CAPÍTULO 8
Anticuerpos o Inmunoglobulinas

Mariana Bernstein y Marina Runco

En este capítulo, se describirán a los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (nombre dado debido a su naturaleza glucoproteica). Los anticuerpos son el producto de las células plasmáticas, derivadas de la activación y diferenciación de los linfocitos B, y son uno de los principales mediadores humorales de la inmunidad adaptativa. A lo largo del capítulo, y de aquí en adelante, tanto anticuerpos como inmunoglobulinas se encuentran abreviados como Ac e Ig, respectivamente, y se utilizarán ambos términos de modo indistinto.

Estructura de los anticuerpos

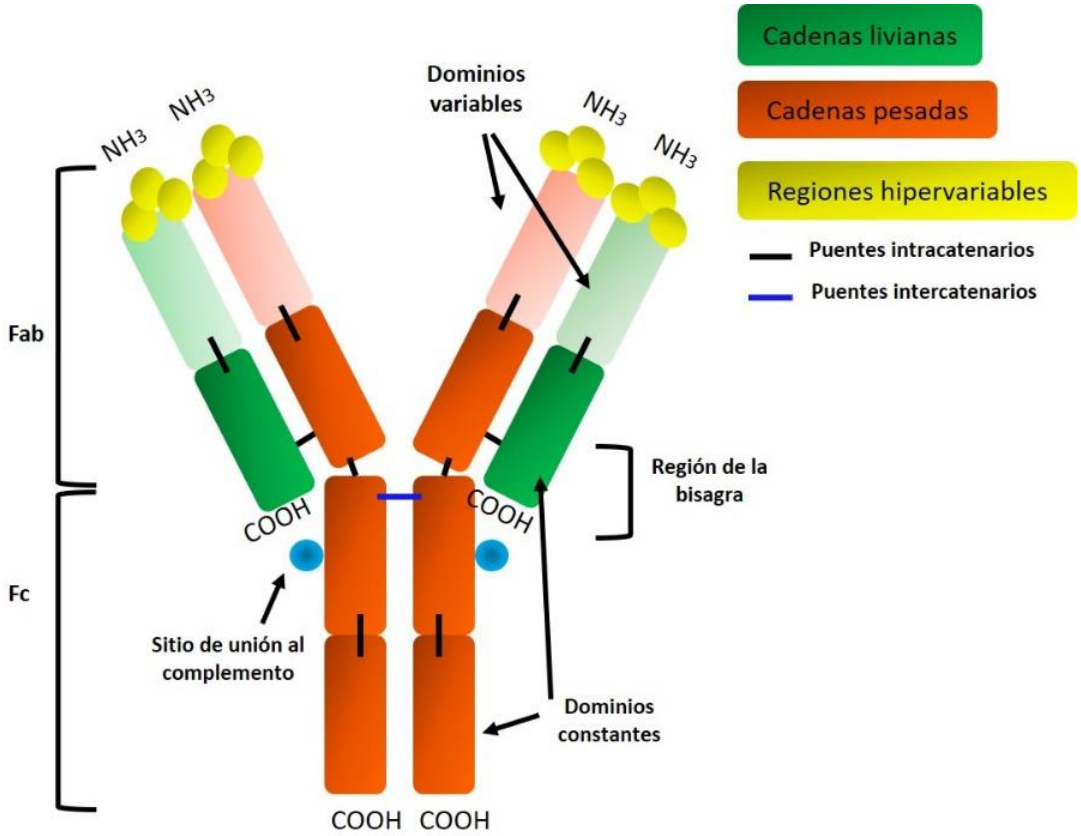
Describiremos a continuación la estructura de un monómero de Ig, cuyos detalles se visualizan en la Figura 8.1. Un monómero de Ig está formado por 4 cadenas peptídicas: 2 cadenas pesadas (50 kDa) idénticas entre sí y 2 cadenas livianas (25 kDa) idénticas entre sí. Las cadenas livianas pueden ser de tipo κ o λ según la secuencia de aminoácidos. Cada cadena pesada tiene una porción constante (que puede tener 3 o 4 dominios dependiendo de la clase de Ig) y otra porción variable. Cada cadena liviana también posee una porción constante y otra variable, ambas del mismo tamaño (igual cantidad de aminoácidos). Las 4 cadenas tienen un extremo amino terminal (NH_3) correspondiente a la porción variable y que participa en el reconocimiento antigénico, y un extremo carboxilo terminal ($COOH^-$) opuesto, correspondiente a la porción constante y que participa en la unión a los receptores para Ac. Además, en la región variable de las 4 cadenas existe una región hipervariable o *región determinante de complementariedad*. Las regiones entre estas secuencias de aminoácidos muestran un gran grado de conservación y forman un armazón que permitirá reconocer al epitopo específico.

La unión de las 2 cadenas pesadas y de cada cadena pesada con las cadenas livianas se realiza a través de puentes disulfuro intercatenarios (entre las diferentes cadenas) e intracatenarios (dentro de la misma cadena). Estos puentes son importantes porque otorgan estabilidad al monómero de Ig. Además, las Ig poseen una región bisagra que los divide en 2 porciones y permite el plegamiento. La porción superior se denomina Fab (del inglés *antigen binding fraction*) y es capaz de unirse al antígeno; la porción inferior se denomina Fc (del inglés

crystallizable fraction) y posee diversas funciones biológicas. También, existe un sitio de unión para el sistema del complemento, debajo de la zona de pliegue de la región bisagra. Este sitio usualmente está tapado o inactivado dado que la porción Fab se pliega sobre la porción Fc, quedando al descubierto únicamente cuando se realiza el reconocimiento del antígeno específico.

Figura 8.1

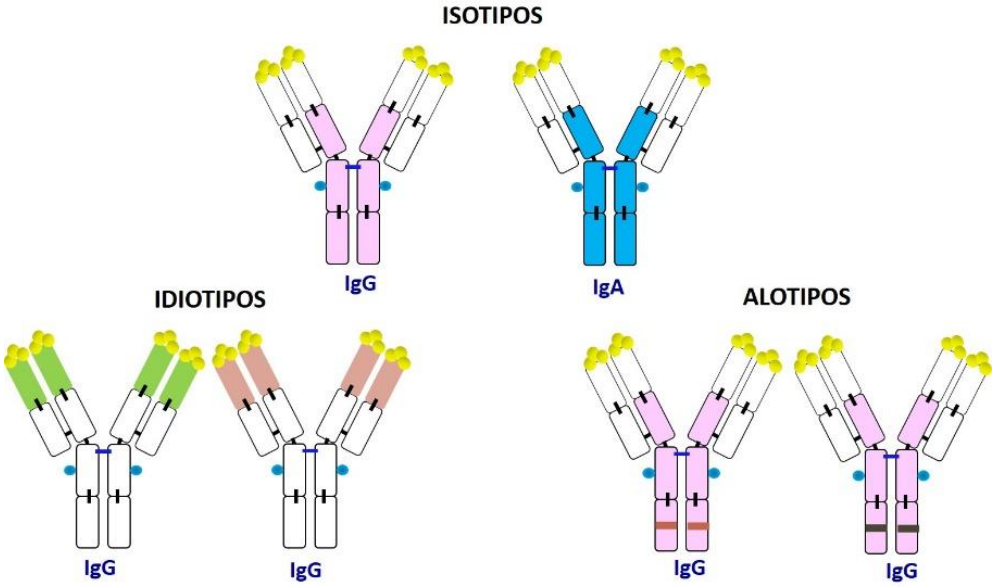
Estructura de un monómero de inmunoglobulina



Existen distintas variantes estructurales de la molécula básica de Ig. Cuando las diferencias se encuentran en las porciones constantes de las cadenas pesadas hablamos de diferencias isotípicas y tendremos diferentes isotipos de Ig, que se describirán a continuación. Cuando las diferencias son en el mismo isotipo, pero en distintos individuos de la misma especie se conocen como diferencias alotípicas. Por último, encontraremos las diferencias idiotípicas en la región variable de un mismo isotipo, por lo tanto, cada idiotipo es exclusivo para un clon determinado de Ac (Figura 8.2).

Figura 8.2

Variantes estructurales de la molécula básica de inmunoglobulina



Isotipos de anticuerpos

Existen 5 isotipos de Ac que pueden observarse en la Figura 8.3. La acción efectora y la localización de cada uno de ellos estará definida por la porción constante de sus cadenas pesadas.

La **IgM** (cadena pesada tipo μ) tiene estructura monomérica cuando actúa como BCR. Sin embargo, su estructura una vez secretada como Ac por las células plasmáticas es pentamérica (5 monómeros unidos a través de una cadena J que le da estabilidad). Es la primera Ig en producirse ante un primer contacto con un antígeno, en consecuencia, es poco específica ante un epitopo ya que las células que la producen no atraviesan los 4 procesos que se llevan a cabo en el centro germinativo (ver capítulo 7). Sus funciones principales son: neutralización de toxinas y microorganismos y activación del sistema del complemento (unida a su epitopo específico). Debido a su gran tamaño tiene relevancia en las pruebas de inmunodiagnóstico de aglutinación (ver capítulo 13).

La **IgG** (cadena pesada tipo γ) tiene estructura de monómero típico y es la más pequeña de las Ig. Su pequeño tamaño le permite migrar del compartimento vascular a los tejidos (en los caninos y felinos, una pequeña cantidad de IgG puede incluso atravesar la placenta, aunque este pasaje tiene poca relevancia protectora en dichas especies). Es la segunda Ig que aparece en sangre un primer contacto con un antígeno, presentando mayor especificidad hacia el antígeno, ya que sus células productoras han sufrido la hipermutación somática y la selección positiva en

el centro germinativo. Es la Ig que se encuentra en mayor concentración en el suero y con mayor vida media (21 días aproximadamente). Sus principales funciones son: neutralización, opsonización, citotoxicidad celular dependiente de Ac y activación del sistema del complemento (unida a su epitopo específico y siempre y cuando haya más de un monómero de IgG presente). Debido a su pequeño tamaño es muy eficaz en las pruebas de inmunodiagnóstico de precipitación (ver capítulo 13).

La **IgA** (cadena pesada tipo α) se localiza de modo característico en todas las mucosas (genitourinaria, digestiva, respiratoria, ocular). Tiene una estructura de dímero (2 monómeros unidos y estabilizados a través de una cadena J). En circulación puede estar como un monómero, pero en las mucosas se encuentra siempre en forma dimérica. Como dímero posee una pieza secretoria que cubre y protege a la Ig y evita su destrucción por las enzimas proteolíticas.

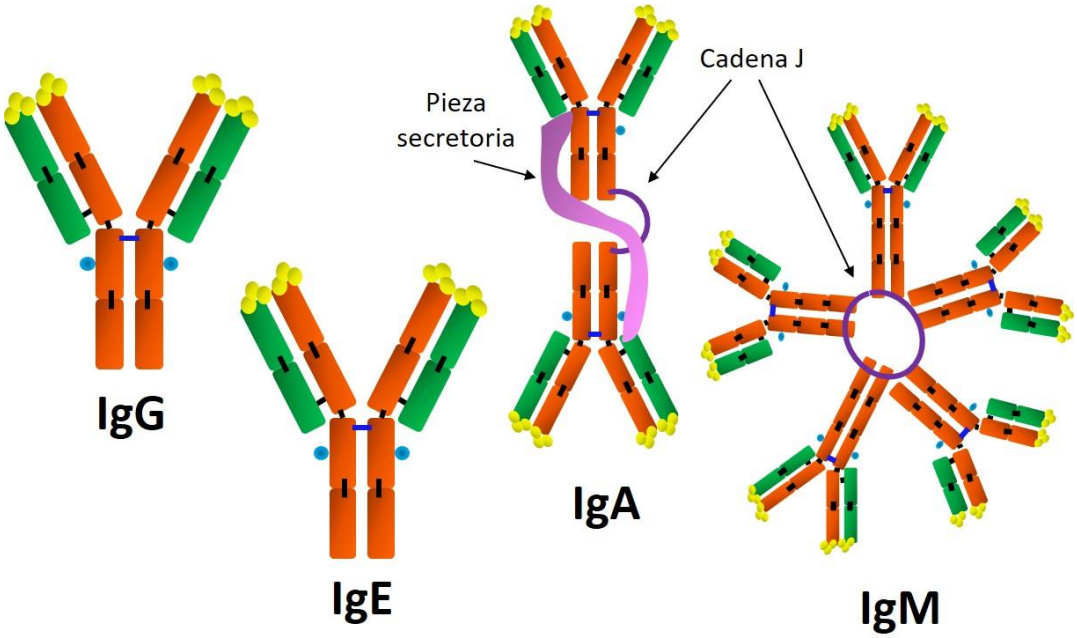
La **IgE** (cadena pesada tipo ε) también tiene estructura de monómero y actúa en las reacciones de hipersensibilidad generando la desgranulación de mastocitos y basófilos.

La **IgD** (cadena pesada tipo δ) es un monómero que se encuentra en primates, roedores y caninos. Tiene una bisagra muy larga que le otorga poca estabilidad y por ello es factible de ser destruida. No se sabe con certeza su función.

Hay dos propiedades que podemos reconocer en los Ac: la afinidad y la avidez. La *afinidad* se define como la *fuerza* que posee un Ac para unirse a un antígeno, es la fuerza combinada de todas sus interacciones con el epitopo específico. La IgG es la más afín por ser la más específica. Por otro lado, la *avidez* se define como la cantidad de sitios funcionales activos, la IgM al ser pentamérica posee muchos sitios de unión al antígeno (10), y aunque no todos son funcionales es la más ávida de las Ig.

Figura 8.3

Isotipos de inmunoglobulinas



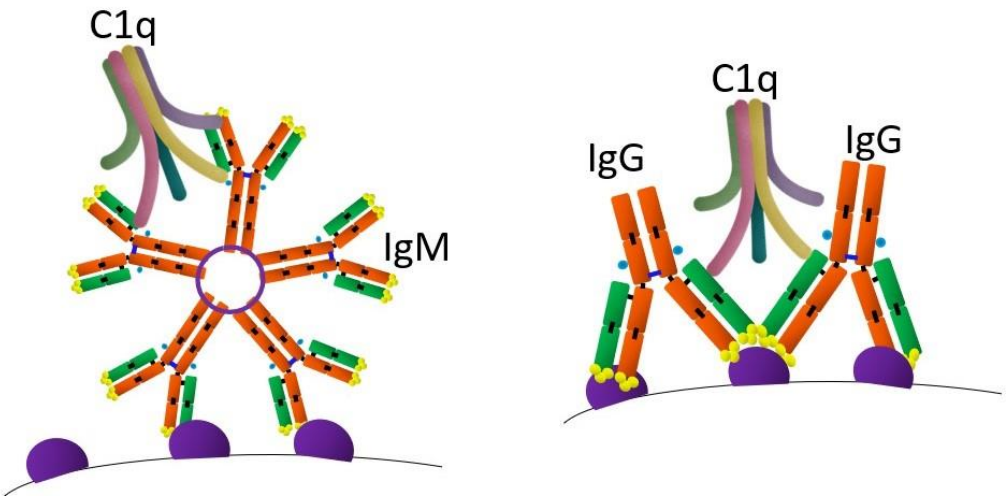
Funciones de los anticuerpos

Los Ac confieren un importante mecanismo de defensa del organismo frente a múltiples organismos patógenos: microorganismos de vida extracelular (ej: bacterias) y sus productos (ej: toxinas), microorganismos de vida intracelular (ej: virus) antes de ingresar a la célula diana (estado de viremia) y microorganismos de vida intravesicular (ej: *Toxoplasma gondii*) antes de ingresar a la célula diana (estado de parasitemia).

Las funciones principales incluyen la **neutralización** (unión del Ac al microorganismo o toxina impidiendo su ingreso a la célula diana), la **opsonización** (reconocimiento de la Ig unida a su epitopo especifico por células fagocíticas para dar comienzo al proceso de endocitosis) y la **activación del sistema del complemento** (reconocimiento por parte de la porción C1q de la vía clásica del complemento de una molécula de IgM unida a antígenos de la superficie bacteriana o, por el contrario, de al menos dos moléculas de IgG unidas al patógeno específico) (Figura 8.4). Además, la IgG posee la capacidad de generar **citotoxicidad celular dependiente de Ac**, descripta en el capítulo 3, en la cual una célula NK reconoce células infectadas que expresan epitopos del patógeno, y por lo tanto se encuentran recubiertas de IgG. La célula NK reconoce la porción Fc de la IgG mediante receptores específicos, lo cual la activa y genera la muerte por apoptosis de la célula infectada (Figura 3.2).

Figura 8.4

Activación del complemento por la vía clásica

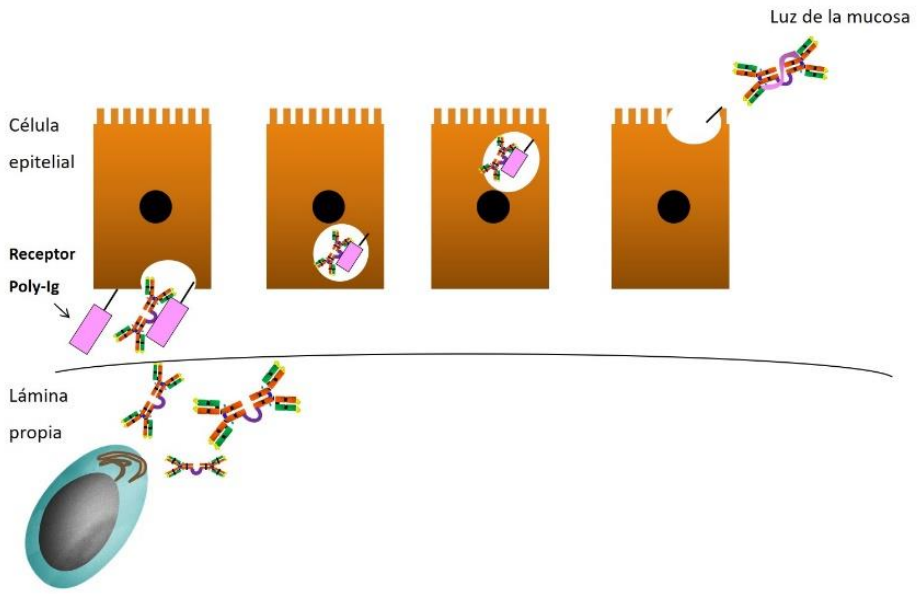


Funciones específicas de la IgA: inmunidad en mucosas

La función principal de la IgA es encargarse de la inmunidad en las mucosas corporales. Es una Ig **antiadherente**, dado que evita precisamente la adhesión de los patógenos a las células de la mucosa para su posterior ingreso. La IgA es producida de forma dimérica por las células plasmáticas de la lámina propia que se ubican debajo de la membrana basal de la mucosa. Una vez secretada, la IgA se une a un receptor llamado Poly-Ig que se expresa en la superficie basolateral de las células epiteliales. De este modo, el complejo Poly-Ig-IgA es internalizado en una vacuola y atraviesa la célula epitelial hacia la superficie apical a través de un proceso denominado *transcitosis* (Figura 8.5). Una vez en la luz de la mucosa se escinde el receptor Poly-Ig de la célula, quedando su región extracelular asociada a la IgA, cubriéndola a modo de *componente* o *pieza secretoria*. La función de la pieza secretoria es proteger a la IgA de la acción proteolítica de las enzimas presentes en la luz de la mucosa. La IgA actúa en superficies que están comunicadas directamente con el exterior del organismo, por eso no actúa generando la destrucción directa de los microorganismos, sino que impide su adhesión y favorece su eliminación a través de mecanismos físicos-químicos de la inmunidad innata (ej: cilias y movimientos peristálticos).

Figura 8.5

Proceso de transcitosis de la IgA en las mucosas



Nota. Las figuras de las células corresponden a Bret Syfert/Wellcome Images

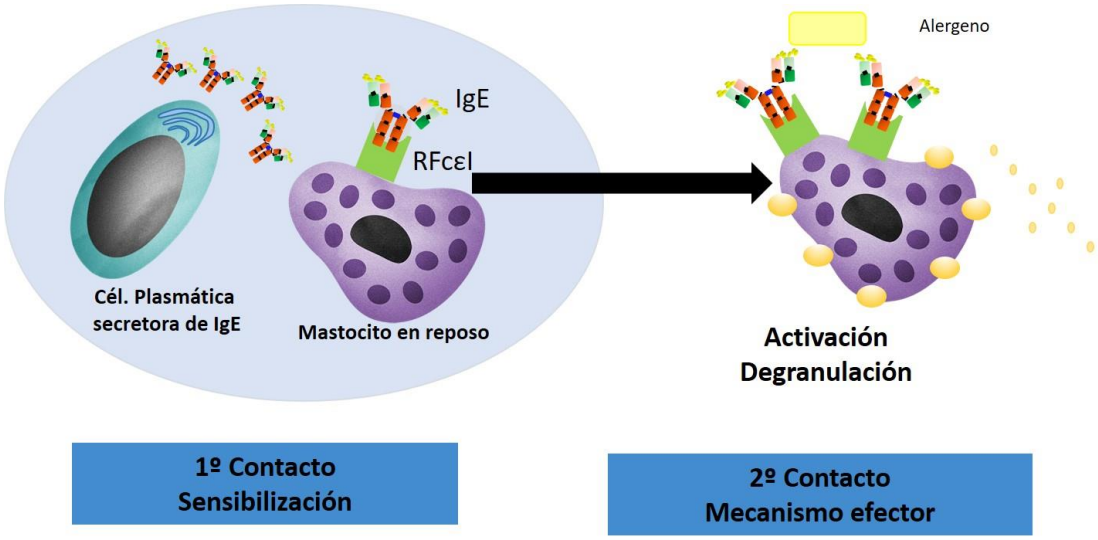
Funciones específicas de la IgE: sensibilización de mastocitos

La IgE juega un rol fundamental en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I (alergias). Su papel se centra en la capacidad de inducir la desgranulación de los mastocitos, células que encontramos en el tejido conectivo de las mucosas y de la piel. Este proceso involucra 2 etapas (Figura 8.6), y se describirá con mayor detalle en el capítulo 9. En la primera etapa la IgE producida en respuesta a un primer contacto antigénico se une con alta afinidad a los receptores Fc de la IgE de tipo I expresados por los mastocitos (estos receptores también pueden ser expresados por basófilos y eosinófilos). En este momento no se produce desgranulación del mastocito. En una segunda etapa, cuando el mismo antígeno vuelve a ingresar al organismo, éste es reconocido por las moléculas de IgE que están unidas a la membrana de los mastocitos. Esto induce un entrecruzamiento de receptores para la IgE y genera la desgranulación y liberación de diferentes mediadores químicos (puede ser histamina, prostaglandinas, entre otros). Esto sucede porque el individuo estaba previamente "sensibilizado", proceso que sucedió en el primer contacto.

La IgE también se encuentra unida a mastocitos en la región intestinal y tiene la capacidad de reconocer antígenos parasitarios. Una vez que los reconoce, produce la desgranulación del mastocito generando un ambiente hostil, con cambios en el pH, activando eosinófilos, monocitos y plaquetas para la eliminación de los parásitos.

Figura 8.6

Sensibilización de mastocitos por la IgE



Nota. Las figuras de las células corresponden a Bret Syfert/Wellcome Images

Anticuerpos monoclonales

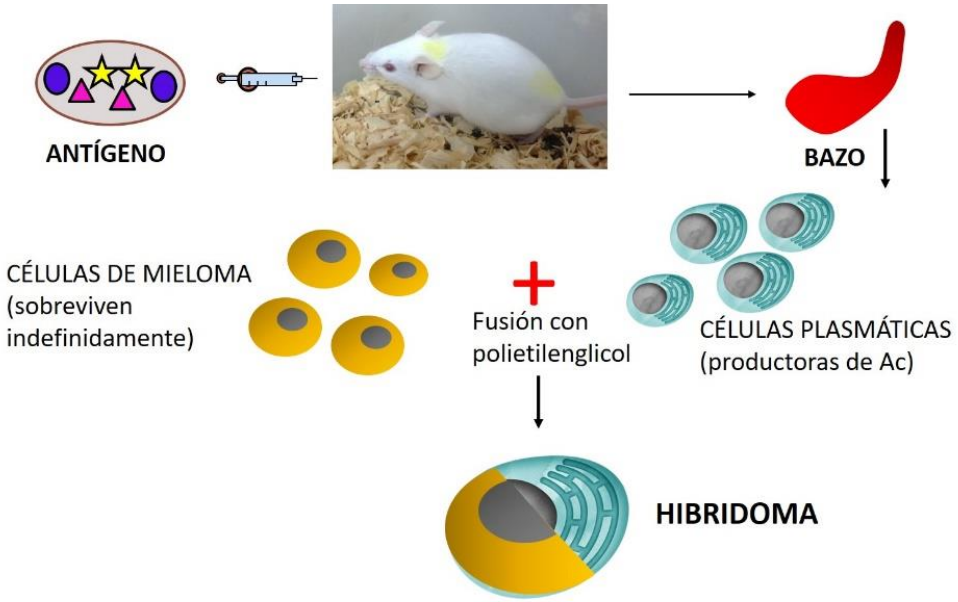
Los investigadores Jerne, Kohler y Milstein, recibieron el premio Nobel en 1984 por realizar la primera descripción sobre la producción de anticuerpos monoclonales. Para comprender qué son los anticuerpos monoclonales es importante que recordemos la teoría de la selección clonal que se explica en el capítulo 7. Brevemente, cada clon de linfocitos B posee un BCR que es único y específico para un determinante antigénico (epitopo). Cuando ese clon se activa (al reconocer a su epitopo especifico) sufre un proceso de expansión clonal y producirá células idénticas a aquella que le dio origen, con un BCR idéntico. Estos BCR específicos serán luego secretados por las células plasmáticas a modo de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos que provienen de un mismo clon de linfocitos B, que tienen la misma porción variable y por lo tanto, la misma especificidad hacia el antígeno.

Producción de anticuerpos monoclonales

La producción de anticuerpos monoclonales se inicia inmunizando un animal de experimentación (ej: un ratón) con un antígeno específico (recordemos que un antígeno es un mosaico antigénico y está formado de distintos determinantes antigénicos o epitopos, por ejemplo: a, b, y c). Generalmente, se utiliza un adyuvante (que refuerza la respuesta inmune) y se hacen varias inoculaciones con intervalos variables, en general de al menos 1 semana. Transcurrido cierto período de tiempo se obtiene el bazo del ratón inmunizado y se aíslan las células plasmáticas productoras de anticuerpos. Entre ellas habrá linfocitos B y sus clones que con diferente especificidad producirán Ig frente a los diferentes epitopos del antígeno específico. Por otra parte, es necesario una línea de células de mieloma. Esta línea celular se puede mantener en cultivo *in vitro* con las condiciones adecuadas. Su característica principal es que son células tumorales de células plasmáticas que tienen la capacidad de multiplicarse indefinidamente (línea celular inmortal). El proceso siguiente y clave para poder continuar es la fusión de las células del bazo del ratón (las células plasmáticas) con las células de mieloma que se hace en presencia de la droga polietilenglicol. Las células que se fusionan se denominan *hibridomas* (Figura 8.7).

Figura 8.7

Proceso de fusión de células plasmáticas de ratón con células de mieloma para formar hibridomas



Nota. Las figuras de las células corresponden a Bret Syfert/Wellcome Images

Los hibridomas son células plasmáticas que pueden producir anticuerpos contra el antígeno con el que inmunizamos al ratón y, además, tienen la capacidad de proliferar indefinidamente y ser mantenidas *in vitro*. Después de la fusión habrá diferentes tipos de células: a- Hibridomas que producen los anticuerpos específicos deseados; b- Hibridomas que producirán anticuerpos de irrelevante especificidad; c- Las células plasmáticas no fusionadas y d- las células de mieloma no fusionadas. Para separar estas poblaciones se transfieren las células a un medio especial que se llama HAT (de hipoxantina, aminopterina y timidina) en una microplaca de 96 pocillos. Las células de mieloma que no se fusionaron carecen de una enzima capaz de degradar componentes presentes en el medio HAT y por lo tanto mueren. Las células plasmáticas que no se fusionaron, no tienen la capacidad de vivir indefinidamente y morirán al poco tiempo. Solo sobreviven las células fusionadas del hibridoma, porque tienen la enzima necesaria para degradar componentes del medio HAT y la capacidad de replicarse indefinidamente. De este modo, se obtienen diferentes tipos de hibridomas en cada pocillo. Luego de 2 a 4 semanas de crecimiento se investiga la presencia de Ac en los sobrenadantes de los cultivos. Para identificarlos, se toman muestras de cada pocillo y se realiza una prueba serológica frente a los epitopos. Cuando se encuentran los Ac que reaccionan con un determinante antigénico de forma específica, se somete a las células del hibridoma del pocillo a un proceso que se denomina clonado, donde las células se diluyen hasta el punto de obtener en un pocillo una única célula híbrida. Los clones adecuados se hacen crecer masivamente en cultivo y se conservan para hacerlos crecer nuevamente cuando se necesite. Esta célula del hibridoma seleccionada y separada se multiplica dando copias idénticas a sí misma (clones) y produce anticuerpos específicos para un epitopo. Estos anticuerpos que provienen de un mismo clon de linfocitos B

los llamamos anticuerpos monoclonales. Su característica es que son de un único isotipo, son monoespecíficos, no cambian con el tiempo y pueden producirse indefinidamente.

Las aplicaciones y usos de los anticuerpos monoclonales son muchas y en constante ampliación, pero principalmente se utilizan en:

1- Investigación (por ejemplo: purificación de proteínas de microorganismos por unión a columnas de sefarosa en cromatografía de afinidad e Identificación de marcadores/receptores celulares CD4, CD8, citometría de flujo, preparación de conjugados para pruebas de diagnóstico).

2- Diagnóstico *in vitro* (por ejemplo: test de preñez, medición de drogas en sangre, estudios de histocompatibilidad, detección de antígenos tumorales) e *in vivo* (detección de antígenos tumorales).

3- Fines terapéuticos (por ejemplo: inmunotoxinas compuestas por Ac monoclonales específicos de células tumorales unidos a una toxina letal e inmunoterapia en perros y gatos).