

## **Asignatura: Anticuerpos: producción y aplicaciones (PCA)**

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

### **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, así como para el diagnóstico y terapias en la clínica.

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 ejemplo).

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. Conocimientos previos mínimos**

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 antipeptidos
  - 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
- Producción de anticuerpos recombinantes.
- Métodos de purificación de policlonales y monoclonales
- Caracterización de los anticuerpos: especificidad y afinidad
- 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 epítopos.
  - 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. Inmunolocalización mediante microscopía confocal. Esta técnica permite la identificación simultánea de distintos tipos celulares en un mismo tejido, así como la colocalización de distintas moléculas en una misma célula. La técnica empleada se basa en el uso de anticuerpos que se unen de forma específica a proteínas en muestras de tejido. Estos anticuerpos se conjugan con anticuerpos secundarios específicos que se encuentran unidos a diferentes fluorocromos.

#### **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 neuroinflamación y el papel de la microglía; 2) las células endoteliales; 3) la neurogénesis en individuos adultos. Se estudian procesos como la memoria inmunológica de la microglía, el mecanismo de muerte de las células endoteliales durante la neuroinflamación, 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 integrarán en circuitos neuronales que participan en el establecimiento de la memoria olfativa, memoria espacial o en el control del balance energético del organismo. Actualmente, su investigación se centra en analizar la implicación de la neurogénesis hipocámpal en la aparición de síntomas depresivos inducidos por situaciones de estrés y su relación con el proceso neuroinflamatorio asociado. En sus estudios, utiliza como herramienta el uso combinado de anticuerpos específicos para distintos marcadores celulares y de proliferación, pudiendo así identificar y cuantificar las nuevas neuronas producidas, así como las características del entorno celular y molecular del nicho neurogénico en el que se encuentran.

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).