

FACULTAD DE QUIMICA

DEPTO. DE SECRETARIA

Rep. 213/86

Dic. 3/86 MCR.

PROGRAMA DE INTRODUCCION A LA INMUNOLOGIA

(Aprobado por el Consejo de Facultad el
26.11.86)

Curso de Introducción a la Inmunología con orientación Molecular y Tecnológica.

Objetivo.-

El objetivo de este curso es introducir a los estudiantes en:
a) el conocimiento de los conceptos básicos de la Inmunología a través del estudio de las interacciones moleculares fundamentales en el sistema inmune y los efectos biológicos a los que ellas dan lugar; b) las aplicaciones tecnológicas derivadas de esos conceptos básicos.

Este objetivo surge de la importancia que, para el desarrollo de la Biotecnología en Uruguay, podría tener la formación de profesionales con conocimientos de Inmunología y sus aplicaciones tecnológicas.

Héngase en cuenta que las técnicas inmunológicas pueden ser de utilidad en especialidades tan diferentes como Toxicología, Farmacología, Farmacodinamia, Parasitología, Análisis Clínicos, Bioquímica, Microbiología, Nutrición, etc.

El cumplimiento de este objetivo exige profundizar en los conceptos inmunológicos básicos que, por lo que se ha dicho, les serán útiles a muchos profesionales egresados de esta Facultad.

Por estas mismas razones el curso práctico estará orientado al aprendizaje de las técnicas inmunoquímicas básicas, que serán de utilidad para todas las especializaciones en que un químico necesite de la Inmunología.

Enfoque.-

El enfoque del curso se basa en aprovechar los conocimientos previos de Bioquímica y Fisicoquímica de los estudiantes para introducirlos en esta área de conocimientos (nueva para ellos) desde una base química. De esta forma, no solamente les resultará más sencilla de comprender la Inmunología, sino que podrán aprovechar al máximo su formación para introducirse en el terreno de las aplicaciones tecnológicas.

Metodología.-

Los conceptos se introducirán, fundamentalmente, a través de los experimentos por medio de los cuales fueron descubiertos. Estos tienen el doble propósito de:

a) formar al estudiante a través del aprendizaje de "como" se adquieren los conocimientos, más que hacerle acumular masas siempre incompletas de conocimientos "acabados".

b) llevar a los estudiantes al concepto de que el alcance de los conocimientos científicos, siendo fruto de un diseño experimental dado, está limitada por éste.

En el curso práctico los estudiantes realizarán las diferentes técnicas inmunoquímicas usando la información disponible en libros y revistas. Se pretende que aprendan así a seleccionar la información, adquiriendo criterios para decidir cuál de las técnicas disponibles es la más apropiada así como para seleccionar las condiciones experimentales óptimas.

D.O. a 403 nm x 0.51 = mg/ml de PO

mg/ml de PO x 0.65 = DmO. a 280 nm debida a PO

(D.O. 280 del conjugado - D.O. 280 debida a PO) x .69=mg/ml Ig

Peso molecular PO = 40.000

Peso molecular Ig=160.000

El control de calidad se controlará con una inmunodifusión radial usando la gammaglobulina humana absorbida a la placa de Petri (plástica) en que se prepara el gel y revelando con sustrato. Este ensayo lo hará la Cátedra y, si hubieran, estudiantes voluntarios.

4.3. Discusión.- Idem (1.3)

5) Quinto Tema de Trabajo:

Enzimoimmunoensayo (ELISA)

5.1) Seminario.- Dada la extensión del tema se repartirá entre dos equipos de trabajo. El equipo 1 se hará cargo de la introducción a los enzimoimmunoensayos homogéneos y heterogéneos y sus aplicaciones más importantes, mientras que el equipo 2 se hará cargo del análisis de las condiciones experimentales de las diferentes etapas del ELISA, criterios para su optimización y problemas posibles en el diseño del ensayo y formas de resolverlos.

Para el equipo 1 se recomienda la siguiente bibliografía, fundamentalmente las marcadas con (#):

5.1a) (#) A.J. Pesce, D.J. Ford y M.A. Gaizutis, "Qualitative and quantitative aspects of Immunoassays". En "Quantitative Enzyme Immunoassay", (1978), pág. 1-6, editado por E. Engvall y A.J. Pesce, Blackwell Sci. Pub., Oxford. (De consulta en la Cátedra).

5.1b) K.E. Rubenstein, "Homogeneous Enzyme Immunoassay Today", en el mismo libro que (5.1a) pero pág. 57-62.

5.1c) (#) H.E. Carlsson y A.A. Lindberg, "Application of enzyme immunoassay for diagnosis of bacterial and mycotic infections", idem (5.1a) pero pág. 97-110.

5.1d) (#) A. Voller, A. Barlett y D.E. Bidwell, "The use of ELISA in the serology of viral and parasitic diseases", idem (5.1a) pero pág. 125-129.

5.1e) A. Voller, D.E. Bidwell y A. Barlett, "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A review with bibliography of microplate applications", (1977), Flowline Pub., Guernsey. (De consulta en la Cátedra).

5.1f) E. Engvall, "History and future outlook of enzyme immunoassay", en "Enzyme Immunoassay" (1981), pág. 1-3, editado por E. Ishikawa, T. Kawai y K. Miyai, Igaku-Shoin, Tokyo. (De consulta en la Cátedra)

5.1g) (#) T. Murachi, "Enzyme reactions", Idem (5.1f) pero pág. 5-13.

5.1h) (#) T. Kawai, "Antigen-Antibody reactions", idem (5.1f) pero pág. 14-26.

5.1i) (#) A.J. Pesce, D.J. Ford y M.T. Makler, "Properties of enzyme immunoassays", idem (5.1f) pero pág. 27-40.

5.1j) K. Miyai, "Enzyme Immunoassay system- schematic representation" idem (5.1f) pero pág. 123-135.

5.1k) (#) A.J. Pesce, N.J. Krieger y J.G. Michael, "Theories of Immunoassay employing labeled reagents with emphasis on heterogeneous enzyme immunoassay". En "Immunoenzymatic Techniques" (1983), pág. 127-138, editado por S. Avrameas, P. Druet, R. Masseyeff y G. Feldmann, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam. (De consulta en la Cátedra).

5.1l) (#) R.F. Masseyeff y B. Ferrua, "The art of assay design in heterologous enzyme immunoassay", idem (5.1k) pero pág. 139-154.

5.1m) C.C. Czerlinsky y cols., "A solid phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody secreting cells". idem (5.1k) pero pág. 215-218.

5.1n) M. Van Regenmortel, R. Yolken, G. Obert y J. Burckard, "Use of viral antibody extracted from egg yolk for detecting rota- and influenza viruses by ELISA", idem (5.1k) pero pág. 291-294.

5.1ñ) W.R. Bommeli, "Use of enzyme immunoassay in veterinary medicine" idem (5.1k) pero pág. 349-362.

5.1o) P. Gugérli, "Use of enzyme immunoassay in phytopathology", idem (5.1k) pero pág. 369-384.

Para el equipo 2 se adjunta un material.

5.2) Trabajo Experimental.-

5.2.1) Equipo 1

Determinación de la concentración óptima del reactivo en fase sólida usando la técnica de saturación con peroxidasa (PO).

Se preparan soluciones en PBS de la proteína a adsorber a las placas de diferentes concentraciones en un rango de 0.1 a 50 ug/ml y se siembran por duplicado a razón de 100 uL/pocillo en la placa. Se incuba toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda y después se descartan los sobrenadantes. Se añaden 100 uL/pocillo de una solución de 100 ug/ml de peroxidasa en PBS y se incuba la placa a 37°C durante 3 horas en cámara húmeda. Se descartan los sobrenadantes y se lava 3 veces con 200 uL/pocillo de PBS-T y una vez con PBS. Se agregan 200 uL/pocillo de solución de sustrato, se incuba agitando durante 20-30 minutos y se lee las D.O. Se trazan la recta de mínimos cuadrados de los puntos con D.O. decrecientes y la horizontal de los valores constantes. El punto de intersección de ambas es el de saturación de la placa con la proteína y la concentración proteica correspondientes es la necesaria para saturar la superficie y, por tanto, la óptima para sensibilizar la placa.

Una vez determinada la concentración de proteína óptima, preparar 11 ml de esa solución y sembrar 100 uL/pocillo de la misma en una placa y dejar incubando a temperatura ambiente toda la noche. Al otro día, eliminar los sobrenadantes, agregar 200 uL/pocillo de una solución de seroalbúmina bovina (SAB) al 1% en PBS (PBS-S) e incubar 1 hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

5.2.2) Equipo 2

Determinación por ELISA de la concentración de anticuerpos específicos contra la proteína usada para sensibilizar la placa.

Se descartan los sobrenadantes de PBS-S y se lava la placa 3 veces con 200 uL/pocillo de PBS-.05% Tween 20 (PBS-T) y una vez con PBS. Se hacen diluciones seriadas de las muestras en PBS-T-S y se siembran 100 uL/pocillo de cada dilución por cuadruplicado.

En paralelo se hace lo mismo con 4 diluciones de una solución estándar de concentración conocida de anticuerpos contra la proteína usada para sensibilizar la placa.

Las muestras se incuban 3 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda y luego se descartan y se lava la placa 3 veces con 200 uL/pocillo de PBS-T y una vez con PBS.

Se preparan 10 ml/placa de la dilución apropiada del conjugado enzimático en PBS-T-S y se siembran 100 uL/pocillo. Se incuba toda la noche en heladera y cámara húmeda, se descartan los sobrenadantes y se lava la placa 3 veces con PBS-T y una con PBS.

Una vez lavada la placa se agregan 200 uL/pocillo de solución de sustrato (OPD) y se incuba la placa agitando a temperatura ambiente durante 20 - 30 minutos. Luego se para la reacción con 50 uL/pocillo de ácido sulfúrico 2M y se lee la D.O. a 492 nm.

Solución sustrato (OPD)	Tampón citrato .1M pH 4.5
Ortofenilendiamina (OPD)	20 mg. ácido cítrico 2.1 g.
Peróxido de hidrógeno 33%	8uL NaOH 1M (para llevar pH)
Tampón citrato .1M pH 4.5	20 ml. agua destilada a 100 ml.

Tómese en cuenta que el tampón citrato se contamina muy fácil, por lo que se ha de preparar cada vez que se ha de usar o guardar congelado. La solución de sustrato ha de prepararse fresca y el OPD sólido ha de mantenerse alejando de la luz.

Los valores de D.O. obtenidos con las muestras estándar de concentración conocida se usarán para hacer una recta de calibración de D.O. vs. concentración y todos los resultados se han de referir a ella (R. Malvano, A. Boniolo, M. DAVIS y M. Zanino, "ELISA for antibody measurement: aspects related to data expression". J. Immunol. Methods 48 (1982) 51).

Para seleccionar la concentración apropiada de conjugado se ha de hacer un ELISA con una muestra de control positiva (que contiene anticuerpos específicos contra la proteína usada para sensibilizar) y otra negativa (que no contiene dichos anticuerpos), ambas sembradas a razón de 100 uL/pocillo tantas veces (por cuadruplicado) como diluciones del conjugado se quieran ensayar (normalmente 4 a 6 diluciones: 1/100; 1/200;...; 1/3200). Luego se siembran 100uL/pocillo de cada dilución del conjugado en los pocillos que contienen cada muestra positiva y negativa y se continúa el ELISA como se ha descrito. La dilución del conjugado para la cual la diferencia de DO. entre el control positivo y el negativo sea máxima, se elige como la óptima. Tómese en cuenta que cada vez que se cambia de lote de conjugado ha de repetirse esta titulación.

5.3) Discusión. - Idem (1.3).

6) Sexto Tema de trabajo

Técnicas simples de detección y determinación de antígenos, anticuerpos y complemento.

6.1) Seminario.- Lo hará la Cátedra.

Las referencias bibliográficas generales para las técnicas de inmunoprecipitación en gel son:

6.1a) O. Ouchterlony y L.A. Nilsson, "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis", en "Handbook of Experimental Immunology" (1978), Vol. 1, pág. 19.1 a 19.44. Editado por D. M. Weir, Blackwell Sci. Pub., Oxford. (De consulta en Biblioteca).

6.1b) L. Hudson y F.C. Hay, "Practical Immunology", (1976), pág. 107 - 124, Blackwell Sci. Pub., Oxford. (De consulta en la Biblioteca y en la Cátedra).

6.1c) N.H. Axelsen, "Handbook of Immunoprecipitation -in-gel techniques", (1983), Blackwell Sci. Pub., Oxford. (De consulta en la Cátedra)

Para las técnicas de aglutinación:

6.1d) W.J. Herbert, "Passive haemagglutination with special reference to the tanned cell technique", en "Handbook of Experimental Immunology", (1978), Vol. 1, Pág. 20.1 a 20.20. Editado por D.M. Weir, Blackwell Sci. Pub., Oxford. (De consulta en Biblioteca).

6.1e) Idem (6.1b) pero pág. 125 - 133.

6.1f) T. Suzuta, "Therapeutic and diagnostic applications of latex-bound immunoglobulins", en "Controlled drug delivery" (1982), Vol. II (Clinical applications), pág. 149-188, editado por S.D. Bruck, C.R.C. Press Inc., Boca Raton (Florida). (De consulta en la Cátedra).

6.1g) R.A. Marghi, "Inmunología e Inmunoquímica", (1982), pág. 416-422, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. (De consulta en la Cátedra).

Para las técnicas de determinación del complemento:

6.1h) Idem (6.1g) pero pág. 204-215.

6.1i) Idem (6.1b) pero pag. 134-141.

6.1j) E.A. Kabat y M.M. Meyer, "Experimental Immunochimistry", (1971) Capítulo 4, Charles C. Thomas, Springfield. (De consulta en Biblioteca).

6.2) Trabajo Experimental.-

Lo hará la Cátedra (Y voluntarios si existieran) de acuerdo a las técnicas que se adjuntan.

6.3) Discusión.-

Se hará como en (1.3) y siempre que se usen estas técnicas en el transcurso del trabajo con los otros 5 temas.