.
- i) Observación al microscopio de fluorescencia. Se observan imágenes fluorescentes características según el Ag. en estudio.

### **Usos**

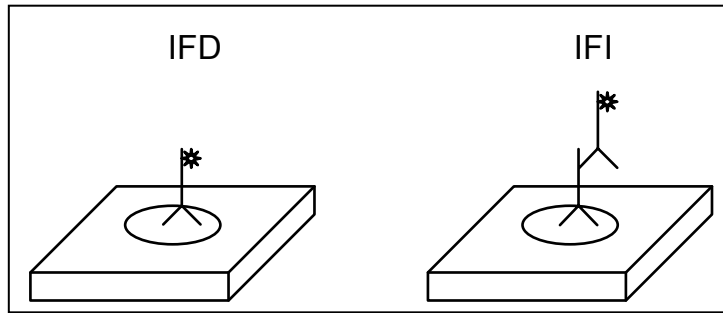
Por ej., la detección de Clamydias en moco cervical, virus de la rabia en el cerebro de un animal presuntamente infectado, de Ag. del virus sarampión en el moco respiratorio, de Ag. del virus dengue en el cerebro de un mosquito infectado, Ag. de virus respiratorios en secreciones respiratorias.

### **B2) Detección de Anticuerpos**

- a) Preparación de la muestra: se extrae sangre, se deja separar el suero, se centrifuga a 5000 rpm.
- b) Antígeno: improntas de cultivos celulares infectados con virus o clamydias, parásitos o bacterias.
- c) Formación del complejo Ag-Ac: La reacción del Ag con el **suero de estudio** (para detectar la presencia de Acs.) tiene un tiempo de incubación variable.
- d) Lavado: se lava con soluciones *buffer* para eliminar Ac y proteínas presentes en el suero que no se han unido al Ag .
- e) Secado: este paso se realiza a temperatura ambiente o bien, para acelerarlo, en estufa de 37°C.
- f) Conjugación: se hace reaccionar por incubación con el conjugado (anti-gamma globulina, específica de especie) marcada con la sustancia fluorescente.
- g) Se lava para eliminar el exceso de anti-gamma globulina marcada (conjugado).
- h) Se realiza el montaje.
- i) Observación al microscopio de fluorescencia. Se observan imágenes fluorescentes características según el Ag usado en el estudio.

### **Usos**

Por ej., detección de anticuerpos contra parásitos (causantes de toxoplasmosis, chagas), bacterias (causantes de sífilis), virus (causantes de sarampión, rubéola, HIV).



## Consideraciones generales para la aplicación de técnicas de inmunofluorescencia

### Controles para técnicas de inmunofluorescencia

Controles negativos o positivos: lo que implicará la ausencia o presencia de antígenos o anticuerpos, de acuerdo con 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.

### 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 observador experimentado y mucha prudencia en la interpretación de los resultados.

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

**OBJETIVO:** *poner de manifiesto antígenos (anticuerpos) presentes en la muestra en estudio, a través de técnicas de interacción primaria de Inmunofluorescencia.*

### Materiales

- ❖ Kits diagnósticos de Inmunofluorescencia
- ❖ Sueros de pacientes.
- ❖ Micropipetas 10 ul, 100 ul
- ❖ *Tips*
- ❖ Agua destilada
- ❖ Hipoclorito de sodio
- ❖ Microscopio de inmunofluorescencia.

### Procedimiento

Los pasos a seguir son los descritos en :



- A) Inmunofluorescencia directa:
- B) Inmunofluorescencia indirecta

Cuyos tiempos de incubación, volúmenes de reacción dependerán de los *Kits* diagnósticos a utilizar.

## 2. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA, EIE)

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 (inmunoreactantes). Son técnicas de alta especificidad y debido a la característica de la actividad enzimática de alta sensibilidad.

Independientemente de su clasificación los EIE comprenden dos etapas generales:

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

Los EIE se clasifican en: a) Homogéneos: se desarrollan en fase líquida y b) Heterogéneos: se emplea un soporte sólido para inmovilizar uno de los inmunoreactantes.

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

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

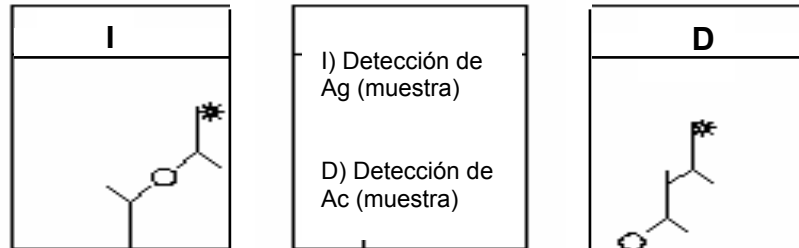
### 1) EIE de amplificación de actividad o no competitivos

Se subdividen de acuerdo con qué inmunoreactante (Ag o Ac) esté unido a la fase sólida.

- a) Inmovilización a la fase sólida.
- b) **Reacción Ag-Ac:** se agrega la muestra a la fase sólida en concentración y tiempo de reacción o incubación variables.
- c) Lavados para eliminar el exceso del inmunoreactante agregado en la muestra.
- d) **Detección de la unión Ag-Ac:** se agrega el conjugado enzimático, que detectará la unión Ag-Ac. uniéndose al inmunoreactante 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 una reacción coloreada que será producto de la acción enzimática y esto demostrará la unión Ag-Ac.
- g) **Detención 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 Ag-AC, por lo que el inmunorreactante (ej. el anticuerpo específico contra un antígeno determinado) se encuentra en la muestra.

### Conjugados:

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



### 2) EIE de modulación de actividad o competitivos

Se subdividen de acuerdo con qué inmunorreactante (Ag. o Ac.) esté unido a la fase sólida

- Inmovilización a la fase sólida.
- Reacción Ag-Ac:** se agrega la muestra 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).
- Lavados para eliminar el exceso de inmunorreactantes.
- 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.
- Detención de la reacción:** mediante el agregado de ácidos o álcalis que modifican el pH de acción enzimática impidiendo su actividad.
- Lectura:** la lectura puede ser visual o por lector espectrofotométrico de EIE.
- Interpretación de resultados:** una reacción **no** coloreada o una **disminución** de la intensidad de coloración (absorbancia espectrofotométrica) implica detectar la unión Ag-Ac, por lo que el inmunorreactante (por 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

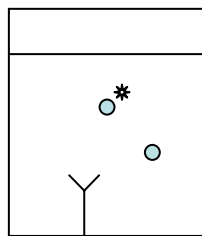
**Peroxidasa:** la más usada se obtiene del rabanito o HRP, son hemoproteínas que transfieren Hidrógeno (H) desde un donante a un aceptor como el agua oxigenada u otros sustratos usados.

Sustratos usados: peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o peróxido de urea.

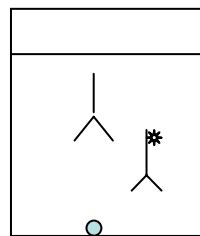
Cromógenos usados: Ortofenilendiamina (OPD); 3 metil-2-benzotiazolinona hidrazona conocido como (MBTH); 2,2-azino-di-(3-etil-benzotiazolina)6-sulfonato de diamonio conocido como (ABTS).

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

Sustratos usados: el para-nitrofenilfosfato (p-NPP).



Competencia  
Ag muestra vs  
Ag\* por el Ac  
Inmovilizado



Competencia  
Ac muestra vs  
Ac\* por el Ag  
Inmovilizado

## DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

**OBJETIVO:** poner de manifiesto antígenos (o anticuerpos) presentes en la muestra en estudio, a través de técnicas de interacción primaria de Enzimoimmunoensayo.

### Materiales

- ❖ Kits diagnósticos de ELISA
- ❖ Sueros de pacientes.
- ❖ Micropipetas 10ul, 100 ul
- ❖ Tips
- ❖ Agua destilada
- ❖ Hipoclorito de sodio

### Procedimiento

Los pasos a seguir son los descritos en:

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

cuyos tiempos de incubación, volúmenes de reacción dependerán de los Kits diagnósticos a utilizar .

## TRABAJO PRÁCTICO N°6: 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.

#### Titulación de sueros

Las técnicas de titulación de sueros son metodologías semicuantitativas.

Titulo del suero: se define así a la máxima dilución del suero (Ac.) a analizar que es capaz de reaccionar con una cantidad constante del Ag. correspondiente (previamente titulado), en forma tal que se hace 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 y titulado) observándose la reactividad hasta la última dilución que resulte positiva. La inversa de esta dilución será el título del suero para dichas pruebas serológicas.

Por ej: si la dilución 1/1024 reacciona y no lo hace la dilución 1/2048, el título será 1024. Son técnicas serológicas de singular importancia diagnóstica, ya que pueden servir para:

- a) Dar un resultado Reactivo (+) o No reactivo (-)
- b) Correlacionar con la gravedad de la patología
- c) Monitoreo de terapia o seguimiento
- d) Establecer el período: agudo o crónico

Estos títulos pueden verse afectados por el estado del reactivo conjugado, para lo cual este debe ser controlado.

Se denomina “conjugado” a aquellos reactivos Acs. o Ags. que tienen adheridos en su estructura sustancias fluorescentes, una Enzima, o una sustancia química, o radioisotópica. Este estado se logra mediante procesos químicos o físicos, y su control debe ser periódico para ver el estado del reactivo.

El control del conjugado se aplica en todas las técnicas de inmunofluorescencia, ELISA, RIA, etc.

#### Título del conjugado

Es la mayor dilución del mismo que permite obtener un resultado de una técnica serológica con mayor precisión y exactitud.

### DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

#### TITULACIÓN DEL SUERO

##### OBJETIVO

***Determinar el título del suero que permitirá definir cuantitativamente el nivel de anticuerpos o antígenos presentes en una muestra.***

#### Procedimiento

Se utilizarán como “modelo” las técnicas de detección de Enfermedad de Chagas y otras parasitosis, tomadas del Manual de Laboratorio del Instituto Nacional de Chagas. “Dr Mario Fatala Chaben”. Bs. As., Argentina.

## **HEMOAGLUTINACIÓN INDIRECTA CUANTITATIVA (HAI)**

### **Materiales**

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

### **Reactivos**

- 1 Glóbulos rojos de carnero o de pollo, estabilizados con formol y sensibilizados con antígeno. En caso de presentarse liofilizado, se debe resuspender en la solución estabilizadora 2 horas antes de su uso, mezclando por inversión cada 30 minutos.
- 2 Solución salina estabilizadora (SSE).
- 3 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 problemas previamente a 56°C durante 30 minutos, por razones de seguridad.
3. Tomar 25 ul de suero de la fila A, y pasándolos progresivamente a las filas subsiguientes (B, C, D, etc.), aspirando y descargando no menos de quince veces para homogeneizar la dilución. Se completan así las diluciones dobles (1/4, 1/8, etc.).
4. 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.
5. Dejar en reposo en una superficie plana, sobre papel húmedo (evita las cargas electrostáticas) y en una mesada libre de vibraciones.
6. La lectura se realizará en el tiempo estipulado por el productor.
7. 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.

## **B) TITULACIÓN DEL CONJUGADO:**

### **Objetivo**

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.

### **Procedimiento**

Se utilizarán como “modelo” las técnicas de detección de Enfermedad de Chagas y otras parasitosis, tomadas del Manual de Laboratorio del Instituto Nacional de Chagas. “Dr Mario Fatala Chaben”. Bs. As. Argentina.

## **INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CUANTITATIVA (IFI)**

### **Materiales**

- ❖ 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.

- ❖ Estufa de Incubación a 37°C.
- ❖ Heladera.
- ❖ Caloventor.
- ❖ Cámara húmeda.
- ❖ Portaobjetos de vidrio no fluorescente y espesor no mayor de 1,2 mm marcados con 12 divisiones indelebles de forma circular de 8 mm de diámetro y cubreobjetos de 24x48 mm.
- ❖ Matraces aforados de 1000 ml.
- ❖ Probetas de 100 ml.
- ❖ Pipetas automáticas de 20 ul. y 200 ul.
- ❖ Jarras de Koplín.
- ❖ Frasco gotero para líquido de montaje.
- ❖ Cajas plásticas con tapa para almacenar portaobjetos.

### **Materiales necesarios para la titulación de antigamma globulina**

- ❖ Sueros testigo de concentración (título) conocido.
- ❖ Sueros no reactivos.
- ❖ Conjugado antigamma globulina a titular.
- ❖ *Buffer* PBS pH 7,4
- ❖ Tubos de Khan.
- ❖ Portaobjetos para Inmunofluorescencia con antígenos específicos.
- ❖ Cámara Húmeda.
- ❖ Líquido de montaje (glicerina con *buffer* PBS pH 8)
- ❖ Cubreobjetos de 18x 24 mm

### **Procedimiento**

- a) Preparar diluciones dobles del suero testigo de concentración conocida.
- b) Numerar correlativamente los portaobjetos (armar tantos juegos de portaobjetos 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 portaobjetos, 20 ul de *buffer* PBS.
- f) Incubar durante 30 min. a 37°C en cámara húmeda.
- g) Lavar con *buffer* PBS (tres lavados de cinco minutos cada uno) y dejar secar a temperatura 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 cubreobjetos.
- m) Mirar al microscopio de inmunofluorescencia.
- n) Determinar los títulos del suero testigo para cada dilución del conjugado usada: los parásitos se teñirán con el fluorocromo de un color verde manzana. La fluorescencia es particularmente intensa en la membrana y el flagelo del parásito. Se observará la fluorescencia hasta que el 50% de los parásitos observados en un campo de fluorescencia alrededor de toda la membrana y flagelo del parásito.

- o) Registrar los resultados en la planilla de trabajo.  
p) Determinación del Título del Conjugado: se establece como título del conjugado a aquella dilución del mismo que permita obtener un título del suero testigo que coincida con la concentración teórica del mismo.

### 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° 5 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.: 128**  
**EJEMPLO DE TITULACIÓN (Para un título estimado del conjugado de 1/500)**

Diluciones del conjugado	Título del testigo	Control negativo	PBS (inespecificidad)
1/200	1024	+ débil	Negativo
1/400	512	+débil	Negativo
1/600	256	Negativo	Negativo
<b>1/800</b>	<b>128</b>	<b>Negativo</b>	<b>Negativo</b>
1/1000	64	Negativo	Negativo

El título del conjugado corresponde a la máxima dilución que da fluorescencia con el suero testigo 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.



## ANEXO

---

### 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 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, o también por polimerización de acrilamida con un pequeño porcentaje de un derivado funcional de la misma que forma uniones cruzadas con polímeros de acrilamida.

**Almidón:** los geles de almidón no son tan ampliamente utilizados como los de agarosa o acrilamida, ya que la solución de almidón debe calentarse a 100°C y luego desgasificarse, proceso sumamente engorroso. 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 usa en técnicas de inmunodifusión y no en las de inmunoelectroforesis.

**Agarosa:** la agarosa es el agar sin agarpectina y se prefiere a este por ser esencialmente una molécula neutra, exhibir 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 se la emplea en las técnicas inmunoelectroforéticas, ya que el Ag y el Ac deben difundir libremente a través del gel. Otra ventaja de la misma es que puede fundirse recalentándose solo a 50°C; de este modo, proteínas tales como los Ac pueden ser mezcladas sin desnaturalizarse.

Con el advenimiento de las placas 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 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 es colocada en un campo eléctrico, estas 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 positivamente se desplazarán 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 tienden 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 en 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 solo 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 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 sus poros 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.

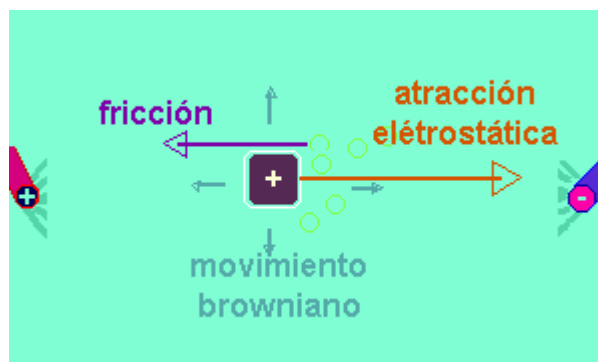


Figura 1

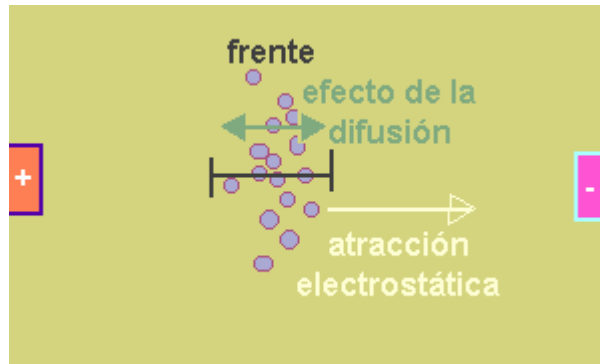


Figura 2

### 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 (isoelectrica) 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 contraiones. Al aplicar un voltaje, los contraiones se mueven, pero no sucede lo mismo con los grupos carboxilo fijados a la matriz del polisacárido. Los contraiones 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.

## OTRAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS DE INTERACCIÓN PRIMARIA

### TÉCNICAS DE 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 (**ceptor**) 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

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

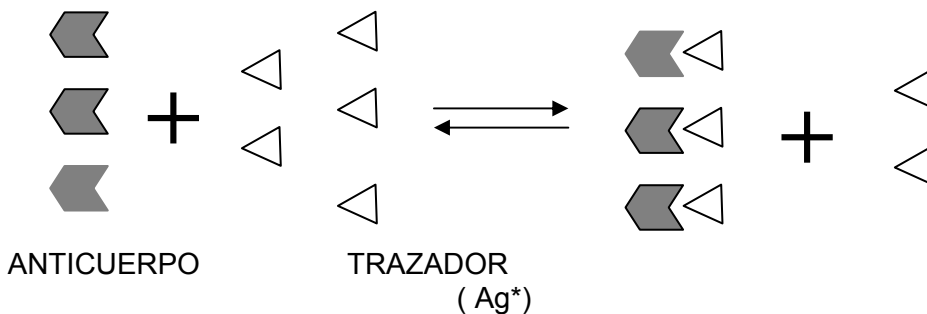


FIGURA N° 1

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)

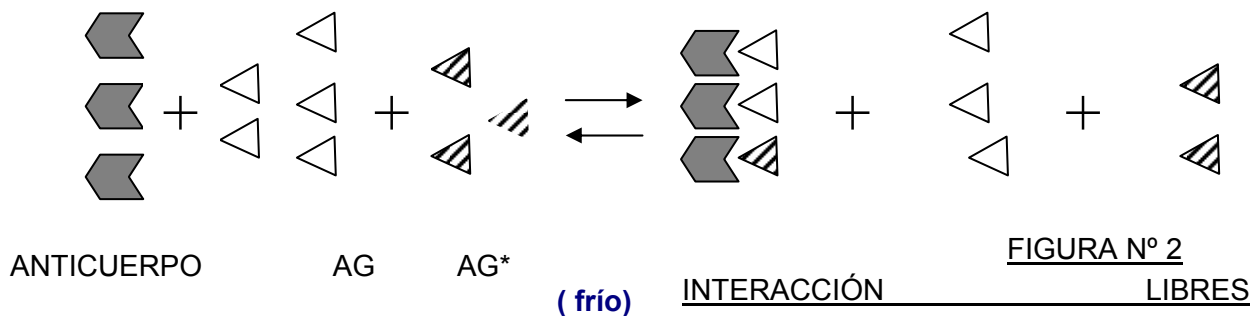


FIGURA N° 2

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 igualan.

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 debida 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.

### **Requerimientos para el RIA**

Los **componentes** de un **sistema de reacción de radioinmunoanálisis** son: la sustancia cuya concentración se desea medir (antígeno no marcado), esa misma sustancia marcada con un isótopo radiactivo (los más utilizados son el Yodo 125 y más raramente el yodo 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 estándar de concentración conocida.**
- 3) La sustancia por valorar debe poder obtenerse altamente purificada para su posterior marcación.**
- 4) El estándar 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  $^3\text{H}$  y el  $^{125}\text{I}$  (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  $^3\text{H}$  es de 12 años), y es un emisor  $\beta$  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  $^{125}\text{I}$  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 estos por el anticuerpo.

## UTILIDADES

**El RIA es una técnica que se utiliza para valorar sustancias como**

- Anticuerpos (**IgE, IgM**)
- hormonas proteicas (**FSH, Prolactina, T<sub>4</sub>**)
- hormonas esteroideas (**progesterona, testosterona estradiol**)
- drogas ( **morfina, bartituratos**), marcadores tumorales, antígeno de hepatitis B <vitamina B<sub>12</sub>, ferritina, etc.

## SEPARACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS

Los Linfocitos (Li) son considerados células centrales del sistema inmune. A partir de la dicotomización de la respuesta inmune fue posible establecer que existen dos poblaciones fundamentales de Linfocitos: los linfocitos T y los linfocitos B, con características distintivas en cuanto a su origen, su función y su fenotipo inmunológico.

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 DE POBLACIONES LINFOCITARIAS

### 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

- ❖ Sangre heparinizada (5U de heparina sódica/ml de sangre).
- ❖ Solución salina tamponada (SST).
- ❖ Solución de Hanks libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , 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. de 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  $\mu\text{m}$  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 ó 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 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 Linfocitos (Li) T presentan en sus membranas los receptores para los GRC, fácilmente identificables por tener la propiedad de formar con ellos rosetas espontáneas llamadas rosetas E. Este fue el primer marcador definido para los Li T. La unión de los Li T a los GRC 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 Li T normales de la sangre periférica forman rosetas a los 4°C, pero no a 37°C. En cambio, los linfocitos tímicos (timocitos) y los linfocitos T activados forman rosetas E tanto a 4°C como a 37°C.

### **Materiales**

- ❖ GRC en solución de Alsever.
- ❖ SSHB
- ❖ Preparación del reactivo para rosetas E;

Lavar los GRC con SSHB, centrifugando 5 min. a 1000 g.

Luego de lavar, descartar el sobrenadante con pipeta de Pasteur.

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**

- ❖ 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 min.



- ❖ Centrifugar 5 min. a 200 g.
- ❖ En este punto se pueden tomar dos caminos diferentes de acuerdo con la temperatura y tiempo de incubación, que nos llevan a la detección de dos poblaciones diferentes:
- ❖ Rosetas E 4°C: incubar en el refrigerador (4°C) durante toda la noche (o por lo menos 3 hs).
- ❖ Rosetas E 37°C : incubar 1 h. a 37°C
- ❖ Lectura: resuspender nuevamente y colocar una gota entre porta y cubreobjetos
- ❖ (observar al microscopio objetivo 40 x ó 63 x).
- ❖ Contar al menos 200 Li y determinar el porcentaje que forma rosetas. Se considera como roseta a todo Li que posea 3 o 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 LiT 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 Li T. Sin embargo, es necesario confirmar el resultado obtenido, con un estudio en el que se utilice un anticuerpo monoclonal que reconozca a los Li T 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/ mm<sup>3</sup> y se informa en %; debido a esto, se dice que es un método indirecto.

## **4. CITOMETRÍA 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 correceptoras 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 12x75 mm, 100 ul de sangre entera Anticoagulada y 5-20 ul 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 vortex y agitar 5 min. en la oscuridad.
4. Centrifugar a 200 x g, 5 min. a 4 °C y aspirar sobrenadante.
5. Agregar 2 ml 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 *microesfers* 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  $2 \times 10^7$  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  $150 \times g$ , durante 10 min. Resuspender las células en 10 ml de Hanks -10 frío y transferirlas a un tubo nuevo.
- 5) Agregar  $4 \times 10^8$  microesferas (1 ml de la suspensión comercial) para  $2 \times 10^8$  células 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  $2 \times 10^7$  cél./ml.
- 8) Repetir los pasos 4-7 en los pasos en que se requiera un mayor grado de pureza.

## TÉCNICA CITOMORFOLÓGICA PARA EL ESTUDIO FUNCIONAL DE PMN

Se utiliza una técnica 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 "*Candida*" en este ensayo es que ambas son destruidas por distintos mecanismos microbicidas: "*C. albicans*" por mecanismos microbicidas oxígeno dependiente, mieloperoxidasa dependiente, mientras que las "*Candida pseudotropicalis*" son destruidas por mecanismos oxígeno dependiente, mieloperoxidasa independiente.

### Método

1. Separación de PMN por adhesividad
  - a) Sobre los portaobjetos de contorno esmaltados depositar 1 ó 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 coágulo 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 min.
  - 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 cámara de Neubauer, como cualquier célula).
  - d) Se resuspenden las levaduras en solución de Hanks, agitando en vórtex con el objeto de obtener microorganismos aislados en suspensión homogénea y se ajustan a la concentración de  $5 \times 10^6$  levaduras, 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 *Candida* al preparado que tiene los Neutrófilos adheridos (evitar que se dessequen).
  - 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'. (20 ml de *buffer* fosfato + 40 gotas de Giemsa, 15'. Enjuagar con H<sub>2</sub>O).
  - 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 teñidas 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 *Candida*. 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 Hansk

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

**Alérgeno.** 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 subisotipo, 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.

---

\* Guía de T.P. de la **Cátedra de Inmunología**. Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de Buenos Aires.

**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.** 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 reumatoidea 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 epitope, 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 (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) y dos de IgA (IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>).

**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 epítipo 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 órgano 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  $\alpha$  y  $\beta$  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 linfóideo 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.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. INMUNOLOGÍA. Ivan Roitt. Jonathan Brostoff. David Male. 4ª y 5ª Edición editorial Harcourt. (1997 y 2000).
2. INMUNOLOGÍA E INMUNOQUÍMICA. FUNDAMENTOS. R. Margni. 5ª Edición editorial Panamericana (1998). (Temas de trabajos prácticos).
3. INMUNOBIOLOGÍA. Charles A. Janeway y col. Garland. (en Inglés y en español) 4ª Edición editorial Masson (2000) y 5ta Ed. 2001.
4. INTRODUCCIÓN A LA INMUNOLOGÍA HUMANA. Leonardo Fainboim; Leonardo Satz. 3ra y 4ta Edición, Taller gráfica Patricia S.R.L. (1995 y 1998).
5. INMUNOLOGÍA Y SEROLOGÍA. Carpenter y col. Edición en Inglés editorial Sauder.
6. GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS de la CÁTEDRA de INMUNOLOGÍA- Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de Buenos Aires.
7. INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR. Abbas y colaboradores. 4ta o 5ta Edición Saunders.
8. INMUNOLOGÍA. FUNDAMENTOS. Ivan Roitt.. 10º Edición 2003 editorial Panamericana.

## BIBLIOGRAFÍA ANEXA DE LIBRE ACCESO A TRAVÉS DE INTERNET

- <http://www.whfreeman.com/kuby>

Contiene textos del libro: *Kuby Immunology*, 4º edición, Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt y Barbara A. Osborne. También animaciones, casos clínicos, auto-evaluaciones y visualizaciones moleculares.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=imm.TOC&deph=2>

Contiene textos del libro: *Immunobiology*, 5ª edición, Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik, con links a un glosario interno del NHI (National Institute of Health), figuras, temas de TP en apéndice I (figuras con leyendas).

- <http://www.blink.biz/immunoanimations>

Contiene animaciones explicativas de distintos eventos inmunológicos, del libro: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5º y 6º edición, Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik.

- <http://pathmicro.med.sc.edu/book/immunol-sta.htm>

Contiene textos provenientes de la Universidad de Carolina del Sur, Cátedra de Inmunología. También archivos en formato PowerPoint y PDF, animaciones y auto-evaluaciones.

- <http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section12/sec12.jsp>

Contiene textos de: *The Merk Manual of Diagnosis and Therapy* con links a otros temas dentro de la misma página.

- <http://www.drscope.com/privados/pac/generales/inmunopatologia/index.html>

Contiene textos sobre Inmunopatologías.

- <http://www.citometriadeflujo.com>

Contiene un manual explicativo y casos clínicos, también links a revistas, libros, organismos oficiales y empresas comerciales.