

Inmunología

Básica, Clínica y Molecular.

*Curso Bienal Superior de Post Grado de Médico
Especialista en Medicina Interna (SMIBA)*

Año 2012.

Dra. Ana María Di Lonardo

Especialista en Inmunología Clínica y Genética Molecular . Profesora titular de las Cátedras de Inmunología, Genética y Medicina Genómica de la Facultad de Medicina. UCES. Fundadora de la Unidad Inmunología y del Banco Nacional de Datos Genéticos del Hospital Dr. Carlos G. Durand.



INMUNOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA CLINICA

Las Ciencias Médicas están viviendo una revolución intelectual de la cual no puede haber retroceso.

La revolución no es solamente conceptual.
Los **procesos fisiológicos** y todas las **enfermedades** humanas, **congénitas** o **adquiridas**, se han hecho *susceptibles de ser analizadas y seguramente tratadas en términos moleculares.*

Los descubrimientos fundamentales de la Inmunología han influido de manera profunda en esta evolución, en todas y cada una de las ramas clínicas y quirúrgicas del ejercicio médico.

El número de pacientes en los que se reconocen *deficiencias inmunológicas* o *respuestas inmunes anormales* como base única de su enfermedad es cada vez mayor.

La Inmunología es una de las áreas de la Medicina que más está avanzando en estos últimos años, entre otras razones por los *puntos en común que tiene con las bases moleculares que están revolucionando el estudio de las enfermedades.*

En las últimas tres décadas, la investigación básica en inmunología molecular, regulación génica y transducción de señales se han focalizado en *sistemas humanos u otros mamíferos o de roedores* a causa de la facilidad en la obtención de recursos, reactivos y ensayos clínicos.

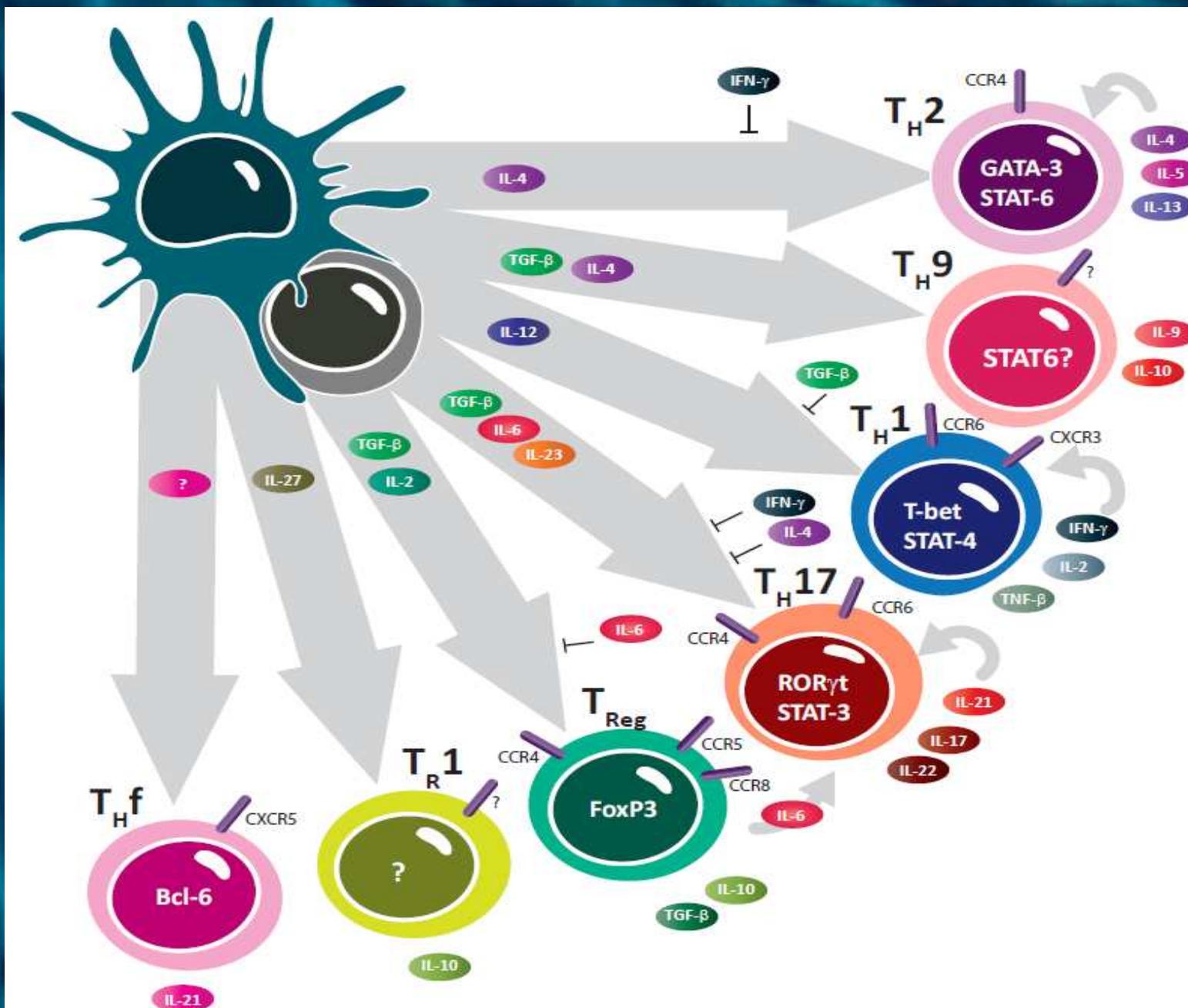


Los avances han sido espectaculares, consolidando a la Inmunología como ciencia independiente, con su conjunto propio de paradigmas y ya prácticamente escindida de su tronco originario microbiológico.

Actualmente su vertiginoso desarrollo está íntimamente ligado al progreso de los campos más relacionados con ella como el de la Biología Molecular.

Entre los grandes progresos recientes se pueden señalar, por ejemplo, el reconocimiento del papel de la tolerancia inmunológica, un reto para poder controlar la inmunorregulación.

EL UNIVERSO DE CÉLULAS T EFECTORAS Y REGULATORIAS

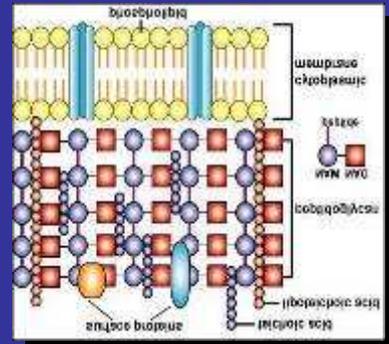
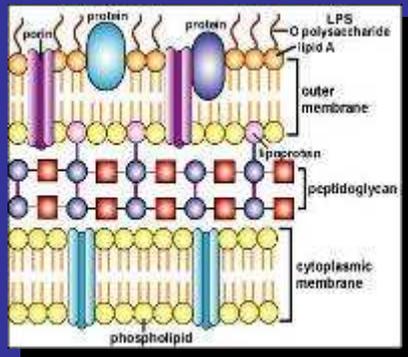


Desde el año 1985 a habido un gran adelanto gracias a la ingeniería genética intentando producir paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos a leucocitos y a otros tipos celulares.

Sumado a esto y casi en el mismo periodo un número relativamente amplio de genes relevantes han sido aislados, clonados y secuenciados particularmente desde mediados de los años 90.

Así han podido investigarse: -los mecanismos moleculares que dan origen al sistema inmune, -la relación entre alteraciones moleculares y patología inmunológica, -el diagnóstico genotípico, -el tratamiento molecular de enfermedades inmunológicas

Estructura de pared de gérmenes Gram (-) y (+)



CELULAS RECEPTORES Y SEÑALIZACION

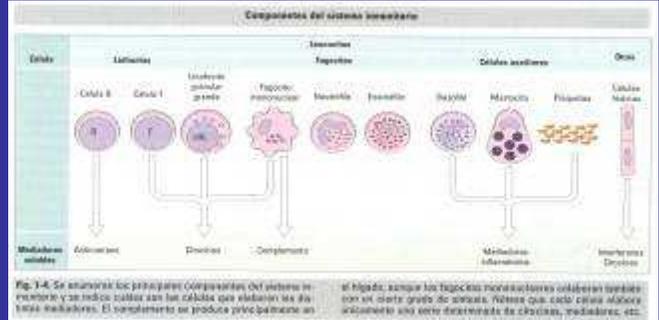


Fig. 3-4. Se muestran los principales componentes del sistema inmunitario y sus interacciones con los patógenos que estimulan las células inmunitarias. El complemento se produce principalmente en el hígado, aunque los tejidos linfoides también sintetizan un cierto grado de actividad. Nota: que cada célula interactúa únicamente con uno de los tipos de células, mediadores, etc.

inmunidad	Celula	Receptor	Antígeno/Patogeno	Receptor	Celula
Inata	Fagocito	MR	Varia/Polisacárido	-	- (patógeno)
	Dendrocito	SR	Varia/Proteína	-	-
	Virus/célula	SPR	Varia/LPS	-	-
		TLR	Varia/OTAs	-	-
Fol	Fol1	Operón de Sgl	-	-	
	Fol2	Operón de Sgl	-	-	
	OT	Operón de Sgl	-	-	
Cl	Linfocito NK	NKRP1	Antígenos	varios	Núcleo
		NKR	Proteína celular	MHC1	-
NKRP1	Linfocito T _H	FcR	Operón de Sgl	-	-
		TCR- $\gamma\delta$	Microorganismos (bacterias)	-	-
Adaptativa	Linfocito T _H	CD4	Proteína celular (intracelular)	MHC1	-
		TCR β	-	-	-
	Linfocito T _H	CD4	Proteína celular (intracelular)	MHC1	Dendrocito, Macrófago, Linfocito B
	TCR $\alpha\beta$	TCR α	-	-	-
Linfocito B	BCR	Varia	-	-	- (patógeno)
	FcR	Operón de Sgl	-	-	-
DC	OT	Operón de Sgl	-	-	-

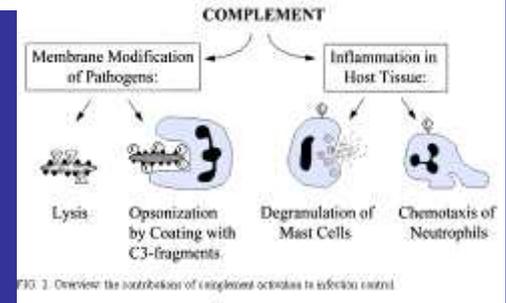
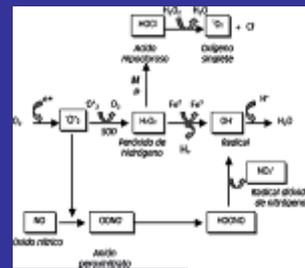
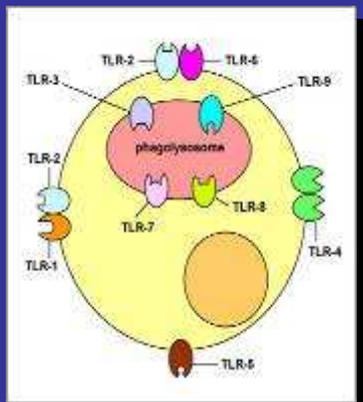


FIG. 2. Overview de la activación de los complementos en infección control.

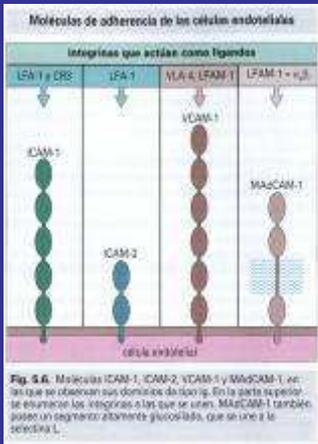


Fig. 3-6. Moléculas ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y MA2CAM-1 son las que se observan sus dominios de tipo Ig. En la parte superior se muestran los integrinos a las que se unen. MA2CAM-1 también posee un segmento altamente glucosilado, que se une a la lectina L.

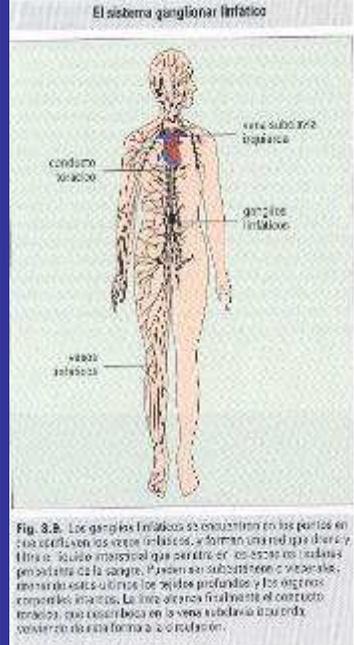
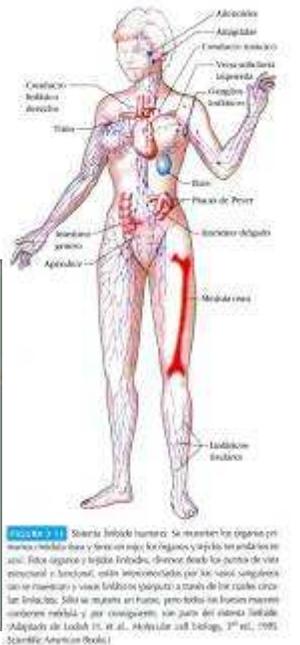
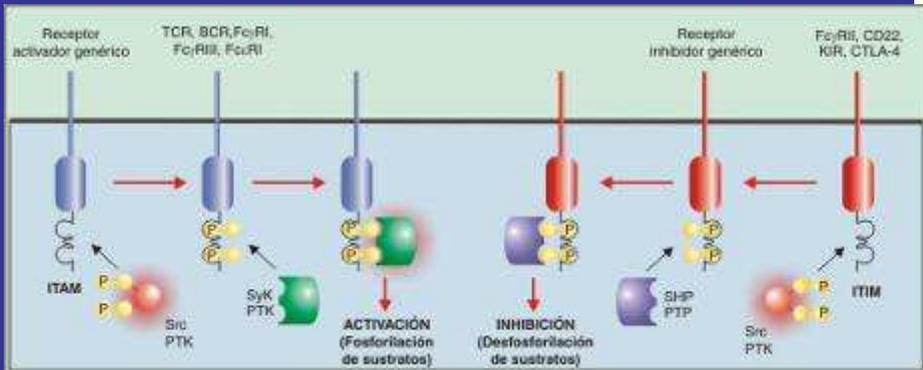


Fig. 3-8. Los ganglios linfáticos se encuentran en los puntos en los que confluyen los vasos sanguíneos, a formar una red que lleva el líquido intersticial que penetra en los tejidos y devuelve el exceso de líquido a la sangre. Pueden ser substancialmente más grandes que los vasos sanguíneos que los rodean. La línea roja muestra el conducto torácico, que contribuye en la vena subclaviana izquierda, devolviendo el exceso de líquido.

LINFOCITOS T COLABORADORES

Los linfocitos T colaboradores o “helper” corresponden a un subgrupo de linfocitos T que posee como marcador clásico de membrana la molécula CD4. Deben su nombre al importante rol que cumplen colaborando con las respuestas de otras células del sistema inmunitario tales como **linfocitos T citotóxicos**, **macrófagos**, **linfocitos B** y **neutrófilos** entre otros (Janeway 2008).

Dentro de esta categoría podemos encontrar los siguientes linajes de linfocitos:

- 1) Linfocitos Th0
- 2) Linfocitos Th1
- 3) Linfocitos Th2
- 4) Linfocitos Th17

Células T helper: CD4

- Rol importante en la inmunidad mediada por células.
- Dirigen la especificidad de la respuesta (reconocen epitopes particulares y seleccionan los que actúan como targets para las funciones efectoras).
- Seleccionan y activan las células efectoras apropiadas.
- Colaboran con los LB en la producción de anticuerpos
- Modulan las acciones de otras células efectoras (LTc. macrófagos, NK, etc).
 - proliferación de células efectoras.
 - aumenta las funciones de células efectoras.

Linfocitos Th0

Son considerados células precursoras de los linfocitos **Th1** y **Th2**.

Dependiendo de la APC que actúe y las señales que ésta libere se estimularán las Th0 que posean el TCR adecuado para reconocer la señal, expandiéndose hacia **Th1** ó **Th2**

Las citoquinas presentes en el medio permiten que las subpoblaciones Th0 se polarizen hacia los subtipos **Th1** ó **Th2**.

Las células Th0 poseen receptores para **IL4** e **IL12**.

Cultivando linfocitos Th0 en un medio con citoquinas **IL-12** e **IFN- γ** , se convierten en linfocitos **Th1**. Cuando existe en el medio **IL-4**, se favorece la conversión de los linfocitos Th0 en **Th2**.

Linfocitos Th1

Son células que se activan por las citoquinas **IL-12** e **IFN- γ** secretadas por las células dendríticas.

La **IL-12** promueve una mayor expansión y diferenciación de los linfocitos Th1.

Los linfocitos Th1 activados producen **IL-2**, **IFN- γ** , **TNF- α** y **TNF- β** , **linfotóxina** ó **LT- α** . (Janeway 2008).

La **IL-2** secretada por los linfocitos Th1 estimula la proliferación de linfocitos T.

Además permite la activación de linfocitos T, B y células NK. El **IFN- γ** estimula a los linfocitos **Th1** y el crecimiento de células B, la **producción de IgG**, **inhibe a los linfocitos Th2**, y finalmente **activa a los macrófagos**
(Janeway 2008)

La principal función de los linfocitos **Th1** es la activación de macrófagos.

Producen gran cantidad de **IFN- γ** y su función principal es la defensa mediada por fagocitos contra las infecciones debidas principalmente, a *microorganismos intracelulares*.

La activación del **macrófago** por parte del linfocito **Th1** estimula la potenciación de sus mecanismos microbicidas como la formación de **óxido nítrico** y **superóxido** para la destrucción de las bacterias.

Además, aumentan las moléculas **MHC de Clase II**, con lo cual se incrementa la presentación antigénica del macrófago a otras células T
(Janeway 2008)

Linfocitos Th2

Los linfocitos Th2 son células inducidas por la presencia de IL-4 a partir de células TCD4+ indiferenciadas tipo Th0.

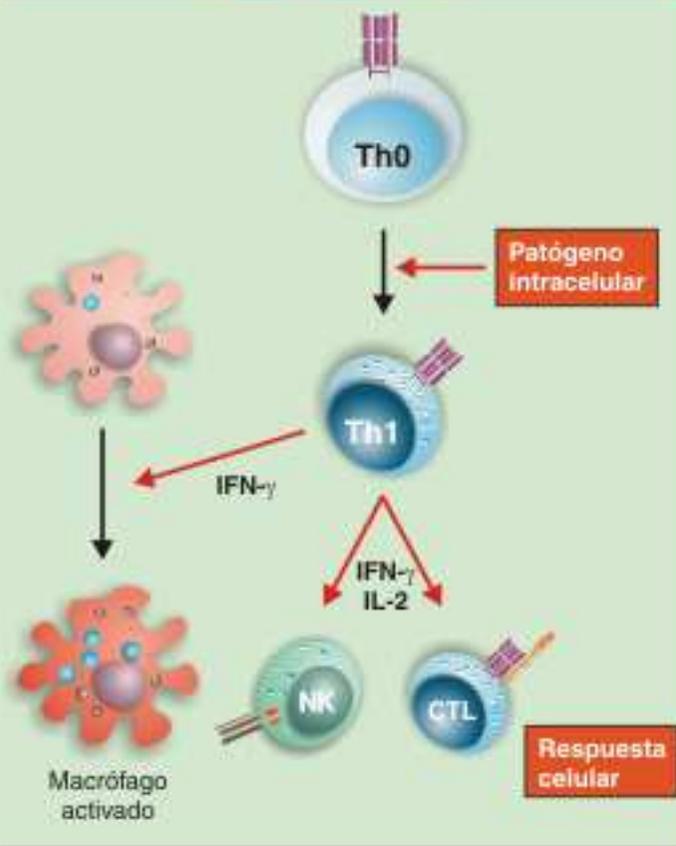
Producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.

La principal función de los linfocitos Th2 es la activación y expansión clonal de los linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas, en especial de isotipo IgM, IgA e IgE.

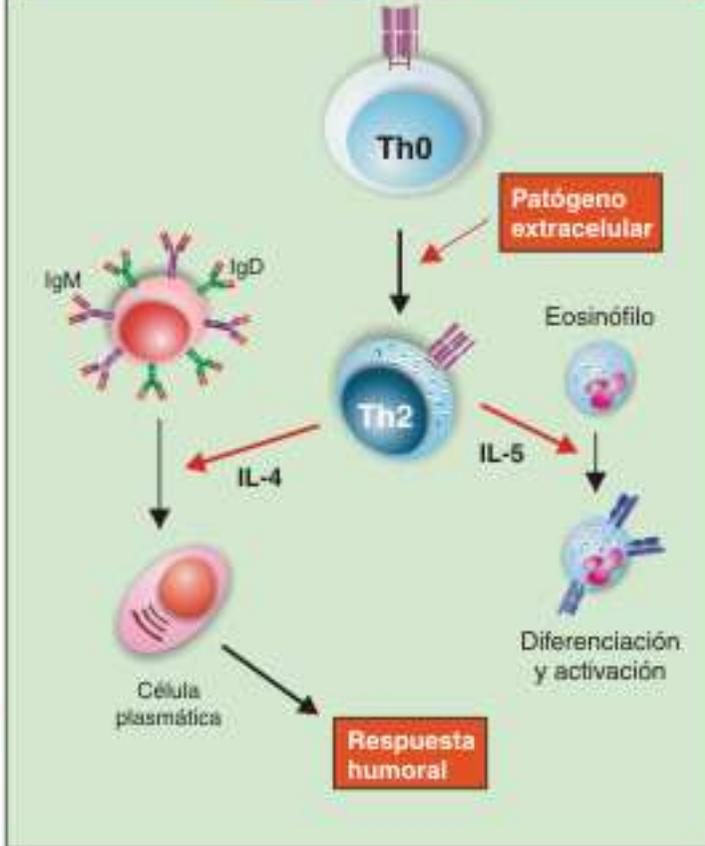
Las IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 son factores de crecimiento para células B, en tanto, la IL-10 inhibe la activación de los macrófagos (Janeway 2008)

Los linfocitos Th2 participan en el cambio de clase de inmunoglobulina hacia IgE, de importancia en procesos alérgicos y en la inmunidad a la infección frente a parásitos extracelulares.

RESPUESTA Th1



RESPUESTA Th2



Linfocitos Th17

Se ha identificado recientemente una 3ª población en la que su perfil de citoquinas no permite ser clasificada bajo ninguno de los dos grupos Th1 y Th2.

Las células Th 17, producen principalmente IL-17 pero no IL-4 ni IFN γ como Th2 y Th1 respectivamente.

Corresponden a células TCD4+ efectoras que inducen a células epiteliales y del estroma a producir quimioquinas que reclutan neutrófilos en sitios de infección al inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa.

La expansión clonal y la diferenciación en células Th17 requiere de IL-6 y TGF- β .

Además, la actividad efectora ulterior de células Th17 requiere de IL-23.

Estas células se caracterizan por su secreción de IL-6, IL-17A, IL-17F, TNF y CXCL1 (Quesniaux 2009), además de IL-22 (perteneciente a la superfamilia de IL10).

Su función parece ser la de participar en reacciones inflamatorias, particularmente rica en neutrófilos, para el control de patógenos extracelulares, actuando en sinergia con el TNF y la IL1, ocasionando daño hístico.

Son las principales mediadoras en algunas reacciones alérgicas, e implicadas en el desarrollo de enfermedades como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal.

La presencia del receptor de IL17 (CD127) a sido propuesto como posible marcador de este fenotipo en humanos.

Datos experimentales en animales indican que, tanto *una respuesta efectora por Th1 o Th17 puede derivar en una enfermedad autoinmune; sólo las condiciones de inducción hacia uno u otro tipo determinan la categoría efectora dominante.*

La diferenciación en Th1, Th2 o Th17 no es al azar, sino que depende de los estímulos que reciba el linfocito T4 virgen cuando contacte un antígeno extraño.

CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs)

- 1) Son células T supresoras que inhiben respuestas inflamatorias in vivo y controlan la proliferación y número de células T in vivo e in vitro.
- 2) Su función es controlar tanto la inmunidad innata como la adquirida.
- 3) Son CD4+CD25+, constituyen el 5-10% del total de las células CD4+.
- 4) Tienen una alta expresión de CD25.
- 5) Tienen expresión de CTLA4 (CD152)
- 6) Tienen un marcador intracelular FOXP3 que es el responsable de su desarrollo.

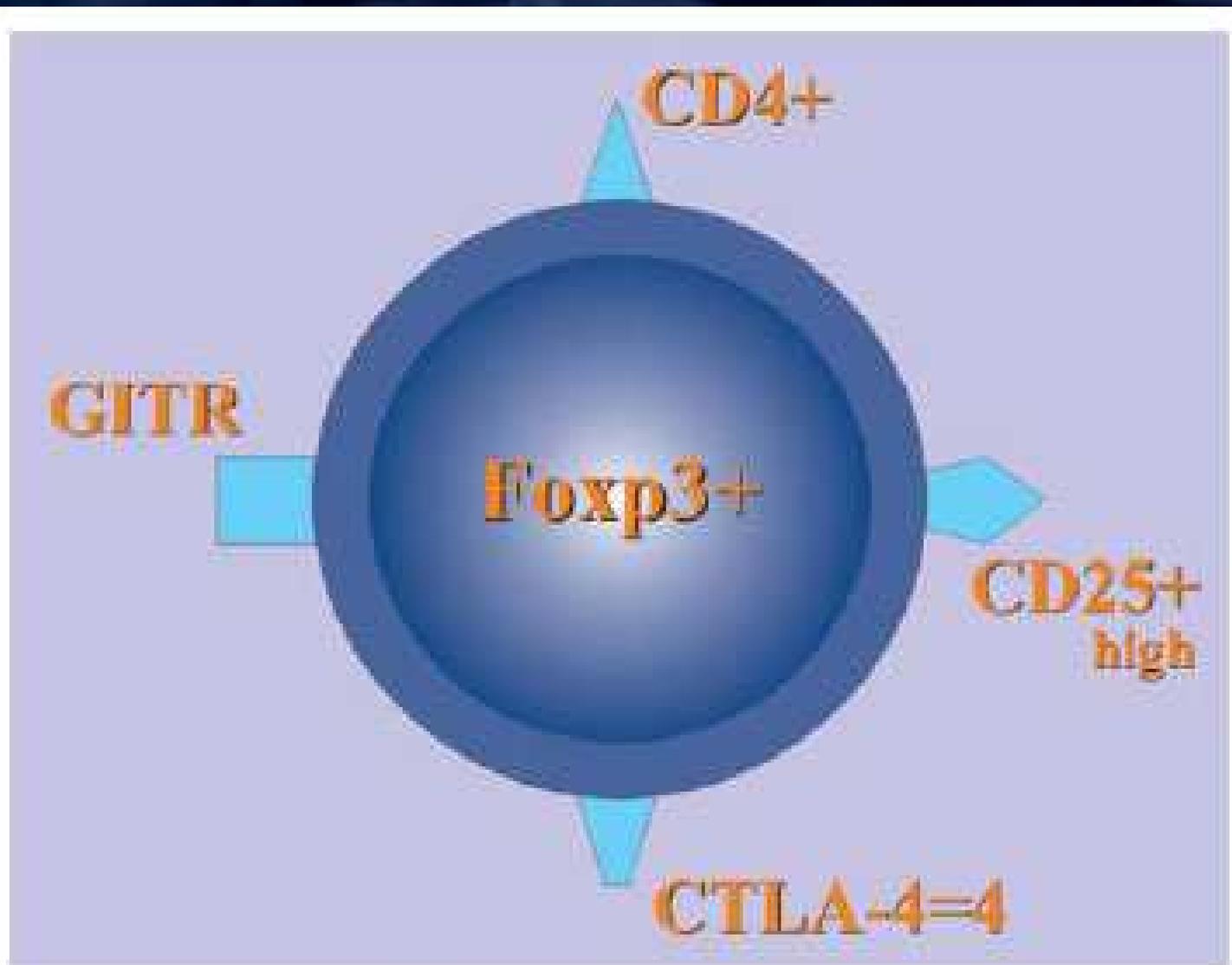


FIGURE 1: Phenotypical expression of natural regulatory T cell. Natural Treg cells express CD4, CD25^{high}, GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) and CTLA-4 (intracellular cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) in the membrane and Foxp3 in the nucleus

TREGs

- El principal avance en el estudio de las células T regulatorias es la identificación de un factor de transcripción conocido como *forkhead box P3* (FOXP3), requerido para el desarrollo, mantenimiento y función.
- Los ratones e individuos que no tienen FOXP3 desarrollan un síndrome linfoproliferativo autoinmune que enfatiza la importancia de las células Treg en el mantenimiento de la tolerancia periférica.
- Aunque FOXP3 ha sido propuesto como el regulador principal de las células Tregs, ya que controla la expresión de múltiples genes que median su actividad regulatoria, también se propone que otros eventos podrían operar concurrentemente con FOXP3 mediando el desarrollo de las células Tregs.

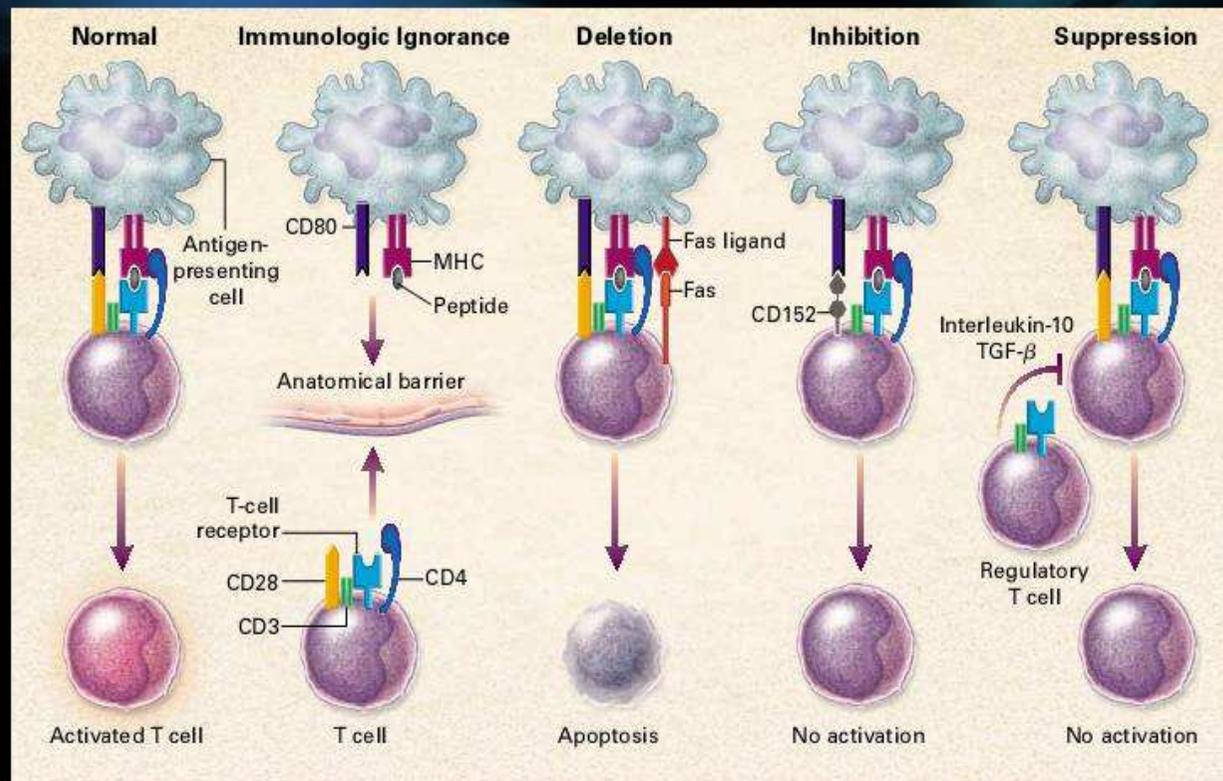
FENOTIPO TREG

- Las células T reguladoras producen **IL-10 Y TGF- β** , citoquinas responsables de controlar la respuesta inmune in vivo.
- Expresan **CTLA-4** (citotoxic lymphocyte – associated protein 4) o **CD152** que no se observa en células en reposo.
- Expresan **RECEPTOR DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL INDUCIDO POR GLUCOCORTICOIDES (GITR)**.

Estas 2 moléculas se expresan en células T no reguladoras luego de la activación.

Tolerancia.

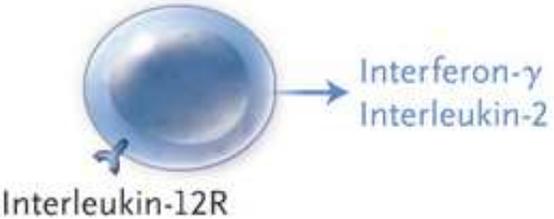
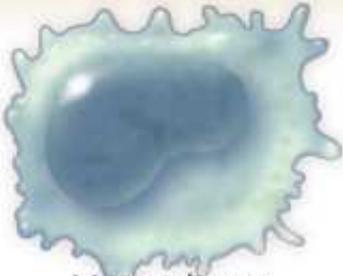
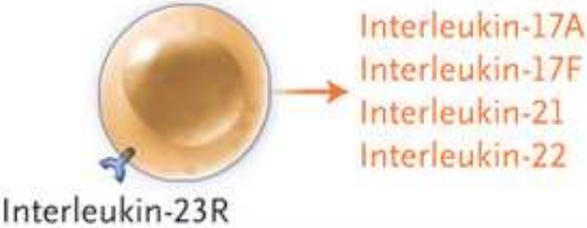
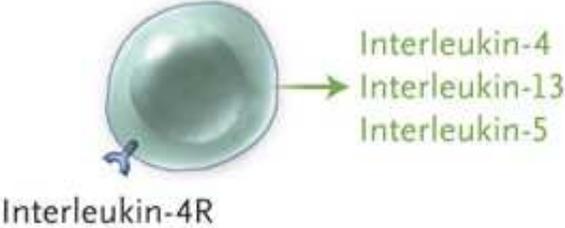
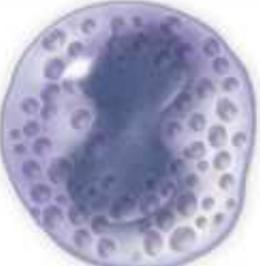
Mecanismo periférico de la tolerancia.



Mecanismos básicos de función de las Tregs

- Desde una perspectiva funcional, los mecanismos de acción de las células Tregs pueden agruparse en:
 - SUPRESIÓN POR CITOQUINAS INHIBITORIAS.
 - SUPRESION POR CITOLISIS.
 - SUPRESION POR DISRUPCIÓN METABOLICA.
 - SUPRESION POR MODULACION DE LA MADURACION Y FUNCION DE LAS CELULAS DENDRITICAS.

SUBPOBLACIONES DE CELULAS Th

Th Group	Cell Products	Cell Target	Infectious Agents
Th1	 <p>Interleukin-12R</p> <p>Interferon-γ Interleukin-2</p>	 <p>Macrophages Dendritic cells</p>	<p>Intracellular bacteria Fungi Viruses</p>
Th17	 <p>Interleukin-23R</p> <p>Interleukin-17A Interleukin-17F Interleukin-21 Interleukin-22</p>	 <p>Neutrophils</p>	<p>Extracellular bacteria Fungi</p>
Th2	 <p>Interleukin-4R</p> <p>Interleukin-4 Interleukin-13 Interleukin-5</p>	 <p>Eosinophils Basophils</p>	<p>Parasites</p>

Estas circunstancias hacen que los inmunólogos actuales estén cada vez mas formados en clínica medica y en la participación de tratamientos de distintas patologías.

Se esta produciendo un cambio espectacular hacia la medicina molecular y en ese campo la inmunología esta aportando mucha información que están aprovechando los médicos clínicos.

La creciente implicancia que esta adquiriendo la inmunología clínica se manifiesta en los aportes fundamentales para el diagnóstico ya que la tecnología inmunológica ha avanzado espectacularmente.

Ante ellos quedarán descartadas muchas de las prácticas clínicas actuales

Por ello, el número de inmunólogos hospitalarios están aumentando notablemente en los países centrales tanto como consultores y/o colaboradores de otras especialidades.

*La Biotecnología como
Nueva Frontera de la Ciencia:
El Proyecto Genoma Humano
y sus
Implicancias Biomédicas*



BASES DE GENETICA Y GENOMICA

El desarrollo vertiginoso de los descubrimientos científicos en el ámbito de la Genética humana en los últimos decenios del siglo XX y en lo que va de este siglo, abrieron enormes expectativas sobre su impacto en el futuro inmediato.

La presentación, en junio del año 2000, del primer borrador de la secuencia completa del Genoma Humano, ha sido considerado uno de *los mayores hitos científicos en la historia de la humanidad.*

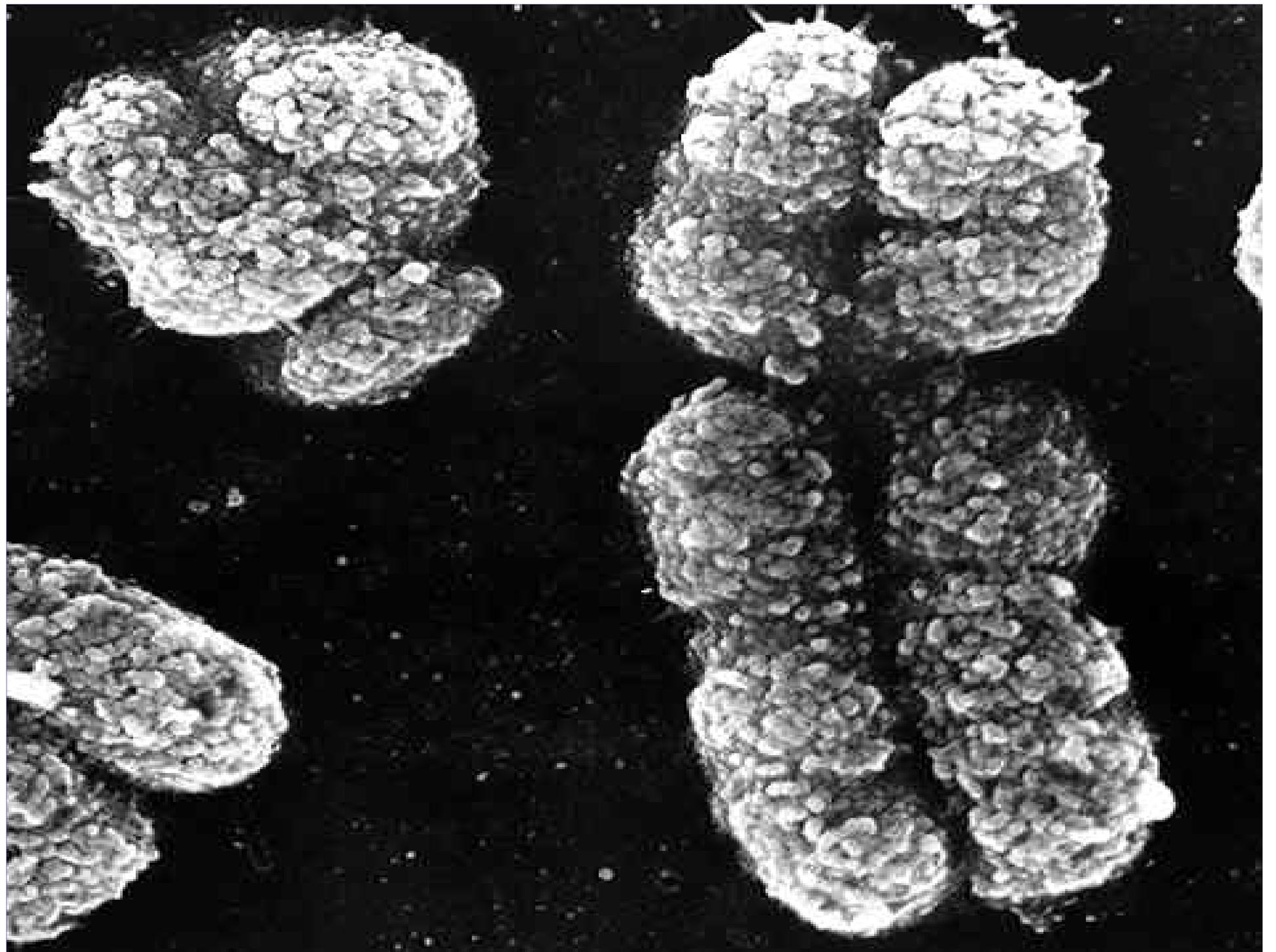
Los descubrimientos sobre el genoma humano han hecho pensar que la medicina vive una "revolución genómica" que permitirá la prevención de muchas enfermedades.

El mayor desafío será entender como todas las "partes" de las células: genes, proteínas y muchas otras moléculas *trabajan en forma integrada* para crear organismos vivientes complejos.

La Medicina, devenida molecular, deberá demostrar la existencia y mecanismos de acción de una miríada de moléculas implicadas en la generación de "lo viviente"

Medicina Genómica: basada en la *identificación de las variaciones* del genoma humano que confieren *riesgo de padecer enfermedades comunes*.

La ciencia genómica tiene acceso experimental directo al *genoma entero*.
Se aplica a condiciones comunes como el *cáncer de mama*, *cáncer colorectal*,
infección por HIV,
tuberculosis, *enfermedad de Alzheimer*, *enfermedad de Parkinson*,
diabetes, etc.





James Watson y Francis Crick

NO. 4156 April 25, 1953 NATURE 737

equipment, and to Dr. G. E. K. Dosescu and the captain and officers of R.N.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

*Sung, P. S., *Genet. & Dev. Phys. Sci., Phil. Mag.*, **46**, 141 (1952).

*Langer-Spiller, W. S., *Ann. Ent. Soc. Amer.*, **46**, 604 (1953).

*L. S. ART, W. S., *Wash. State Papers in Phys. Geology, Kelso*, **13** (1952).

*Kilham, L. W., *Ann. Agr. Chem. Soc. (London)*, **10** (1952).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has several features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagram is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates and the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser on the press. In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate di-ester groups joining *D*-deoxy-*D*-ribose residues with *3'*/*5'* linkages. The two chains that run their bases are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain, loosely described by Furberg's model No. 1, is that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The orientation of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

is a residue on each chain every 3.4 Å, in the direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphate atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, distances have many access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical *exo*-orientations. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 2 to pyrimidine position 3; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms that is, with the keto rather than the enol configuration² it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on the complementary other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain, does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence of the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{5,6} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on inter-atomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

Two sugar & phosphate chains. The two chains consist of two sugar-phosphate chains, and the two chains run in opposite directions. The sugar and phosphate are on the outside. The orientation of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

J. D. Watson and F. H. C. Crick (1)

April 25, 1953 (2), *Nature* (3), 171, 737-738

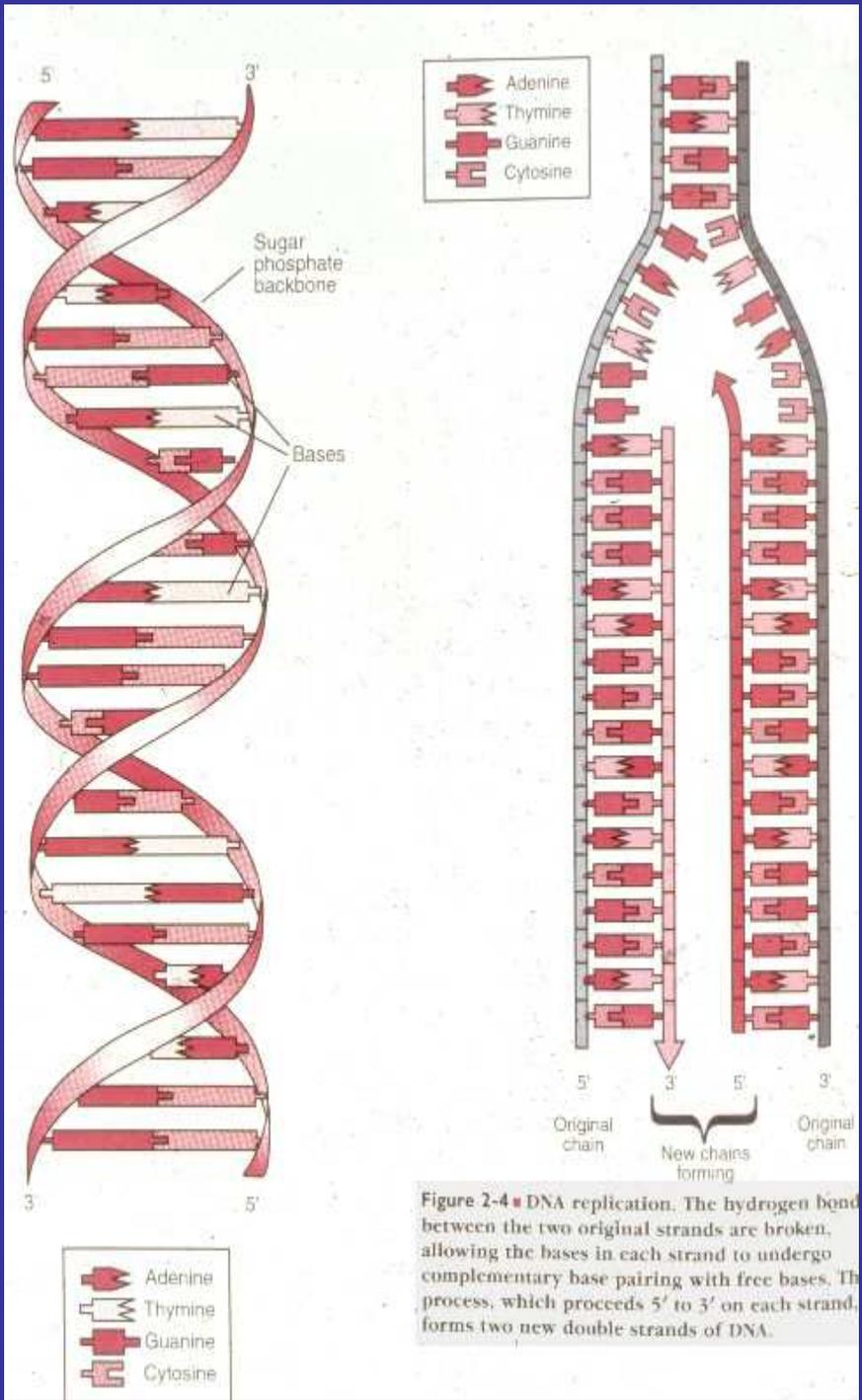


Figure 2-4 DNA replication. The hydrogen bond between the two original strands are broken, allowing the bases in each strand to undergo complementary base pairing with free bases. The process, which proceeds 5' to 3' on each strand, forms two new double strands of DNA.

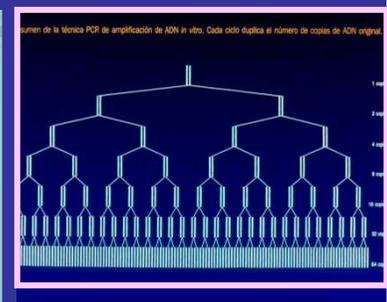
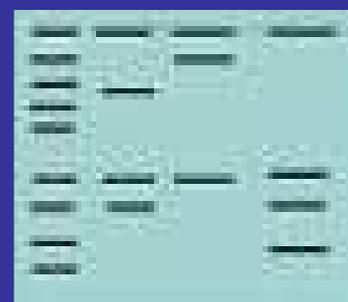
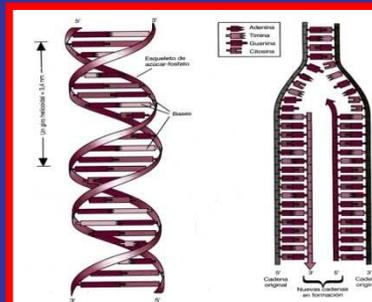
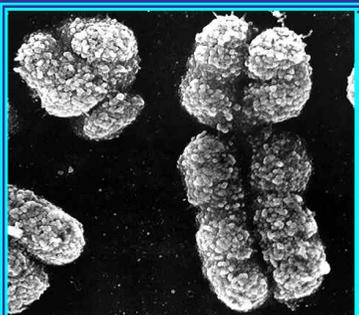
1940: Se inicia una nueva era en la Genética. Se investiga para descubrir la base física de la información genética que ya se sabía que estaba contenida en los genes.

1944: Avery, McLeod y McCarty demuestran que el ADN de los cromosomas es el responsable de la información genética.

1953: J. Watson y F. Crick describen la doble hélice del ADN y su mecanismo de replicación.

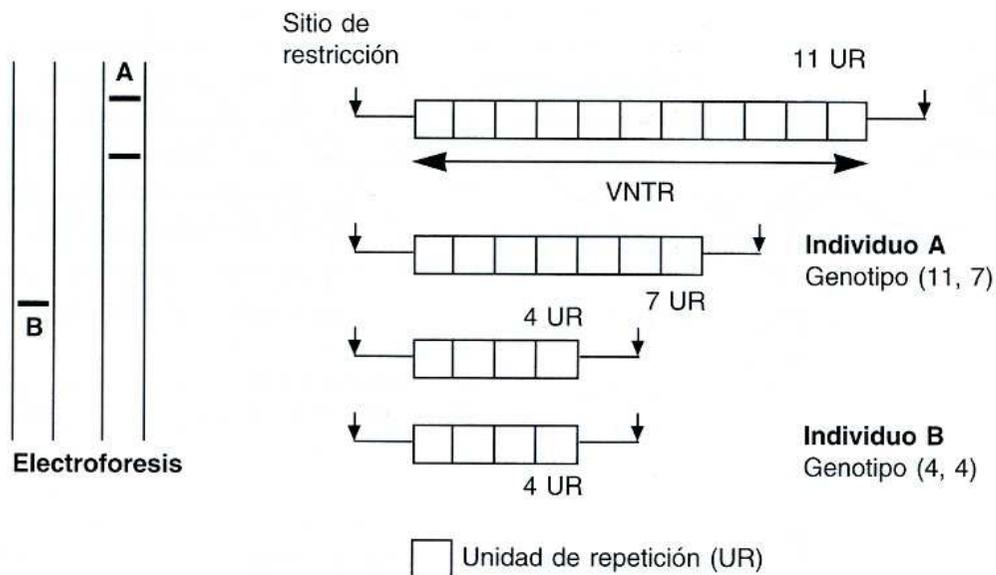
1961: F. Crick y col. establecen las características del código genético. Se contesta al interrogante sobre cómo se produce el pasaje de la información contenida en el ADN hasta su traducción para la producción de proteínas. Nace la Genética Molecular. Años: 1972 – 1978 – 1985 – 1988 –

1990 – 2003: Desarrollo de la Ingeniería Genética.

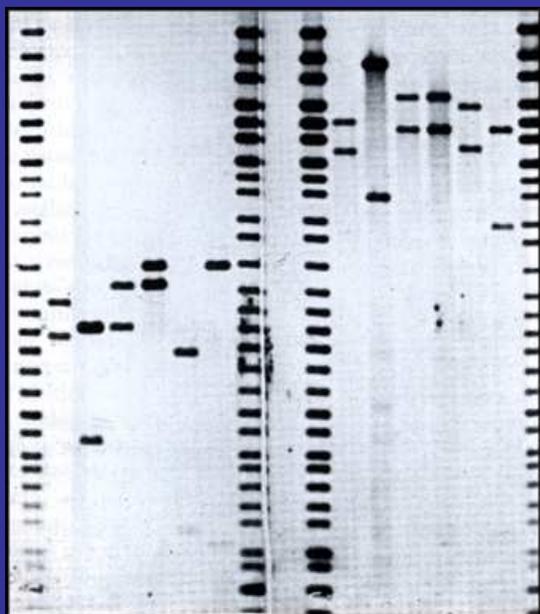




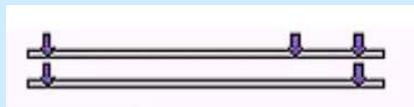
Polimorfismos de tipo VNTR o número variable de repeticiones en tándem.



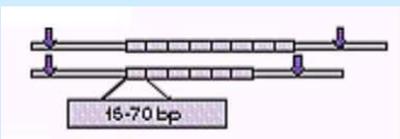
Polimorfismos de longitud



RFLP (Polimorfismo de Tamaño de Fragmentos de Restricción)



VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tándem)



LTR (Larga Repetición en Tándem) "minisatélite"



STR (Corta Repetición en Tándem) "microsatélite"

**BIOTECNOLOGIAS
PARA LOS NUEVOS
DESARROLLOS**

Desde el año 1985 a habido un gran adelanto gracias a la ingeniería genética intentando producir paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos a leucocitos y a otros tipos celulares.

Sumado a esto y casi en el mismo periodo un número relativamente amplio de genes relevantes han sido aislados, clonados y secuenciados particularmente desde mediados de los años 90.

Así han podido investigarse: -los mecanismos moleculares que rigen al sistema inmune, -la relación entre alteraciones moleculares y patología inmunológica, -el diagnóstico genotípico, -el tratamiento molecular de enfermedades inmunológicas

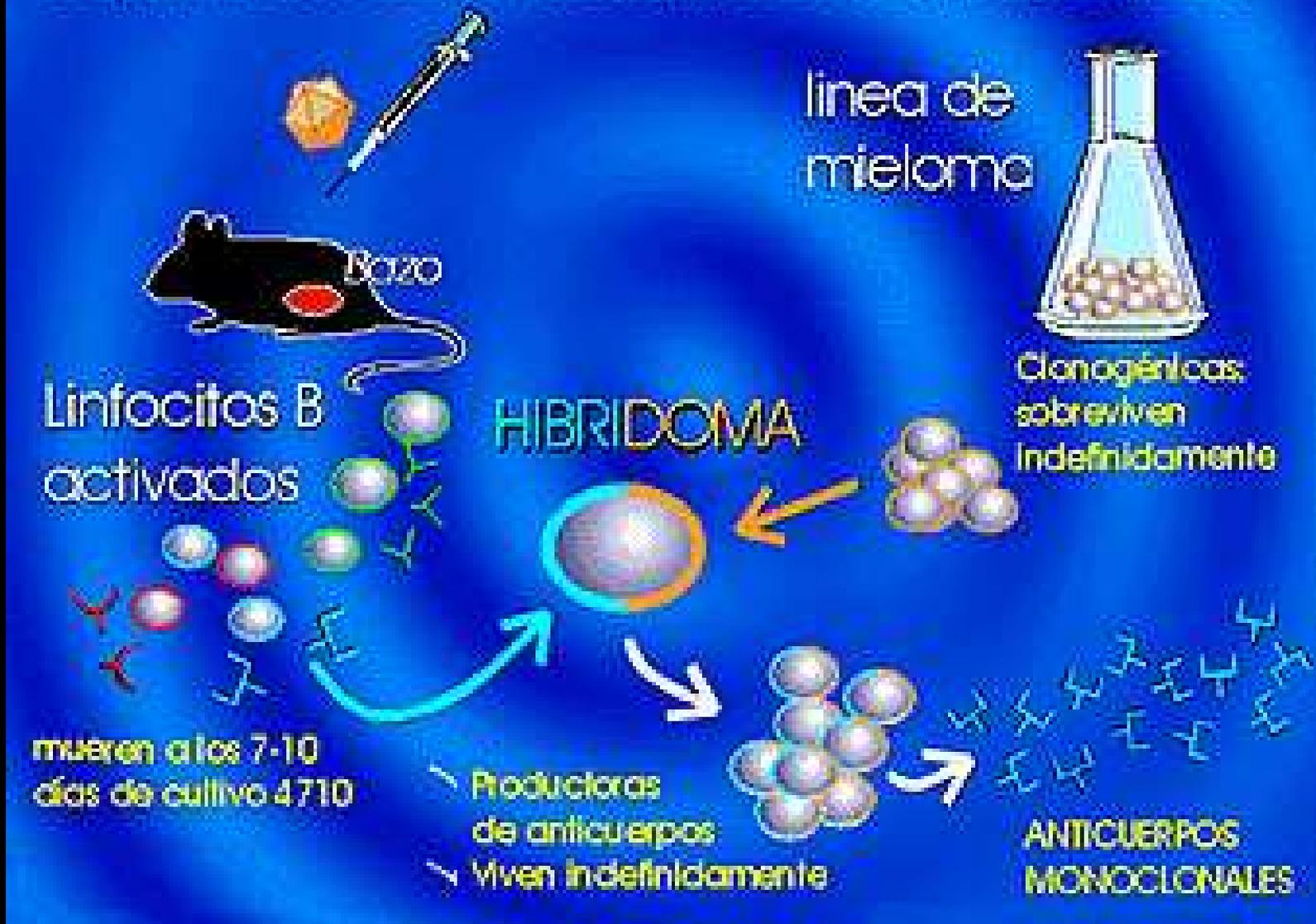
Los anticuerpos monoclonales (Mabs)

- Desde 1975 la habilidad de tener anticuerpos para aplicarlos en forma terapéutica ,dejó de ser una quimera gracias al trabajo de Kohler y Milstein



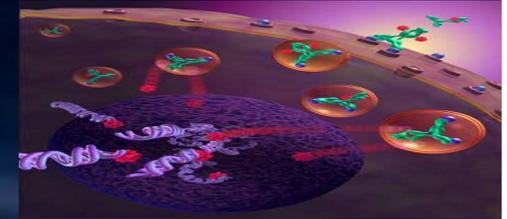
César Milstein
(1927-2002)
Premio Nobel
Medicina
1984

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES



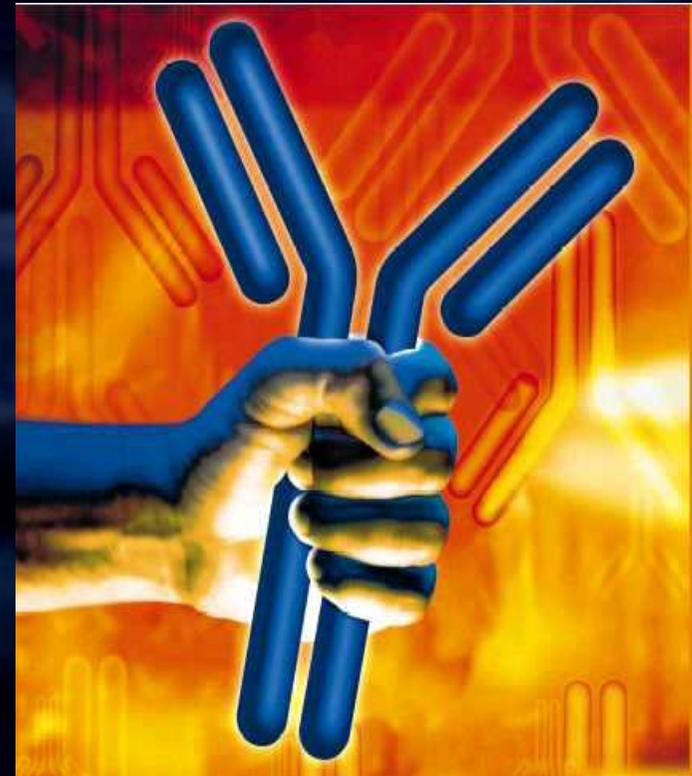
ANTICUERPOS MONOCLONALES

- **ANTICUERPO MONOCLONAL.**
 - anticuerpo con especificidad única.
 - producido por un único clon de células plasmáticas.
 - producción sostenida indefinidamente.
- **1975 KÖHLER Y MILSTEIN** (Premio Nobel 1984) encuentran la forma de combinar el crecimiento potencial ilimitado de las células de mieloma con la especificidad predeterminada de las células inmunes esplénicas normales
- **LITERALMENTE: FUSION DE CELULAS DE MIELOMA CON CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS DE UN RATON INMUNIZADO = HIBRIDOMA (HIBRIDIZACION DE CELULAS SOMATICAS)**



INGENIERIA DE ANTICUERPOS

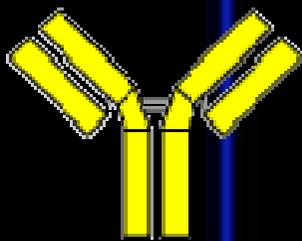
- ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATON
 - Pueden ser reconocidos como extraños por el humano y generar una respuesta de anticuerpos.
 - Los complejos circulantes de anticuerpos de ratón y ser humano pueden causar reacciones alérgicas.



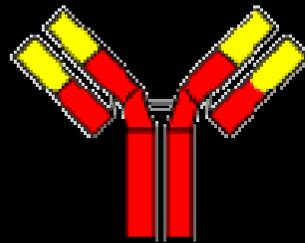
INGENIERIA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SITIOS DE UNION DE ANTICUERPO CON TECNOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE.

ANTICUERPO HUMANIZADO

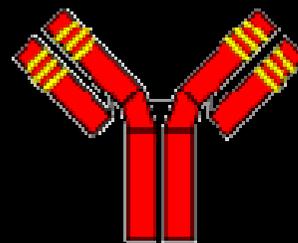
- Humanizado significa que el Anticuerpo Monoclonal, contiene un **90 por ciento** de material humano.



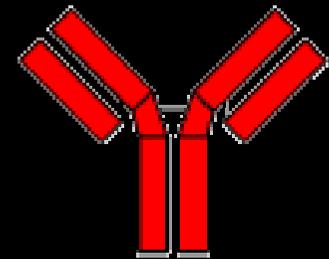
MURINO



QUIMERA



HUMANIZADO



HUMANO

- SU ESPECIFICIDAD ANTIGENICA DERIVA DEL ADN DEL RATON.
- SU ISOTIPO PROCEDE DEL ADN HUMANO.

Uso de Anticuerpos Monoclonales terapéuticos en la actualidad

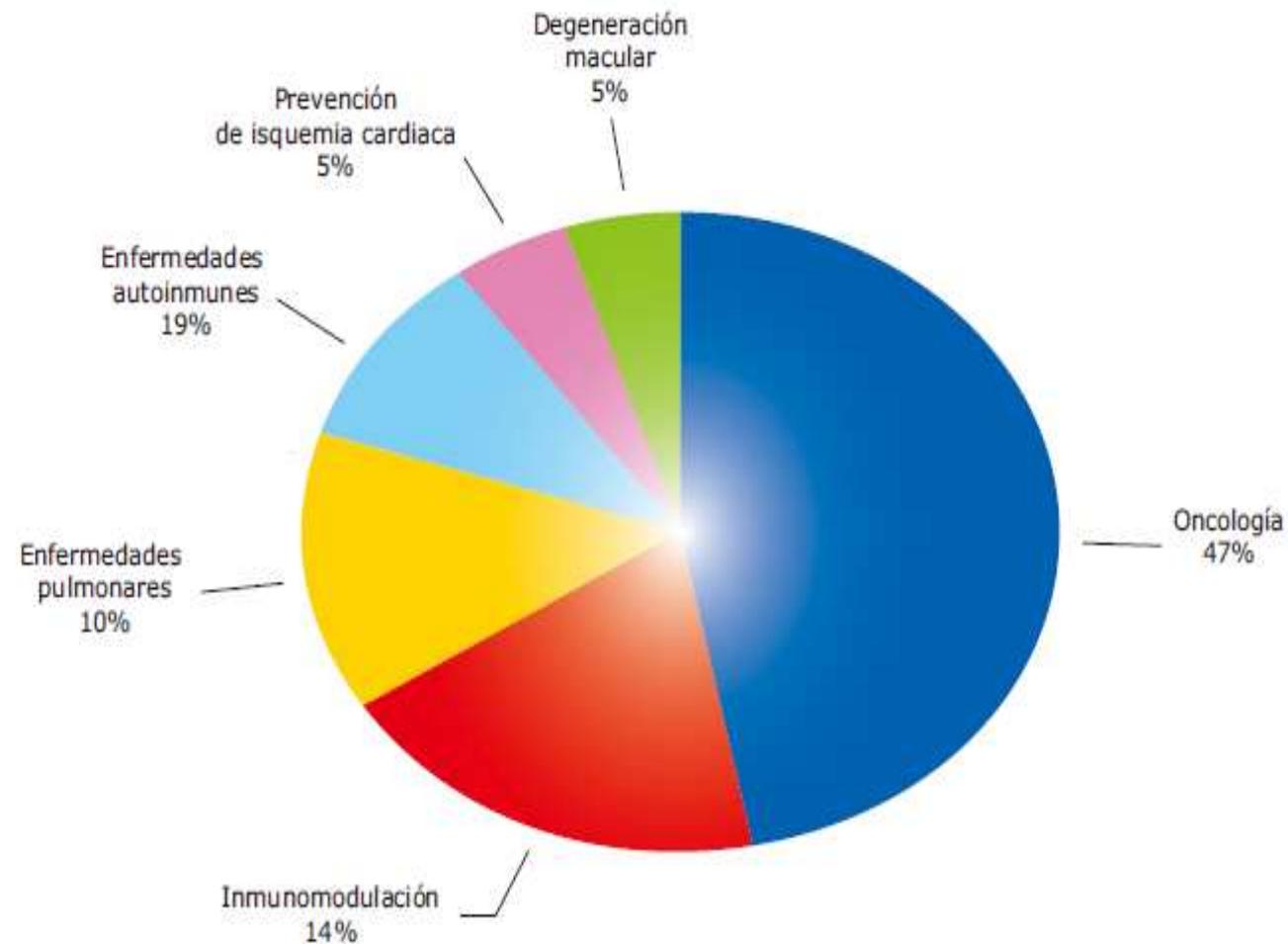


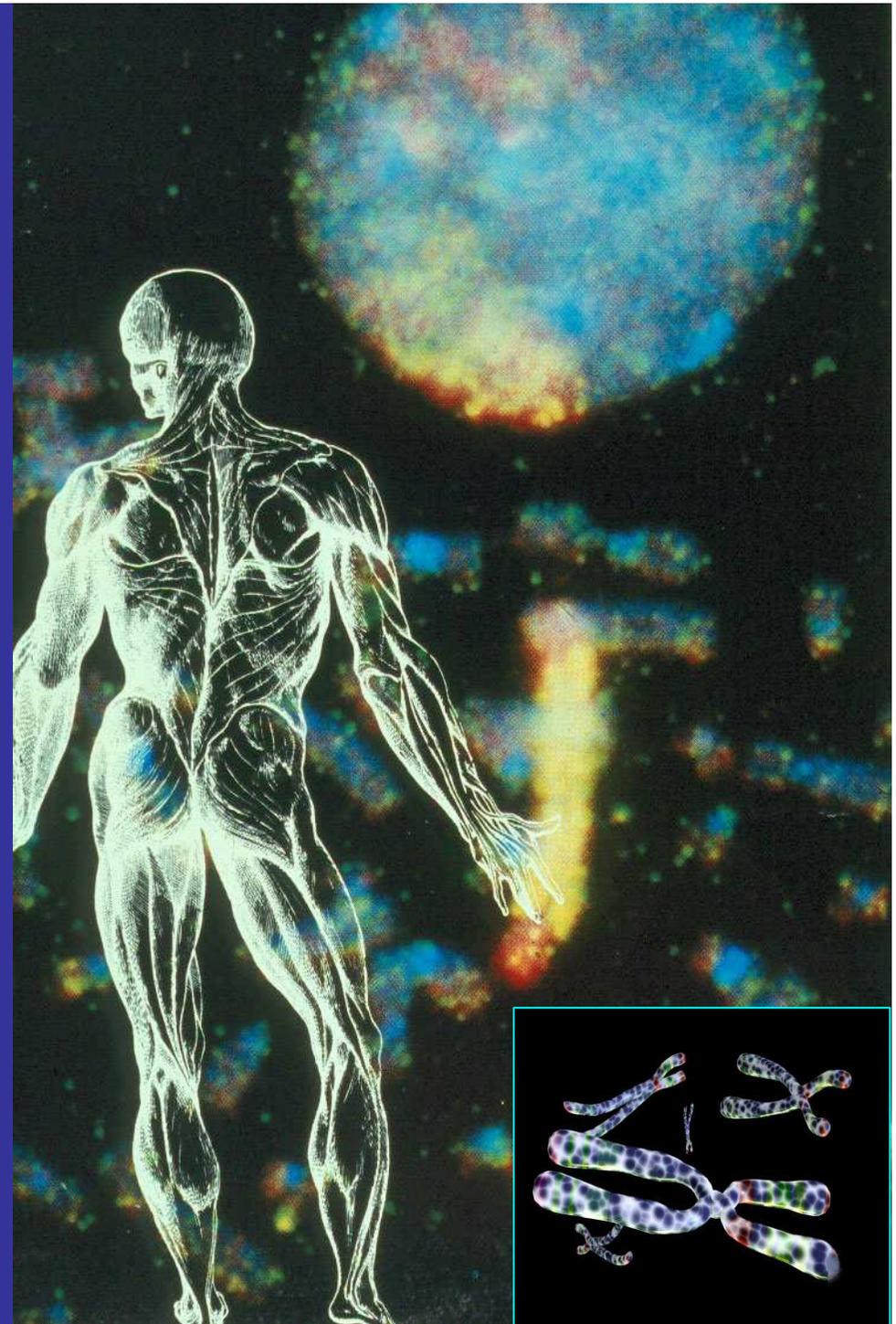
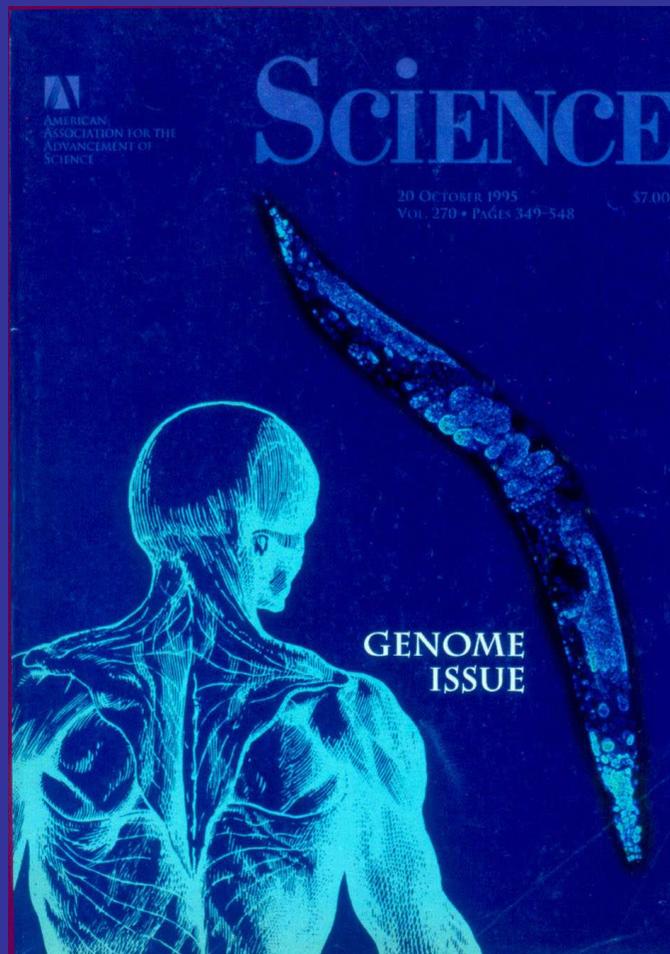
Fig. 22. Anticuerpos monoclonales terapéuticos comercializados en la actualidad.

Top 10 productos hospitalarios en EU (productos, moléculas y ventas)

TOP 10 5EU Hospital products	MAT March 08
HERCEPTIN (TRASTUZUMAB)	838.075.916,00 EUR
MABTHERA (RITUXIMAB)	597.686.276,00 EUR
TAXOTERE (DOCETAXEL)	502.690.788,00 EUR
REMICADE(INFLIXIMAB)	463.927.616,00 EUR
AVASTIN (BEVACIZUMAB)	383.022.879,00 EUR
ENBREL (ETANERCEPT)	320.151.676,00 EUR
TRUVADA (EMTRICITABINE/TENOFOVIR)	313.419.881,00 EUR
ARANESP (DARBEPOETIN ALFA)	295.753.853,00 EUR
NEORECORMON (EPOETIN BETA)	254.157.591,00 EUR
EPREX (EPOETIN ALFA)	251.376.761,00 EUR

8 de los Top 10 son drogas por biotecnología!!!

PROYECTO GENOMA HUMANO



Objetivos del Proyecto Genoma Humano

1. Establecer la secuencia de bases del ADN (A,T,G,C) en el genoma humano.
2. Identificar las variaciones en la secuencia (SNPs).
3. Elaborar un mapa que ubique a cada uno de los genes en el ADN humano.
4. Interpretar la función de los genes.
5. Secuenciar organismos no-humanos.
6. Desarrollar bioinformática y computación.
7. Implicancias éticas, legales y sociales (ELSI).

El Proyecto Genoma Humano, un gigantesco esfuerzo internacional, concluyó en su primera fase que consistió en la elaboración de mapas genéticos y mapas físicos de gran resolución del ADN genómico. La elaboración de tales mapas fué un requisito necesario para secuenciar la totalidad de los cromosomas .

Proyecto Genoma Humano (HGP)

HGP Completado Octubre 1990- Abril 2003

2006- Cromosomas Humanos completados:
1-3-8-11-12-17.

2005- Cromosomas Humanos completados:
2- 4-X.

2004- Cromosomas Humanos completados:
5-9-10-13-16-18-19.

2003- Cromosomas Humanos completados:
6-7-14-Y

2002-Genoma del ratón completado.

2001- Cromosoma Humano completado: 20

2000- Cromosoma Humano completado: 21

1999- Cromosoma Humano completado: 22

Acceso del público a las Bases de Datos del Genoma Humano

The screenshot shows a Netscape browser window titled "Netscape: Genomes Guide: Homo sapiens". The page features the NCBI logo and a navigation menu with links to PubMed, Entrez, BLAST, OMIM, Taxonomy, and Structure. A search bar contains the text "LocusLink" and "for www.ncbi.nlm.nih.gov". The main content area is titled "Human Genome Resources" and includes a section "The Genome at a Glance" with a karyotype of human chromosomes. A sidebar on the left lists various resources under "Genomic Biology", "Maps", "Human Genes", "Sequences", and "NHGRI".

NCBI

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

Search LocusLink for www.ncbi.nlm.nih.gov Go

Human Genome Resources

The Genome at a Glance

Genes & Disease

Disease gene profiles for students and the public

NHGRI

National Human Genome Research Institute

Human genome project

El ADN de cada individuo **contiene** en forma codificada **toda la información genética** sobre la que se ha construido su persona, todo el **patrimonio biológico** que ha **heredado** de sus **ancestros** y que le confieren un **carácter de *único***, expresado en su **“patrón o perfil genético”**.

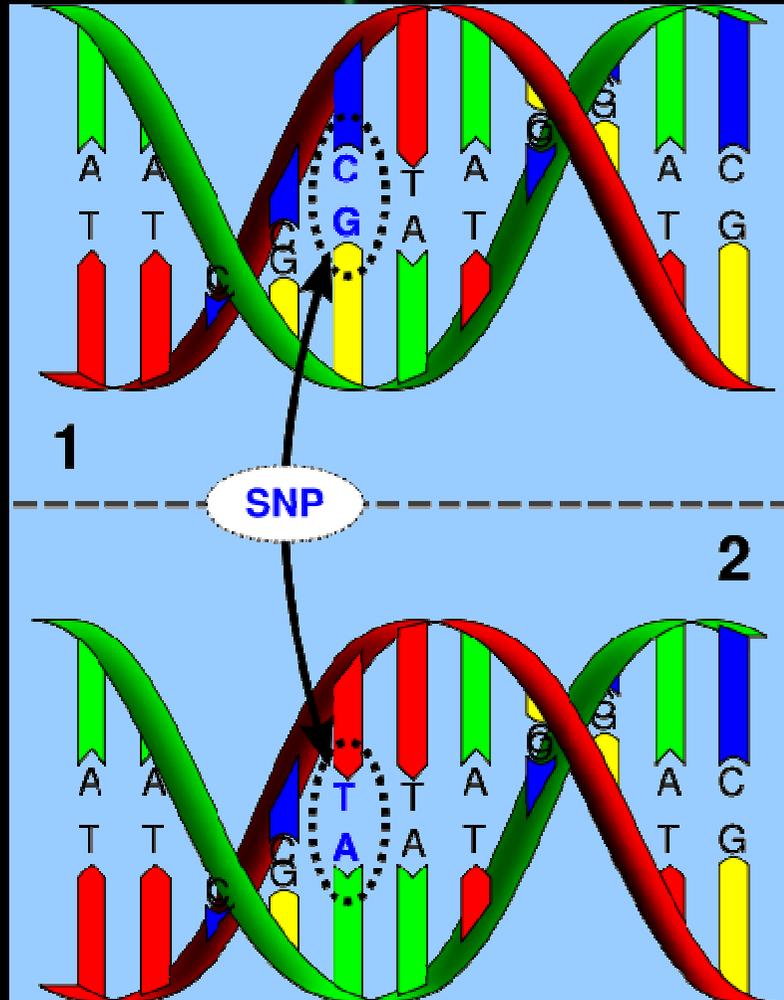
**La secuencia del
genoma humano
es única para cada
individuo**

La secuencia del ADN de dos individuos no relacionados biológicamente es 99,9% idéntica.

Existen cerca de 3.000.000 de posiciones dentro del Genoma en que podemos variar: Individualidad.

Los lugares de la secuencia de ADN donde los individuos difieren en una sola base se conocen como SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Los polimorfismos de un nucleótido *SNPs* son la fuente de variación más común



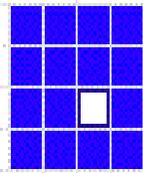
Los SNPs no causan enfermedades.

Sin embargo, algunos confieren *riesgo genético* para aquellas

comunes: Alzheimer,

Parkinson, Cáncer, Diabetes,

Enfermedades Cardiovasculares.

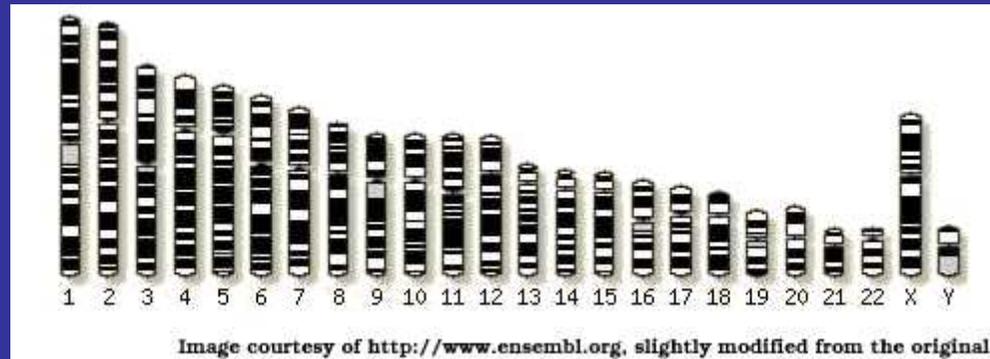


APBiotech - AstraZeneca - Aventis - Bayer - Bristol-Myers Squib - F.Hoffman-La Roche - Glaxo Wellcome

THE SNP CONSORTIUM LTD

IBM - Motorola - Novartis - Pfizer - Searle - SmithKline Beecham - Wellcome Trust

“Single Nucleotide Polymorphisms” para la Investigación Biomédica



The SNP Consortium (TSC) es una colaboración pública/privada que ha descubierto y caracterizado hasta la fecha cerca de 1.8 millones de SNPs

<http://snp.cshl.org/>

PROYECTO GENOMA HUMANO

Y

ERA POST - GENOMA

La segunda fase del Proyecto Genoma Humano estuvo y continúa estando enfocada a la generación de resultados tangibles que beneficien a la sociedad.

1.- Proyecto Internacional HapMap (Mapa de Haplotipos)

Objetivo: producción de la "nueva generación" del mapa del genoma humano, acelerar el descubrimiento de genes relacionados con enfermedades como asma, cáncer, diabetes y cardiovasculares.

Identificar los SNPs (variaciones de 1 nucleótido) dentro del genoma *que confieren individualidad a cada miembro de nuestra especie y que confieren susceptibilidad a enfermedades comunes.*

El proyecto finalizó en 2005 para las etnias tradicionales y continúa para las subestructuras poblacionales.

2.- Enciclopedia de los Elementos del ADN (ENCODE).

Enciclopedia cuya 1ª parte acaba de finalizar, consistió en el desarrollo de estrategias de gran precisión para identificación y localización de todos los genes que codifican y no codifican proteínas y de otros elementos funcionales basados en secuencias genómicas.

3. Desarrollo de Genómica Química.

Se trata de integrar una colección pública de entre 500,000 y 1.000.000 de compuestos químicos orgánicos, a fin de ser empleados en el esfuerzo de *caracterizar las vías metabólicas a mayor resolución y comprender mejor la función de los genes.*

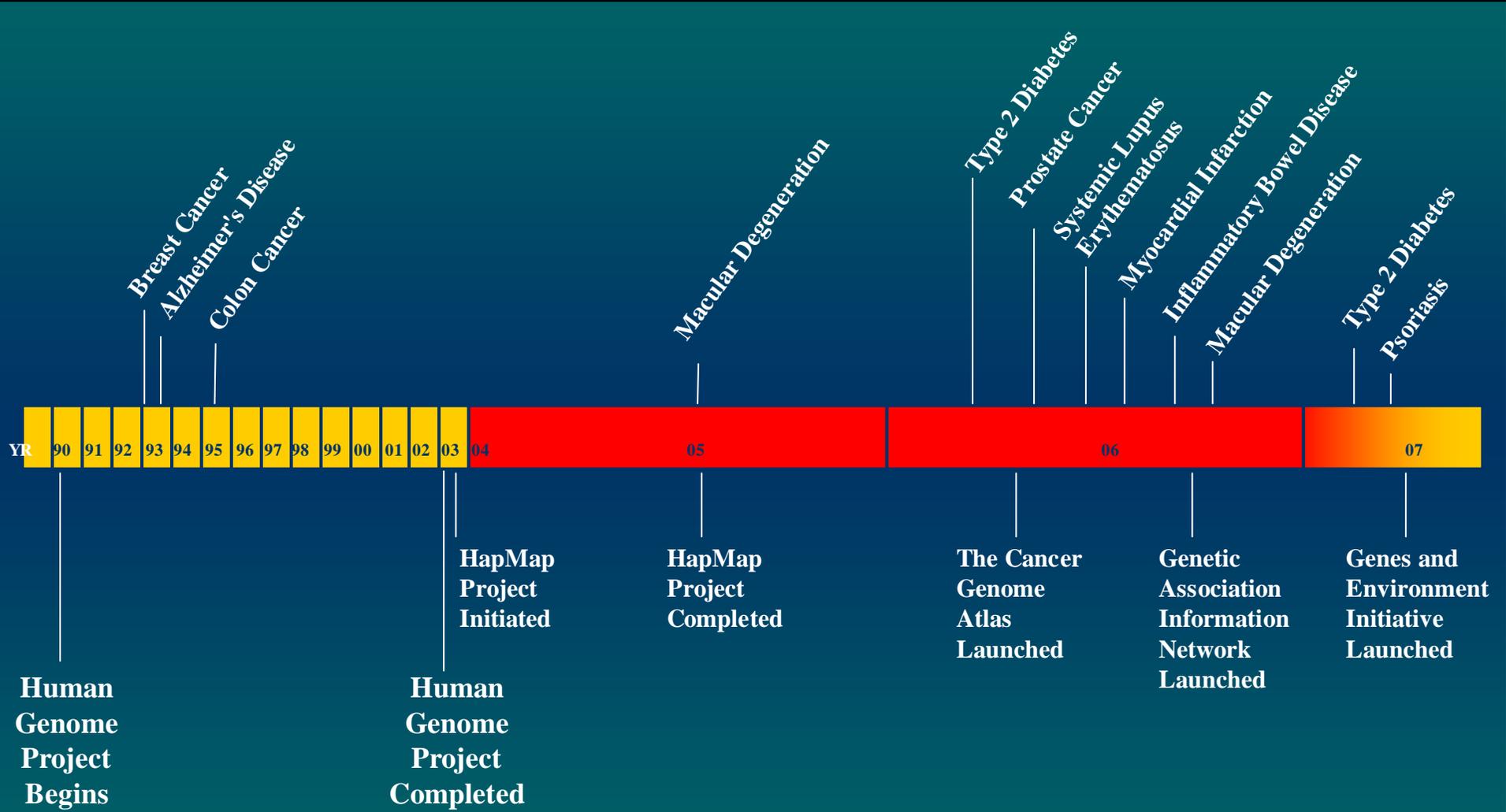
4. Genomas para la Vida.

Comprensión de los intrincados detalles sobre los procesos de la *vida microbiana* a un nivel tal que puedan desarrollarse *modelos computacionales* capaces de describir y *predecir sus respuestas a cambios en el ambiente.*

5. Creación del Consorcio para la Genómica Estructural.

Consiste en la *identificación sistemática y a gran escala de la estructura tridimensional de las proteínas cruciales para el diseño racional de nuevos medicamentos, para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.*

Gene Discoveries for Common Complex Diseases



NIH Research Initiatives

Proyecto Genoma Humano

Aplicaciones Biomédicas

- Desarrollo de tecnología:
automatización y robotización
- Diagnóstico
- Terapéutica
- Nuevas disciplinas

Extracción automatizada de ADN



Termocicladores



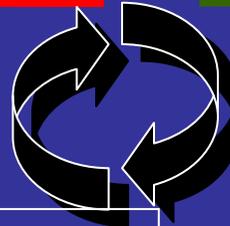
**Amplificación de
ADN Automatizada**



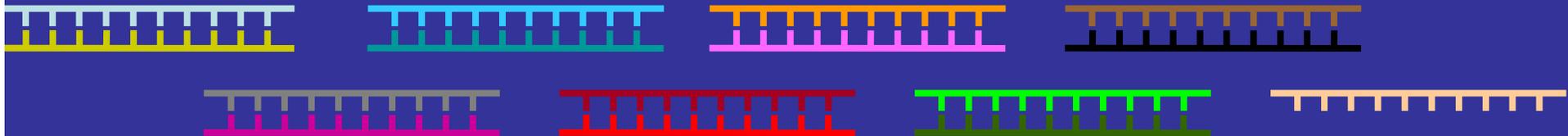
Copiado exponencial de DNA en sucesivos ciclos de temperatura



Región DNA target original



CICLO



**En 32 ciclos con 100% de eficiencia,
son creadas 1.07 billones de
copias de ADN**



ABI PRISM 3.500 – 24 capilares

Instrumentos para ensayos de SNPs

SNaPshot



Multi-Color Capillary Electrophoresis (ABI 310 or 3100)

Luminex Beads



Luminex 100 Flow Cytometer

TaqMan

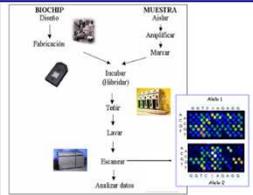


Roche LightCycler



Primer Extension

Time-of-Flight Mass Spectrometer



PCR en Tiempo Real
("Real Time PCR": RT-PCR)

Amplificación de ADN en tiempo real: método para cuantificar cantidad de ADN amplificable presente en una muestra previo análisis convencional de marcadores genéticos (genoma nuclear incluyendo cromosoma Y y genoma mitocondrial).



SECUENCIADOR
ABI-PRISM 3130XL (16 capilares)



PCR
ABI-PRISM 7900HT



SECUENCIADOR
ABI-PRISM 3100avant (4 capilares)



SECUENCIADOR
ABI-PRISM 310 (1 capilar)



PCRs, ABI-9700

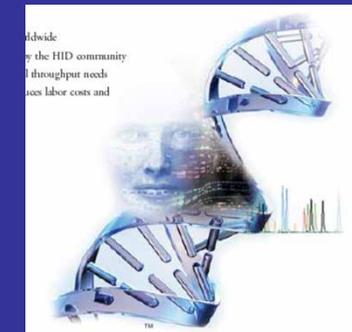


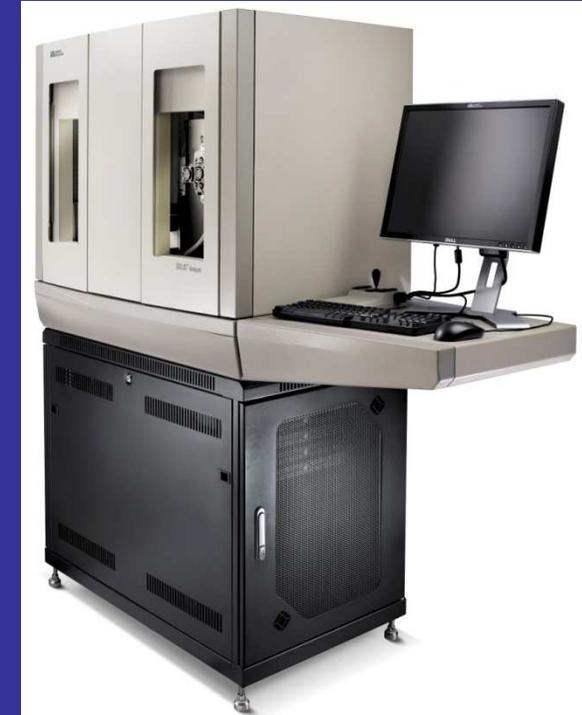
La próxima generación en análisis genómico.

Por su velocidad de secuenciación, costo por corrida y seguridad de análisis: **Applied Biosystems SOLiD™** (Sequencing by Oligonucleotides Ligation and Detection) **System**. El costo del equipo es de US\$ 600.000 en USA. Capacidad 4 gigabases por corrida (el genoma humano es de 3 gigabases). La corrida dura entre 20 y 30 días y su costo estimado es de US\$ 3.500.



ABI Prizm 7000 Sequence Detector System





La próxima generación en análisis genómico.

Por su velocidad de secuenciación, costo por corrida y seguridad de análisis: Applied Biosystems SOLiD™

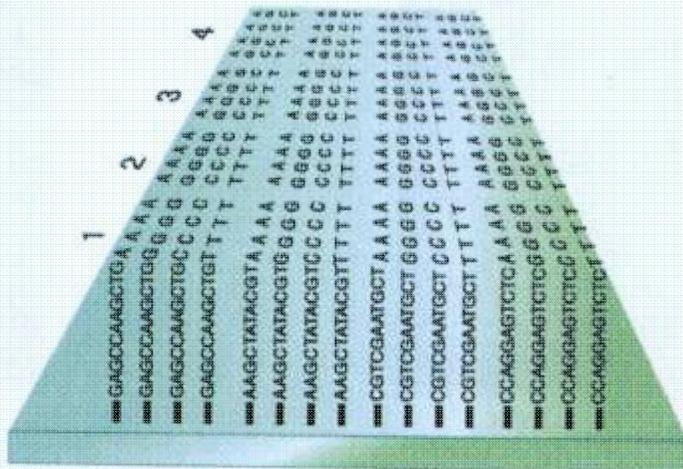
(Sequencing by Oligonucleotides Ligation and Detection)

System. El costo del equipo es de U\$S 600.000 en USA.

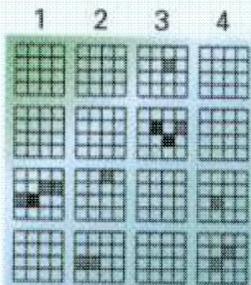
Capacidad 4 gigabases por corrida (el genoma humano es de 3 gigabases). La corrida dura entre 20 y 30 días y su costo estimado es de U\$S 3.500.

Microchips de ADN

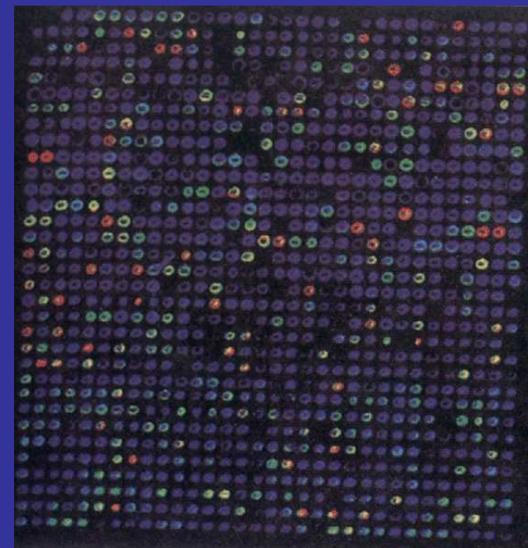
(b) Serie ordenada de oligonucleótidos



(c) Hibridación de una sonda



Microarray o chip de ADN es un soporte sólido, por ejemplo, donde se encuentran representados de manera ordenada (*arrayed*) miles de genes o de fragmentos genómicos



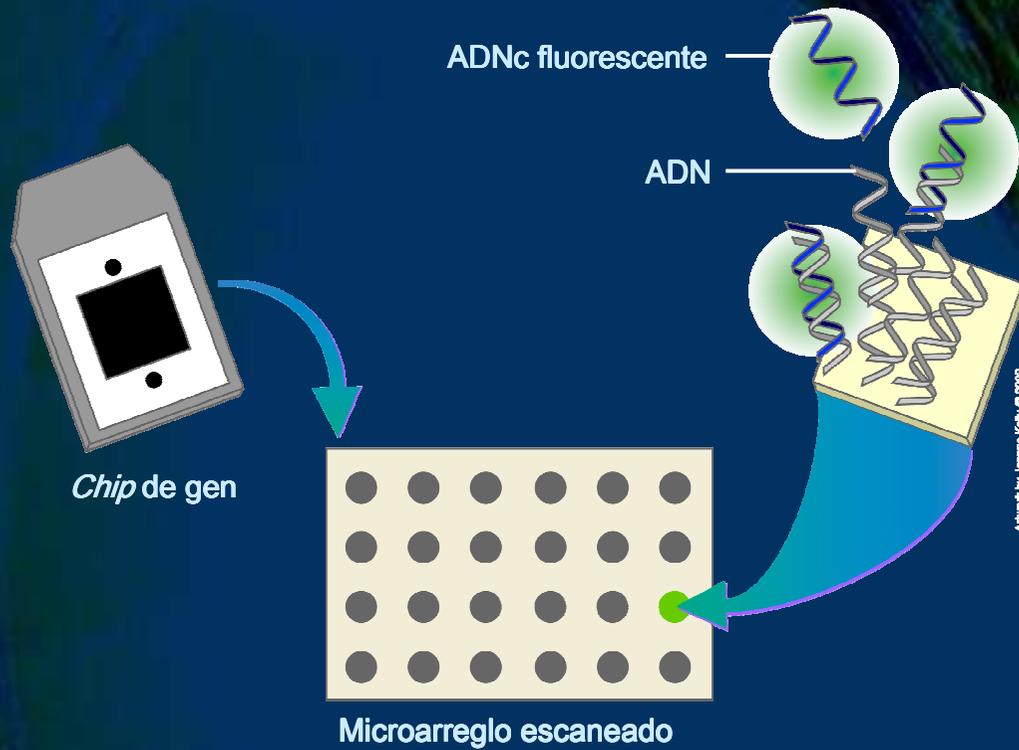
x 65000

x 1046



Tecnologías de genotipado SNPs

Microarrays Microchips



ILLUMINA



1500 - 300 SNPs

SNIPlex



400 - 40 SNPs

Sequenom

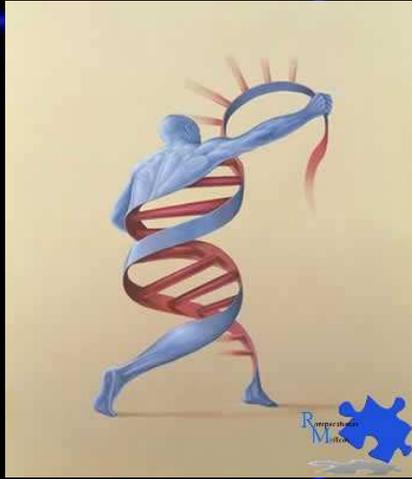


40 - 5 SNPs

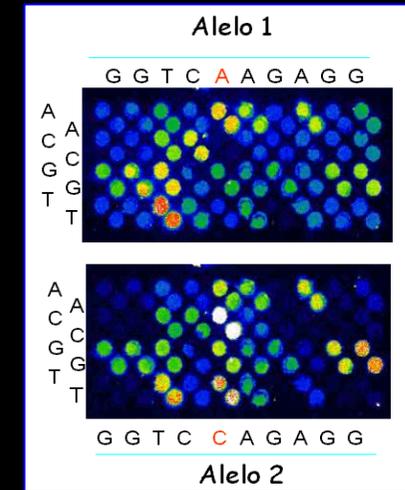
TaqMan



10 - 1 SNPs

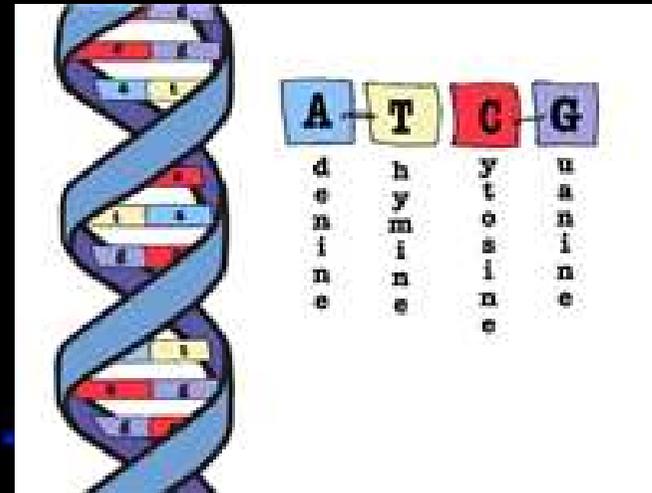


SNPs



Perfiles de expresión

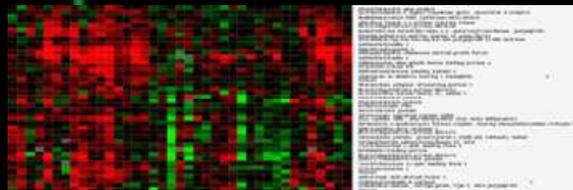
Firma molecular



Microarrays: identificación de genes candidatos de baja penetrancia en perfiles de expresión.



Alta expresión



Baja expresión



Capaz de medir la expresión de cientos de genes en el tumor simultáneamente.

Basados en su expresión podemos tener el *“cluster” del tumor y optimizar la terapia.*