

# Seminario N° 1

## Antígenos-Inmunización

Inmunología Clínica  
2010

INMUNIZACION: el proceso de inducción de **inmunidad** artificial frente a una enfermedad..... (def. médica)

- PASIVA: adquisición de Ac de una fuente externa.
  - ACTIVA: producción local de Ac.

# CONCEPTO DE ANTÍGENO INMUNÓGENO Y HAPTENO

## 1. ANTÍGENO:

*Sustancia reconocida por el sistema inmune (BCR y TCR / Ac). Antigenicidad: capacidad de combinarse de forma específica con estos elementos específicos del sistema inmune*

## 2. INMUNÓGENO:

*Sustancia reconocida por el sistema inmune (BCR y TCR / Ac) + induce una respuesta inmune. Inmunogenicidad*

## 3. HAPTENO:

*Sustancia reconocida por el sistema inmune **INCAPAZ** de inducir una respuesta inmune*

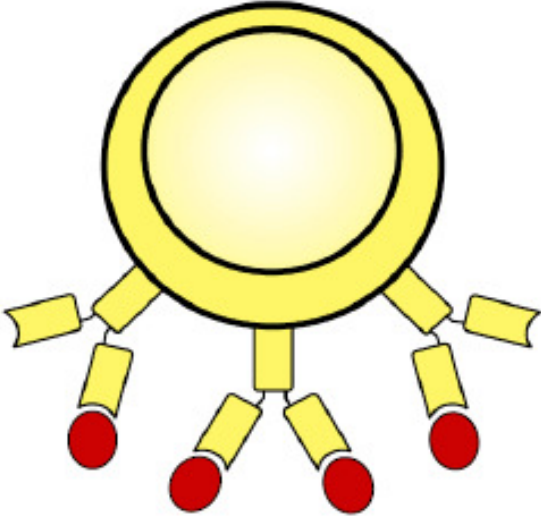
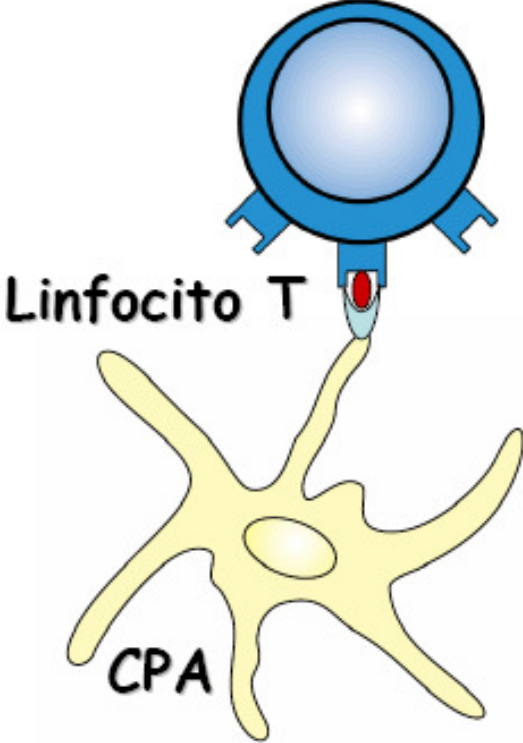
## CONCEPTO DE EPÍTOPO O DETERMINANTE ANTIGÉNICO

**Sitio concreto** de un antígeno que se une específicamente a un TCR / BCR o Ac

---

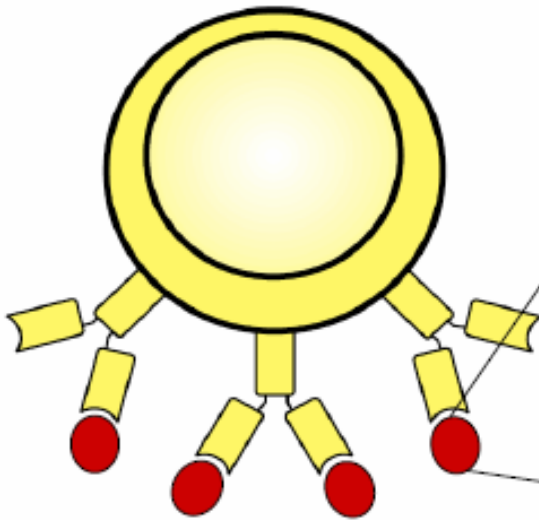
Un antígeno (o un inmunógeno) puede **tener varios epítopos o determinantes antigénicos**, cada uno de los cuales es reconocido de forma específica por un receptor concreto (TCR o BCR) / Ac.

# CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

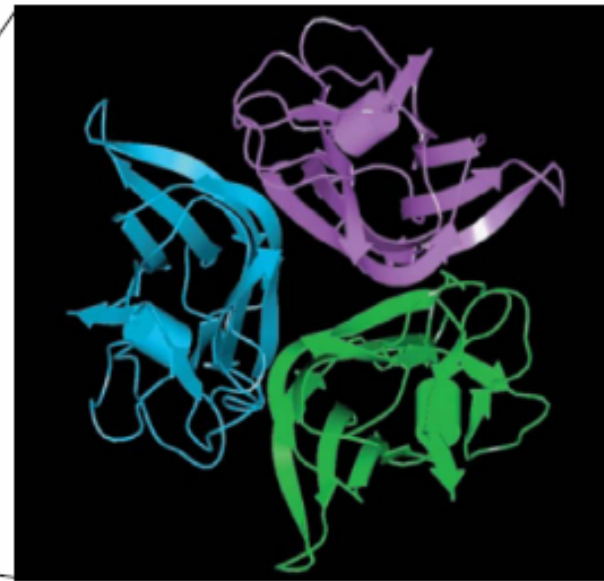
Ag conformacionales	Ag secuenciales
 <p data-bbox="591 1238 891 1295">Linfocito B</p>	 <p data-bbox="1176 863 1473 920">Linfocito T</p> <p data-bbox="1279 1238 1384 1295">CPA</p>

# CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

Ag conformacionales



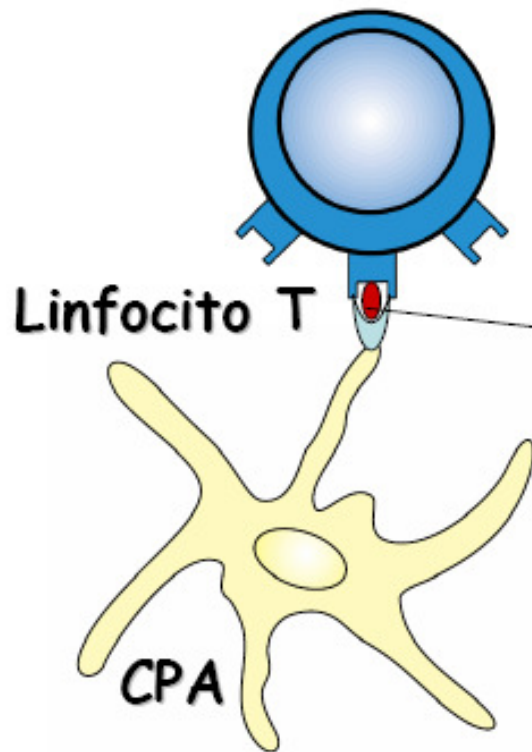
Linfocito B



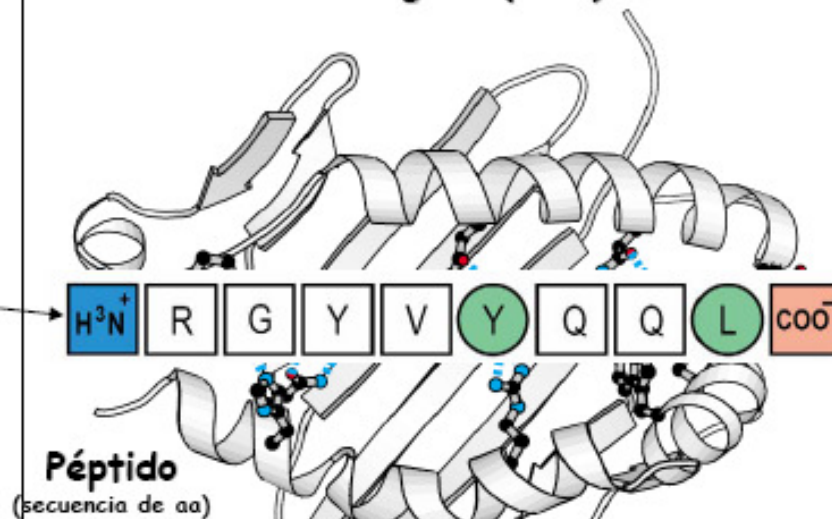
Tipos de Ag conformacionales:  
-Continuos  
-Discontinuos

# CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

Ag secuenciales

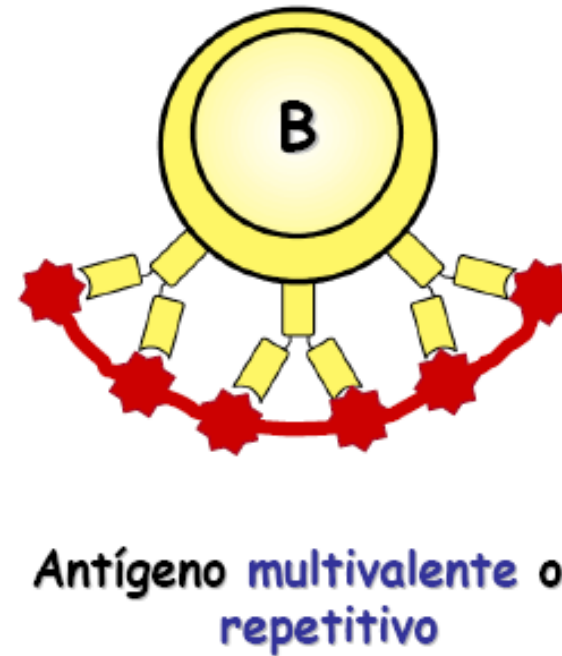
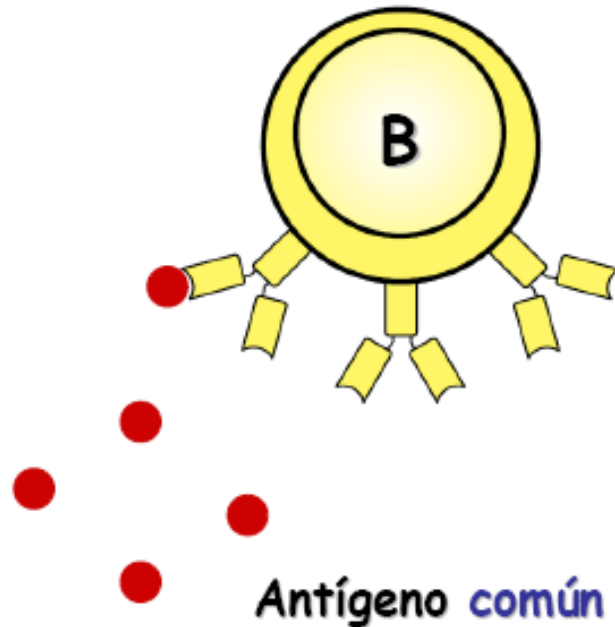


Molécula presentadora de antígeno (HLA)



# TIPOS "ESPECIALES" DE ANTÍGENOS

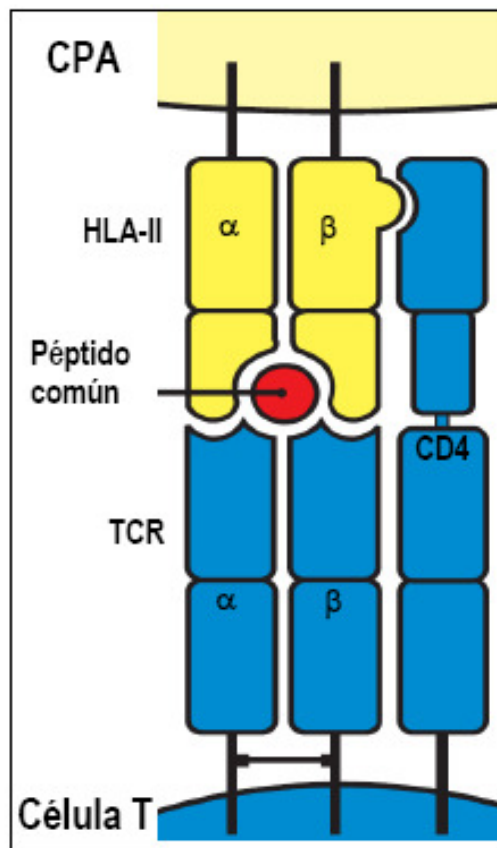
Antígenos multivalentes o repetitivos



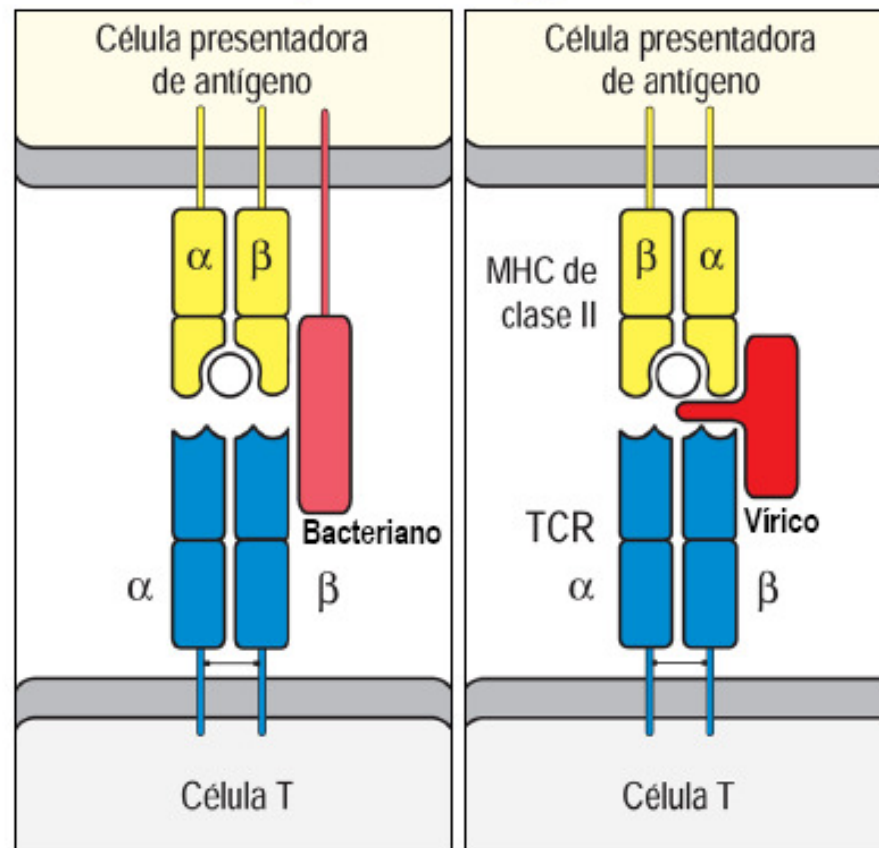


# TIPOS "ESPECIALES" DE ANTÍGENOS

## Antígeno común



## Superantígenos



## FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

- 1.- Estructura **bioquímica**
- 2.- **Peso** molecular
- 3.- Composición y **complejidad** química
- 4.- **Dosis** de inmunógeno
- 5.- **Vía** de administración
- 6.- **Número de contactos** con el antígeno
- 7.- Administración de **adyuvantes**
- 8.- Factores **genéticos** del huésped

# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 1.- Estructura bioquímica



Proteínas ricas en tirosina

Proteínas

Lípidos (se presentan en moléculas CD1)

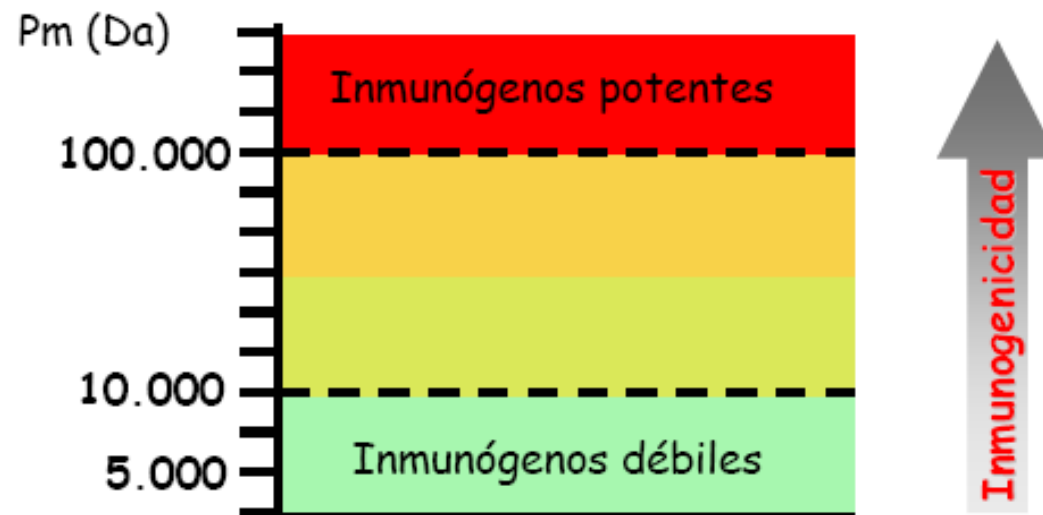
Ácidos nucleicos

Sustancias inorgánicas

# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 2.- Peso molecular (Pm)

**Relación directa** entre el tamaño de una macromolécula y su inmunogenicidad



# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 3.- Composición y complejidad química

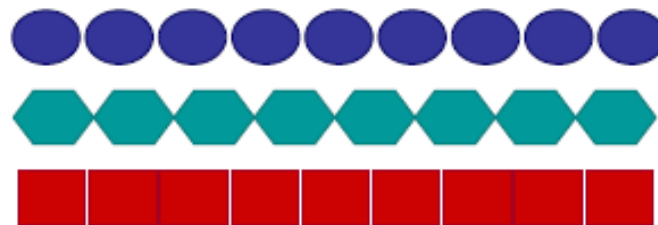
**Relación directa** entre la complejidad de una macromolécula y su inmunogenicidad

Copolímeros compuestos



↑↑ **Inmunogenicidad**

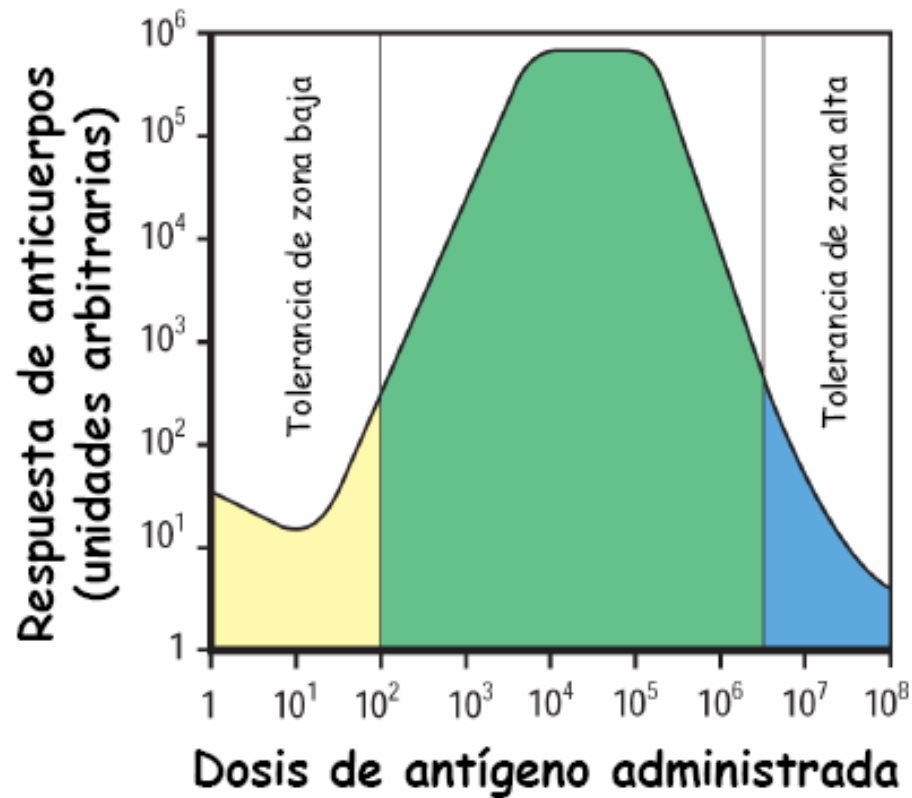
homopolímeros sintéticos



↓↓ **Inmunogenicidad**

# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 4.- Dosis de inmunógeno



# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 5.- Vía de administración



Vía parenteral no i.v.

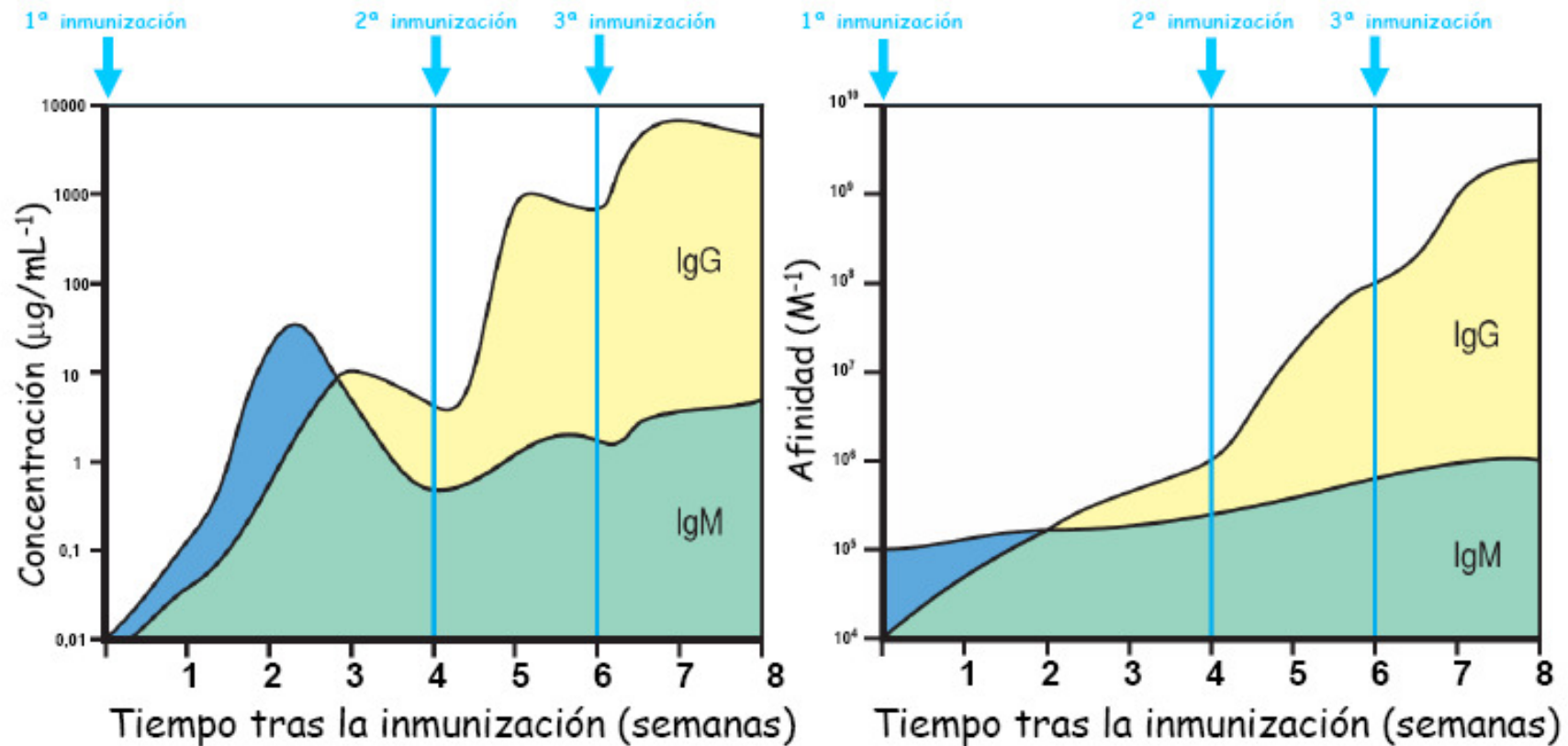
Subcutánea  
Intradérmica  
Intramuscular

Vía oral

Vía intravenosa

# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 6.- Número de contactos





# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 7.- Administración de adyuvantes

*Potencian la inmunogenicidad del antígeno*

<i>Adyuvante</i>	<i>Mecanismo de acción</i>			
	Prolonga la persistencia del Ag	↑ señal co-estimuladora	Formación granulomas	Proliferación inespecífica de linfocitos
Coadyuvante incompleto de Freund	+	+	+	-
Coadyuvante completo de Freund	+	++	++	-
Sulfato potásico de aluminio	+	?	+	-
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	-	?	+	-
<i>Bordetella Pertussis</i>	-	?	-	+
Lipopolisacárido bacteriano (LPS)	-	+	-	+
Polinucleótidos sintéticos	-	?	-	+

# ¿Qué es un adyuvante?

- Son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune.
- Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específico
- Mecanismo de acción: El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de sus funciones importantes es crear un reservorio o depósito del antígeno de larga vida. Por otro lado todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos; éstos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos.

# Adyuvantes emulsiones usados en inmunología experimental

Completo de Freund



Respuesta de Ac y C.T. Muy tóxico

Incompleto de Freund



Respuesta humoral

- Elevada eficacia, amplio espectro de aplicación, fácil manipulación y disponibilidad comercial.
- El adyuvante completo de *Freud* (FCA):
- Producción de antisueros en animales
- cantidades limitadas de antígenos
- presentan una baja inmunogenicidad.
- Toxicidad
- En la investigación pueden utilizarse, además,
- los compuestos de aluminio
- "Syntex-1" (SAF-1): treonil análogo del dipéptido murámico,
- polímeros no iónicos en bloque (NBP)
- saponinas,
- bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA),
- lipopéptidos,

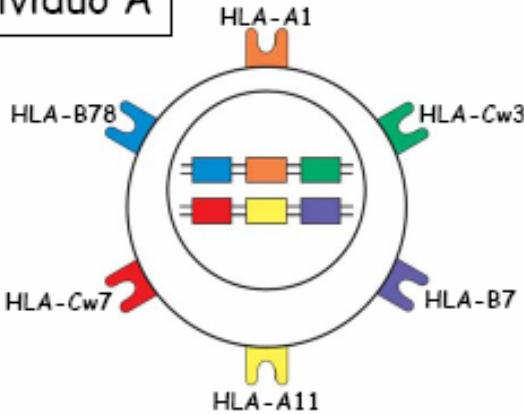
# FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

## 8.- Factores dependientes del huésped

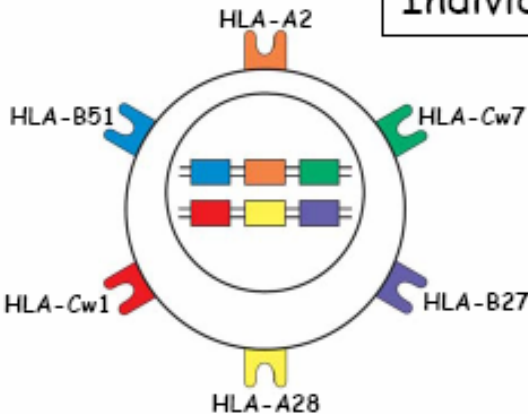
El **genotipo** del individuo inmunizado influye en el tipo y grado de respuesta inmune

### MOLÉCULAS HLA

Individuo A



Individuo B



# Consideraciones:

- **Bienestar animal:** la extracción de los anticuerpos del animal se realiza de una manera no invasiva, minimizando el sufrimiento del animal, así como también permite la reducción en el número de animales necesarios para obtener una cantidad de anticuerpos determinada.
- **Científicas:** permite el uso de estas inmunoglobulinas en sistemas de investigación y diagnóstico, permitiendo la obtención de anticuerpos contra antígenos mamíferos muy conservados filogenéticamente.
- **Económicas:** reducción de costos en la producción de anticuerpos policlonales, ya que la cantidad de inmunoglobulinas que pueden obtenerse a partir de la yema de huevo de las aves es similar a la producida por animales grandes, mientras que el costo de mantenimiento de una gallina es similar al de un animal pequeño.

	Ratón	Rata	Cobayo	Conejo	<b>caballo</b>
Oral	0,5-1ml /sonda gástrica	1-2ml	1-2ml	5-7ml	
ID	0,1ml piel lomo	0,1ml	0,1ml	0,1ml	
SC	0,5- 1ml piel laxa lomo	1-5ml	1-2ml	1-5ml	
IP	1ml lateral abdomen	5ml	10ml	20ml	
IM	0,05ml muslo posterior	0,1ml	0,1ml	0,2ml	
IV	0,2ml vena lateral cola	0,5ml	0,5ml vena metatarsiana	0,5ml vena marginal de la oreja	
Extracción de sangre	0,3ml vena de la cola- seno orbital- punción cardiaca	0,3ml	5ml Vena de la oreja- vena metatarsiana	15ml vena marginal de la oreja	<b>30- 50ml</b>

## VIAS DE ADMINISTRACIÓN

Formas de introducir una vacuna al organismo

Oral

Intramuscular

Subcutánea

Intravenosa

Intradérmica

## SITIOS DE APLICACIÓN

🌸 Lugar anatómico seleccionado para que el daño tisular vascular sea mínimo

🌸 Induzca la respuesta inmune deseada

🌸 Provoque el menor daño local y sistémico

## Tipo de respuesta inmune según la vía de infección del patógeno

Bacterias no invasivas (*Vibrio cholerae*, ETEC) → epitelios no permeables a las Igs séricas → ruta tópica de vacunación → sIgA producida localmente

Patógenos invasivos (*Chlamydias*, *H. pylori*, virus como herpes simple) → protección mediada por células CD4<sup>+</sup> o por CTLs y células NK

Patógenos de la mucosa respiratoria o urogenital → mas permeable a las Igs séricas → una ruta parenteral de vacunación puede ser también efectiva.

Patógenos entéricos que invaden la mucosa o proliferan en los tejidos linfoides de la submucosa (*S.typhi*) y luego se expanden por el organismo → una ruta parenteral de vacunación puede ser también efectiva



# ¿Las Igs producidas atraviesan placenta?

- Vaca, cabra , cerdo y caballo mayor permeabilidad en el intestino: se absorben los Ac del calostro pero no atraviesan la placenta.
- Hombre, mono y cobayo atraviesan la placenta pero no se absorben en intestino los anticuerpos de la leche.

.

# Inmunización con *Cándida*. Antígeno?

- Mezcla de extracto crudo: fácil de obtener, gran número de antígenos, difícil de estandarizar y reacción cruzada ( bacterias y otros hongos).
- Antígenos recombinantes: en huésped procariota, fácil de estandarizar y se eliminan las reacciones cruzadas.
- Péptidos sintéticos

# ¿Levadura completa?

- Microorganismo entero muerto por calor, acetona, formol, etanol.
- A partir de cultivos en medios enriquecidos, se selecciona la colonia y se transfiere a caldo enriquecido, se incuba 6-8hs a 37°C y se calienta a 100°C 2hs.
- Preservar con 0,5ml de formol al 10%

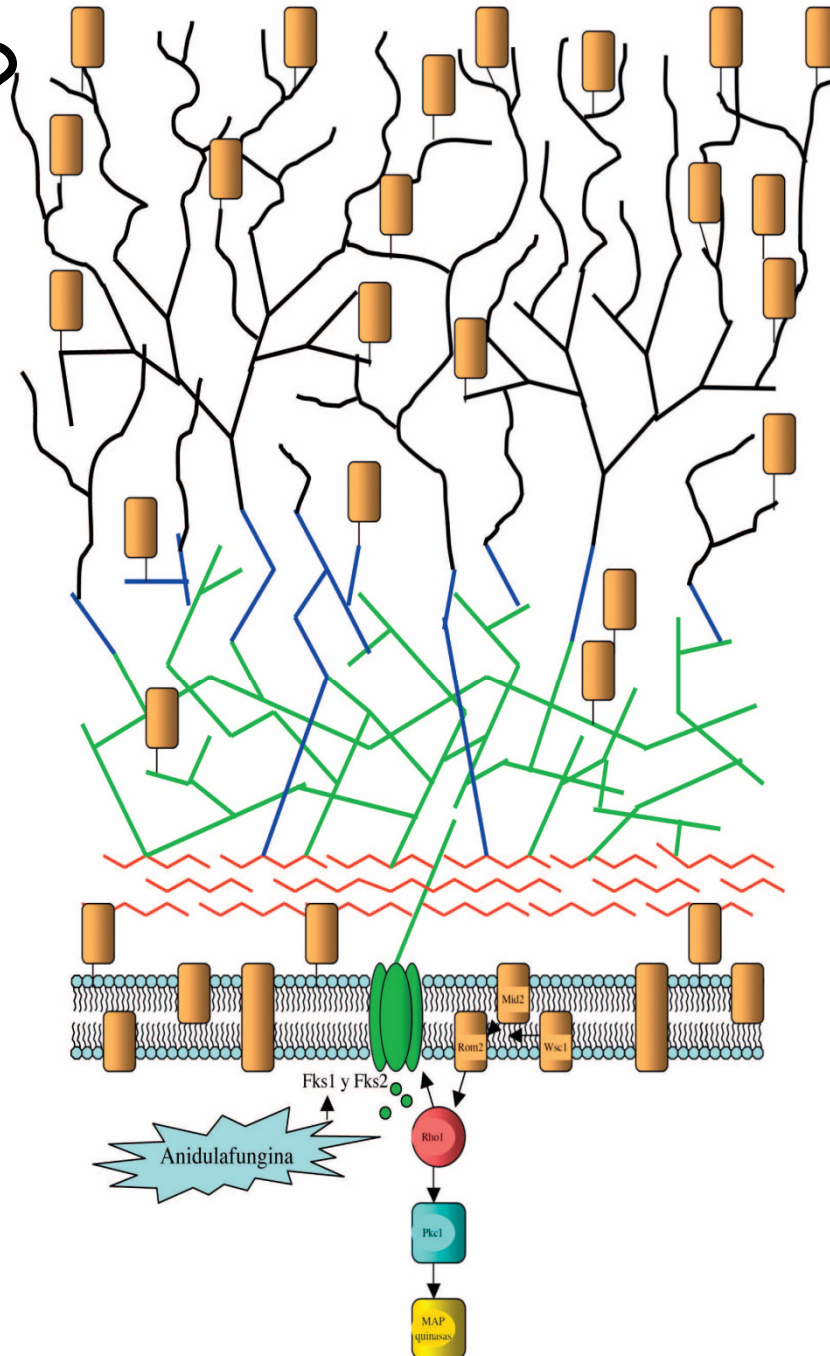
# ¿Concentración del inóculo?

- Concentración  $10^9$  /ml ¿Cómo ajusto la concentración?
- Tubo 3 del nefelómetro de Mac Farland (0,3ml ClBa 1%+ 9,7ml H<sub>2</sub>S<sub>4</sub>Al1%)
- Leer a 660nm (previamente una curva (Abs. 700 correlaciona con 100000000))
- Contar en cámara de Neubauer.

# ¿Antígeno purificado?

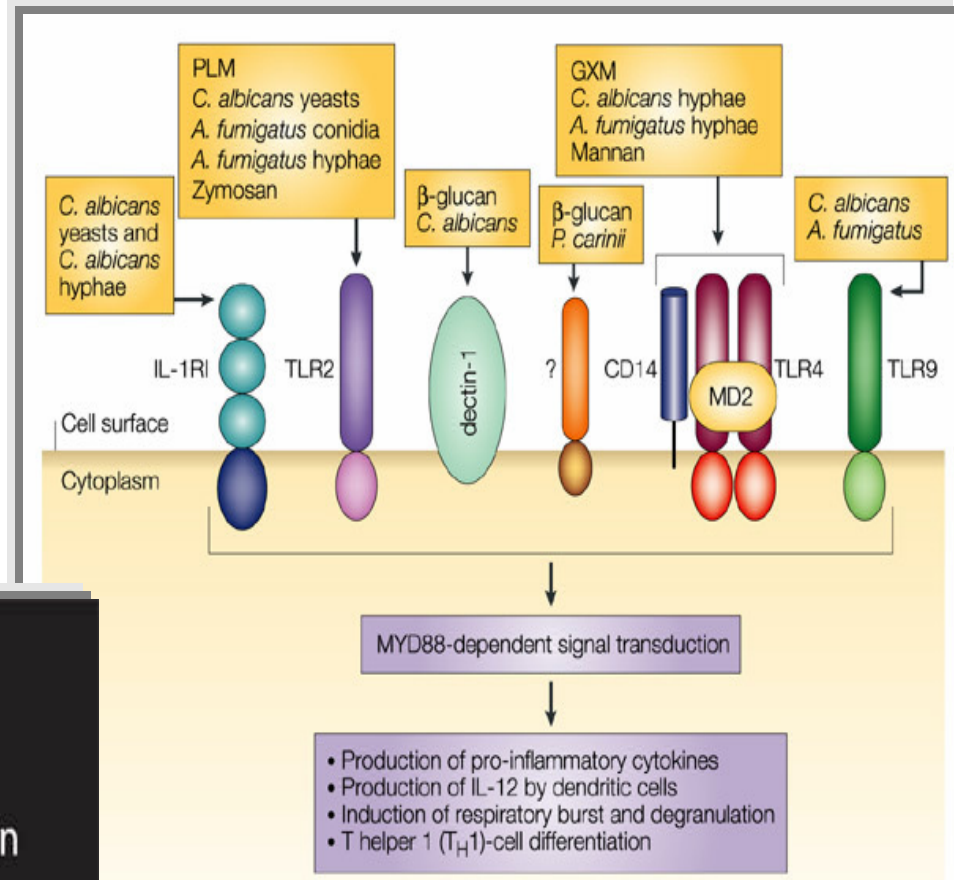
Pared celular de *C. albicans*:

- quitina N-acetilglucosamina (rojo) (componente fibrilar)
- $\beta$ -1,3-D-glucano (verde)
- $\beta$ -1,6-D-glucano (azul)
- mananos (D-manosa) (negro)
- proteínas (naranja)



# Interacción PAMP-TLR

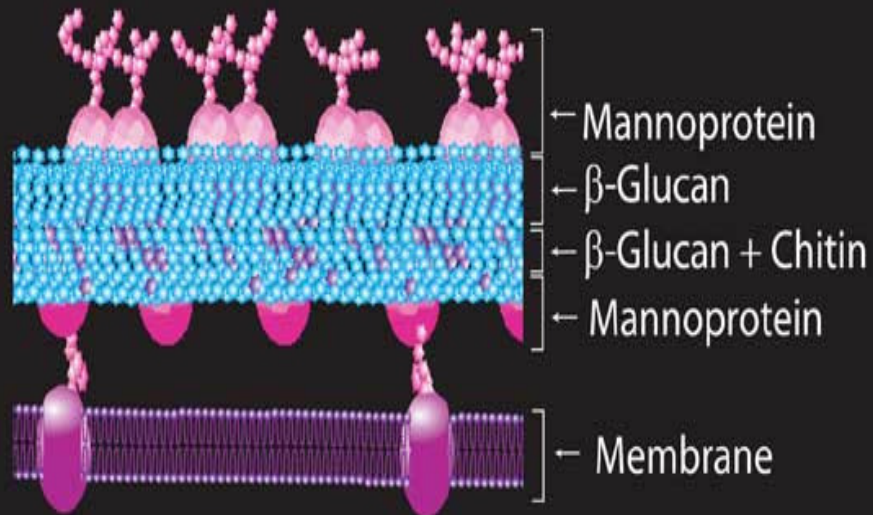
## Hongos



Nature Reviews | Immunology

Nature Reviews Immunology 4, 11-24 (January 2004)

## Yeast Cell Wall



The yeast cell wall is made of ~25% helical  $\beta(1-3)$  and  $\beta(1-6)$ -D-glucans and ~25% oligo-mannans, ~20% protein, ~10% lipids, and some chitin. The protein component exists predominantly as a mannoprotein complex. Covalent linkages are reported to exist as  $\beta(1-4)$ -linkages between the reducing ends of chitin and the nonreducing end of  $\beta(1-3)$ -glucans as well as among glycoproteins,  $\beta(1-6)$ -glucans, and  $\beta(1-3)$ -glucans.

# Colonización vs Infección

- Colonización comensal de la sup de mucosas. Individuos normales tienen anticuerpos. Falsos positivos
- Infecciones oportunistas en inmunocomprometidos baja producción de anticuerpos. Falsos negativos

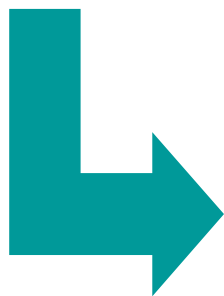
**H. UNICELULAR  
(levadura)**



**Blastoconidio**



**Pseudomicelio**



**Tubo germinal**



Stage 1: Colonization

Epithelial adhesion  
Nutrient acquisition



Adhesins  
Hydrolytic enzymes  
Hypha formation  
Phenotypic switching  
Molecular mimicry?

Stage 2: Superficial infection

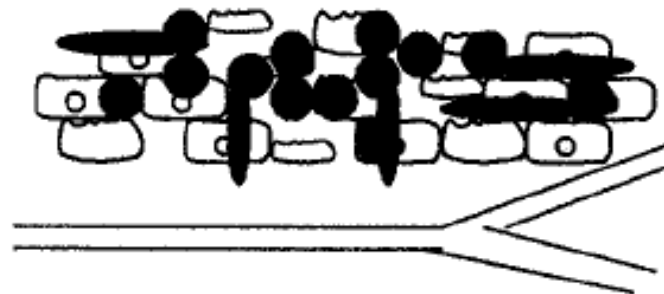
Epithelial penetration  
Degradation of host proteins



Hydrolytic enzymes  
Hypha formation

Stage 3: Deep-seated infection

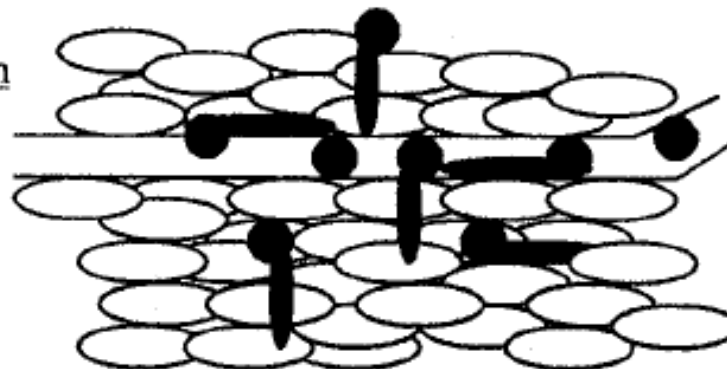
Tissue penetration  
Vascular invasion  
Immune evasion or escape



Hydrolytic enzymes  
Hypha formation  
Host mimicry?  
Immunomodulators?

Stage 4: Disseminated infection

Endothelial adhesion  
Infection of other host tissues  
Activation of coagulation and  
blood clotting cascades

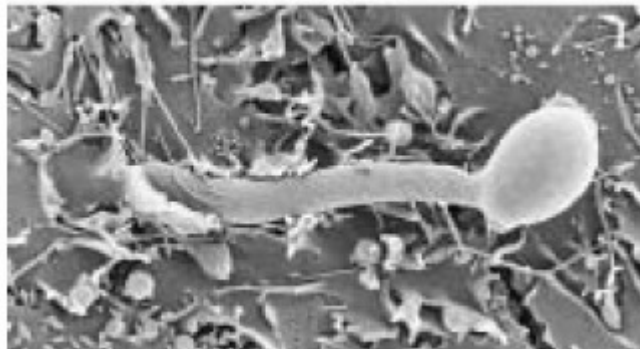


Adhesins  
Hydrolytic enzymes  
Hypha formation  
Phenotypic switching?  
Antioxidants?  
Immunomodulators?

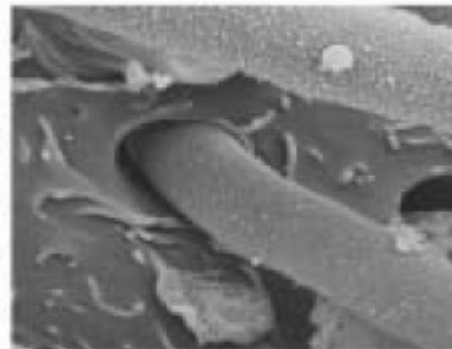
# Invasión

- Penetración: secreción de enzimas hidrolíticas como SAPs ( proteasa), Plbs (fosfolipasa), Lips (lipasa) que digieren la sup. epitelial
- Endocitosis por cél. Epitelial ( Als3 . Proteina de adhesión anclada a GPI)

induced endocytosis



active penetration



# Antígenos específicos de la forma hifal

- La transformación a la forma hifal es un factor de virulencia, asociado con una fase invasiva:
- Hyr1; proteína reguladora hifal glicoproteína de la pared del tubo germinal
- Ece1: proteína de elongación de la célula
- Als3: glicoproteína de la pared celular similar a aglutinina implicada en la adhesión a la superficie del huésped
- Hwp1: glicoproteína expresada en la superficie de la pared hifal relacionada con la adherencia y factor de virulencia

# Enzimas

- Enolasa: enzima glicolítica inmunodominante presente en el citoplasma y en la pared interna de *Cándida Albicans* en ambas formas.
- Proteínasa aspartil secretada: Pt secretadas por *Cándida sp.* Considerada un antígeno inmunodominante y factor de virulencia asociado con adherencia e invasión a tejidos y diseminación.

# Proteínas Recombinantes

- Sistema de expresión: bacterias, hongos, baculovirus-cél de insectos: elección del vector( plásmido) y el hésped. Considerar: tamaño del inserto, sitios de restricción, estrategias de purificación, resistencia a antibioticos para selección
- DNA constructor
- Data base genoma de Cándida (CGD)
- [http// www.candidagenome. org](http://www.candidagenome.org)
- Importante conocer estado y sitios de glicosilación, uniones disulfuras, modificaciones postraslacionales, estabilidad de la proteina
- Ej. Bacteriofago T7 en E.Coli ( pt no glicosiladas)

## Fuentes naturales de proteínas

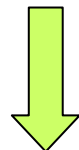
Bajos rendimientos

Impurezas



## Técnicas de ADN recombinante

Permiten la síntesis y la expresión autónoma, en un huésped determinado, de un híbrido formado por la combinación de moléculas de ADN de orígenes diferentes



Proteína heteróloga

# Estrategia para la obtención de una Proteína Heteróloga

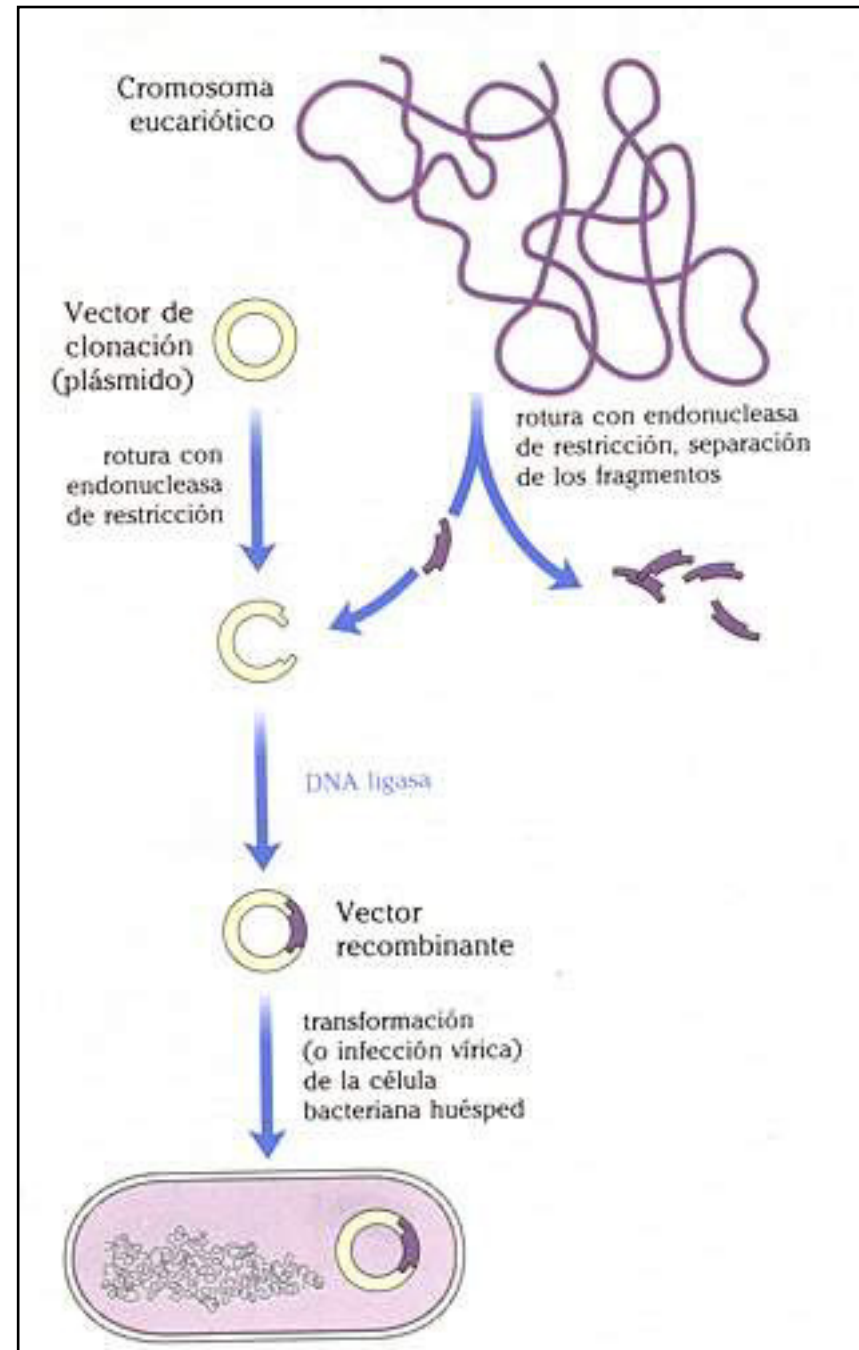
## ➤ Clonado

## ➤ Sistema de Expresión

- Estabilidad
- Solubilidad
- Tamaño
- Modificaciones Post-traduccionales

## ➤ Aplicaciones

- Antígeno (alta cc, fácil purificación)
- Estudio de la función biológica (mantener la actividad)
- Estudios estructurales (solubilidad)



# Aspectos Técnicos

## 1- Selección del ADN de interés

Dónde buscarlo ?

Qué expresamos ?

Cuánto necesitamos ?

## 2- Selección del vector

Expresión en eucariotas

Expresión en procariotas

## 3- Digestión, Ligación del vector y del inserto y transformación

## 4- Clonado y Expresión de la proteína

Plegamiento de la proteína

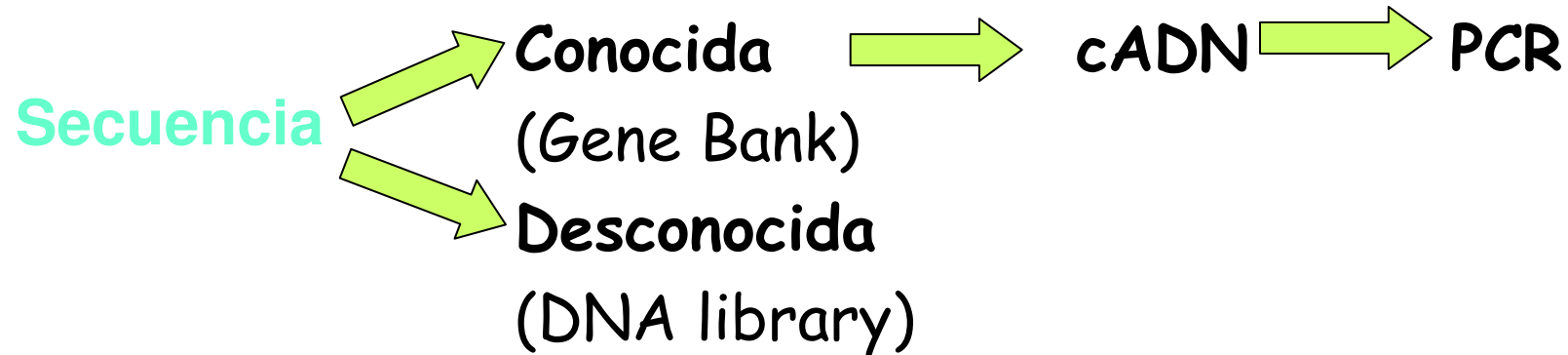
## 5- Purificación

## 6- Detección (SDS-PAGE)

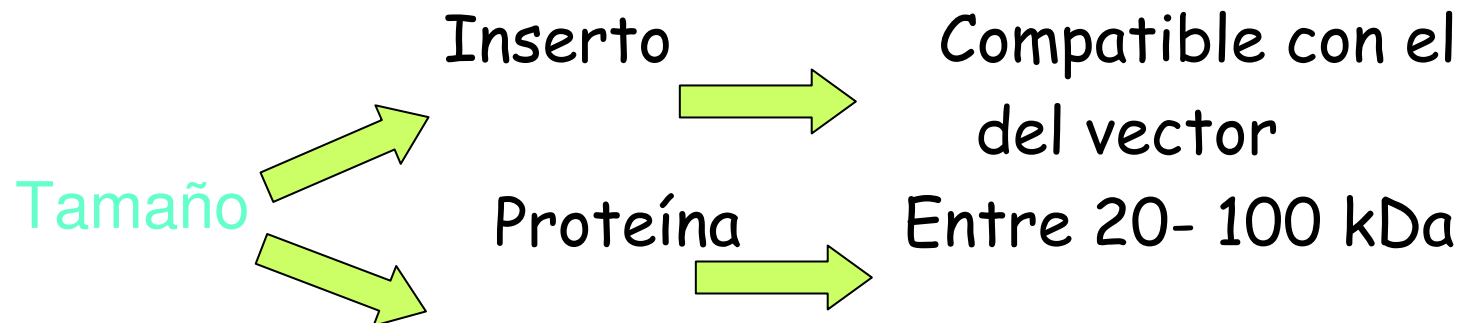
Confirmación de identidad (WB/secuencia de ADN)



# Selección del ADN de interés



Qué porción del gen vamos a expresar ?



Tener en cuenta:

hidrofilicidad/hidrofobicidad

# Candida Genome Database



Quick Search:

[Site Map](#) | [Full Search](#) | [Help](#) | [Contact CGD](#) | [Home](#)

- [Community Info](#)
- [Submit Data](#)
- [BLAST](#)
- [Primers](#)
- [PatMatch](#)
- [Gene/Seq Resources](#)
- [Advanced Search](#)
- [Virtual Library](#)

## Search Options

- [View all, Advanced Search, Get Sequence, BLAST, GBrowse \(A21\), Pathways, PatMatch, Primers, Full-text Search \(Textpresso\), Search CGD web pages, Global Gene Hunter, Search Literature, and more.](#)

## Help Resources

- [View all, Getting Started, Sitemap, FAQ, and more.](#)

## GO Resources

- [View all, SGD GO Tutorial, What is GO?, GO Slim Mapper, GO Term Finder, and more.](#)

## Community

This is the home of the *Candida* Genome Database, a resource for genomic sequence data and gene and protein information for *Candida albicans*. CGD is based on the [Saccharomyces Genome Database](#) and is funded by the [National Institute of Dental & Craniofacial Research](#) at the [US National Institutes of Health](#).

## CGD News

- 10th ASM Conference on *Candida* and Candidiasis**  
The 10th ASM Conference on *Candida* and Candidiasis will take place from March 22-26, 2010, at the Hyatt Regency in Miami Florida. Abstract submissions will open in Fall 2009. Please see the [meeting web site](#) for details. (Posted May 10, 2009)
- Search full text of *Candida* journal articles with Textpresso**  
A [full-text literature search capability](#) has now been added to CGD. The literature search tool is powered by Textpresso, a text-mining tool developed at Wormbase ([Muller H, et al. \(2004\) PLoS Biol. 2\(11\):e309](#)). Currently, the application contains over 16,500 *Candida*-related full-text journal articles. The full-text literature search can be accessed via the Full-text Search link on the sidebar on the CGD home page, and is also available as a link on the [Search Options](#) contents page. (Posted April 14, 2009)



Quick Search:  Submit

Site Map | Full Search | Help | Contact CGD | Home

Community Info Submit Data BLAST Primers PatMatch Gene/Seq Resources Advanced Search Virtual Library

### HWP1/orf19.1321 Summary

Help

Summary Locus History Literature Gene Ontology Phenotype

#### HWP1 BASIC INFORMATION [ View References ]

Standard Name	<i>HWP1</i>
Systematic Name	orf19.1321
Allele Name	orf19.8901
Feature Type	ORF, Verified
Description	Hyphal cell wall protein; covalently crosslinked to epithelial cells by host transglutaminase; opaque- and alpha-factor induced; at MTL side of conjugation tube; assessment of virulence role complicated by URA3 effects (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)
Name Description	Hyphal Wall Protein <sup>3</sup>
Alias	<i>ECE2</i> <sup>9</sup> orf19.8901, IPF26012.1 <sup>10</sup> , IPF12916.1 <sup>10</sup> , Contig4-2436_0002 <sup>11</sup> , orf6.4883 <sup>12</sup> , CA2825 <sup>10</sup> ,

#### HWP1 RESOURCES

**GBrowse for Assembly 21**  
Click on map for expanded view

orf19.1321

**All Annotated Se**  
orf19.1321  
HWP1, Verified,  
orf19.8901  
Unche

**GBrowse for Assembly 19**  
Click on map for expanded view

orf19.1321 orf19.8901