

Asignatura: Anticuerpos: producción y aplicaciones (PCA).

Profesores: María Dolores López Ávalos, Margarita Pérez Martín, Jesús Mateos Grondona y Juan Pérez Rodríguez (coordinador),

## 1. Breve descripción de la asignatura

Los anticuerpos se han convertido en los últimos tiempos en una herramienta fundamental de la investigación biológica y médica.

Por su especificidad, afinidad y versatilidad, los anticuerpos se usan en múltiples técnicas inmunoquímicas con diversos objetivos, entre otros: detección de moléculas en la superficie de células vivas (citometría de flujo), identificación y cuantificación de moléculas en fluidos biológicos (ELISA, RIA), análisis de extractos celulares (inmunoblot), inmunolocalización de componentes de células y tejidos (inmunocitoquímica).

Además de los usos anteriormente mencionados, los anticuerpos son herramientas fundamentales en el diagnóstico de enfermedades (detección de antígenos asociados a una determinada patología) y, más recientemente, en determinados tratamientos terapéuticos (bloqueo de moléculas específicas, destrucción de células tumorales, por ej).

En la asignatura PCA tratamos de dar una visión amplia sobre los aspectos fundamentales de la producción, caracterización y uso de anticuerpos policlonales y monoclonales para que cada alumno pueda aplicarlo a su campo de interés.

El enfoque de la asignatura es teórico-práctico, dedicando aproximadamente la mitad del tiempo disponible a exposición y discusión en el aula y la otra mitad a prácticas en el laboratorio.

## 2. Conocimiento previo mínimo

Cualquier alumno graduado en una disciplina biológica o médica (biología, ciencias ambientales, bioquímica, medicina, farmacia, veterinaria etc) debe tener conocimientos previos suficientes para cursar este módulo. Se necesitan conocimientos básicos de biología celular, bioquímica e inmunología.

### 3. Programa de la asignatura

Teoría:

Introducción: anticuerpos y técnicas inmunoquímicas

Anticuerpos policlonales contra antígenos proteicos

- Diseño del protocolo de inmunización
- Policlonales antipéptidos
- Ventajas y limitaciones de los policlonales

Anticuerpos monoclonales

- Etapas en la producción de monoclonales
- Elección del método de *screening*
- Tipos de ELISAs usados en el screening
- Clonación por dilución limitante
- Expansión clonal

Métodos de purificación de policlonales y monoclonales

Caracterización de los anticuerpos: especificidad y afinidad

Anticuerpos monoclonales contra diferentes conformaciones de la proteína hepática alfa-1-antitripsina

Anticuerpos funcionales: concepto y usos en investigación y en clínica

Procesamiento de tejidos animales para técnicas inmunocitoquímicas:

- Efectos de distintos tipos de fijadores sobre los epítomos.
- Técnicas de recuperación de antígenos para inmunocitoquímica.
- Pre-tratamiento del tejido para las distintas técnicas inmunocitoquímicas.

Tipos de técnicas inmunocitoquímicas.

Protocolo de inmunotinción con la técnica ABC.

Inmunofluorescencia: fundamentos, fluorocromos y técnicas más usadas.

Observación del ADN mediante microscopía de fluorescencia.

## Uso de agentes *anti-fading* en inmunofluorescencia

### Prácticas:

1. ELISA tipo *sandwich* cuantitativo con anticuerpos policlonales y monoclonales contra un antígeno proteico: desarrollo del ELISA, parámetros básicos, representación gráfica de los resultados, análisis de los resultados.
2. Inmunofluorescencia doble con anticuerpos marcadores de distintos tipos celulares del sistema nervioso en cortes de vibratomo de cerebro de ratas adultas. Observación de los cortes con un microscopio confocal.

### 4. Especialidad del profesorado

Los profesores participantes en el módulo PCA tienen amplia experiencia en la producción de anticuerpos y en su uso en distintas técnicas inmunoquímicas.

María Dolores López Ávalos y Jesús Mateos, centran su investigación en varios aspectos del sistema nervioso central: 1) la neurogénesis en individuos adultos; 2) las células endimarias; 3) la neuroinflamación. Se estudian interacciones entre ellos, como el mecanismo de muerte de las células endimarias durante la neuroinflamación, la modificación de la identidad de dichas células endimarias *in vitro*, o los factores que modulan la neurogénesis en diferentes regiones cerebrales. Para estas investigaciones se utilizan diferentes aproximaciones metodológicas, siendo la inmunocitoquímica una herramienta fundamental.

Margarita Pérez Martín trabaja en neurogénesis postnatal, evaluando la capacidad del cerebro adulto de roedores para producir neuronas que finalmente se integran en circuitos neuronales que participan en el establecimiento de la memoria olfativa, memoria espacial o en el control del balance energético del organismo. Esta plasticidad nerviosa se evalúa analizando el efecto de diversos factores tróficos (estradiol, IGF-I, GH) y diferentes situaciones fisiológicas o patológicas (envejecimiento, ejercicio, estrés, adicción a drogas) en diferentes áreas neurogénicas (ventrículos laterales, hipocampo e hipotálamo).

Juan Pérez Rodríguez trabaja en la producción de anticuerpos monoclonales contra la serpina (inhibidores de serín proteasas) alfa-1-antitripsina (AAT). Ha producido anticuerpos específicos para las diferentes conformaciones de la molécula. Dichos anticuerpos están permitiendo localizar y cuantificar la AAT en modelos animales y en muestras humanas tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. También ha participado en la producción de anticuerpos monoclonales bloqueantes de la polimerización de la AAT humana. Los polímeros de AAT son causantes de una enfermedad conformacional conocida como deficiencia en AAT con graves efectos en hígado y pulmón. Estos trabajos se vienen realizando durante los últimos 12 años en colaboración con el Prof DA Lomas, primero en la Universidad de Cambridge y después en la de Londres (UCL).