

Seminario N° 1

Antígenos-Inmunización

Inmunología Clínica
2009

Consigna:

Obtener anticuerpos anti- cándidas

- Conceptos generales de Antígenos-
Inmunización
- Inmunización con *Cándida Albicans*
- Casos clínicos

- ¿Inmunización?
- ¿Antígeno- inmunógeno- hapteno?

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*

¿Qué factores influyen en la
inmunogenicidad?

Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

1.- Estructura bioquímica



Proteínas ricas en tirosina

Proteínas

Lípidos (se presentan en moléculas CD1)

Ácidos nucleicos

Sustancias inorgánicas

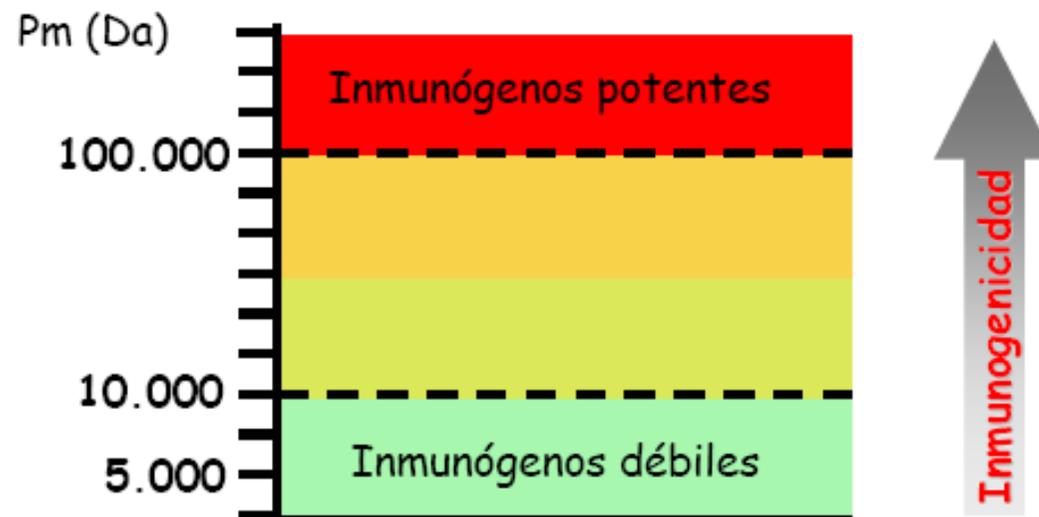
Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

2.- Peso molecular (Pm)

Relación directa entre el tamaño de una macromolécula y su inmunogenicidad



Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

3.- Composición y complejidad química

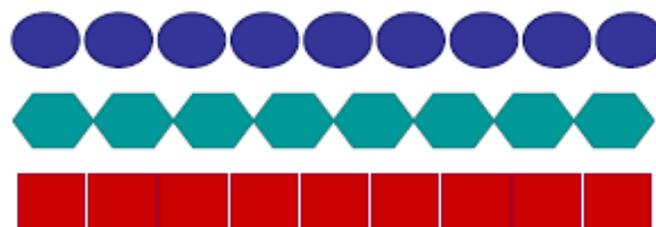
Relación directa entre la complejidad de una macromolécula y su inmunogenicidad

Copolímeros compuestos



↑↑ **Inmunogenicidad**

homopolímeros sintéticos



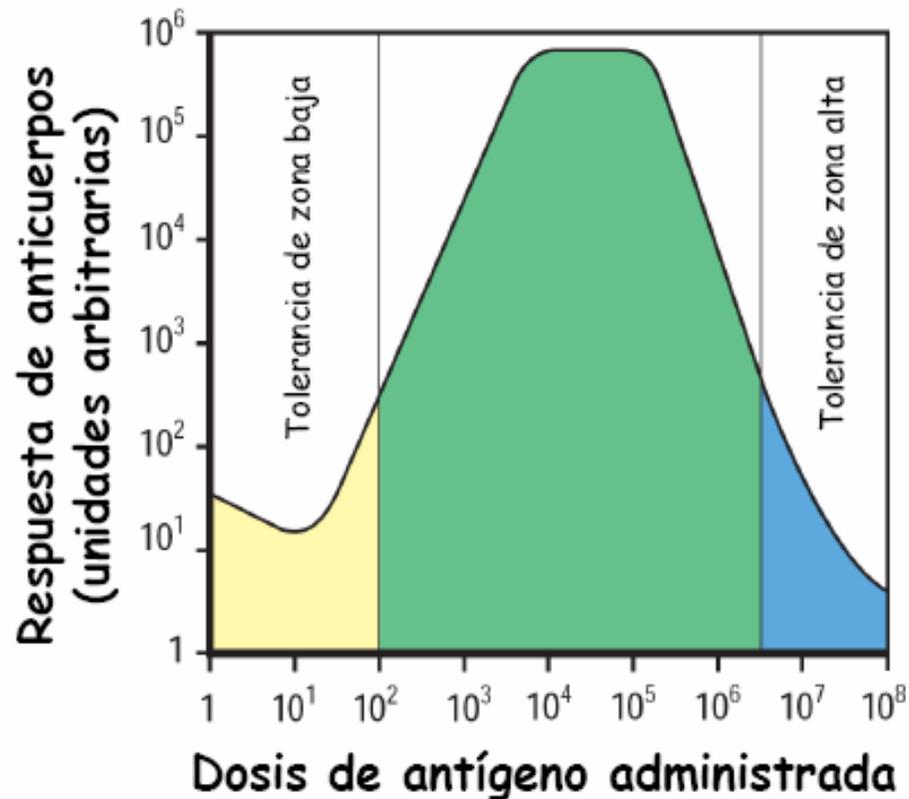
↓↓ **Inmunogenicidad**

Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

4.- Dosis de inmunógeno



Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

5.- Vía de administración



Vía parenteral no i.v.

Subcutánea
Intradérmica
Intramuscular

Vía oral

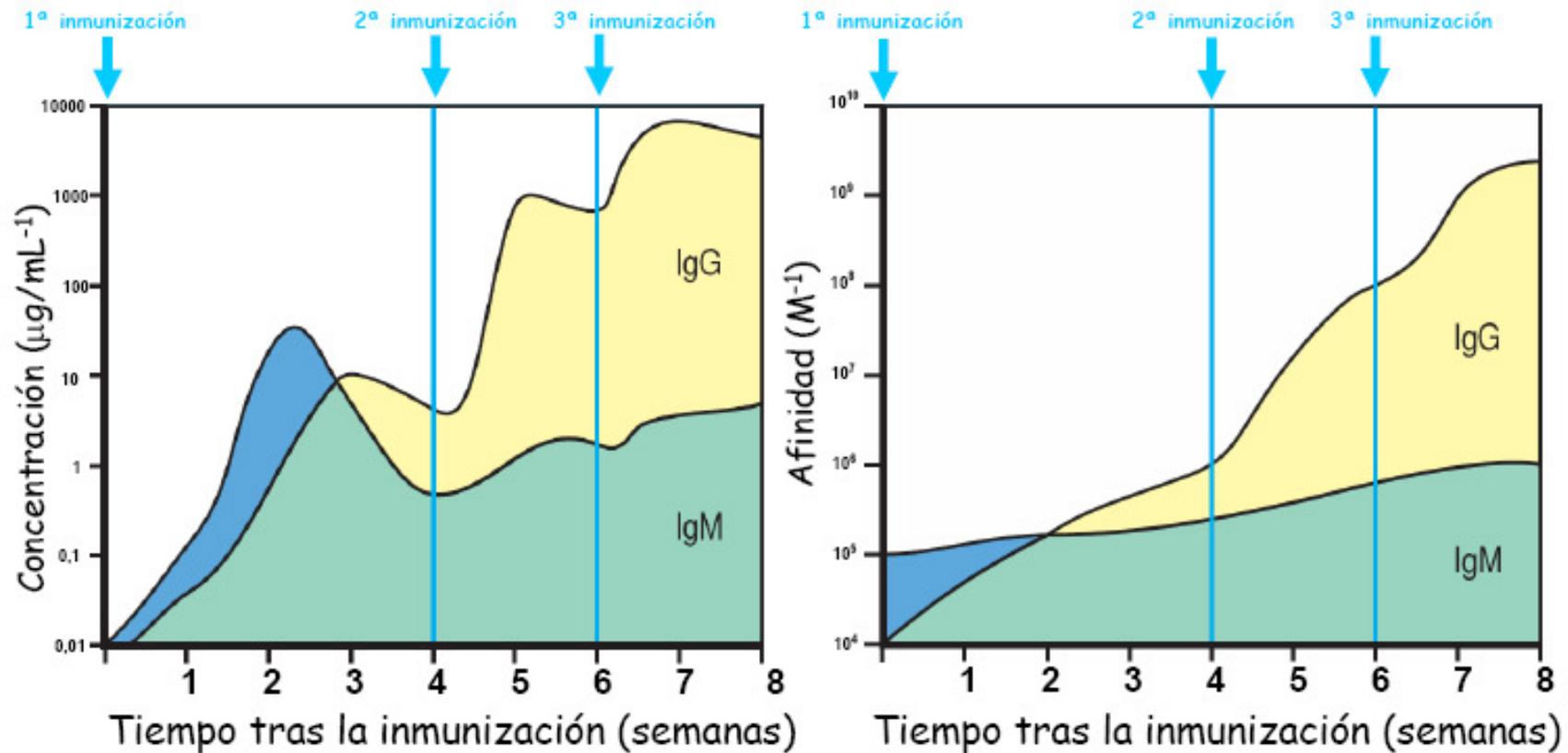
Vía intravenosa

Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

6.- Número de contactos



Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

¿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:
 - crear un reservorio o depósito del antígeno de larga vida.
 - activar o estimular 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

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	-	?	-	+

Factores que influyen

1. Estructura Química
2. Tamaño
3. Complejidad
4. Dosis
5. Vía de inoculación
6. Número de dosis
7. Adyuvante
8. Huesped

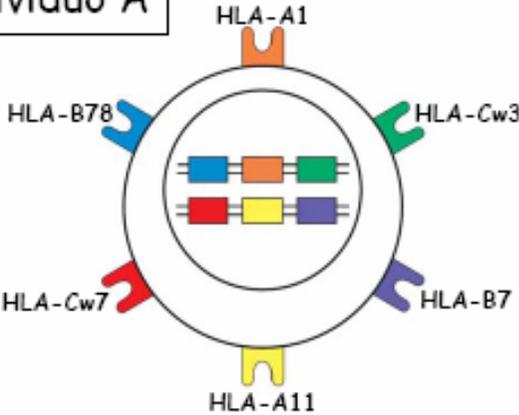
FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANTIGENICIDAD

8.- Factores dependientes del huésped

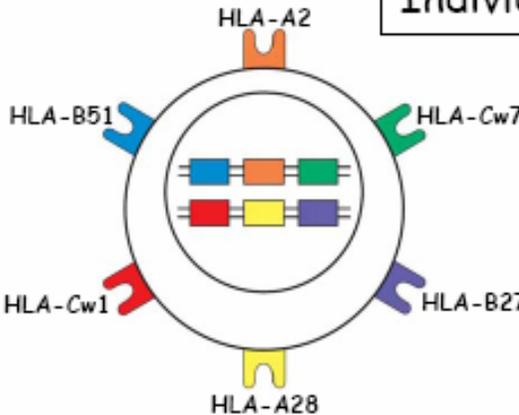
El **genotipo** del individuo inmunizado influye en el tipo y grado de respuesta inmune

MOLÉCULAS HLA

Individuo A



Individuo B



¿Otras características del antígeno considera importante tener en cuenta?

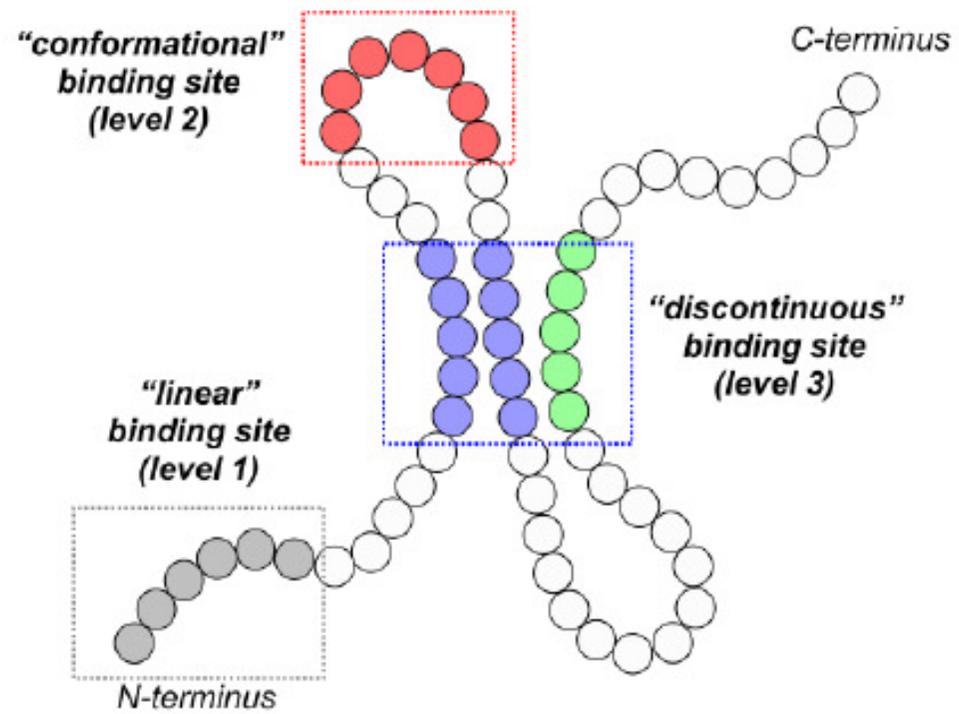
- ¿ Extraño?
- ¿ Número de epitopes del antígeno?
- ¿ Respuesta que genera?

CONCEPTO DE EPÍTOPO O DETERMINANTE ANTIGÉNICO

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

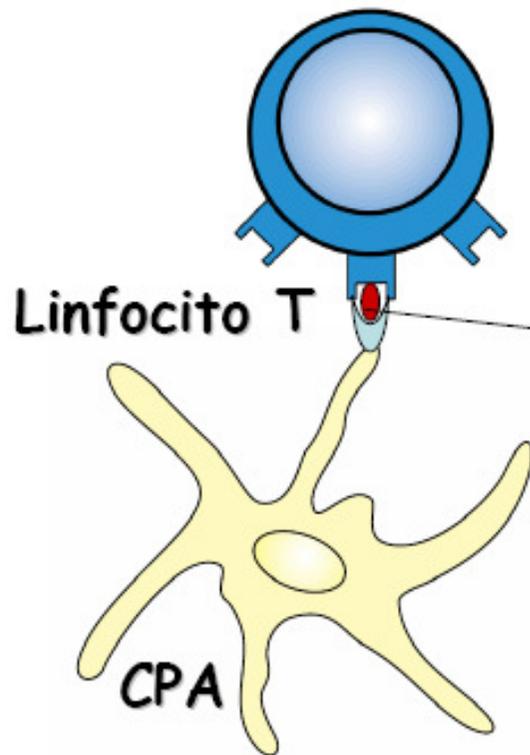
Un antígeno (o un inmunógeno) puede **tener varios epítomos o determinantes antigénicos**, cada uno de los cuales es reconocido de forma específica por un receptor concreto (TCR o BCR) / Ac.

¿ Considera relevante saber si el determinante antigénico tiene una secuencia lineal o conformacional?

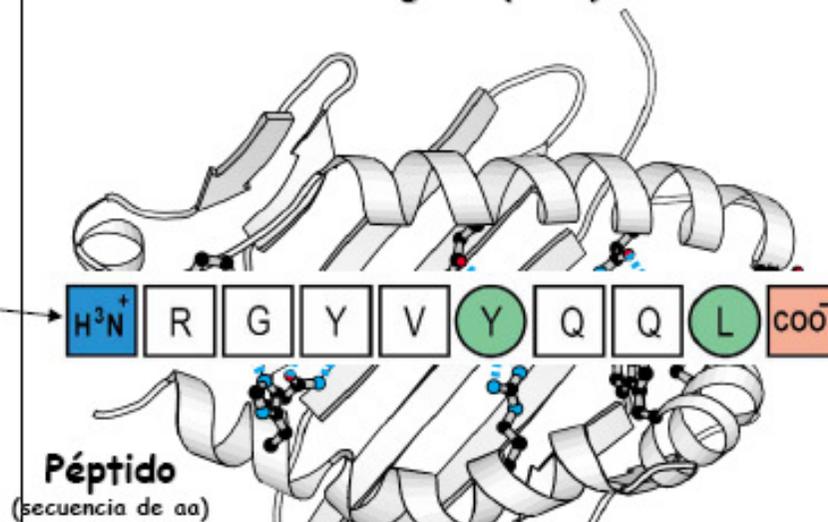


CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

Ag secuenciales

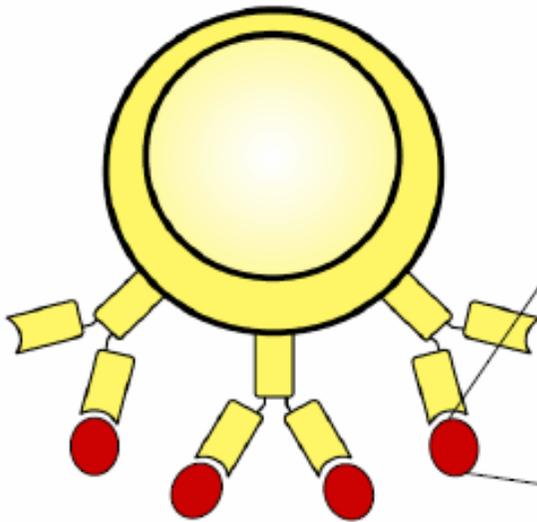


Molécula presentadora de antígeno (HLA)



CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

Ag conformacionales



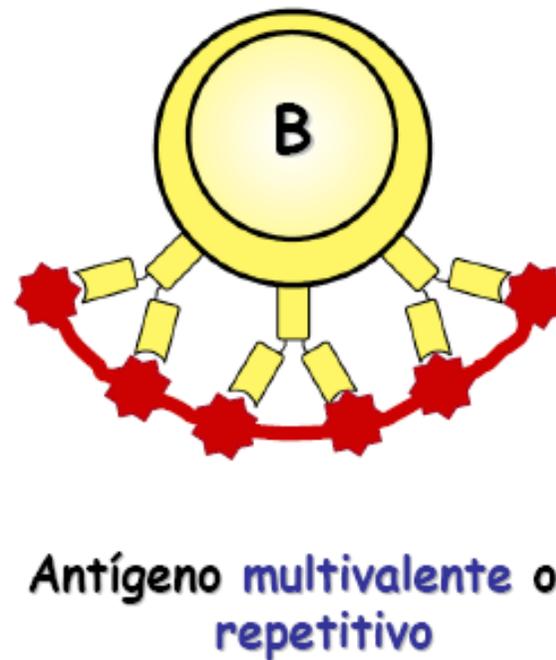
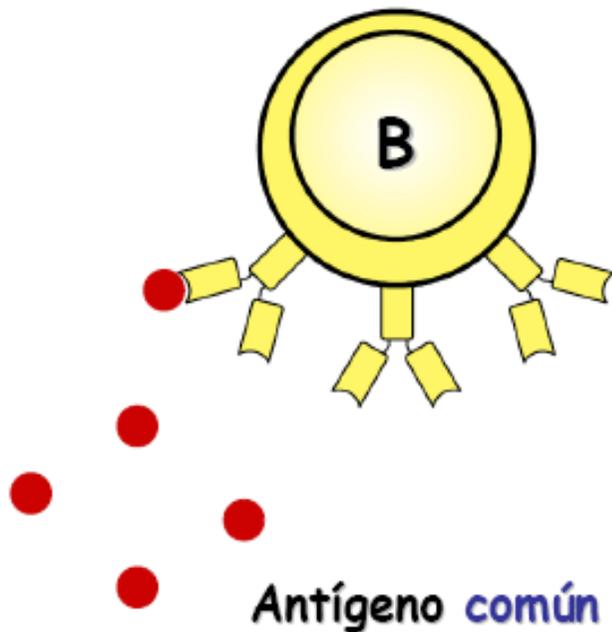
Linfocito B



Tipos de Ag conformacionales:
-Continuos
-Discontinuos

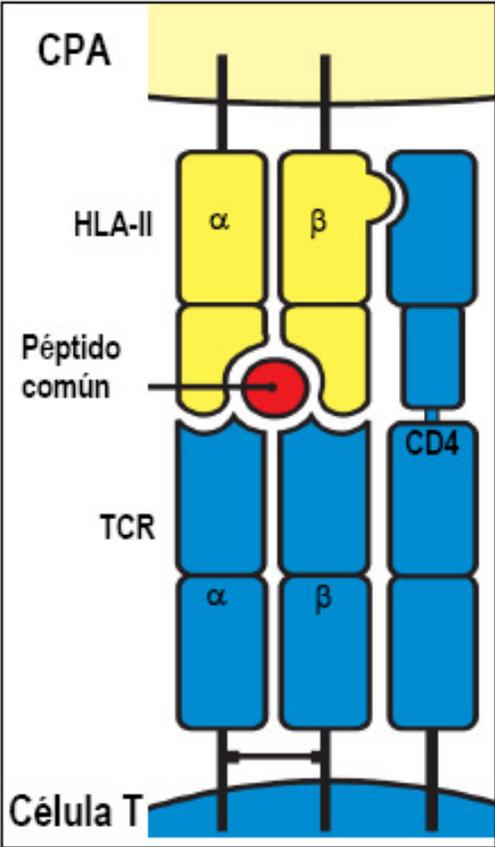
TIPOS "ESPECIALES" DE ANTÍGENOS

Antígenos multivalentes o repetitivos

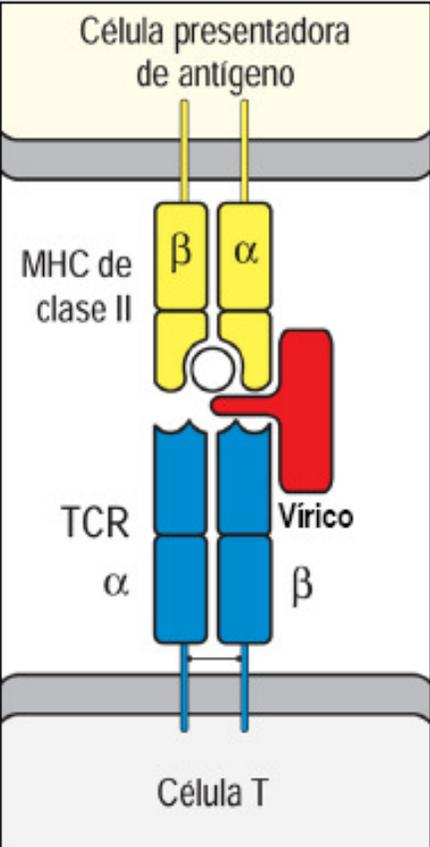
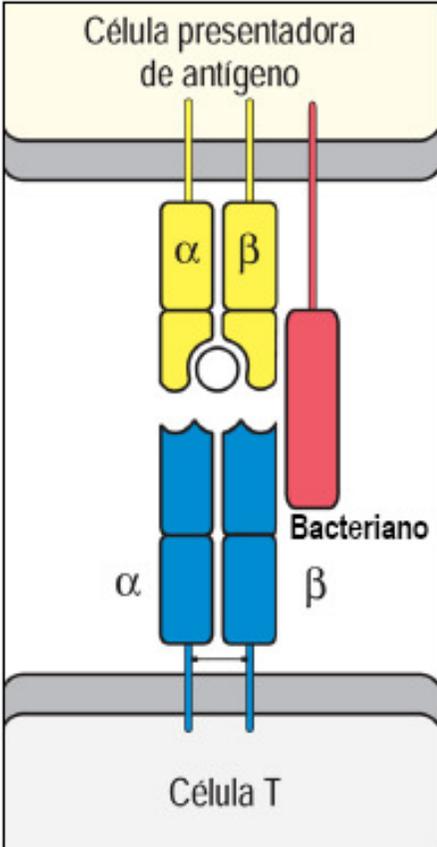


TIPOS "ESPECIALES" DE ANTÍGENOS

Antígeno común



Superantígenos



Factores que influyen en la inmunogenicidad de una proteína

Parámetro	Inmunog. incrementada	Inmunog. disminuida
Tamaño	Grande	Pequeño
Dosis	Intermedia	Alta o baja
Ruta	SC > IP > IV - Mucosa	
Composición	Compleja	Simple
Forma	Particulado	Soluble
Similaridad a lo propio	Múltiples dif.	Pocas dif.
Adyuvantes	{ Lib. lenta Presencia de bact.	Lib. rápida Ausencia de bact.
Interacción con MHC del huésped	Efectiva	No efectiva

¿ Como es la respuesta inmune que genero?

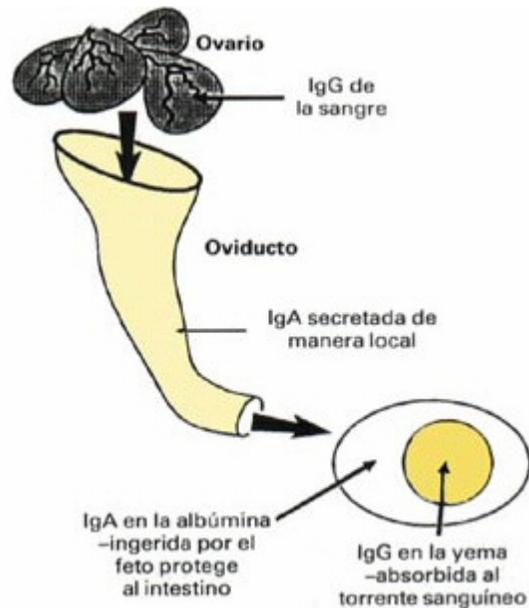
- Inmunomodulación?
- Prevención o Tratamiento?
- Específica o inespecífica?
- Respuesta primaria o secundaria?
- Generar memoria o no?
- Humoral y o celular?

¿Qué animales pueden utilizar para inmunizar?

- a) Si lo que buscan obtener es anticuerpos anti-candidas para administrar el suero a un individuo.
- b) En el caso de querer obtener anticuerpos anti- cándidas para uso en diagnóstico.

¿Inmunización de gallinas?

- La transferencia de la IgY al huevo ocurre en los folículos ováricos. En las membranas de los ovocitos de las gallinas existen receptores específicos que captan activamente las IgY presentes en el suero. Esto permite que en la yema del huevo, la concentración de IgY alcance niveles similares a los del suero.



Ventajas:

- **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.

Analice e Indique:

- a) Vía de inoculación seleccionada. Justifique
- b) Esquema de inmunización. Justifique.
- c) Forma de inmunización. ¿ En que casos utilizaría adyuvante? Justifique.

	Ratón	Rata	Cobayo	Conejo
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



Otras consideraciones.....

- a) Es importante la edad del animal. Justifique.
- b) Si trabajamos con un animal preñado ¿Podemos recuperar los anticuerpos deseados del líquido amniótico? Justifique
- c) Si lo amamanta ¿Puedo obtener anticuerpos del recién nacido? Justifique
- d) Modificaría esto la conducta de una inmunización

¿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.
- Los anticuerpos homólogos atraviesan placenta pero no los heterólogos.

Inmunizar con *Cándida Albicans*

- Inocular un Conejo por vía SC 4-6 veces cada 15 días 1ml de antígeno con 1ml de adyuvante completo- incompleto de Freund.
- Respuesta humoral con producción de IgG de alta afinidad, memoria.
- ¿Qué antígeno utilizamos?

Inmunización con *Candida Albicans*

- a) Si inmuniza con la levadura completa ¿obtiene anticuerpos monoclonales o policlonales? Ventajas y Desventajas.
- b) ¿Y si inmuniza con una proteína y con un péptido?
- c) En el caso de querer obtener anticuerpos monoclonales como lo haría? En que especie? Justifique.

¿Antígeno?

- Levadura
- 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

¿Antígeno?

- **Levadura**
- 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%
- Constatar viabilidad?

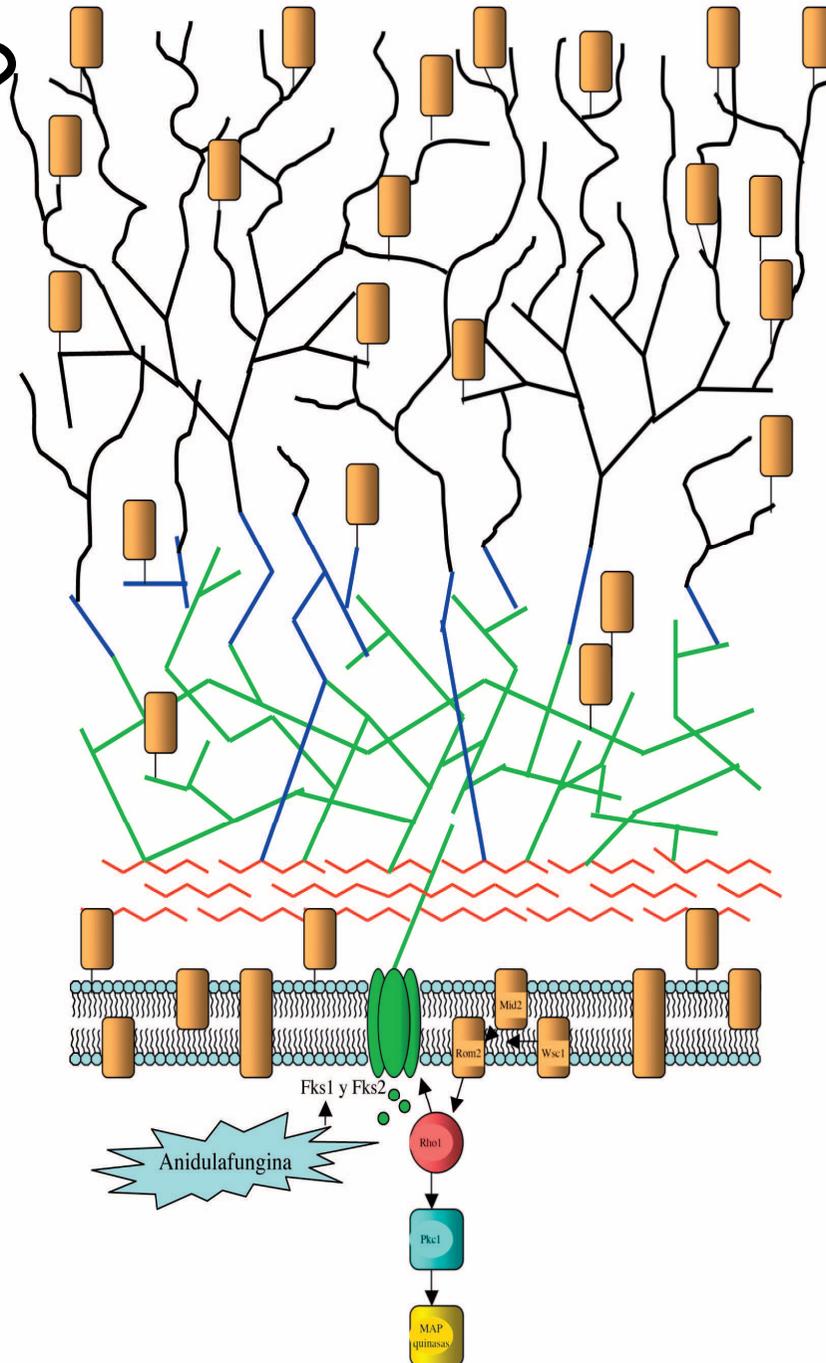
¿Concentración del inoculo?

- Concentración 10^9 /ml ¿Cómo ajusto la concentración?
- Tubo 3 del nefelómetro de Mac Farland (0,3ml ClBa 1%+ 9,7ml H₂S₄Al1%)
- Leer a 660nm (previamente una curva (Abs. 700 correlaciona con 100000000))
- Contar en cámara de neuvaber.

¿Antígeno purificado?

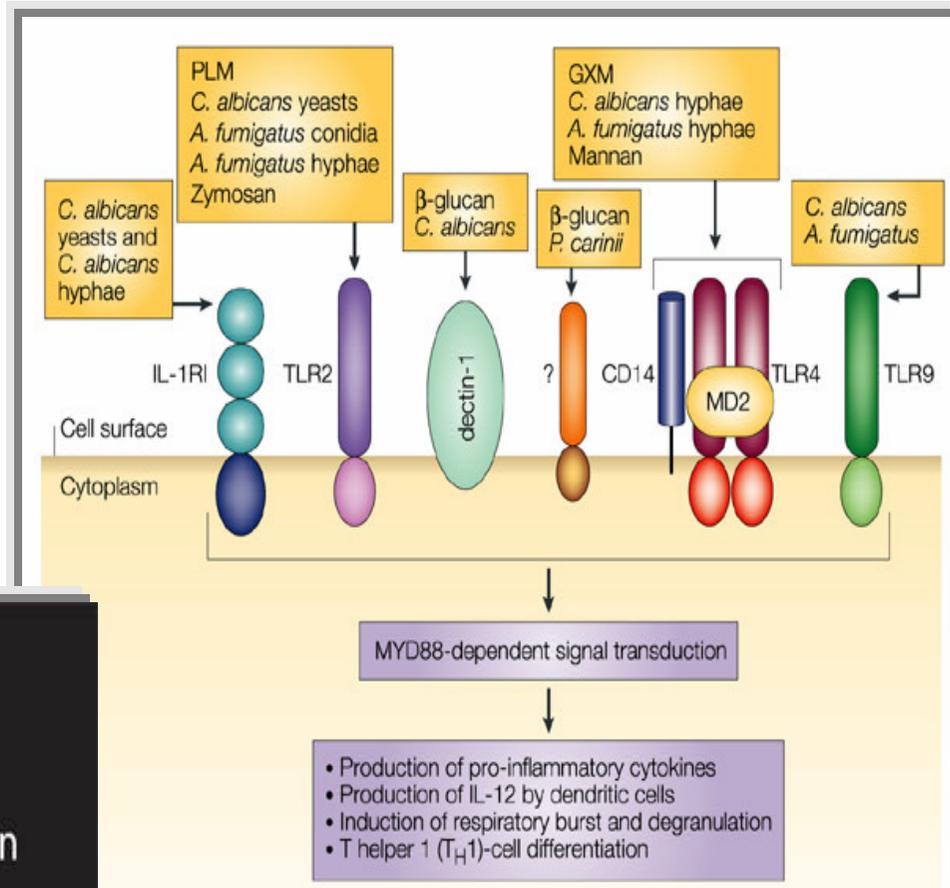
Pared celular de *C. albicans*:

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



PAMP-TLR

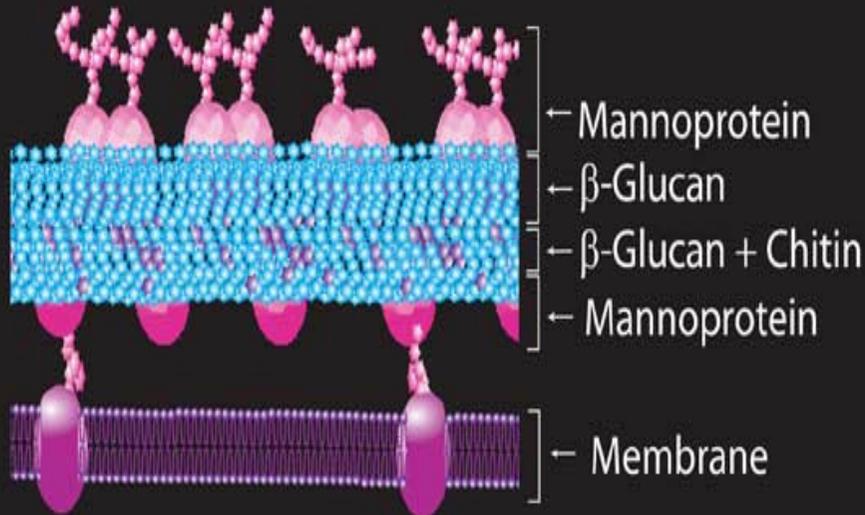
Hongos



Nature Reviews | Immunology

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

Yeast Cell Wall

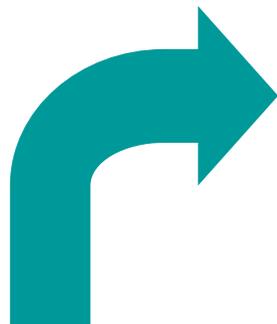


The yeast cell wall is made of ~25% helical $\beta(1-3)$ and $\beta(1-6)$ -D-glucans and ~25% oligo-mannans, ~20% protein, ~10% lipids, and some chitin. The protein component exists predominantly as a mannoprotein complex. Covalent linkages are reported to exist as $\beta(1-4)$ -linkages between the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

¿levadura?

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

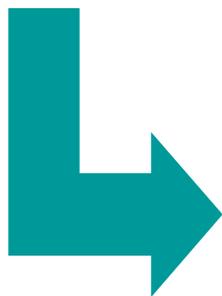
**H. UNICELULAR
(levadura)**



Blastoconidio



Pseudomicelio



Tubo germinal

Stage 1: Colonization

Epithelial adhesion
Nutrient acquisition



Adhesins
Hydrolytic enzymes
Hypha formation
Phenotypic switching
Molecular mimicry?

Stage 2: Superficial infection

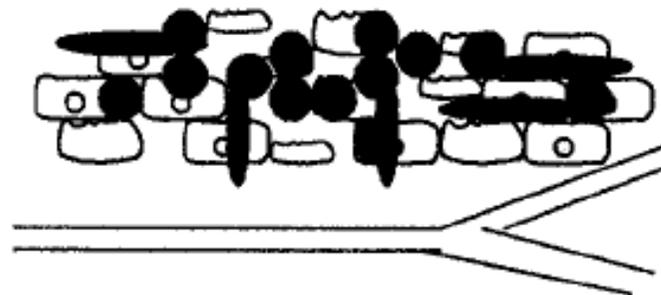
Epithelial penetration
Degradation of host proteins



Hydrolytic enzymes
Hypha formation

Stage 3: Deep-seated infection

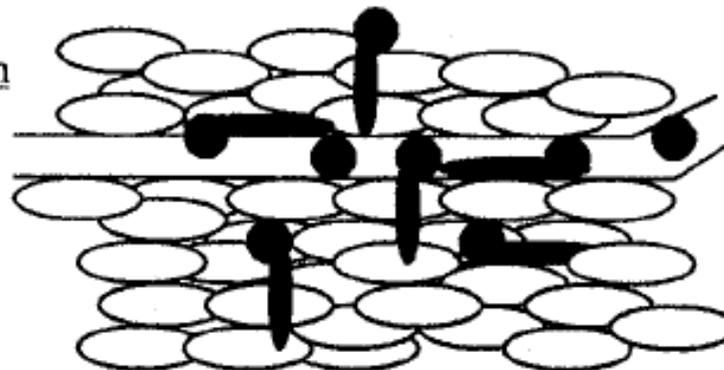
Tissue penetration
Vascular invasion
Immune evasion or escape



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

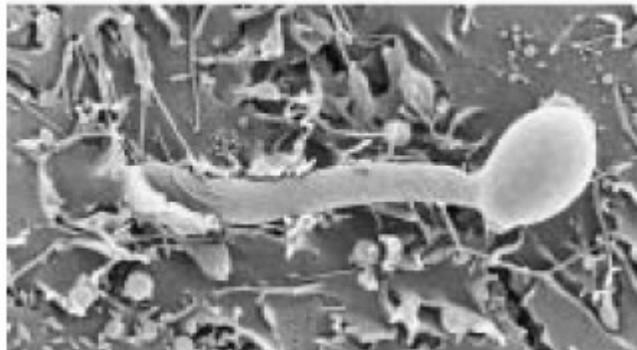


Adhesins
Hydrolytic enzymes
Hypha formation
Phenotypic switching?
Antioxidants?
Immunomodulators?

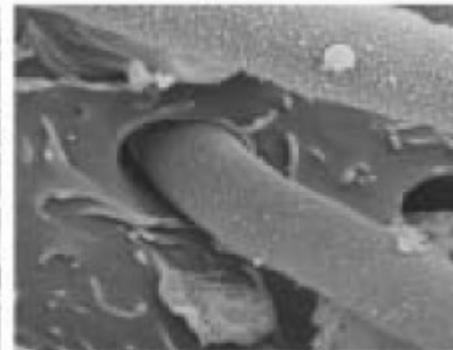
Invasión: enzimas y proteínas de adhesión

- 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.

¿Cómo los obtengo?

- Antígeno purificado
- Proteína recombinante
- Péptido sintético

Fuentes naturales de proteínas

Bajos rendimientos

Impurezas



Técnicas de ADN recombinante

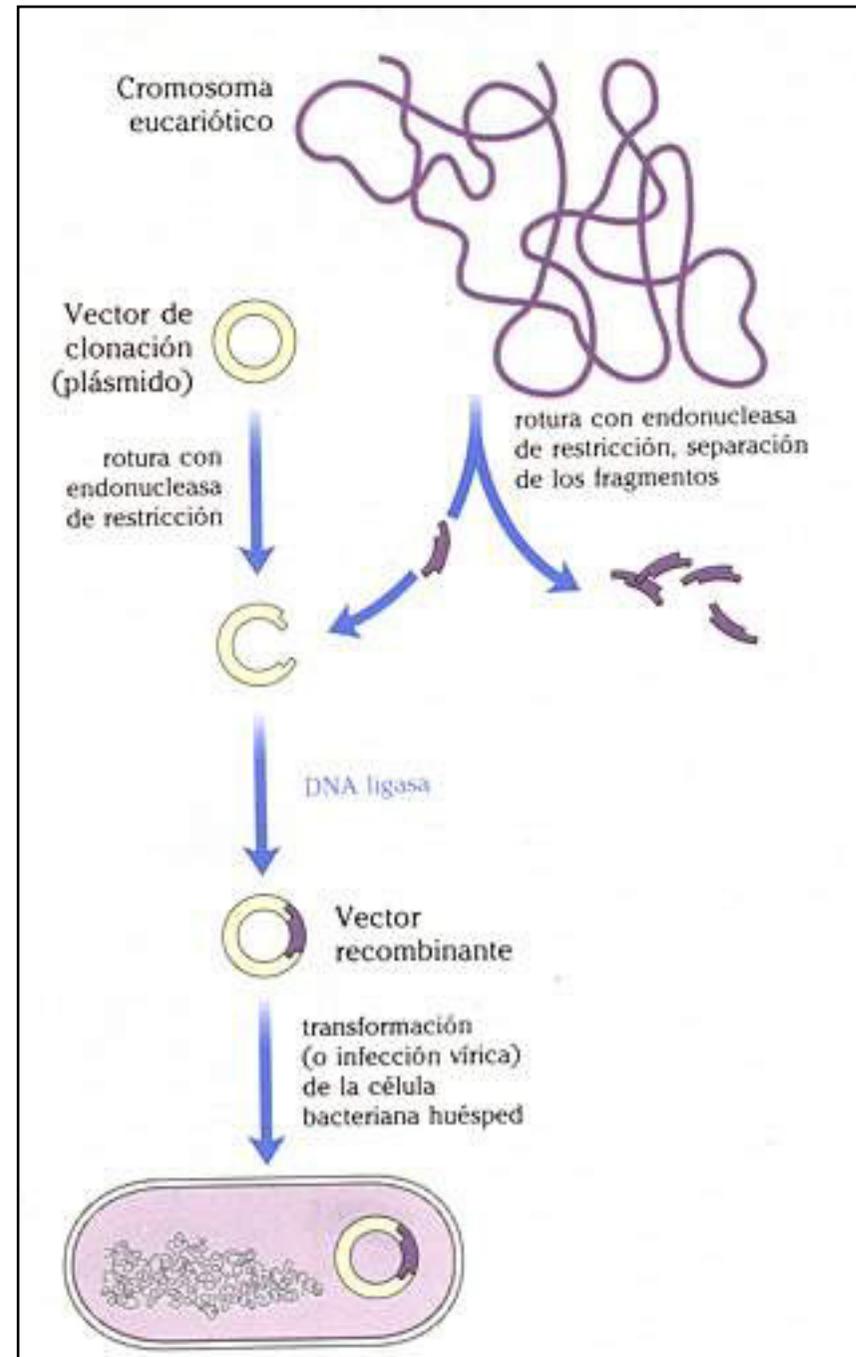
Permiten la síntesis y la expresión autónoma, en un huésped determinado, de un híbrido formado por la combinación de moléculas de ADN de orígenes diferentes



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

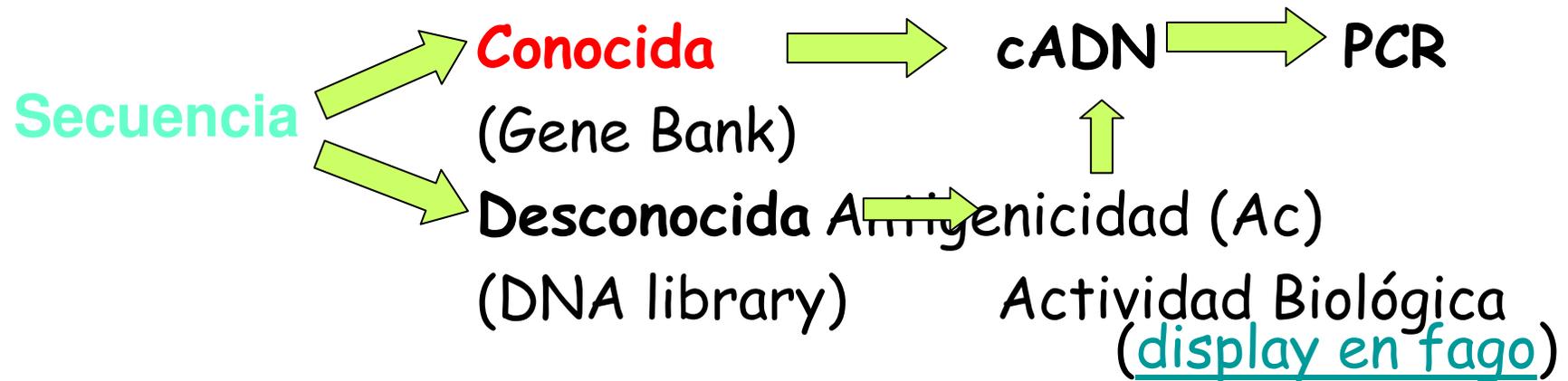
Plegamiento de la proteína

5- Purificación

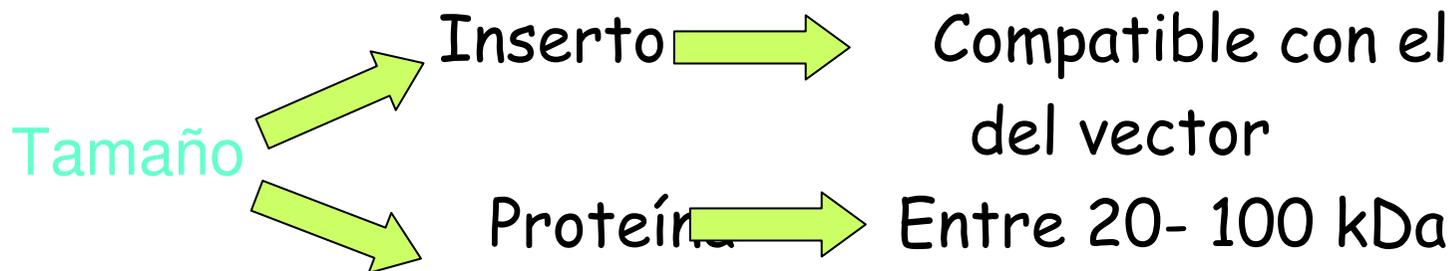
6- Detección (SDS-PAGE)

Confirmación de identidad (WB/secuencia de ADN)

1- Selección del ADN de interés



Qué porción del gen vamos a expresar ?



Tener en cuenta:

- hidrofilicidad/hidrofobicidad
- presencia de péptido señal

The Candida Genome Database - Windows Internet Explorer

C:\Documents and Settings\Administrador\Mis documentos\susana\trabajos practico immuno\Práctico 1 y 2 antígeno- inmunización\lo último\The Candida Genome Database.mht

Local Strike Customized Web Search

Google

Windows Live Bing

Novedades Perfil Correo Fotos Calendario MSN Compartir

Acceder Iniciar sesión

The Candida Genome Database

Candida Genome Database

CGD

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](#)

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)

Inicio

C:\Documents and Se... Presentación1.ppt C:\Documents and Se... The Candida Genome... Adobe Reader - [ibi... Internet 100% 10:46

Data base genoma de Cándida (CGD)

Síntesis de Péptidos



Epitope

143 item(s) found, displaying 1 to 25 (Click the column headers to adjust the sorting)

« previous 1 2 3 4 5 6 next » Go To » 1

Export all results: Excel

Epitope ID ↑	Structure	Source Antigen	Source Organism
697	ADKSSILFLCDD	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans
960	AEHARDHTLRFG	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans
1402	AFSVAAPVTVTR	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans
3708	APPWYKNL	Aureobasidin A resistance protein homolog	Candida albicans
3900	APVTVTRFVNAS	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans
4681	ASPTGYDWRADW	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans
4984	ATGQIIFGGVDNAKYSGLI	secreted aspartic proteinase 2	Candida albicans
7719	DCNLSGDVVFNFSSKNAKISV	aspartic proteinase	Candida albicans
7817	DDLDDKCKNDGW	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans
8119	DEPAGE	heat shock protein 90	Candida albicans
8132	DEQFIPK + AMID(K7)	pillin	Pseudomonas aeruginosa
8505	DGTSYKKSDFSS	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans
8535	DUTLDFSSKDFSS	pH-regulated antigen PRA1 precursor	Candida albicans

A base de péptidos sintéticos no progresan:

- ❖ no son tan inmunógenos como las proteínas
- ❖ facilidad para sintetizar proteínas recombinantes o de alta pureza
- ❖ dificultad para incluir los epítopes inmunodominantes