

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Carrera: Tecnicatura Universitaria en Biotecnología

Asignatura: Técnicas Inmunológicas

Núcleo al que pertenece: Núcleo Avanzado Obligatorio

Profesora: Carla Sabrina Capobianco

Prerrequisitos: Fundamentos en Biología Celular y Molecular

Objetivos:

Se espera que quienes cursen esta asignatura:

- Conozcan las distintas aplicaciones de la Inmunología en el campo de la Biotecnología y otras disciplinas relacionadas.
- Manejen las principales técnicas de detección inmunológica empleadas en laboratorios de investigación, empresas, industrias, etc, proporcionando los elementos teóricos y prácticos necesarios para la adecuada selección e implementación de estas herramientas teniendo en cuenta sus ventajas y limitaciones.
- Diseñen los ensayos e interpreten de manera correcta los resultados obtenidos al aplicar las técnicas.
- Comprendan los fundamentos detrás de cada técnica aprendida, posibilitando la optimización de pasos y la resolución de problemas.
- Puedan comunicar los resultados obtenidos a partir de la confección de informes. También se espera que entrenen habilidades para la exposición oral.

Contenidos mínimos: Anticuerpos y antígenos. Inmunomarcación. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Citometría de Flujo. Radioinmunoanálisis y Técnicas Radioinmométricas. *Western Blot*. Tipificación de antígenos por técnicas serológicas y moleculares. Inmunodifusión radial. Inmunoelectroforesis. Aglutinación. Inmunoprecipitación. Producción de anticuerpos poli y monoclonales.

Carga horaria semanal: 4 horas.

Programa analítico:

Unidad 1: Introducción a la Inmunología.

Los componentes del sistema inmune. Principios de la inmunidad innata y adaptativa. Tejidos y órganos involucrados en la respuesta inmune. Primera línea de defensa del huésped. Mecanismos de la inmunidad innata. Respuestas innatas inducidas por la infección.

Reconocimiento antigénico por los receptores de las células B y T. Procesamiento antigénico. Complejo mayor de histocompatibilidad. Desarrollo de los linfocitos B y T. Inmunidad celular y células presentadoras de antígeno.

Inmunidad humoral: activación de las células B y producción de anticuerpos. Respuesta inmune a las infecciones. Memoria inmunológica.

Unidad 2: Cultivo celular eucariota. Definición. Aplicaciones. Ventajas y limitaciones. Morfología de las células y formas de crecimiento (adherentes y en suspensión). Requerimientos y medios de cultivo. Sustratos para el crecimiento celular. Equipamiento y material necesario. Manejo de la técnica aséptica. Contaminaciones. Líneas celulares finitas y continuas. Cultivos primarios. Cinética de crecimiento en cultivo. Mantenimiento de líneas celulares (Repique, conteo de células, criopreservación y descongelación).

Unidad 3: Western Blot e Inmunoprecipitación (IP).

Western Blot: Pasos generales y fundamento. Preparación de la muestra: métodos de extracción según origen de la muestra, cuantificación de proteínas totales (Lowry, Bradford y BCA), selección del *buffer* de siembra. Electroforesis (SDS-PAGE). Transferencia. Bloqueo. Detección directa e indirecta. Selección del anticuerpo (monoclonales vs. policlonales). Análisis de los resultados. Controles de la técnica. Posibles problemas y soluciones.

Inmunoprecipitación (IP): Objetivo y aplicaciones de la técnica. Co-IP. IP de proteínas con *Tag*. Estrategias de inmovilización de anticuerpos. Selección del *buffer* de lisis, *binding buffer*, *buffers* de lavado, y *buffer* de elusión (optimización).

Unidad 4: Citometría de Flujo.

Objetivos y fundamentos de la técnica. Enfoque hidrodinámico. Láseres y dispersión de la luz. Análisis de *Forward* y *Side Scatter*. Filtros (*short pass*, *long pass*, filtros de banda y dicróicos) y detectores del citómetro de flujo (fotomultiplicadores y fotodiodos). Selección de fluoróforos para marcaciones múltiples. Componentes de la señal. Análisis de los resultados: histogramas y *dot plots*. Controles de la técnica.

Unidad 5: Inmunomarcación.

Inmunohistoquímica (IHQ): Objetivos y aplicaciones de la técnica. Ejemplo de aplicación: detección del marcador HER2neu en cáncer de mama. Selección de los anticuerpos. Manipulación de la muestra: Fijación, corte y recuperación antigénica. Métodos de detección directo e indirectos (ejemplos: PAP y ABC). Sustratos disponibles (comparación de sensibilidad y aplicaciones). Bloqueos. Controles de la técnica.

Inmunofluorescencia (IF): Fundamento de la técnica. Protocolo estándar: Preparación de los cortes, fijación, permeabilización, bloqueo, métodos de inmunotinción directo e indirecto, montaje. Microscopio de fluorescencia. Microscopía confocal. Marcaciones múltiples. Análisis de colocalización. Controles de la técnica. Aplicaciones.

Unidad 6: ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) y Radioinmunoanálisis (RIA).

ELISA: Fundamento de la técnica. Aplicaciones. ELISA para detección de antígenos (ELISA *sandwich*). ELISA para la detección de anticuerpos (directo e indirecto). ELISA de competición (directo, indirecto y *sandwich*). Ventajas y limitaciones de la técnica. Sustratos colorimétricos y Quimioluminiscentes. Curvas de calibración, controles y cuantificación.

RIA: Fundamento de la técnica. Ensayo de inhibición competitiva para antígenos. Curvas de calibración. Ventajas y desventajas de la técnica. Aplicaciones.

Unidad 7: Técnicas de Aglutinación y Precipitación.

Fundamento de la técnica. Aglutinación directa e indirecta. Curva cuantitativa de aglutinación. Determinación del título de anticuerpos. Hemaglutinación y tipificación de grupos sanguíneos. Prueba de Coombs. Inmunodifusión radial para la cuantificación de antígenos y anticuerpos. Inmunolectroforesis.

Unidad 8: Tipificación de antígenos.

Tipificación de antígenos leucocitarios humanos (HLA): Aplicaciones. Pruebas serológicas - linfotoxicidad. Métodos celulares. Tipificación basada en secuencia mediante *primers* específicos. Tipificación del HLA por análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Hibridización con sondas de oligonucleótidos secuencia-específicos.

Unidad 9: Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales.

Anticuerpos policlonales y monoclonales: Ventajas y Desventajas. Producción de anticuerpos policlonales mediante inmunizaciones reiteradas. Fundamento y desarrollo de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales mediante hibridomas. Técnicas de selección de hibridomas (método HAT de selección). Selección de hibridomas específicos (dilución limitante, *in situ*, marcadores de superficie artificial, etc). Anticuerpos quiméricos y humanizados. Obtención de Fab a partir de bibliotecas de fagos. Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales (tratamientos médicos, diagnóstico, biosensores, etc)

Bibliografía:

De Consulta:

Kenneth Murphy, Casey Weaver y Allan Mowat. **Inmunología de Janeway.** Ciudad de México: Editorial El Manual Moderno, 2019.

Susan Viselli, Thao Doan y Roger Melvold. **Inmunología (2a. ed.).** L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona: Wolters Kluwer Health, 2013.

Rodolfo Kölliker Frers. **Inmunología.** Buenos Aires: Corpus Editorial, 2016.

Organización de las clases:

Clases teóricas: todos los temas son expuestos y explicados en clase utilizando pizarrón y/o presentaciones con apoyo de imágenes. Las clases teóricas se

desarrollan en un ambiente tendiente a promover el diálogo y la formulación de preguntas a fin de favorecer la comprensión de los diferentes contenidos disciplinares. Se trata de proporcionar ejemplos de interés general o en relación con la carrera de grado que se encuentran cursando las personas estudiantes.

Clases de trabajos prácticos de laboratorio: las personas estudiantes cuentan con una guía de trabajos prácticos de laboratorio (TP), que incluye el protocolo completo para la realización de la actividad.

Dependiendo del TP se realizan determinaciones cualitativas y/o cuantitativas. Previo a la realización de cada TP se realiza una breve explicación proporcionada por docentes.

Las personas estudiantes trabajan en pequeños grupos. La realización del informe es de forma individual.

Los trabajos prácticos de laboratorio a desarrollar son:

1) Cultivo Celular:

Objetivos: El objetivo de este trabajo práctico es que las personas estudiantes se familiaricen con las técnicas básicas de cultivo celular eucariota.

Actividades: Las actividades que se desarrollan incluyen el repique y conteo de células mediante el uso de cámara de Neubauer (se utilizarán células de la línea F3II, de carcinoma mamario murino). Las personas estudiantes sembrarán, adicionalmente, placas para la extracción de proteínas totales, que luego servirán como material de partida del trabajo práctico que se realizará a continuación (Western Blot).

2) Western Blot:

Objetivos: El objetivo de este trabajo práctico es la detección de una proteína específica (ERK) mediante la técnica de Western Blot.

Actividades: Las actividades a desarrollar incluyen la extracción de proteínas totales a partir de las células F3II sembradas en el primer trabajo práctico, la preparación de los geles de poliacrilamida, siembra de las muestras, electroforesis, transferencia, bloqueo y revelado mediante quimioluminiscencia. Por último, se realiza un análisis cualitativo de los resultados.

3) Citometría de Flujo:

Objetivos: Los objetivos de este trabajo práctico incluyen la detección de un antígeno de membrana (gangliósido GM3) en células X63 (mieloma de ratón).

Actividades: Las personas estudiantes parten de células X63 que fueron cultivadas el día previo al trabajo práctico. De esta manera, realizan todos los pasos de incubación para la marcación indirecta del antígeno X63 con un anticuerpo específico (incluyendo la incubación con el anticuerpo primario, secundario, bloqueo y lavados). Al finalizar la marcación, todas las personas estudiantes analizan sus muestras en el citómetro de flujo, se familiarizan con los diferentes componentes del equipo, y reciben un archivo con los resultados obtenidos, a fin de realizar el informe correspondiente.

4) Inmunofluorescencia:

Objetivos: El objetivo de este trabajo práctico es que las personas estudiantes se familiaricen con la técnica de inmunofluorescencia, a partir

de la marcación indirecta de un antígeno específico (Subunidad alfa de la proteína CK2) en células de tumorales de mama de ratón (línea 4T1).

Actividades: Las personas estudiantes reciben los cubreobjetos sembrados con células 4T1, tratadas y sin tratar con un inhibidor de CK2, de forma tal de realizar una comparación de los niveles de expresión entre las células sometidas al tratamiento, versus su control. A continuación, realizan las incubaciones, bloqueos, y lavados necesarios para realizar la marcación con fluorescencia. Una vez finalizada la marcación, las personas docentes realizan el montaje utilizando un medio de montaje con DAPI, de manera tal de marcar los núcleos celulares con fluorescencia. Por último, se realiza la observación en un microscopio de fluorescencia, y se fotografían las muestras, que luego se envían a las personas estudiantes para la confección del informe.

5) ELISA:

Objetivos: El objetivo de este trabajo práctico es la detección de Rotavirus grupo A por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) de captura, y la confección de una curva patrón a partir de dicha técnica.

Actividades: Las muestras de partida para la realización de este trabajo práctico son entregadas por las personas docentes al inicio del TP. Se realiza a continuación la técnica de ELISA de captura (ELISA *Sandwich*). Las personas estudiantes realizan la inmovilización del anticuerpo de captura, la incubación de las muestras (luego de su dilución seriada), la incubación con el anticuerpo de reconocimiento, y luego el revelado, mediante la medición de la densidad óptica utilizando un lector de placas. Para la realización del informe, se les provee a las personas estudiantes los valores obtenidos de absorbancia para la confección de una curva patrón a partir de las diluciones realizadas.

Modalidad de evaluación:

Evaluación: 2 evaluaciones parciales y examen final integrador.

Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes (Res. CS N° 201/18):

Las asignaturas podrán ser aprobadas mediante un régimen regular, mediante exámenes libres o por equivalencias.

Las instancias de evaluación parcial serán al menos 2 (dos) en cada asignatura y tendrán carácter obligatorio. Cada asignatura deberá incorporar al menos una instancia de recuperación.

El/la docente a cargo de la asignatura calificará y completará el acta correspondiente, consignando si el/la estudiante se encuentra:

- a) Aprobado (de 4 a 10 puntos)
- b) Reprobado (de 1 a 3 puntos)
- c) Ausente
- d) Pendiente de Aprobación.

Se considerará Ausente a aquel estudiante que no se haya presentado/a a la/s instancia/s de evaluación pautada/s en el programa de la asignatura.

Modalidad libre

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas, laboratorios y problemas de aplicación.

Cronograma Tentativo

Semana	Tema/Unidad	Actividad				Evaluación
		Teórico	Práctico			
			Res. Probl.	Laboratorio	Otros	
1	Unidad 1: Introducción a la Inmunología.	X				
2	Unidad 2: Cultivo celular eucariota.	X	X			
3	TP 1: Cultivo celular.			X		
4	Unidad 3: Western Blot e Inmunoprecipitación (IP).	X				
5	TP 2: Western Blot.			X		
6	Unidad 4: Citometría de Flujo.	X				
7	TP 3: Citometría de Flujo. Clase de consulta	X		X		
8	Primer examen parcial					X
9	Unidad 5: Inmunomarcación	X				
10	Recuperatorio Primer examen parcial					X
11	TP 4: Inmunofluorescencia			X		
12	Unidad 6: ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) y Radioinmunoanálisis (RIA).	X				
13	TP 5: ELISA			X		
14	Unidad 7: Técnicas de Aglutinación y Precipitación. Unidad 8: Tipificación de antígenos.	X	X			

15	Unidad 9: Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales. Clase de consulta.	X				
16	Segundo examen parcial					X
17	Recuperatorio Segundo examen parcial					X
18	Integrador / Cierre de notas y entrega de actas					X