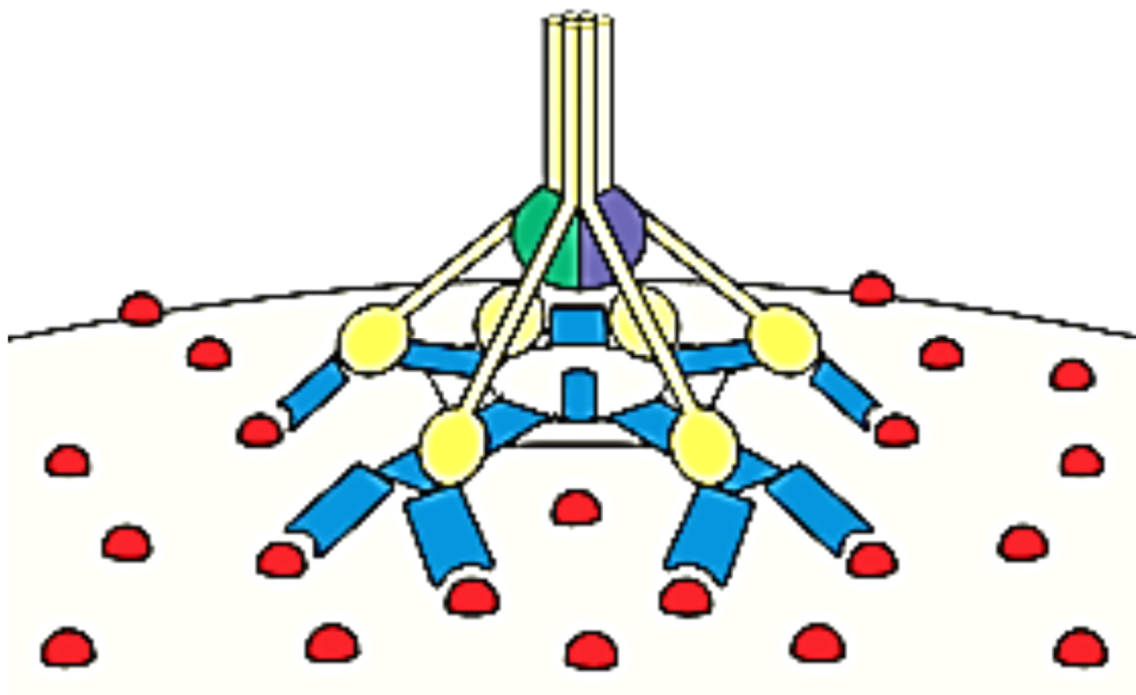




DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A COMPONENTES DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO HUMANO. APLICACIÓN DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA

Tesis Doctoral

MARTA MONEDERO RAMOS

Departamento de Fisiología y Farmacología

Facultad de Farmacia

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

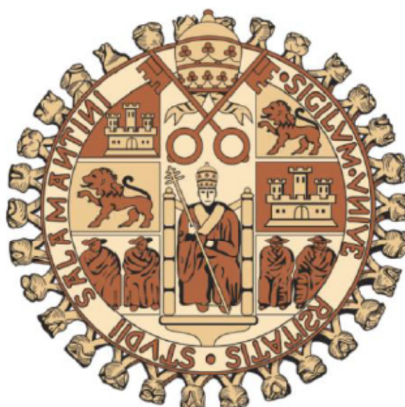


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

SALAMANCA 2018



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES FRENTE A COMPONENTES DEL
SISTEMA DEL COMPLEMENTO HUMANO. APLICACIÓN
DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA**

Memoria que presenta **Dña. Marta Monedero Ramos** para optar al Título de Doctor
por la Universidad de Salamanca

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del doctorando, Marta Monedero Ramos.

Salamanca, 31 de Julio de 2018

D^a. M^a JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a componentes del sistema del complemento humano. Aplicación diagnóstica y terapéutica”, presentada por D^a. **Marta Monedero Ramos** para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de la Dra. Dña. Mercedes Domínguez Rodríguez, Jefa de la Unidad de Inmunología Microbiana del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, la Dra. Dña. Inmaculada Moreno Iruela, Investigadora contratada de la Unidad de Inmunología Microbiana del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, y la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 31 de Julio de dos mil dieciocho.



Fdo. M^a Jesús Monte Río

D^a. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a componentes del sistema del complemento humano. Aplicación diagnóstica y terapéutica”, presentada por D^a. **Marta Monedero Ramos** para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de la Dra. Dña. Mercedes Domínguez Rodríguez, Jefa de la Unidad de Inmunología Microbiana del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, la Dra. Dña. Inmaculada Moreno Iruela, Investigadora contratada de la Unidad de Inmunología Microbiana del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, y la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 31 de julio de dos mil dieciocho.



Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías

Dra. Dña. Mercedes Domínguez Rodríguez, Jefa de la Unidad de Inmunología Microbiana del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, la Dra. Dña. Inmaculada Moreno Iruela, Investigadora contratada de la Unidad de Inmunología Microbiana del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, y la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “Desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a componentes del sistema del complemento humano. Aplicación diagnóstica y terapéutica”, presentada por D^a. **Marta Monedero Ramos** para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Servicio de Inmunología del Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda y en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a 31 de Julio de dos mil dieciocho.

Fdo. Mercedes Domínguez Rodríguez

Fdo. Inmaculada Moreno Iruela

Fdo. Rocío I. Rodríguez Macías

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado, en parte, con cargo a los siguientes Proyectos de Investigación:

- Instituto de Salud Carlos III, con referencia PH3/01446 “Desarrollo de Inmunoensayos para detectar y cuantificar la activación del sistema del complemento en pacientes con procesos inflamatorios, autoinmunes e infecciones recurrentes”. Investigador Responsable: Mercedes Domínguez Rodríguez. Periodo: 2014-2016.
- Ministerio de Economía y Competitividad, con referencia RTC-2016-46351 “Plataforma Integrada para el diagnóstico molecular de enfermedades relacionadas con el sistema del complemento (PIDMECOMP)” Investigador Responsable: Mercedes Domínguez. Periodo: 2016-2018.
- Ministerio de Economía y Competitividad, con referencia SAF2016-75197-R. “Desarrollo de un modelo predictivo de la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con hepatoblastoma”. Investigador Responsable: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2017-2019.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han enviado para su evaluación y publicación:

- **Monedero M**, Infantes J, Moreno I, Martín AB, Macias RIR, Toraño A, Dominguez M. Development and characterization of mouse monoclonal antibodies to eight human complement components: analysis of reactivity with orthologs of nine mammalian genera (segunda revisión enviada a Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases).

Además, se han publicado en forma de abstract en las siguientes revistas o libros de abstracts tras su presentación en congresos:

- “El complemento en su interacción con *Leishmania*” Inmaculada Moreno Iruela
COMPLEMENTO EN SALUD Y ENFERMEDAD, CIB, Madrid, 9-10 de Marzo de 2018.

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de un trabajo muy laborioso, como lo es una tesis doctoral, hace que nos demos cuenta de todo lo que podemos aportar y extraer de uno mismo en la realización de un proyecto que nos apasiona. Sin embargo, he de reconocer, tras realizar un análisis objetivo de este proyecto, que no se hubiera podido llevar a cabo sin la participación de personas e instituciones que han hecho, día a día, que este “viaje”, de cuatro años, haya terminado de la mejor manera posible. Por ello, para mí es un orgullo reconocer en estas líneas el trabajo de todas las personas que han estado a mi lado durante todo este tiempo, expresándoles así mis agradecimientos.

En primer lugar, agradezco de una manera muy especial a las tres directoras de tesis, Inmaculada Moreno, Mercedes Domínguez y Rocío Rodríguez la oportunidad que me han brindado de trabajar con ellas. Desde el principio de este proyecto han sido los tres pilares fundamentales. Gracias por vuestra ayuda, vuestra paciencia, vuestra constancia y, sobre todo, por vuestro tiempo, porque sin duda alguna, juntas hemos conseguido lo que tanto tiempo he esperado.

Asimismo, no quiero dejar pasar la oportunidad de agradecer a Alfredo Toraño su apoyo, su trabajo y su compromiso. Gracias infinitamente por hacer que un sueño, como lo es la publicación de un artículo que lleva mi nombre, se haga realidad.

Quiero extender un sincero agradecimiento al doctorando, José. Gracias por tu colaboración y tu ayuda constante desde el comienzo en la parte experimental de la tesis. Lo que empezó como una rutina de trabajo diario a tu lado, a día de hoy, se ha convertido en una sólida amistad.

Igualmente y no menos importante ha sido el papel de Soledad y Ana en este proyecto. Gracias a ellas he podido llevar a cabo parte de los experimentos que forman parte de la tesis, dado que mi dedicación a este trabajo ha sido en tiempo parcial, debido a mi situación laboral.

Por último, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia y amigos. Sin su apoyo incondicional, su paciencia e inspiración no hubiera sido posible llevarlo a cabo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. El Sistema del Complemento.....	15
1.1.1. Funciones del Sistema del Complemento	15
1.1.2. Activación del Sistema del Complemento.....	16
1.1.3. El componente C3.....	20
1.1.4. La vía lítica	21
1.1.5. Regulación del Sistema del Complemento.....	23
1.2. Enfermedades relacionadas con la desregulación del Sistema del Complemento	27
1.2.1. Deficiencias en factores del complemento	27
1.2.2. Hiperactivación en el Sistema del Complemento	29
1.2.3. Otras patologías asociadas	33
1.3. Desarrollo de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y tratamiento de patologías asociadas con alteraciones en el Sistema del Complemento.....	36
1.4. Objetivos y planteamiento experimental.....	41
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.1. Material biológico.....	43
2.1.1. Animales	43
2.1.2. Líneas celulares.....	43
2.2. Productos y equipos	43
2.3. Obtención y preparación de reactivos biológicos	46
2.3.1. Sueros humanos	46
2.3.1.1. Suero Humano Normal.....	46
2.3.1.2. Suero humano normal biotinilado	46
2.3.1.3. Seroteca.....	46
2.3.2. Proteínas del Complemento humano	47
2.3.3. Anticuerpos monoclonales frente a proteínas del complemento	47
2.4. Obtención de anticuerpos monoclonales frente a proteínas del Sistema del Complemento	49

2.5. Inmunoensayos empleados en la caracterización de anticuerpos monoclonales	50
2.5.1. ELISA indirecto	50
2.5.2. ELISA de captura	51
2.5.3. Análisis por SDS-PAGE y Western blot	51
2.5.4. Citometría de flujo.....	52
2.6. Inmunoensayos desarrollados para la caracterización y cuantificación del Sistema del Complemento	53
2.6.1. ELISA de funcionalidad de las tres vías de activación del sistema del complemento: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas	53
2.6.2. ELISA de determinación del complejo C5b-9 soluble.....	55
2.6.2.1. Purificación del complejo C5b-9 soluble	55
2.6.2.2. Desarrollo y puesta a punto del ELISA de determinación del complejo SC5b-9.....	56
2.6.3. Ensayos de inhibición de hemólisis con AcM frente a componentes del complemento	57
2.6.3.1. Preparación de los eritrocitos	57
2.6.3.2. Ensayo de hemólisis e inhibición.....	58
2.7. Inmunofluorescencia en cortes de tejido.....	59
2.7.1 Preparación de muestras.....	59
2.7.2 Inmunodetección.....	59
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
3.1 Caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón frente a los componentes del complemento humano.	63
3.1.1 Caracterización por ELISA de captura y ELISA indirecto.....	63
3.1.1.1 Componentes de la vía clásica.....	63
3.1.1.1.1 Componente C1q.....	63
3.1.1.1.2. Componente C4.....	65
3.1.1.2 Componentes de la vía alternativa.....	67
3.1.1.2.1 Factor B.....	67
3.1.1.2.2 Properdina	68
3.1.1.3 Componente C3	70
3.1.1.4 Componentes de la Vía Lítica	70

3.1.1.4.1 Componente C5	70
3.1.1.4.2 Componente C9	72
3.1.2 Caracterización de los anticuerpos monoclonales por Western Blot	75
3.1.2.1 Componentes de la vía clásica, vía alternativa y Vía Lítica: C1q, C4, fB, P, fH, fD, C5 y C9	75
3.1.2.2 Componente C3 y productos de degradación	76
3.1.3 Caracterización de la reactividad de los anticuerpos monoclonales por citometría de flujo	78
3.2. Obtención de nuevos anticuerpos monoclonales frente al fB, C5 y C5a	80
3.2.1. Anticuerpos monoclonales frente a fB	80
3.2.2. Anticuerpos monoclonales frente a C5 y C5a	81
3.3. Desarrollo de un ensayo para medir la funcionalidad de las tres vías del sistema del complemento: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas	84
3.4 Desarrollo y puesta a punto de un ensayo ELISA tipo sándwich para la determinación del complejo C5b-9 soluble	88
3.4.1. Caracterización y selección de los anticuerpos monoclonales necesarios para desarrollar el ELISA	88
3.4.1.1. Selección del anticuerpo de revelado anti-C9	88
3.4.1.2 Selección del anticuerpo monoclonal anti-C5	90
3.4.2. Purificación del complejo SC5b-9	92
3.4.3. Análisis de la concentración SC5b-9 en muestras de la seroteca	95
3.5. Aplicaciones diagnósticas	98
3.5.1. Caracterización de la activación del complemento en muestras de pacientes con disfunciones del Sistema del Complemento	98
3.5.2. Ensayos de inhibición empleando los anticuerpos monoclonales	101
3.5.3. Detección de inmunocomplejos en pacientes con penfigoide ampolloso	103
4. CONCLUSIONES	109
5. BIBLIOGRAFÍA	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Funciones efectoras del Sistema del Complemento.

Figura 1.2. Activación de vía clásica.

Figura 1.3. Activación de la vía de las lectinas.

Figura 1.4. Activación de la vía alternativa.

Figura 1.5. Amplificación de la actividad del complemento por la vía alternativa.

Figura 1.6. Degradación del componente C3.

Figura 1.7. Formación del Complejo de ataque a la membrana.

Figura 1.8. Activación de las vías del complemento.

Figura 1.9. Proteínas reguladoras del complemento.

Figura 1.10. Principales enfermedades relacionadas con la desregulación del complemento.

Figura 1.11. Sitios de actuación del C1-INH.

Figura 1.12. Desregulación del complemento en el Síndrome Urémico Hemolítico Atípico.

Figura 1.13. Localización del epítipo NC16A en el Penfigoide Ampollosa.

Figura 1.14. Representación esquemática de las diferentes estrategias empleadas en la terapia anti-complemento.

Figura 2.1. Diseño de la placa de ELISA para analizar la activación del complemento por las tres vías

Figura 3.1. Reactividad frente al componente C1q.

Figura 3.2. Cinética de unión del AcM al componente C1q.

Figura 3.3. Reactividad frente al componente C4.

Figura 3.4. Cinética de unión del AcM al componente C4.

Figura 3.5. Reactividad frente al fB.

Figura 3.6. Cinética de unión del AcM al componente fB.

Figura 3.7. Reactividad frente a la P.

Figura 3.8. Cinética de unión del AcM a la P.

Figura 3.9. Reactividad frente al componente C5.

Figura 3.10. Cinética de unión al componente C5.

Figura 3.11. Reactividad frente al componente C9.

Figura 3.12. Cinética de unión al componente C9.

Figura 3.13. Análisis por WB de la reactividad de los AcM frente a los componentes del complemento purificados.

Figura 3.14. Análisis de la reactividad por CF de los AcM frente a promastigotes de *leishmania* opsonizados en SHN.

Figura 3.15. Reactividad por WB de AcM anti C5 en condiciones no reductoras.

Figura 3.16. Selección del AcM frente al componente C5.

Figura 3.17. Selección del AcM frente al componente C9.

Figura 3.18. Reactividad de los AcM anti-C5, anti-C9 y mezcla equimolecular de ambos en SHN (■) y SHN-EDTA (□)

Figura 3.19. Selección del agente activador de VC.

Figura 3.20. Selección del agente activador de VA.

Figura 3.21. Selección del AcM anti-C9 que mejor detecta SC5b-9.

Figura 3.22. Selección del AcM anti-C9 biotinilado.

Figura 3.23. Selección de AcM de captura frente a C5.

Figura 3.24. Elución de columna de afinidad AcM anti-C5.

Figura 3.25. ELISA sándwich de determinación de SC5b-9.

Figura 3.26. Elución de columna de afinidad AcM anti-C9.

Figura 3.27. Análisis de la purificación de SC5b-9.

Figura 3.28. Ajuste a una curva logística de cuatro parámetros de los valores obtenidos en ELISA sándwich para determinación SC5b-9

Figura 3.29. Análisis por WB de fD y pro-fD

Figura 3.30. Inhibición de la hemólisis de eritrocitos de carnero empleando AcM frente a factores de complemento.

Figura 3.31. Inhibición de la hemólisis de eritrocitos de conejo empleando AcM frente a factores de complemento.

Figura 3.32. Localización por inmunofluorescencia en cortes de piel de un paciente con PA (A) o de un sujeto control (B) de C3 utilizando el anticuerpo SIM 27.A.49.

Figura 3.33. Localización por inmunofluorescencia en cortes de piel de un paciente con PA (A) o de un sujeto control (B) de C9 utilizando el Ac SIM 235.6.2.5

Figura 3.34. Localización por inmunofluorescencia en cortes de piel de un paciente con PA (A) o de un sujeto control (B) de P utilizando el Ac SIM 246.1.1.1

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. AcM frente a las proteínas del complemento C1q, C4, P, fB y C3.

Tabla 2.2. AcM frente a las proteínas del complemento fH, fD, C5 y C9.

Tabla 2.3. AcM utilizados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Tabla 3.1. Selección de AcM frente a los factores del C' por ELISAc y ELISAi.

Tabla 3.2. Caracterización por WB de los diferentes AcM frente al componente C3 y sus productos de degradación iC3b y C3d.

Tabla 3.3. Características de AcM frente al fB.

Tabla 3.4. Características de AcM frente al C5 y C5a.

Tabla 3.5. Porcentaje de actividad y sueros analizados por VC.

Tabla 3.6. Porcentaje de actividad y sueros analizados por VA.

Tabla 3.7. Porcentaje de actividad y sueros analizados por VL.

Tabla 3.8. Concentración de SC5b-9 determinada en suero por ELISA.

Tabla 3.9. Porcentaje de activación del complemento en muestras de plasma.

ABREVIATURAS

Ac Anticuerpo

ACF Adyuvante completo de Freund

AcM Anticuerpo monoclonal

Ag Antígeno

AIF Adyuvante incompleto de Freund

C´ Sistema del Complemento

CF Citometría de flujo

C1 Primer componente del Sistema del Complemento

C1q, C1r, C1s Subcomponentes del complejo C1

C1-INH Inhibidor del componente C1

C2 Segundo componente del Sistema del Complemento

C2a Fragmento derivado de la escisión del C2

C2b Fragmento derivado de la escisión del C2

C3 Tercer componente del Sistema del Complemento

C3a Fragmento derivado de la escisión del C3

C3b Fragmento derivado de la escisión del C3

iC3b Fragmento inactivo derivado de la escisión del C3

C3dg Fragmento anclado a la membrana derivado de la escisión del C3

C3G Glomerulopatías C3

C3NeF Factor nefrítico

C4 Cuarto componente del Sistema del Complemento

C4a Fragmento derivado de la escisión del C4

C4b Fragmento derivado de la escisión del C4

C4BP Proteína de unión a C4

C5 Quinto componente del Sistema del Complemento

C5a Fragmento derivado de la escisión del C5

C5b Fragmento derivado de la escisión del C5

C6 Sexto componente del Sistema del Complemento

C7 Séptimo componente del Sistema del Complemento

C8 Octavo componente del Sistema del Complemento

C9 Noveno componente del Sistema del Complemento

DAF Factor de aceleración de la degradación

DMAE Degeneración macular relacionada con la edad

ELISAc ELISA de captura

ELISAi ELISA indirecto

fB Factor B

Fc Región constante de las inmunoglobulinas

fD Factor D

fH Factor H

fI Factor I

HPN Hemoglobinuria paroxística nocturna

HRF Factor de restricción homóloga

IC Inmunocomplejo

Ig Inmunoglobulina

kDa kilodaltons

LES Lupus eritematoso sistémico

LPS Lipopolisacárido

MAC Complejo de ataque a la membrana

MASPs Serín proteasas de unión a MBL

MBL Proteína de unión a manosa

MCP Proteína cofactor de membrana

P Properdina

Pm Peso molecular

PA Penfigoide ampoloso

SHN Suero humano normal

SC5b-9 Complejo C5b-9 soluble

SUHa Síndrome urémico hemolítico atípico

TCC "Terminal complement complex"

VA Vía alternativa

VC Vía clásica

VL Vía de las lectinas

WB Western blot

RESUMEN

El Sistema del Complemento (C') es uno de los principales integrantes de la defensa innata del hospedador vertebrado pero, además, constituye un sensor de reconocimiento de señales extrañas y/o de peligro de vertebrados que, junto con las familias de receptores Toll y de proteínas citoplásmicas NLR, desempeña un papel primordial en la inducción y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Está integrado por unas 30 proteínas plasmáticas y de la superficie celular de leucocitos y de otros tejidos. Algunos de sus componentes son zimógenos que se activan por proteólisis en forma de cascada siguiendo un proceso amplificador que genera respuestas efectoras de gran intensidad y rapidez. Alteraciones en los mecanismos homeostáticos del complemento dan origen a diversas patologías. Entre sus mecanismos efectores se incluyen la opsonización, el desarrollo de respuestas inflamatorias con liberación de potentes anafilatoxinas, la destrucción de células y microorganismos por acción de la cascada citolítica, y la solubilización y aclaramiento de inmunocomplejos (IC) opsonizados potencialmente lesivos para el organismo. Se conocen tres vías de activación del complemento, la vía clásica (VC), la de las lectinas (VL) y la alternativa (VA). Aunque descritas como independientes, suelen activarse simultáneamente y confluyen en la proteólisis del C3, el componente central del sistema.

La finalidad de esta Tesis Doctoral fue obtener y caracterizar anticuerpos monoclonales (AcM) frente a proteínas del C' y utilizar los mejores para el diseño de inmunoensayos que permitiesen identificar disfunciones del mismo en patologías asociadas con procesos inflamatorios, enfermedades autoinmunes o infecciones recurrentes. También seleccionar los AcM que, por sus características, fueran adecuados para dirigirse a puntos clave de las vías (dianas) para el control de la activación del C'.

Se han caracterizado AcM frente a los componentes de la VC (C1q y C4), de la VA (factor B (fB), factor D (fD), factor H (fH) y Properdina (P), C3/iC3b/C3d, y de la Vía Lítica (C5 y C9), lo que permitirá el empleo de los mismos en inmunoensayos como: ELISA indirecto (ELISAI), ELISA de captura (ELISAc), western-blot (WB), Citometría de flujo (CF) e Inmunohistoquímica.

Además, se han obtenido AcM frente al fB, integrante de la C3 y C5 convertasa de la vía alternativa; frente al C5; y frente al C5a, la anafilotoxina más potente generada e involucrada en enfermedades autoinmunes con base inflamatoria.

Empleando los AcM anti C5 y C9 se diseñaron dos ensayos tipo ELISA: 1) Uno de ellos permite un análisis cualitativo de la activación del C' simultáneamente por las tres vías; VC, VL y VA. Este ensayo se puso a punto con sueros humanos normales, posteriormente fue probado en 191 sueros procedentes de una seroteca de nuestro laboratorio y, por último, los resultados fueron contrastados con los obtenidos con un ELISA comercializado para el mismo fin en un grupo más reducido de muestras. Los resultados obtenidos con estos sueros, representativos de la población general adulta trabajadora, mostraron que el 85% de la población tiene funcional las tres vías de activación del C'; que el 95% tiene íntegras la VC y la VA; y que el 100% de los individuos analizados son capaces de activar el C' por la VC. 2) El otro inmunoensayo desarrollado es un ELISA tipo sándwich que permite la cuantificación de la concentración del complejo soluble C5b-9 (SC5b-9) en suero. Su puesta a punto se llevó a cabo con el SC5-9 purificado y se testó posteriormente en los mismos 191 sueros mencionados. A pesar de que este complejo está asociado a enfermedades que cursan con una elevada activación del complemento, se detectó su presencia en el 11% de los sueros obtenidos de una población teóricamente sana.

Los AcM obtenidos a lo largo de este trabajo y la caracterización funcional de los mismos mediante la determinación de la inhibición de la actividad del C' por la VC con un anti-C3b, de la VA con un anti-P, y de la Vía Lítica con un anti-C9, proporcionan nuevas herramientas que deberán ser evaluadas en el futuro para valorar su posible utilidad como agentes inmunomoduladores en las alteraciones inflamatorias originadas por una activación exacerbada del C'.



Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Sistema del Complemento

El C' es uno de los principales mecanismos efectores de la respuesta inmune innata. Estudios evolutivos han demostrado la existencia de un C' primitivo en cnidarios, remontando así su origen a hace más de 500 millones de años [35]. Está implicado en la defensa frente a infecciones y en la eliminación de células tumorales y, junto con las familias de receptores Toll y de proteínas citoplasmáticas NLR, desempeña un papel primordial en la inducción y modulación de la respuesta inmune adaptativa [45].

El C' fue descrito por Jules Bordet en el siglo XIX como una proteína termolábil del suero [35], mientras que la parte termoestable eran los anticuerpos (Ac). Posteriormente, Paul Ehrlich le designa el término de complemento, definido como *“la actividad del suero de la sangre que complementa la acción bactericida y hemolítica de los anticuerpos”* [32]. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento sobre este sistema, sus componentes, su activación y sus implicaciones fisiológicas, de forma paralela al desarrollo de nuevas técnicas de laboratorio para su caracterización, lo que ha permitido que se reconozca su gran relevancia.

1.1.1. Funciones del Sistema del Complemento

El C' es un sistema complejo vital en la defensa del huésped [49]. Entre sus funciones efectoras se encuentran las siguientes, que también se representan en la figura 1.1.

1. Lisis de patógenos.
2. Oponización de microorganismos.
3. Aclaramiento de IC.
4. Favorecer la presentación del antígeno (Ag).
5. Activación de células B de memoria.
6. Generación de péptidos con propiedades quimiotácticas y reguladoras del sistema inmune [45].

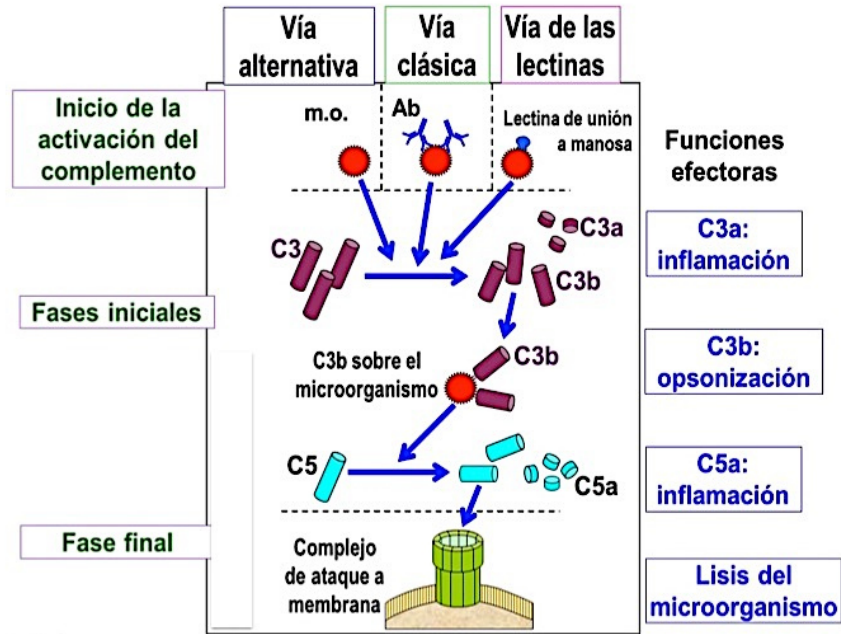


Figura 1.1. Funciones efectoras del C': 1) Interviene en la respuesta inflamatoria por la producción de las anafilotoxinas C3a y C5a. 2) Opsonización de microorganismos a través del fragmento C3b. 3) Induce la lisis de los patógenos por la formación del complejo de ataque a la membrana.

(www.ehu.es/immunologia/iwiki/?2_1_Inmunidad_innata_frente_a_bacterias_extracelulares)

Ab, anticuerpo; m.o., microorganismo.

1.1.2. Activación del Sistema del Complemento

El C' está integrado por más de una treintena de proteínas que están presentes en el plasma y en la superficie de las células de la sangre y de otros tejidos [48]. Los componentes solubles del plasma se encuentran como zimógenos que se activan por digestión proteolítica, desencadenando un proceso amplificador en cascada que genera respuestas efectoras de gran intensidad y rapidez.

Se consideran principalmente tres vías de activación del C': 1) VC, 2) VL y 3) VA, que confluyen en la producción del componente clave del sistema, el C3b. Se ha descrito otra posible vía de activación a través de la P, aunque finalmente se le ha atribuido un papel de reclutamiento de C3 y C3b, más que un mecanismo de activación [24, 28].

Activación de la vía clásica

La VC se inicia y activa cuando el componente C1 se une a la región constante (Fc) de las inmunoglobulinas (Ig) IgM e IgG (excepto el isotipo IgG4 en humanos y el IgG3 en ratón). Cuando las Ig están unidas a un Ag de superficies celulares de patógenos o a IC solubles son reconocidas por el primer componente, el C1. El C1 es un complejo trimolecular formado por una molécula de C1q, dos moléculas de C1r y dos de C1s y que es estabilizado en presencia de iones Ca^{2+} . El subcomponente C1q está compuesto por 18 cadenas polipeptídicas agrupadas de tres en tres formando una estructura globular de seis subunidades idénticas. Cada subunidad está formada por un brazo en disposición de triple hélice (porción fibrilar que se dispone igual que el colágeno) y termina en una cabeza globular que posee un sitio de reconocimiento para la región Fc (figura 1.2). La unión de C1q a la región Fc de las Ig induce un cambio conformacional que activa a las subunidades C1r y C1s. El C1 activado actúa sobre los dos siguientes componentes de esta vía, el C4 y el C2. Como consecuencia de la escisión del C4 se producen el C4a, una anafilotoxina que se libera al medio, y el C4b, que se une covalentemente a proteínas de la superficie activadora. En estas condiciones al C4b se le une el C2a que en presencia de iones Mg^{2+} forma un complejo sobre la superficie celular denominado C3 convertasa de la VC, una serín-proteasa que hidroliza C3 en C3b y C3a. El C3a se libera al suero como anafilotoxina, favoreciendo el proceso inflamatorio. Se han descrito varios productos microbianos, como el lípido A de la endotoxina, la proteína A de *Staphylococcus aureus*, o la plasmina [20], y mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva y el componente amiloide-P sérico [10], que pueden activar el componente C1 directamente sin la participación de Ac.

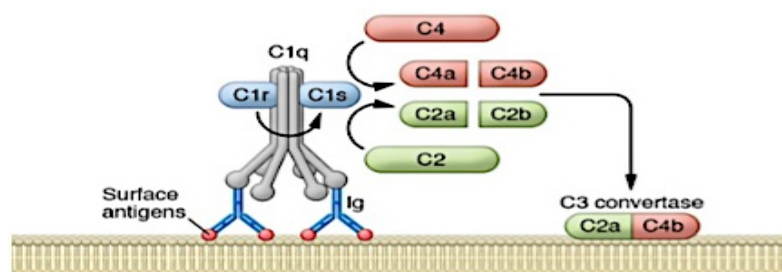


Figura 1.2. Activación de VC. La unión del componente C1q a los IC induce un cambio conformacional y activa las subunidades C1r y C1s que produce una escisión de los componentes C2 y C4, formándose la C3 convertasa de la VC. Adaptado de [2].

Activación de la vía de las lectinas

La VL se inicia y activa por la unión de polisacáridos microbianos a lectinas circulantes, como la proteína de unión a manosa (MBL) y determinadas ficolinas plasmáticas, que poseen una estructura similar al C1q. La unión activa a diversas serín-proteasas (MASP-1, MASP-2, MASP-3) (figura 1.3), capaces de escindir a C4 y C2, en presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , de forma similar a lo que ocurre en la VC. Por tanto, esta vía se considera una ruta de activación de la VC en ausencia de Acs específicos.

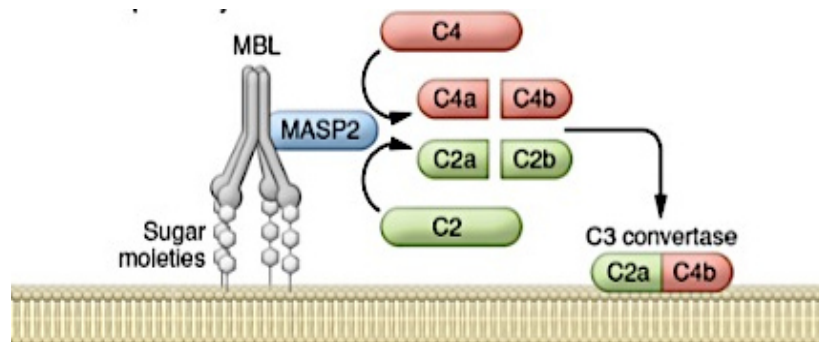


Figura 1.3. Activación de la VL. La MBL se une a restos de azúcares de la superficie de los patógenos, activando una cascada de señalización intracelular mediada por las MASPs con actividad serín-proteasas capaces de escindir los componentes C2 y C4 de manera análoga a lo que ocurre en la VC. Adaptado de [2]

Activación de la vía alternativa

La activación del C' por la VA se considera un proceso no "inmunológico" que permite la deposición de C3b en superficies activadoras de microorganismos. En condiciones fisiológicas, el componente C3 se encuentra activado como C3b debido a la hidrólisis espontánea del enlace tioéster en el medio acuoso; no obstante, su concentración es muy baja y su vida media muy corta (milisegundos) [33]. La presencia de superficies activadoras, tales como endotoxinas bacterianas, polisacáridos de parásitos, bacterias o levaduras, alteran dicho equilibrio y disparan la producción de C3 (H_2O). Esta molécula es funcionalmente igual al C3b generado por la convertasa de la VC y se fija covalentemente a la superficie activadora. El fragmento C3b forma un complejo con el fB, que a su vez es escindido por acción del fD (figura 1.4), una serín-proteasa que circula de forma activa a baja concentración por la sangre. El complejo C3bBb es muy lábil y es estabilizado por la P, se forma de ese modo la C3bBbP o C3 convertasa de la VA, que

cataliza la proteólisis de más moléculas de C3. Los nuevos fragmentos C3b generados actúan como opsoninas y se unirán de nuevo a la superficie activadora, pudiendo servir como sustrato inicial de esta misma vía en un proceso de retroalimentación [46].

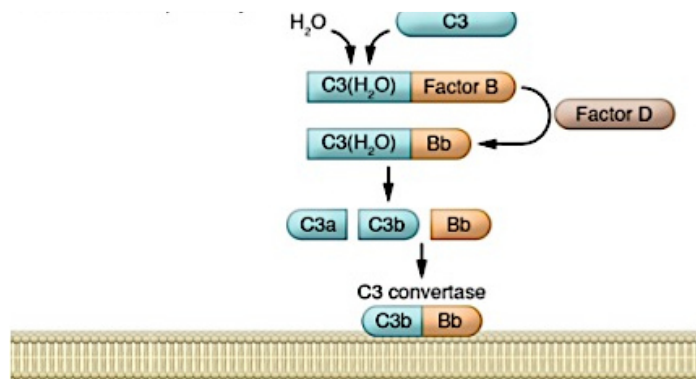


Figura 1.4. Activación de la VA. El componente C3 se hidroliza de forma espontánea. El fragmento C3b generado se une al FB formando el complejo C3bBb, que es muy lábil y es estabilizado por la P (C3bBbP), formando la C3 convertasa de la VA. De la hidrólisis de C3 se produce la liberación del fragmento C3a, una anafilotoxina con funciones inmunomoduladoras. Adaptado de [2].

El fragmento C3b, idéntico el generado tanto por la VC como por la VA, es capaz de amplificar la VA de forma rápida y eficiente (figura 1.5) participando así en aproximadamente el 80% de actividad de la vía lítica del complemento [49].

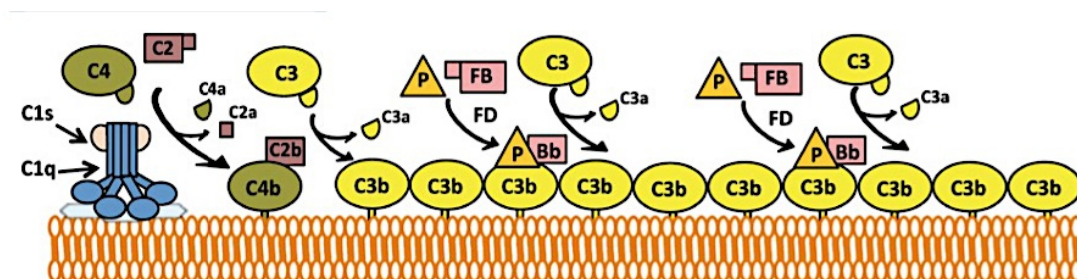


Figura 1.5. Amplificación de la actividad del complemento por la VA. El fragmento C3b generado en las tres vías de activación del C' se deposita en la superficie celular y sirve como lugar adicional de formación de C3 convertasas originando la cascada de amplificación. Adaptado de [6].

1.1.3. El componente C3

El C3 es el componente más importante del C'. De todos los factores, es el que se encuentra a mayor concentración en el suero, además de ser capaz de reaccionar con una plétora de proteínas del huésped y de microorganismos involucrados en la activación y función efectora del C'. El C3 es una glicoproteína de 195 kilodaltons (kDa) compuesta por dos cadenas peptídicas denominadas cadena α (120 kDa) y cadena β (75 kDa), que están unidas entre sí por un puente disulfuro (figura 1.6). En la cadena α se encuentra un grupo tioéster oculto en la molécula hasta que el C3 es escindido por acción de la C3 convertasa en el fragmento C3a (9 kDa) que se libera de la cadena α quedando expuesto el grupo tioéster, altamente reactivo. Este grupo puede: 1) reaccionar con el agua, y el C3b se inactiva, o 2) reaccionar con proteínas de la superficie celular formando un enlace covalente tipo amida. Si el C3b se une al C4b2a de forma estable dará lugar al C4b2aC3b, que es la C5 convertasa de la VC, y si se une al C3bBbP da lugar al C3bBbPC3b, que es la C5 convertasa de la VA. Además de la participación del C3 en el mecanismo efector del C', que conlleva la lisis de microorganismos, el C3b es una importante opsonina que, al unirse a IC o a la superficie celular, participa en el aclaramiento de estas sustancias al interactuar con el receptor CR1 de las células fagocíticas. Posteriormente, el C3b unido a la superficie celular puede dar lugar a distintos productos de degradación, que sirven como biomarcadores en la caracterización de enfermedades de desregulación del C', o participar en otras funciones, como la activación de linfocitos B cuando el fragmento C3d (88 kDa) se une al receptor CR2 de estas células.

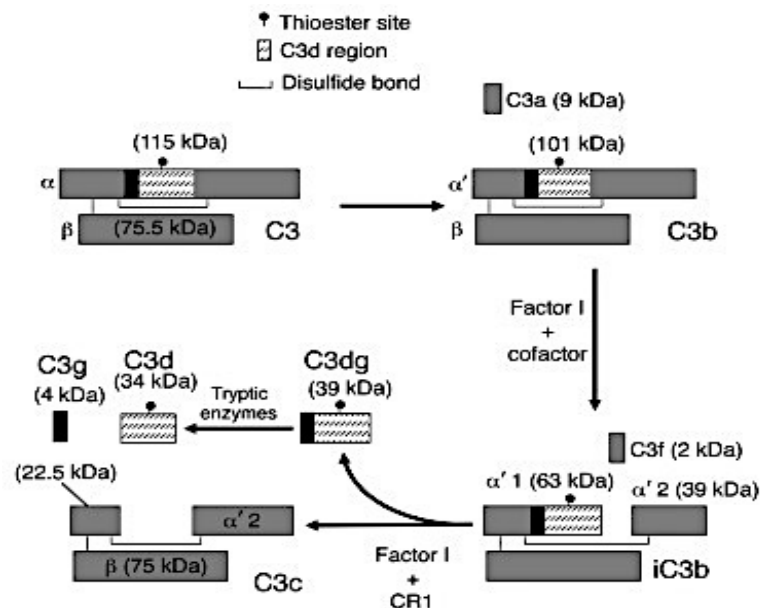


Figura 1.6. Degradación del componente C3. El fi escinde el fragmento C3b originando el fragmento iC3b, que permanece unido a la superficie celular, y el fragmento soluble C3f. De nuevo, el fi vuelve a actuar sobre el iC3b y libera el fragmento C3c soluble y el fragmento C3dg, que permanece unido a la membrana. Este fragmento será degradado por diversas proteasas séricas en fragmentos menores, entre ellos, el C3d. Adaptado de [47].

1.1.4. La vía lítica

La adición del fragmento C3b a las C3 convertasas de la VC y la VA genera las C5 convertasas (C4b2aC3b y C3bBbPC3b), que actúan sobre C5 y lo escinden en dos fragmentos C5b y C5a. El C5a, al igual que el C4a y el C3a, se libera al medio como anafilotoxina, y activa fundamentalmente mastocitos, basófilos y neutrófilos, induciendo la liberación de mediadores inflamatorios, como la histamina, que producen un aumento de la permeabilidad vascular. El C5a es 2.500 veces más potente que el C4a y 20 veces más que el C3a, es la anafilotoxina más potente que existe, y debido al daño potencial que puede inducir en las células del organismo existe en el suero una carboxipeptidasa que elimina el residuo de Arginina en el extremo C-terminal del C5a creando las formas desarginadas. Estas retienen las propiedades quimiotácticas, pero pierden la actividad biológica. En presencia de esta anafilotoxina, los macrófagos y los neutrófilos aumentan la expresión de receptores del complemento en su superficie, lo que conlleva un aumento en la secreción de interleuquinas IL-1 e IL-6. Estas citoquinas

pueden estimular la proliferación de células T activadas y así, de una forma indirecta, el C5a interviene en la respuesta inmune adaptativa[40].

El C5b queda anclado a la superficie celular y permite la unión secuencial de C6 y C7 para formar el complejo C5b67, que se inserta en la membrana plasmática permitiendo la unión del componente C8, formándose así el complejo C5b678, que adquiere capacidad citolítica gracias a que C8 modifica su configuración espacial para ofrecer zonas hidrofóbicas que facilitan su inserción en la membrana. Finalmente, el C9 polimeriza en la parte de unión de C5b-8 dando lugar al complejo de ataque a la membrana (MAC) (figura 1.7), el cual forma poros en la membrana originando la lisis osmótica celular.

El componente C9 presenta homología estructural con la perforina, proteína liberada por los linfocitos T citotóxicos y las células NK y que es, asimismo, responsable de la formación de poros en la membrana de las células diana.

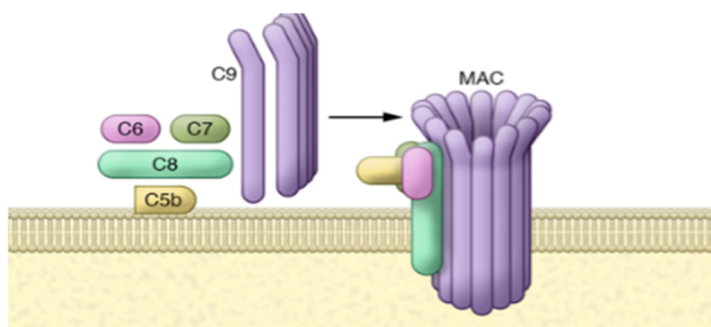


Figura 1.7. Formación del MAC. Tras la hidrólisis del componente C5 se origina el fragmento C5a, una potente anafilotoxina que se libera al suero, y el fragmento C5b que se deposita sobre la superficie celular, al cual se unirán el resto de componentes C6, C7, C8 y C9 para formar el MAC, que producirá la lisis celular. Adaptado de [2].

A continuación, a modo de, resumen en la figura 1.8 se presentan las tres vías de activación principales del C' y sus interrelaciones.

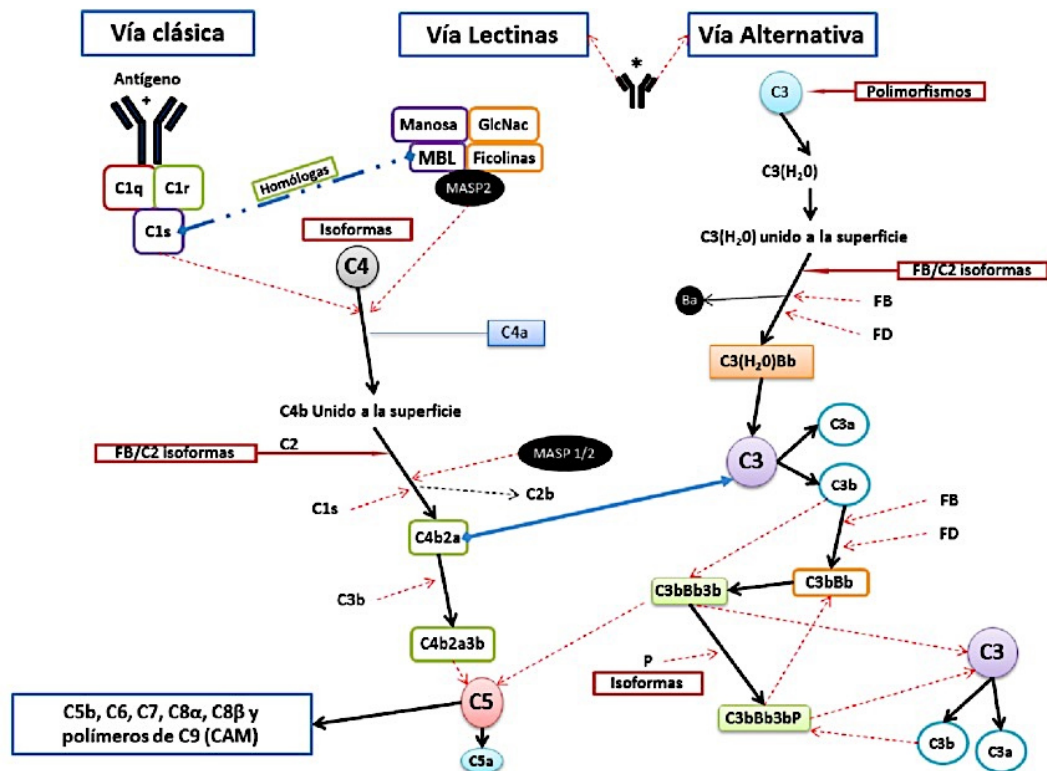


Figura 1.8. Activación de las vías del complemento. La VC, por depósito de IC. La VL por la MBL, ficolinas y restos de azúcares de la superficie de microorganismos y la VA, por hidrólisis espontánea del componente C3. Inicio de la vía lítica a través de las C5 convertasas originadas por la VC y la VA y formación del MAC con actividad citolítica. Adaptado de www.researchgate.net/figure/262545540. Esquemas de las vías de activación del complemento.

1.1.5. Regulación del Sistema del Complemento

La activación de la cascada del complemento se encuentra finamente regulada. Estos mecanismos de regulación están destinados, principalmente, a preservar la acción lítica del C' sobre las células del huésped. Por ello, en este sentido, la mayoría de los componentes no se encuentran en el suero de forma activada, sino en forma de zimógeno. Otros como el C3b, son muy lábiles en solución, y se inactivan por hidrólisis rápidamente. Pero, además, cada vía de activación del C' tiene sus propios elementos de regulación (figura 1.9). Son reguladores fisiológicos, tanto de fase soluble, como de membrana.

Reguladores de la VC

- El inhibidor de C1 (C1-INH) es un miembro de la familia de serinas, también conocido como *SERPINE1* [1], que actúa controlando la activación inespecífica de C1; se une a C1r y C1s y los disocia de C1q, inhibiendo la activación de la VC. También puede inhibir las proteínas MASP-1 y MASP-2, pero no la actividad de MASP-3, controlando la activación de la VL [28]. Inhibe además la calicreína, la plasmina y ciertos factores de la coagulación, como el factor XIa y el factor de Hageman (XIIa)[1].
- El proteoglicano condroitín-4-sulfato y el grupo hemo derivado de la hemólisis pueden unirse a C1q e inhibir la activación de la VC. El mecanismo de acción del hemo, así como de otros inhibidores del C1q, se basa en la unión a la cabeza globular del componente C1q[48].
- La calreticulina, liberada durante la muerte celular, también puede actuar como un inhibidor del C1q [28].

Reguladores de la VL

- Las proteínas MASP-3, MAP44 y MAP19 son capaces de unirse a la MBL y a ficolinas y competir con las proteínas MASP-1 y MASP-2, pero sin capacidad proteolítica sobre los componentes C2 y C4.

Reguladores de la VA

- El fH es el regulador principal de la VA. Funciona como cofactor para la escisión mediada por el fI y la inactivación de C3b a iC3b. Inhibe la actividad de la C3 convertasa, disociando el complejo C3bBb formado en la superficie celular.
- El fI controla la activación de la VA. Es una serín-proteasa que requiere la presencia de varios cofactores como el fH, proteína cofactor de membrana (MCP) y el receptor del complemento CR1, para escindir el fragmento C3b en 1) iC3b, producto de degradación de C3b que no puede unirse eficazmente al fB [28]. 2) C3c que se libera al suero y 3) C3dg, que permanece anclado a la

superficie celular. También participa en la proteólisis del componente C4 con ayuda del cofactor C4BP (proteína de unión a C4)[28].

- La C4BP es una glicoproteína plasmática implicada en la regulación de la VC y la VL. Acelera la disociación de la C3 convertasa. Actúa como un cofactor del fl en la escisión de los fragmentos C3b y C4b. La degradación del fragmento C4b genera los productos inactivos C4c y C4d [28].
- El receptor del complemento CR1 o CD35 es una glicoproteína de membrana con afinidad por los componentes C3b, iC3b y C4b. Actúa como cofactor único del fl, induciendo una escisión adicional de iC3b para generar los fragmentos de degradación C3c y C3dg.
- La MCP o CD46 actúa como cofactor del fl e interviene en la escisión del fragmento C3b.

Reguladores de la Vía Lítica

- La proteína S o vitronectina forma el complejo SC5b67 que no puede insertarse en la bicapa lipídica, impidiendo así la formación del MAC.
- La proteína Sp40 o clusterina tiene una acción similar a la proteína S. También se llama CLI (*complement lysis inhibitor*).
- El inhibidor de anafilatoxina es una carboxipeptidasa soluble que inactiva a los productos C4a, C3a y C5a eliminando el residuo arginina N-terminal y limitando su actividad.
- El factor de aceleración de la degradación (DAF) o CD55 es un inhibidor intrínseco que favorece la disociación de la C3 y C5 convertasas ancladas a la membrana.
- La protectina o CD59 es una proteína anclada a la membrana que inhibe la inserción y polimerización de C9, evitando la formación de poros en la membrana.
- El factor de restricción homóloga (HRF) es una proteína de membrana que inhibe la inserción de los componentes C8 y C9 en las membranas celulares.

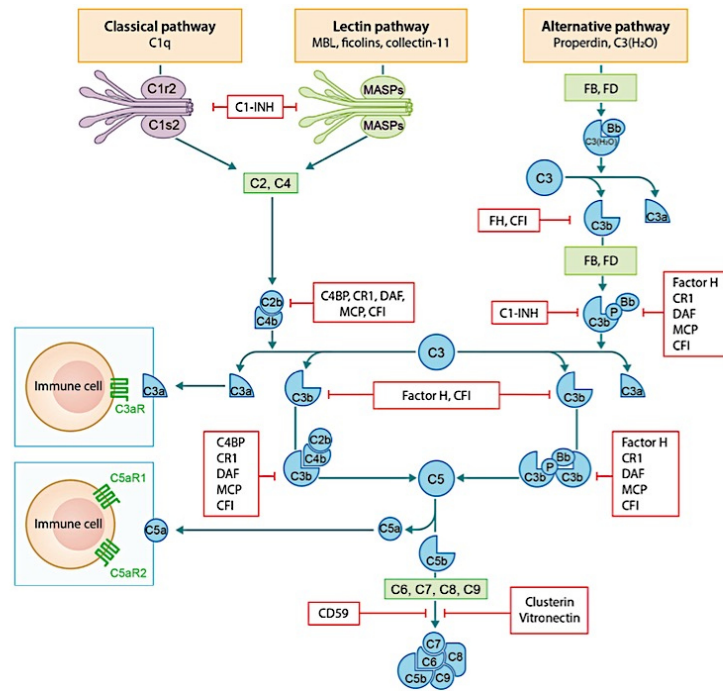


Figura 1.9. Proteínas reguladoras del complemento. Inhibidores fisiológicos que evitan la activación no deseada del C': C1-INH, MASPs, fH, fI, C4BP, proteína S, clusterina y componentes de membrana que bloquean la actividad efectora del C': CR1, MCP, DAF, CD59. Adaptado de [16].

1.2. Enfermedades relacionadas con la desregulación del Sistema del Complemento

La actividad anormal del C' se asocia con un gran número de enfermedades (figura 1.10) autoinmunes, trombóticas, relacionadas con la edad avanzada, infecciones, inflamación y cáncer, entre ellas destacan el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa), las glomerulopatías C3 (C3G), la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) o la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

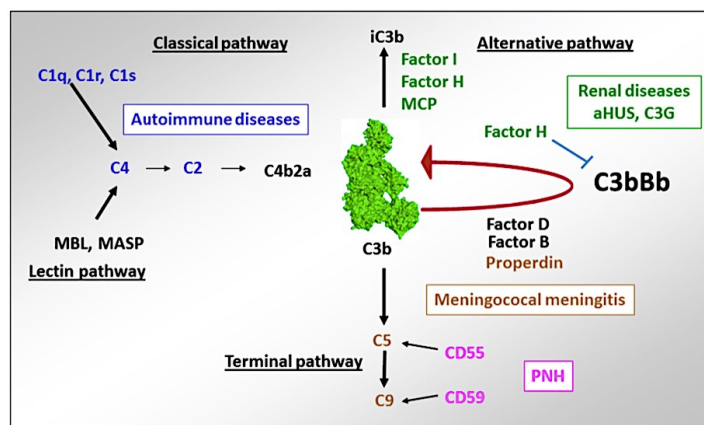


Figura 1.10. Principales enfermedades relacionadas con la desregulación del complemento. Las enfermedades autoinmunes, como LES, se relacionan con alteraciones en la VC, mientras que infecciones por bacterias capsuladas, el SUHa y las C3G se relacionan con alteraciones en componentes de la VA. Adaptado de [29].

1.2.1. Deficiencias en factores del complemento

Las enfermedades asociadas a deficiencias de alguno de los componentes de C' pueden ser primarias (hereditarias) o secundarias (adquiridas). La mayoría de las deficiencias se transmiten de forma autosómica recesiva, con excepción de la deficiencia en C1-INH, fB o MCP, que lo hacen de forma autosómica dominante, y la deficiencia en P, que va ligada al cromosoma X.

La expresión clínica de las deficiencias del C' es muy variable. Los pacientes con deficiencias genéticas de alguno de los componentes del C' presentan mayor susceptibilidad a infecciones, enfermedades reumáticas, angioedema o pueden

permanecer asintomáticos. A continuación, se describen las patologías más prevalentes en la población por deficiencias en factores del C':

Deficiencia en C1, C2 y C4

La deficiencia de factores que intervienen en la activación de la VC, como C1q, C1r, C1s, C2 y C4, está fuertemente asociada a manifestaciones autoinmunes e infecciones sistémicas. El LES es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por síntomas que van desde erupciones en la piel, fatiga crónica y artritis a la glomerulonefritis, serositis y afectación neurológica graves[29]. Puede ser debido a deficiencias cuantitativas (ausencia de C1q) o anormalidades funcionales (falta de C1r, C1s, C2 y C4) que conllevan a una activación ineficaz y a una alteración en el aclaramiento de células apoptóticas. El LES se asocia también a la presencia de Ac anti-C1q o complejos inmunes activadores del complemento en la circulación y en los glomérulos renales[29].

Deficiencia en C3

Los sujetos con deficiencia en el componente C3 presentan infecciones recurrentes por bacterias capsuladas (neumococo, *H. influenzae* y meningococo), neumonía, bacteriemia, meningitis y osteomielitis, debido a una disminución o ausencia de actividades de opsonización y quimiotaxis. Estos sujetos padecen con frecuencia enfermedades causadas por depósitos de IC, entre las que se encuentran el LES y la glomerulonefritis.

Deficiencia en C5, C6, C7, C8 y C9

Las deficiencias en los factores que conforman el MAC (C5, C6, C7, C8 y C9) conllevan una actividad lítica del suero defectuosa y se asocian con infecciones sistémicas recurrentes causadas por bacterias Gram negativas, como neisserias. El principal mecanismo de patogenicidad de estos gérmenes es la presencia de un polisacárido capsular que impide la fagocitosis y favorece su diseminación e invasión celular.

1.2.2. Hiperactivación en el Sistema del Complemento

Angioedema por deficiencia del inhibidor C1

La deficiencia del inhibidor del primer componente del C', el C1-INH, puede ser causada por un defecto genético (angioedema hereditario) con deficiencia en el C1-INH o por un consumo elevado (angioedema adquirido). La forma prevalente en la población es el angioedema hereditario, que se transmite de forma autosómica dominante, mientras que hasta en un 25% puede tratarse de una mutación espontánea [1, 22]. El angioedema hereditario sin deficiencia en C1-INH es una nueva variante del angioedema que cursa con valores normales de este regulador y se asocia con altos niveles de estrógenos (por ejemplo, durante el embarazo). Estudios recientes demuestran como posible causa de esta enfermedad una mutación del factor XII de la coagulación [22]. En el angioedema hereditario los niveles de C1-INH están disminuidos, mientras que en el angioedema adquirido los niveles en plasma del componente C1-INH son normales, o incluso pueden estar aumentados.

El C1-INH regula las vías de activación clásica y de las lectinas a nivel del C1r, C1s, MASP-1 y 2, la cascada de la coagulación, inhibiendo la activación de los factores XII y XI, y el sistema de contacto mediado por la calicreína, responsable de la generación de bradicinina a partir del cininógeno (figura 1.11). El principal mediador responsable de la generación del angioedema es la bradicinina.

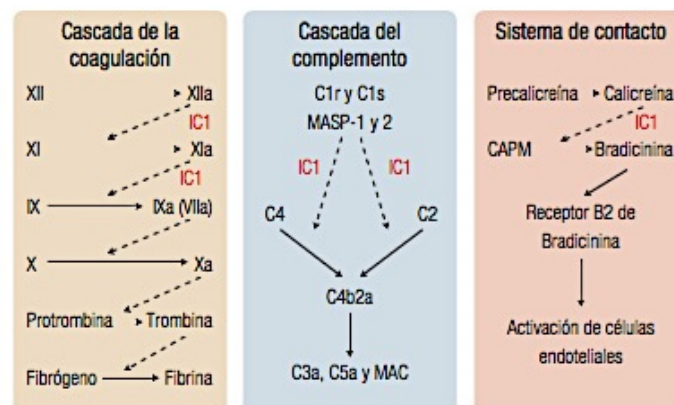


Figura 1.11. Sitios de actuación del C1-INH: en la cascada de la coagulación, en la cascada del complemento y en el sistema de contacto [50].

Se caracteriza por un edema recurrente severo del tejido subcutáneo y de la mucosa [22, 23] que puede afectar a cualquier parte del cuerpo; extremidades inferiores y superiores, el aparato digestivo, la cara y la vía respiratoria. Los avances recientes en el tratamiento del angioedema hereditario incluyen nuevas técnicas utilizadas para aislar y purificar el C1-INH derivado de humanos (Berinert® y Cinryze®), la producción de una forma recombinante de C1-INH, conestat alfa (Ruconest®) y el desarrollo de fármacos que se dirigen a la vía de calicreína-cinina, bien disminuyendo los niveles de bradisinina (ecallantide, Kalbitor®) o bloqueando de forma competitiva el receptor de la bradisinina de tipo 2 (B2) (icatibant, Firazyr®) [22, 23].

Hemoglobinuria paroxística nocturna

La Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un tipo de anemia hereditaria causada por una mutación genética en el gen *PIGA*, localizado en el cromosoma X, que codifica para la molécula de anclaje glucosil-fosfatidil-inositol, necesaria para que numerosas proteínas de membrana se fijen a la superficie celular. Dentro de estas proteínas se encuentran el DAF (CD55) y el CD59, ambos inhibidores fisiológicos de la activación del C'. Como consecuencia de este déficit, los hematíes son más sensibles a la acción lítica del complemento. Clínicamente se caracteriza por una hemólisis intravascular y por una producción medular disminuida de leucocitos y plaquetas, lo que provoca una aplasia medular.

El eculizumab es un anticuerpo monoclonal (AcM) humanizado que se une específicamente a la proteína del complemento C5 con gran afinidad, con lo que inhibe su escisión en C5a y C5b e impide la generación del complejo C5b-C9 de la cascada terminal. Está indicado en el tratamiento de pacientes con HPN.

Síndrome urémico hemolítico atípico

El Síndrome urémico hemolítico atípico (SHUa) es una microangiopatía trombótica renal caracterizada por hemólisis mecánica, trombocitopenia y daño en las células del endotelio vascular del glomérulo renal, que conduce a la formación de microtrombos. Es una enfermedad sistémica rara que afecta principalmente a los riñones, pero en un 20% de los pacientes se producen manifestaciones extrarrenales, afectando a otros

órganos como el cerebro, el corazón, los pulmones, el tracto gastrointestinal, el páncreas y la piel. Las anomalías adquiridas y genéticas de la regulación del C' se observan en aproximadamente el 70% de los pacientes [11]. Se han identificado mutaciones y polimorfismos en los genes que codifican ciertas proteínas que se relacionan con la desregulación de la VA (figura 1.12). Así, mutaciones en el fH, la MCP, el fI y la trombomodulina se relacionan con una disminución en la actividad de proteínas reguladoras. Y mutaciones en el fB y en el componente C3 se asocian a una actividad elevada de las C3 convertasas[8]. Este exceso de actividad del C' induce a la formación y depósito de C5b-9 en la superficie celular provocando daño en el endotelio glomerular.

Además de las mutaciones en los genes del complemento, se han identificado la presencia de auto-anticuerpos contra el fH. Los epítomos de unión de estos auto-anticuerpos están localizados en la región C-terminal y conducen a una deficiencia funcional del factor. Su papel en la patogénesis del SHUa no está completamente establecido, pero parecen asociarse con el inicio o las recurrencias de la enfermedad [8]. Debido a la fisiopatología de este síndrome, se ha postulado que la inhibición del C' es una opción terapéutica en estos pacientes.

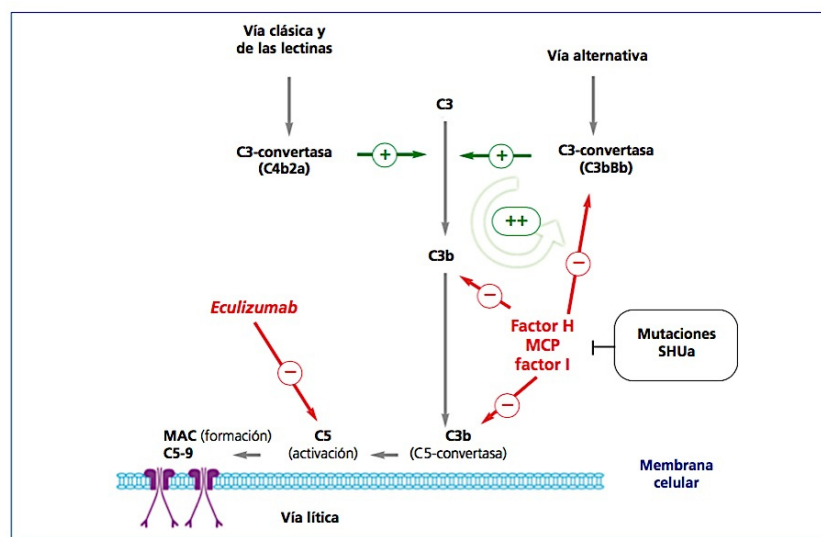


Figura 1.12. Desregulación del complemento en el SHUa. El exceso de actividad debido a mutaciones genéticas en los componentes reguladores de la VA, así como una hiperactividad de la C3 convertasa origina el depósito de C5b-C9 en la superficie celular causando las lesiones. El AcM eculizumab, cuya diana es el componente C5, inhibe el inicio de la vía lítica y la formación del MAC. Adaptado de [8].

El AcM eculizumab bloquea la activación del complemento terminal (figura 1.12), previene el daño orgánico mediado por el complemento y, actualmente, se recomienda como tratamiento de primera línea [11].

Glomerulopatías del componente C3

Las Glomerulopatías del componente C3 (C3G) son enfermedades renales crónicas raras, caracterizadas por depósitos del componente C3 en las células mesangiales y en la membrana basal del glomérulo renal. Se han descrito dos subtipos de C3G: enfermedad de depósito denso y glomerulonefritis del C3 [29]. La base fisiopatológica de la enfermedad se debe a una activación anormal de la VA del complemento, que conduce a una producción excesiva de C3 activo (C3b) y sus productos de degradación (iC3b y C3dg), que se depositan en el glomérulo.

Las causas de esta actividad incontrolada de la VA pueden ser debidas a mutaciones genéticas en las proteínas reguladoras del complemento (fH, fI y MCP) o a la presencia de auto-anticuerpos frente a la C3 convertasa.

Entre los auto-anticuerpos destaca el factor nefrítico (C3NeF), presente en más del 50% de los pacientes con C3G [29]. El C3NeF es un anticuerpo que se une a la C3 convertasa de la VA e impide su disociación espontánea, estabilizando su función. Se produce un consumo masivo de C3, impidiendo la acción de las proteínas reguladoras sobre la convertasa. Se han descrito otros auto-anticuerpos que actúan de manera similar al C3NeF, impidiendo la disociación de la C3 convertasa, son los Ac anti-fB y anti-C3b. El fH es una proteína soluble que ejerce su actividad reguladora sobre la VA inactivando C3b, favoreciendo la disociación de la C3 convertasa y evitando la formación del MAC sobre la superficie celular. Tanto la presencia de auto-anticuerpos anti-fH, que van dirigidos al extremo N-terminal de la molécula, como mutaciones en los genes que codifican al fH provocan una desregulación del componente C3 y una hiperactividad de la VA, desencadenando la enfermedad.

Degeneración macular asociada con la edad

La Degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a la retina. Es la principal causa de pérdida irreversible de la visión en

los ancianos [15]. Existen dos formas de DMAE avanzada: la neovascular y la atrofia geográfica.

En la patogénesis de la enfermedad, además de factores de riesgo genéticos y ambientales descritos, está implicado el C. Numerosos estudios han encontrado variantes genéticas que conducen a una desregulación de la VA, manteniéndola activada de forma incontrolada y generando la formación de depósitos inmunes que dañan las células epiteliales del pigmento de la retina, provocando así la pérdida de la visión.

Entre los genes implicados en la DMAE relacionados con el C' se encuentran los que codifican para: fI, fH, C3, C2, C9 y vitronectina.

Debido al papel central del C', la inhibición del complemento se ha considerado una opción terapéutica potencial y se han iniciado varios ensayos clínicos con AcM frente a los factores del complemento para investigar esta posibilidad [15] entre ellos destacan: eculizumab, avacincaptad pegol y tesidolumab, (AcM anti-C5), lampalizumab (AcM anti-fD), CLG561 (AcM anti-properdina) y POT4 (AcM anti-C3).

Los resultados muestran que el eculizumab no pareció ser efectivo, mientras que lampalizumab puede tener un efecto beneficioso en la reducción de la progresión de la DMAE[27].

1.2.3. Otras patologías asociadas

El cáncer y el Sistema del Complemento

Estudios recientes han demostrado que la activación del C' dentro del microambiente tumoral puede iniciar el crecimiento del tumor, promoviendo la inflamación crónica, induciendo la angiogénesis y activando las vías de señalización relacionadas con la progresión tumoral [2].

La sobre-expresión de proteínas reguladoras, productos de degradación del C3, y los productos de activación del complemento C5a, C3a y C5b-9 en las células tumorales,

estimulan su crecimiento a través de un efecto autocrino directo, mediado por C3aR y C5aR (receptores del complemento para los fragmentos C3a y C5a, respectivamente).

Otro posible mecanismo por el cual el C' estaría relacionado con el desarrollo de tumores es la presencia de unas proteínas en la membrana de la célula tumoral, con actividad serín-proteasa, que pueden escindir al componente C5 y generar C5a sin necesidad de la activación del C', y la expresión celular de C1q independiente de C4 en ciertos tumores como el melanoma, que favorece la progresión tumoral y la metástasis [2].

La inmunoterapia, basada en el desarrollo de AcM, se encuentra entre las estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer. Estos Ac terapéuticos inducen la muerte de la célula tumoral mediante mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de Ac, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento y apoptosis, potenciando tanto la inmunidad innata como la adquirida, específica para las células tumorales con la mínima toxicidad para las células sanas del huésped.

Penfigoide ampollosa

El penfigoide ampollosa (PA) es la enfermedad ampollosa autoinmune adquirida crónica que afecta con mayor frecuencia a los ancianos [16]. Clínicamente, los pacientes presentan lesiones ampollosas subepidérmicas y fragilidad capilar. La causa se debe a la unión de auto-anticuerpos de tipo IgG y el componente C3 al antígeno BP180 o colágeno tipo XVII, concretamente al dominio NC16A (no colagenoso 16), que es un segmento extracelular próximo a la membrana plasmática y el antígeno BP230 (figura 1.13), que están situados en los hemidesmosomas del queratinocito basal.

Técnicas como la inmunohistoquímica utilizando Ac frente a proteínas del C', han revelado la deposición específica de IgG y/o C3b a lo largo de la zona de la membrana basal. Asimismo, se han encontrado otros componentes y fragmentos de activación del C' como C1q, C3, C3c, C3d, C4, C4d, C5, C5b-9, fB, fH y P, tanto en la membrana basal como en el fluido de ampollas de pacientes con PA. Estos hallazgos indican la participación de la VC y la VA en la patogenia de esta enfermedad [16].

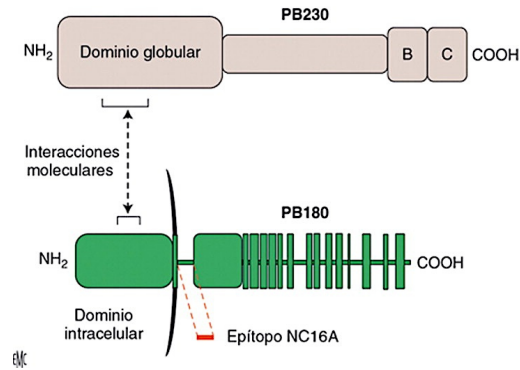


Figura 1.13. Localización del epítipo NC16A en el PA, que es reconocido por las IgG formando el IC que se deposita sobre la membrana basal de los queratinocitos en el PA. Adaptado de [37].

Complejo soluble C5b-C9

Los efectos biológicos y patológicos de la activación del C' están mediados por productos de activación [45] a través de fragmentos proteolíticos procedentes de la degradación de proteínas del complemento (C3, C4 y C5) o a través de la formación del complejo de ataque multimolecular (MAC), formado a partir de cinco proteínas (C5, C6, C7, C8 y C9) en la última fase de la activación de este sistema y que se une directamente a la membrana de las células diana provocando su lisis. En publicaciones recientes se describen aproximaciones sobre la estructura molecular no solo del MAC, sino también de su subproducto, el complejo del complemento terminal en fase fluida o también conocido como C5b-9 soluble (SC5b-9)[25, 39].

En individuos sanos el SC5b-9 se encuentra en baja concentración en el plasma y otros fluidos biológicos. Se ha observado que sus niveles aumentan notablemente durante la activación del complemento [31]. Ciertas enfermedades, tanto de naturaleza inmune como de base no inmunológica, cursan con niveles plasmáticos elevados de SC5b-9; esto ocurre en enfermedades autoinmunes como el LES, en enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, en ciertas infecciones y durante el *bypass* cardiopulmonar.

También se han encontrado niveles elevados en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide [31]. Recientemente se ha detectado la presencia de auto-anticuerpos contra neoantígenos de la proteína C9 en el plasma de algunos pacientes con enfermedades autoinmunes, infecciosas o neoplásicas, pero son necesarios más estudios para definir la utilidad de este marcador sérico en la evaluación de patologías asociadas a la desregulación del C'.

1.3. Desarrollo de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y tratamiento de patologías asociadas con alteraciones en el Sistema del Complemento

Desde hace años se conoce el papel del C' en la patogénesis de numerosas enfermedades inflamatorias, infecciosas y de etiología autoinmune, bien como agente desencadenante o contribuyendo a la amplificación de la enfermedad.

El desarrollo de AcM frente a los diferentes componentes y fragmentos activados del C' supone un avance para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con patologías relacionadas con alteraciones de este sistema.

Para el desarrollo de estos AcM es importante conocer qué vía de activación del C' está implicada en la patogénesis de la enfermedad, pudiendo así los Ac actuar como moléculas inmunomoduladoras y posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades. La figura 1.14 muestra una representación de las diferentes estrategias empleadas en la terapia anti-complemento y en qué fase de desarrollo se encuentran actualmente [9]

Ejemplos de moléculas que se encuentran en fase de investigación incluyen el NT009, un AcM que bloquea el componente C1s, una de las enzimas específicas implicadas en el inicio de la activación de la VC y que se ha probado como diana para el tratamiento de enfermedades como el PA y la crioglobulinemia. Otro ejemplo, es el AcM PRO-02 contra el componente C2 y el ANX005 contra C1q.

Entre los AcM en desarrollo y relacionados con la VL destacan el OMS721 y el OMS906 dirigidos contra las proteínas MASP-2, para el tratamiento de la microangiopatía trombótica.

Novelmed ha desarrollado anticuerpos contra fB (bikaciomab) y contra P (NM9401), que se encuentran aún en fases preclínicas, relacionados con la actividad de la VA del C'.

El componente C5 es una de las proteínas del C' para la cual se ha investigado más. En el año 2007 se comercializó un AcM anti C5, Soliris®, que inhibe selectivamente la activación de C5 y la formación del MAC, y que está aprobado por las agencias reguladoras para el tratamiento de la HPN y el SHUa. Actualmente se está investigando el ALXN1210, una versión del fármaco original diseñado para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, ampliando el intervalo de dosificación y previniendo su acumulación. Numerosas moléculas frente al factor C5 se encuentran en desarrollo clínico, como: LFG316, CLG561, ALXN5500 o la Mubodina que es un anticuerpo contra C5 para el tratamiento del SUHa [9]. También se están desarrollando AcM contra el componente C6, el Regenemab y el SKY59 frente al MAC.

El lampalizumab es la fracción Fab de unión al antígeno dirigido específicamente al fD. Siendo la primera terapia que muestra eficacia significativa frenando la progresión de la DMAE [27].

Una alternativa para abordar el tratamiento de enfermedades basadas en un exceso de activación del C' es el desarrollo de moléculas inhibitoras de su activación, de igual modo a cómo actúan los inhibidores endógenos como el C1-INH. Así, se han comercializado el Cinryze®, el Berinert® y el Ruconest®, todos ellos inhibidores del componente C1[22].

La terapia con AcM frente a las etapas iniciales de activación del C', antes de la formación del C3b, conlleva más riesgo de sufrir infecciones al inhibirse entonces la opsonización de microorganismos por este componente. El bloqueo de la vía terminal y la formación del MAC se asocia a un mayor riesgo de infección por bacterias Gram negativas. Una de las estrategias para mitigar este hecho es el uso de antibióticos profilácticos y la vacunación de los pacientes [3].

Como estrategia alternativa a la terapia inespecífica con AcM se han desarrollado fragmentos de proteínas o AcM con afinidad sólo por componentes de la cascada del C' activado. Estos componentes o fragmentos activados se encuentran en mayor concentración en los lugares dónde se desencadena la enfermedad y están covalentemente unidos a las superficies celulares antigénicas [9]. La generación de agentes terapéuticos que se dirigen específicamente al sitio dónde se está activando la cascada de complemento permite una terapia selectiva y evita administrar dosis altas y los efectos adversos derivados de la terapia sistémica con Ac. Esta estrategia de localización incluye también los dominios de unión de los receptores del complemento y de sus reguladores específicos [40]. Actualmente se encuentran en ensayo clínico diversas terapias basadas en AcM dirigidos a neoepítomos de proteínas activadas del complemento como el IFX-1, un Ac humanizado frente a la anafilotoxina C5a que no tiene ningún impacto sobre la formación de MAC [40]. A diferencia de muchos otros agentes que actúan frente a la proteína nativa C5, el IFX-1 sólo se une al producto activado C5a; impidiendo el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos T y, con ello, la respuesta celular inflamatoria. Hay varios estudios en fase II con esta molécula para el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, como la Hidradenitis Supurativa.

Otros fármacos que se dirigen a neoepítomos incluyen: 1) el H17, un AcM humanizado que se une específicamente al C3b activado y al fragmento inactivo iC3b, bloqueando el bucle de amplificación de la VA [9]. Este agente tiene aplicación clínica en enfermedades con disregulación de la VA como la C3G. 2) el AcM S77, obtenido por tecnología del ADN recombinante, se une al fragmento C3b, pero no al componente nativo C3, bloqueando su interacción con el fB y así la activación de la VA y 3) el agente TT30 es una molécula quimérica que comprende el dominio de unión al cociente iC3b/C3dg del CR2 o CD21 y los dominios funcionales del fH. Esta molécula ha demostrado un marcado beneficio terapéutico, inhibiendo de forma significativa el C' en varios modelos animales. Fue desarrollado por Alexion Pharmaceuticals y ya se ha probado en humanos con HPN [9].

Otro agente con unión selectiva frente a componentes activos del complemento es el AcM TNT020, que se dirige a un neoepítomo específico del componente C1s activado, aunque en la actualidad aún hay pocos datos disponibles.

Otra estrategia en desarrollo es el diseño de moléculas pequeñas biodisponibles por vía oral para inhibir el C' en humanos; esta estrategia representa un gran avance en el campo de la farmacología anti-complemento. Novartis ha desarrollado inhibidores de la fB por vía oral que se encuentran en desarrollo.

Las estrategias basadas en la tecnología de ADN recombinante se han empleado desde hace tiempo para generar formas solubles de proteínas reguladoras del C' como alternativa al desarrollo de moléculas que bloqueen directamente el C'.

El antagonismo de los receptores del complemento por moléculas pequeñas también se ha probado en humanos; como el inhibidor del receptor C5a (C5aR1), denominado avacopan o CCX168, que se encuentra en las últimas etapas del desarrollo clínico para el tratamiento de la vasculitis ANCA [9].

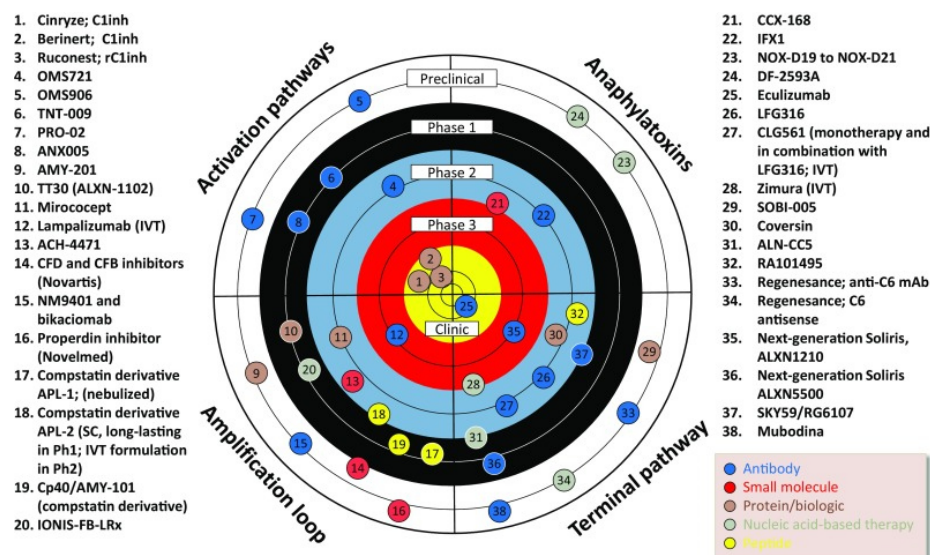


Figura 1.14. Representación esquemática de las diferentes estrategias empleadas en la terapia anti-complemento. Las dianas terapéuticas y la fase de desarrollo clínico en la que se encuentran basadas en AcM, proteínas solubles y moléculas recombinantes obtenidas por ingeniería genética. Adaptado de [9].

La utilización de ingeniería genética para modificar la biosíntesis de una determinada proteína, bien para prevenir la expresión de una proteína activadora o aumentar la expresión de una proteína inhibidora, podría ser una línea alternativa y novedosa para el tratamiento de patologías asociadas a alteraciones del complemento[19]. En este sentido, Ionis Pharmaceuticals ha desarrollado una serie de oligonucleótidos antisentido que regulan la traducción de proteínas del complemento, como el fB, para el tratamiento de la nefritis lúpica murina [9]. Sin embargo, todas las terapias que incluyen

el desarrollo de AcM con el reconocimiento de neoepítomos constituyen a día de hoy las terapias más prometedoras para el tratamiento de enfermedades asociadas a la desregulación del Sistema del Complemento.

1.4. Objetivos y planteamiento experimental

El trabajo realizado en esta tesis doctoral se encuadra dentro de la ejecución de dos Proyectos de Investigación: FIS (Desarrollo de Inmunoensayos para detectar y cuantificar la activación del sistema del complemento en pacientes con procesos inflamatorios, autoinmunes e infecciones recurrentes, PI3/01446) y Retos (Plataforma Integrada para el diagnóstico molecular de enfermedades relacionadas con el sistema del complemento, RTC-2016-46351). La ejecución de ambos proyectos y, por tanto, la del trabajo que aquí se presenta, estaban dirigidos a profundizar en el conocimiento del Sistema del Complemento Humano para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades asociadas a la desregulación de este sistema.

Como **objetivo global** se pretendía obtener y caracterizar AcM que permitieran el desarrollo de inmunoensayos con utilidad diagnóstica y, entre los AcM obtenidos, seleccionar aquellos cuyas características funcionales (afinidad intrínseca, especificidad epitópica, capacidad inhibitoria, etc) permitieran deducir que podían tener un potencial interés inmunomodulador y terapéutico en enfermedades inmunológicas y de naturaleza inflamatoria.

Para alcanzar el objetivo global se definieron los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Caracterizar los AcM ya obtenidos frente a los componentes del complemento humano C1q, C4, C3/iC3b/C3d, fB, P, fD, C5 y C9, para evaluar la funcionalidad del C'.

Objetivo 2: Obtener AcM frente al C5a, la anafilotoxina más potente generada e involucrada en enfermedades autoinmunes con base inflamatoria.

Objetivo 3: Desarrollar un ELISA para evaluar la activación conjunta por la VC, VL o VA del C' a través de la detección del complejo citolítico C5b-C9 (MAC).

Objetivo 4: Poner a punto un ELISA para la determinación del complejo SC5b-9, marcador de enfermedades relacionadas con la desregulación del C'.

Objetivo 5: Desarrollar aproximaciones diagnósticas y terapéuticas utilizando los AcM o los inmunoensayos establecidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

2.1.1. Animales

- Conejos New Zealand (animalario del ISCIII, Majadahonda)
- Ratones BALB/c (animalario del ISCIII, Majadahonda)
- Ratones DBA2 (Janvier Labs,)

2.1.2. Líneas celulares

- Línea celular de mieloma de ratón SP2/O-Ag14, ATCC (Middlesex, UK)

2.2. Productos y equipos

- Ácido etilenglicol bis (β -amino-etil éter) N', N', N', N' tetraacético (EGTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ácido etilendiamino N', N', N', N' tetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
- Albúmina sérica bovina (BSA), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Adyuvante completo Freund (ACF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Adyuvante incompleto Freund (AIF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Anticuerpo policlonal de cabra frente a inmunoglobulinas de ratón marcado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Anticuerpo policlonal de cabra frente a inmunoglobulinas de ratón marcado con Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)
- Antisuero policlonal de cabra monoespecífico para:
 - Las cadenas γ 1 de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
 - Las cadenas γ 2a de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)

- Las cadenas γ 2b de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Las cadenas γ 3 de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Las cadenas κ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Las cadenas λ de anticuerpos de ratón (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, NY, USA)
- Columnas HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia)
- DAPI (Life Technologies, Madrid).
- Diaminobencidina (DAB) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Estreptavidina marcada con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)
- Espectrofotómetro ANTHOS 2020 (Cultek S.L.U, Madrid)
- Espectrofotómetro SmartSpec™ Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Hemolisina (Serovet, Ávila)
- High Density Glyoxal 4 Rapid RUN™ (ABT, Madrid)
- Inmunoglobulina G Humana (OCTAGAM) (Octapharma S.A., Madrid)
- Inmunoglobulina M humana (Millipore Ibérica, Burgos)
- Lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhosa* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Mananos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Medio Clonacell HY (Stemcell, Grenoble, Francia)
- Medio RPMI 1640 (Lonza, Vervies, Bélgica)
- Microscopio confocal TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania)
- Membranas de Nitrocelulosa, (Amersham™ Protran™ 0,45 μ m NC (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia)
- O-fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Placas ELISA de 96 pocillos, Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca)
- Polietilenglicol, Hybri-max (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Proteínas purificadas del complemento: C1q, C4, C3d, fB , P, fD, C9 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
- Reactivos de SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ez-link-Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Scientific, Schaumburg, IL, USA)
- Tampón veronal (Serovet, Ávila)
- Tampón fosfato salino (PBS) (Lonza, Vervies, Bélgica)
- Zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.3. Obtención y preparación de reactivos biológicos

2.3.1. Sueros humanos

2.3.1.1. Suero Humano Normal

Los sueros humanos que denominamos normales (SHN) utilizados en este trabajo procedían de donantes sanos, sin alteraciones conocidas del sistema inmunitario y con los que habíamos realizado con antelación y en numerosas ocasiones distintos ensayos para analizar la funcionalidad del C'. La sangre de la que procedían se obtuvo por venopunción, tras la extracción en tubos vacutainer de 10 ml que contenían un activador de la coagulación. La sangre se dejó reposar para favorecer la formación del coágulo a temperatura ambiente durante 1 hora y, posteriormente, se separó el suero centrifugando a 1.200 x g durante 10 minutos. El suero obtenido, si no iba a ser utilizado en el momento, se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su uso.

2.3.1.2. Suero humano normal biotinilado

En ocasiones, previa utilización de los sueros, se procedió al marcaje de las proteínas séricas con biotina siguiendo el protocolo de Schuh et al., 1992 [42]. A una alícuota de 1 ml de suero suplementado con EDTA a una concentración final 5 mM, le añadimos 4,2 µmol de Sulfo-NHS-LC-Biotina. Para finalizar la reacción de incorporación de la biotina a las proteínas añadimos Tris-HCl a una concentración final de 10 mM, pH 7,5.

2.3.1.3. Seroteca

Para la puesta a punto de los inmunoensayos era necesario contar con un elevado número de sueros de distinta procedencia que representaran a la población general adulta. Para obtenerlos, se contactó con 191 trabajadores del ISCIII que actuaron como donantes, tras informarles sobre del proyecto y firmar el consentimiento correspondiente, según procedimiento con número CEI PI 47_2013_v2, aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Centro. A todos se les extrajo 10 ml de sangre por venopunción y se procesaron como se ha indicado para el SHN.

2.3.2. Proteínas del Complemento humano

- Las proteínas purificadas del complemento C1q, C4b, P, C3d, C9, fD y fH fueron adquiridas en Merck Millipore.
- Los componente C5, C5a , fB y C3, así como los fragmentos de su degradación (C3b, iC3b, fBb y fBa), fueron cedidos por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba del Grupo de Patología Molecular/Genética del Complemento del CIB, CSIC.

Cuando fue necesario se procedió al marcaje de estas proteínas, utilizando el EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina según las instrucciones del fabricante con modificaciones. En concreto, 100 µg de proteína purificada (a una concentración entre 0,5-1 mg/ml) se marcaron con Sulfo-NHS-LC-Biotina en una relación molar biotina: proteína 20:1. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas y, transcurrido ese tiempo, se paró añadiendo Tris-HCl a una concentración final de 10 mM.

2.3.3. Anticuerpos monoclonales frente a proteínas del complemento

Para llevar a cabo el presente trabajo debimos caracterizar, como describiremos más adelante, los AcM anteriormente obtenidos en el Servicio de Inmunología del ISCIII, frente a las proteínas del complemento: C1q, C4, P, fB, C3, fH, fD, C5 y C9.

Los AcM se obtuvieron a partir de los sobrenadantes procedentes del medio de cultivo de los hibridomas. En las tablas 2.1 y 2.2 se indican los AcM analizados.

En los ensayos que se describen en los apartados siguientes se utilizaron, bien el sobrenadante de cultivo, o bien los AcM purificados o marcados con biotina, como indicaremos en cada caso.

Tabla 2.1. AcM frente a las proteínas del complemento C1q, C4, P, fB y C3.

AcM anti-C1q	AcM anti-C4	AcM anti-P	AcM anti-fB	AcM anti-C3
SIM 194.13.2.1	SIM 192.4.2.1	SIM 246.12.6.3	SIM 212.6.4.5	SIM 27.4 .18.5
SIM 194.35.H.1	SIM 192.15.1.1	SIM 248.29.6.2	SIM 212.8.3.4	SIM 27.4.59.92
SIM 194.42.1.1	SIM 192.15.3.6	SIM 295.5.2.7	SIM 212.13.3.2	SIM 27.4. 73.57
SIM 194.43.5.2	SIM 192.15.7.6	SIM 295.5.3.8	SIM 212.19.4.1	SIM 27.4.83.23
	SIM 192.23.3.5	SIM 295.5.4.27	SIM 212.31.4.5	SIM 27.12.2.16
		SIM 295. 5.5.15		SIM 27. A49.1.53
		SIM 295.5.6.13		SIM 27.49.5.16
		SIM 295..9.3.4		SIM 27.93.39.20
				SIM 309.12.1.4
				SIM 309.12.1.7
				SIM 309.12.1.12
				SIM 320.6.2.1
				SIM 320.12.2.1
				SIM 320.12.2.2
				SIM 320.12.3.1
				SIM 320.12.3.3

Tabla 2.2. AcM frente a las proteínas del Complemento fH, fD, C5 y C9.

AcM anti -fH	AcM anti-fD	AcM anti-C5	AcM anti-C9
SIM 214.12.3.8	SIM 234.5.12.1	SIM 225.1.3.4	SIM 235.6.2.7
	SIM 238. 1.16.2	SIM 225.8.2.4	SIM 235.6.4.7
		SIM 225.9.2.4	SIM 235.6.5.2
		SIM 225.13.3.1	SIM 235.6.12.3
		SIM 225.16.3.3	SIM 235.35.16.6
		SIM 225.19.3.2	SIM 235.35.16.7
		SIM 225.20.10.2	SIM 235.35.16.11

Para obtener los sobrenadantes con el AcM se inició un cultivo con las células del hibridoma hasta que la viabilidad estaba alrededor del 20%. El sobrenadante se recogió tras centrifugación a 800 g x 10 minutos y se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para la purificación de los AcM se utilizaron columnas de afinidad de HiTrap™ Protein G HP siguiendo las instrucciones del fabricante. El sobrenadante de cultivo de los hibridomas, previamente filtrado, se pasó a través de la columna. Para eluir el AcM retenido se empleó como eluyente NH₄OH 1 N. Se recogieron fracciones de 0,5 ml, en

las que se midió a densidad óptica (D.O.) a 280 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus. Las fracciones que presentaban mayor D.O. se mezclaron y se dializaron frente a PBS. La concentración aproximada de AcM se determinó empleando como coeficiente de extinción porcentual 1,4 mg/ml. El AcM purificado se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

Cuando fue necesario marcar los AcM con biotina se tomó una alícuota de los mismos a una concentración de 1 mg/ml y se marcó Ez-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotina siguiendo las instrucciones del fabricante como acabamos de describir para las proteínas del C'.

2.4. Obtención de anticuerpos monoclonales frente a proteínas del Sistema del Complemento

Para alguno de los inmunoensayos que describimos fue necesaria la obtención de nuevos AcM, como frente a fB, C5 y C5a y para ello se siguieron protocolos previamente establecidos en nuestro laboratorio. Los ratones hiperinmunizados utilizados como donantes de esplenocitos para la obtención de AcM frente al C5 y C5a fueron de la cepa DBA2, ya que estos ratones son deficientes en este componente. Para obtener el AcM anti-fB se utilizaron ratones BALB/c. Los animales se inmunizaron por vía intraperitoneal con una primera dosis de Ag emulsionado con adyuvante completo de Freund (ACF). Posteriormente, a intervalos de un mínimo de 15 días se realizaron inmunizaciones con los Ags emulsionados en adyuvante incompleto de Freund (AIF). El ratón cuyo suero presentó un título mayor de reactividad por ELISAI frente al Ag de inmunización recibió una última dosis antigénica por vía intraperitoneal y se sacrificó a las 96 horas. Las células del bazo se fusionaron en presencia de polietilenglicol con la línea celular de mieloma de ratón SP2/O-Ag 14, según los métodos descritos por Galfré y Milstein y Goding [14, 17, 18]. Para identificar los hibridomas productores de Ac específicos se realizó un primer cribado por ELISAI frente a la proteína purificada y por ELISAc empleando la proteína o SHN marcados con biotina. Posteriormente, en algunas ocasiones, como en los Ac obtenidos frente al fB y C5, su reactividad se confirmó mediante CF con promastigotes de *Leishmania* opsonizados con SHN y mediante WB con las proteínas purificadas. Estos inmunoensayos se describen en el apartado siguiente, ya que metodológicamente son iguales que los empleados para la

caracterización de los AcM de la colección del Servicio de Inmunología. Los hibridomas obtenidos tras la fusión se clonaron dos veces en medio líquido por dilución límite, comprobándose que tras cada clonaje se mantenían las características por las que habían sido seleccionados.

2.5. Inmunoensayos empleados en la caracterización de anticuerpos monoclonales

Tanto en la caracterización los AcM que habían sido desarrollados en el Servicio de Inmunología frente las proteínas del C', como para la selección de los nuevos AcM que se obtuvieron en el marco de esta Tesis Doctoral, se emplearon 4 tipos de inmunoensayos: ELISAI, ELISAc, WB y CF.

2.5.1. ELISA indirecto

Se emplearon placas de 96 pocillos tapizadas con 50 µl de las proteínas purificadas diluidas en PBS a una concentración entre 1-10 µg/ml dependiendo del componente, durante 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C. Finalizada la incubación las placas se bloquearon con 75 µl de BSA al 2% durante media hora a 37°C y, a continuación, se lavaron tres veces con el tampón Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM pH 7,2 (PBS) suplementado con 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Posteriormente, se añadieron 50 µl del sobrenadante de cultivo de hibridomas durante 2 horas a 37°C. Cuando el fin del inmunoensayo era la determinación del título de reactividad de los AcM, se añadieron 50 µl de sobrenadante y se realizaron 12 diluciones seriadas (factor de dilución 1:3) en PBS suplementado con BSA 2% y PBS-T. Finalizada la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron 50 µl de Ac policlonal de cabra frente a IgG de ratón marcado con peroxidasa (HRP) a una dilución de 1:2.000 durante media hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T y se revelaron utilizando 100 µl de OPD disuelto en el tampón citrato-fosfato pH 4,89 a una concentración de 1 mg/ml y suplementado con H₂O₂ a una dilución de 1:1.000. Tras 5 minutos de incubación se paró la reacción añadiendo 50 µl H₂SO₄ 3 N y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro ANTHOS 2020.

2.5.2. ELISA de captura

Las placas de 96 pocillos se tapizaron con 50 µl de Ac policlonal de cabra frente a IgG de ratón diluido en PBS a una concentración de 3 µg/ml durante toda la noche a 4°C. A continuación, los pocillos se bloquearon con 75 µl de BSA al 2% durante media hora a 37°C y tras tres lavados con PBS-T se añadieron 50 µl del sobrenadante del cultivo de los hibridomas. Cuando el inmunoensayo no era de selección de hibridomas, sino de determinación del título de reactividad de los AcM, se realizaron diluciones seriadas de los distintos Ac en PBS-T y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Finalizada la incubación y tras retirar el exceso de Ac mediante tres lavados con PBS-T se añadió 50 µl de SHN marcado con biotina [4] diluido a 1:20 en PBS-T o de las proteínas del complemento purificadas marcadas con biotina. Tras incubar una hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces y se añadió 50 µl de estreptavidina marcada con HRP diluida a 1:2.000 en PBS-T durante media hora a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se produjo empleando como cromóforo OPD en las mismas condiciones que en el ELISAI.

2.5.3. Análisis por SDS-PAGE y Western blot

La electroforesis en geles SDS-PAGE se realizó siguiendo el protocolo descrito por Laemmli [36] *et al.* Se utilizaron geles de acrilamida/bisacrilamida al 7,5% para el fH, C4 y C5, al 10% para los factores C1q, C9, P, fB, C3, C3d y iC3b, y al 12% para el fD. Las proteínas purificadas se diluyeron en el tampón de carga (Tris-HCL 62,2 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 2 % SDS y 0,02 % de azul de bromofenol) a una concentración de 1 µg. En la electroforesis en condiciones reductoras el tampón de carga estaba suplementado con mercaptoetanol.

Tras la electroforesis, las proteínas se visualizaron mediante tinción azul de coomasie o mediante WB. Para la tinción del gel se empleó como colorante una solución de azul de coomasie R-250 a 0,1% en 40% metanol y 10% de ácido acético. Finalizado este proceso, para eliminar la tinción inespecífica, el gel se lavó tres veces con una solución de desteñido (40% metanol, 10% de ácido acético). En el caso del WB, finalizada la

electroforesis, las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche desnatada diluida al 5% en PBS durante 20 minutos, a temperatura ambiente en agitación, y tras un lavado con PBS-T se añadieron los sobrenadantes de los AcM y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Finalizada la incubación, la membrana se lavó tres veces con PBS-T para eliminar los restos de Ac y se incubó con el secundario frente a Igs de ratón marcado con HRP durante una hora. Tras dos lavados con PBS-T y uno con PBS se procedió al revelado del WB empleando como cromóforo DAB a una concentración 0,5 mg/ml suplementada con H₂O₂ a una dilución de 1:1.000. La reacción se paró añadiendo agua destilada.

2.5.4. Citometría de flujo

Como superficie activadora se utilizaron promastigotes de *Leishmania amazonensis*. 50 µl de una suspensión de promastigotes conteniendo 2x10⁸ células/ml se mezcló con 50 µl de SHN diluido con PBS al 50% y se incubaron diez minutos a 37°C; como control negativo se empleó SHN diluido al 50% en PBS-EDTA 10 mM, condiciones en las que no se produce activación del C'. La reacción se paró por dilución adicionando 1 ml de PBS que contenía paraformaldehído al 1% y, a continuación, los promastigotes se lavaron dos veces en PBS por sedimentación a 11.000 x g durante un minuto. Los parásitos opsonizados se incubaron con diferentes AcM durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, los promastigotes se lavaron con PBS y se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente con el Ac policlonal del cabra frente a Ig de ratón marcado con Alexa 488. La fluorescencia unida a los promastigotes se analizó en el citómetro de flujo.

2.6. Inmunoensayos desarrollados para la caracterización y cuantificación del Sistema del Complemento

2.6.1. ELISA de funcionalidad de las tres vías de activación del sistema del complemento: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas

El desarrollo del ELISA para medir la activación y funcionalidad de las tres vías de activación del complemento se realizó, con modificaciones, siguiendo el procedimiento descrito por Roos *et al.* [41]. Para el análisis de la activación de la VC se probaron como agentes activadores las IgM e IgG humanas en un rango de concentraciones de 10 µg/ml a 1 µg/ml diluidas en PBS. Para la activación de la VA se emplearon el Lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhosa* y *Escherichia coli* a una concentración de 30 µg/ml en PBS y zymosan a una concentración de 50 mg/ml diluido en tampón 0,1 M NaHCO₃/ Na₂CO₃ pH 10 y para la VL sólo se testó como agente activador los mananos a 100 µg/ml diluido en tampón 0,1 M NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 10.

Las placas de ELISA se tapizaron con 50 µl por separado de cada uno de los agentes activadores y con cada una de las concentraciones mencionadas durante dos horas a 37°C. A continuación, la placa se bloqueó con 75 µl BSA al 2% media hora a 37°C y tras tres lavados con PBS-T se añadió 50 µl una mezcla de SHN a las diluciones de 1:20, 1:50 y 1:100 en tampón veronal para la VC y la VL y 50 µl de una mezcla de SHN diluidos a 1:10 y 1:20 en tampón veronal suplementado con EGTA 10 mM y MgCl₂ 7 mM para la VA, ya que en presencia de EGTA solo es funcional esta vía. Los sueros se incubaron durante una hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la activación del C' se determinó midiendo la formación del complejo MAC con cada uno de los AcM anti-C5 (SIM 225.8.2.4, SIM 376.11.2.1 y SIM 376.85.1.1) y de los AcM anti-C9 (SIM 235.35.16.11, SIM 235.35.16.7 y SIM 235.36.2.7). Posteriormente, la placa se incubó durante una hora a 37°C y se lavaron de nuevo tres veces con PBS-T, se adicionó 50 µl del Ac secundario frente a Igs de ratón marcado con HRP diluido 1:2.000 en PBS-T durante media hora a temperatura ambiente. Tras cinco lavados, los pocillos se revelaron utilizando 100 µl de OPD disuelto en citrato-fosfato a una concentración 1 mg/mL y H₂O₂ a una dilución de 1:1.000. Tras 5 minutos de incubación la reacción se paró añadiendo 50 µl H₂SO₄ 3 N y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas ANTHOS 2020.

Para establecer las condiciones del ensayo utilizamos una mezcla de SHN que posteriormente, en la estandarización del mismo pasó a ser el control positivo; y como control negativo se empleó la misma mezcla de sueros suplementada con EDTA 10 mM, condiciones en las que se encuentra inhibida la activación del C' por las tres vías.

La validación del ensayo la llevamos a cabo en las condiciones finalmente establecidas con los 191 sueros de nuestra colección. En la figura 2.1 se muestra el diseño de la placa de ELISA donde se analiza la activación del complemento en 14 muestras de suero humano (M1-M14) tanto por VC, como VA como VL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M1	M1	M9	M9	M1	M1	M9	M9	M1	M1	M9	M9
B	M2	M2	M10	M10	M2	M2	M10	M10	M2	M2	M10	M10
C	M3	M3	M11	M11	M3	M3	M11	M11	M3	M3	M11	M11
D	M4	M4	M12	M12	M4	M4	M12	M12	M4	M4	M12	M12
E	M5	M5	M13	M13	M5	M5	M13	M13	M5	M5	M13	M13
F	M6	M6	M14	M14	M6	M6	M14	M14	M6	M6	M14	M14
G	M7	M7	C+	C+	M7	M7	C+	C+	M7	M7	C+	C+
H	M8	M8	C-	C-	M8	M8	C-	C-	M8	M8	C-	C-



Vía Clásica



Vía Alternativa



Vía de las Lectinas

Figura 2.1. Diseño de la placa de ELISA para analizar la activación del complemento por las tres vías.

Finalmente, nuestros resultados fueron contrastados con un equipo comercializado para el mismo fin denominado “Complement system Screen WIESLAB®”. En este ensayo se seleccionaron un total de 20 sueros que eran representativos del tipo de respuesta en nuestro ensayo.

Para el cálculo del porcentaje de actividad de cada vía se utilizó la fórmula indicada en el equipo comercial:

$$\% \text{ ACTIVIDAD} = \frac{[(\text{DO MUESTRA}) - (\text{DO Control-}) / (\text{DO Control+}) - (\text{DO Control-})]}{(\text{DO Control+}) - (\text{DO Control-})} * 100$$

Los sueros se dividieron en tres grupos en función del % de actividad: < 100%, entre el 100-200% y >200%.

2.6.2. ELISA de determinación del complejo C5b-9 soluble

2.6.2.1. Purificación del complejo C5b-9 soluble

Para la purificación del complejo SC5b-9, que posteriormente iba a ser utilizado como reactivo estándar, se utilizaron como inmunoabsorbentes, AcM frente a C5 y C9, los cuales se dializaron frente a tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM a pH 10 y, posteriormente, se conjugaron a una matriz de glioxal siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial que brevemente describimos a continuación:

Conjugación del AcM a una matriz de glioxal

Un mililitro de bolas de agarosa-glioxal se incuban con 9 ml de la solución de Ac purificado a una concentración de 1 mg/ml en un tampón 0,1 M NaHCO_3 pH 10, durante 4 horas en agitador orbital. Finalizado el tiempo de acoplamiento se añaden 10 mg de Na_3BO_3 y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, para eliminar el Na_3BO_3 que no ha reaccionado, se lava la matriz con 10 ml tampón 25 mM fosfato pH 7, 10 ml de agua destilada y un nuevo lavado con 10 ml de tampón fosfato, quedando así preparada la matriz para ser utilizada en la inmunoabsorción del SC5b-9.

Este complejo se purificó a partir de una mezcla de sueros en los que previamente se activó el C' por la VC y por la VA, siguiendo el protocolo descrito por Bergseth et al. [4]. Para la activación por la VC se emplearon agregados de IgG humana a una concentración de 1 mg/ml. Estos agregados se obtuvieron calentando una solución de IgG a 100 mg/ml a 63°C durante 15 minutos para nada más finalizar esta incubación enfriar la solución en hielo y así favorecer la precipitación. Para la activación de la VA se utilizó zymosan a 10 mg/ml. Sobre 20 ml de una mezcla de sueros se añadieron 200 µl de agregados de

IgG más 4 ml de zymosan (50 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 1 hora. El suero activado se centrifugó a 500 g x 5 minutos para eliminar los restos de zymosan, se filtró y se hizo pasar a través de una precolumna de IgG de ratón acoplada a la matriz de glioxal para eliminar todas aquellas proteínas que se pudiera unir inespecíficamente a la matriz. El filtrado de la precolumna se sometió a cromatografía de afinidad empleando la columna elaborada con el AcM anti-C5 (SIM 225.8.2.4). Tras un lavado exhaustivo, el Ag retenido en la columna se separó de la matriz empleando como eluyente NH₄OH 1 N. Esta mezcla de proteínas se dializó frente a PBS y se sometió a cromatografía de afinidad en la columna elaborada igual manera a la que acabamos de describir para el anti-C5, pero en este caso con el AcM anti-C9 (SIM 235.6.7.4). El eluido de esta segunda columna estaba constituido por el complejo SC5b-9 que, posteriormente, se utilizó para el desarrollo del ELISA de determinación del complejo soluble en suero. Las fracciones obtenidas del complejo SC5b-9 se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y, posteriormente, se realizó un WB revelando la presencia del complejo con el AcM anti-C5 (SIM 376.11.2.1) y AcM anti-C9 (SIM 235.6.6.1).

2.6.2.2. Desarrollo y puesta a punto del ELISA de determinación del complejo SC5b-9

Tras caracterizar el comportamiento en este inmunoensayo de todos los AcM anti-C5 y anti-C9 con los que contábamos se seleccionó como AcM de captura el anti-C5 SIM 225.8.2.4 y como Ac de revelado una mezcla de 2 AcM anti-C9 SIM 235.6.2.7 y SIM 235.6.6.1.

Para el desarrollo del ELISA, se tapizaron los pocillos con 50 µl de un Ac policlonal de cabra frente a IgG2a de ratón a una concentración de 3 µg/ml, el mismo isotipo que el AcM anti-C5 que íbamos a utilizar posteriormente. A continuación, se añadió 50 µl de sobrenadante del SIM 225.8.2.4 y se mantuvo durante 2 h a 37°C. Transcurrida la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadieron, por duplicado, los SHN a una dilución 1:10 en PBS-EDTA 10 mM y se incubaron durante 1 h a 37°C. Al finalizar la incubación los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, se adicionaron 50 µl la mezcla de los AcM SIM 235.6.2.7 Y SIM 235.6.6.1 marcados con biotina a una dilución 1:100 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Para el revelado se empleó

estreptavidina HRP a una dilución 1:2000 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como cromóforo se utilizó OPD disuelta en tampón citrato-fosfato a una concentración 1 mg/ml y H₂O₂ a una dilución de 1:1.000. Tras 5 minutos de incubación la reacción se paró añadiendo 50 µl H₂SO₄ 3 N y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas ANTHOS 2020.

Como control positivo se usó el SHN activado detallado en el apartado 2.5.2.1 del presente trabajo (8 diluciones seriadas desde 1:50 con factor de dilución ½) y para cuantificar la concentración de SC5b-9 que había en los sueros se empleó una curva patrón realizada con la preparación de SC5b-9 purificada previamente desde una concentración de 5 µg/ml en diluciones de 1:2.

2.6.3. Ensayos de inhibición de hemólisis con AcM frente a componentes del complemento

Se puede cuantificar la capacidad del suero para activar el complemento por la VC mediante la medida de lisis de eritrocitos de carnero o para activar el complemento por la VA mediante la medida de lisis de eritrocitos de conejo [34].

2.6.3.1. Preparación de los eritrocitos

Los eritrocitos de carnero fueron suministrados por la empresa Serovet. El sedimento de eritrocitos empaquetados se obtuvo de la sangre de carnero que se centrifugó a 800 x g 10 minutos. Los eritrocitos fueron lavados tres veces con tampón veronal y tras la última centrifugación se resuspendieron al 10% en el mismo tampón. Posteriormente, sensibilizamos los eritrocitos con hemolisina (Ac policlonal de conejo, mayoritariamente de isotipo IgM, frente a eritrocitos de carnero) a una concentración 1:200 incubándolos durante media hora a 37°C. La concentración de hemolisina empleada es la que recomienda el fabricante para la prueba de fijación de complemento. Tras la incubación, los eritrocitos se lavaron con tampón veronal dos veces por centrifugación a 800 x g durante 5 minutos y se procedió a realizar el ensayo de hemólisis.

Los eritrocitos de conejo procedían de animales del estabulario del Centro Nacional de Microbiología a los que se les extrajo 10 ml de sangre mediante punción en la arteria

auricular recogida en tubos que contenían como anticoagulante EDTA. Los eritrocitos se separaron de la sangre por centrifugación a 800 x g 10 minutos y posteriores lavados con tampón veronal suplementado con EGTA 10mM, MgCl₂ 7mM. Finalmente, se llevaron al 3% en el mismo tampón para su empleo en el ensayo de hemólisis.

2.6.3.2. Ensayo de hemólisis e inhibición

Para determinar la capacidad de los AcM frente a proteínas del complemento para inhibir de la activación del C' empleamos un ensayo de hemólisis, tanto por la VC, como por la VA. Previo a la hemólisis, se incubaron durante 30 minutos a 37°C 100 µl de SHN diluido a 1:50 con 100µl de los AcM purificados a una concentración de 0,5 mg/ml. Transcurrida la incubación se tomaron 50 µl de la mezcla y se depositaron en una microplaca de 96 pocillos con fondo curvo, sobre los cuales se añadieron 50 µl de eritrocitos de carnero sensibilizados, como acabamos de describir, diluidos al 3% en tampón veronal o 50 µl de eritrocitos de conejo al 3% y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, las placas se centrifugaron a 500 x g 1 minuto para sedimentar los eritrocitos que no habían sido lisados y se transfirieron 50 µl de sobrenadante a una placa de ELISA convencional para leer la D.O. en el lector ANTHOS 2020 a una longitud de onda de a 405 nm. Como control negativo de ensayo se empleó SHN suplementado con EDTA 10 mM. El 100% de hemólisis se determinó lisando 50µl de eritrocitos tanto de cordero como de conejo con 50 µl de agua.

Los resultados se expresan como *Porcentaje de Hemólisis* calculado como:

$$\% \text{ HEMÓLISIS} = [(DO \text{ MUESTRA}) - (DO \text{ Control-}) / (DO \text{ Hemólisis del agua}) - (DO \text{ Control-})] * 100$$

2.7. Inmunofluorescencia en cortes de tejido

2.7.1 Preparación de muestras

A partir de fragmentos de piel obtenidos de un sujeto control y de un paciente con PA, almacenados a -80°C, se obtuvieron cortes de 3 µm en un criostato a una temperatura entre -20°C y -15°C, se colocaron en portas y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

2.7.2 Inmunodetección

Las muestras se fijaron y permeabilizaron con metanol frío durante 3 minutos y, tras 3 lavados rápidos con PBS, se realizó un bloqueo con SBF al 5% en PBS durante 30 minutos. La incubación con los Ac primarios (tabla 2.3) diluidos en PBS con 2% de SBF se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora.

AcM	Proteína del complemento que reconoce
SIM 27.A.49	C3
SIM 235.6.2.7	C9
SIM 225.3.2.1	C5
SIM 378.16.1.1	C5a
SIM 194.13.2.1	C1q
SIM 307.28.4.2	fB
SIM 246.1.1.1	P

Tabla 2.3. AcM utilizados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia

A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 hora en oscuridad, con un Ac secundario anti IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488® (dilución 1:1.000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5.000). Después de tres lavados de 10 minutos con PBS, se añadió medio de montaje, se colocó el cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas. La visualización del marcaje se realizó en un microscopio confocal.



Resultados y discusión

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón frente a los componentes del complemento humano.

Los ensayos que se describen a continuación estaban orientados a seleccionar de entre los AcM de la colección disponible en el laboratorio el mejor por: ELISAc, ELISAi, WB, y CF. Ello permitiría la puesta a punto de ensayos con potencial utilidad diagnóstica y terapéutica que se describirán en los siguientes apartados. Si en algún caso los AcM disponibles no eran adecuados para alguna de las técnicas, se procedió a la obtención de nuevos AcM durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

3.1.1 Caracterización por ELISA de captura y ELISA indirecto

3.1.1.1 Componentes de la vía clásica

3.1.1.1.1 Componente C1q

Se analizó la reactividad de 6 AcM frente al componente C1q. Para la selección de los anticuerpos se llevaron a cabo ensayos a dilución límite, teniendo en cuenta para su selección, tanto la dilución máxima de reconocimiento del AcM por su Ag, como la intensidad de la interacción. En la figura 3.1 se muestra las reactividades de los AcM por ELISAc (●) y por ELISAi (●) a la dilución 1:2.187, dilución a la que era más sencillo el análisis de las diferencias de reactividad entre los distintos AcM. Como se puede observar, los dos AcM que presentaban mayor reactividad fueron el SIM 194.43.5.2 por ELISAc (nº 6 en la figura) y el SIM 194.35.4.1 por ELISAi (nº 4 en la figura).

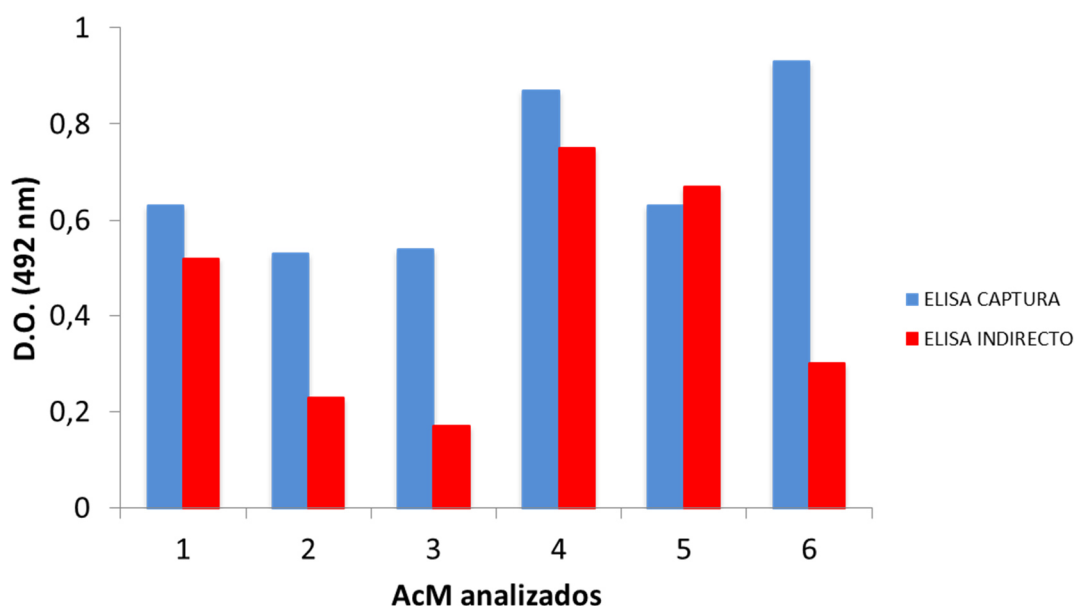


Figura 3.1. Reactividad frente al componente C1q a una dilución 1:2.187 por ELISAc (●) y por ELISAi (●) de los AcM: 1) SIM 194.13.2.1, 2) SIM 194.33.4.1, 3) SIM 194.35.2.1, 4) SIM 194.35.4.1, 5) SIM 194.42.1.1 y 6) SIM 194.43.5.2.

Aunque el ensayo cinético de diluciones seriadas se realizó con los 6 AcM, a modo de ejemplo en la figura 3.2, mostramos el perfil de reactividad en ELISAc y en ELISAi para cada uno de los AcM seleccionados. El AcM SIM 194.43.5.2 presenta una reactividad alta hasta la dilución 1:81, a partir de la cual comienza a disminuir, presentando la típica forma sigmoidea característica de la cinética de unión Ag-Ac. Con el SIM 194.35.4.1 por ELISAi observamos hasta la dilución 1:243 un efecto prozona, fenómeno que se pone de manifiesto en aquellos ensayos cinéticos en los que uno de los reactivos está muy en exceso. En nuestro caso, solo a partir de la dilución 1:243 se establecían las condiciones adecuadas de interacción Ag-Ac. Aunque era más evidente en el caso del ELISAi, en cursos cinéticos de ambos inmunoensayos observamos pendientes muy pronunciadas, en dos títulos la reactividad disminuye tanto que la presencia de AcM unido al Ag es indetectable recordando este perfil al descrito para Ac de alta afinidad por el Ag [18].

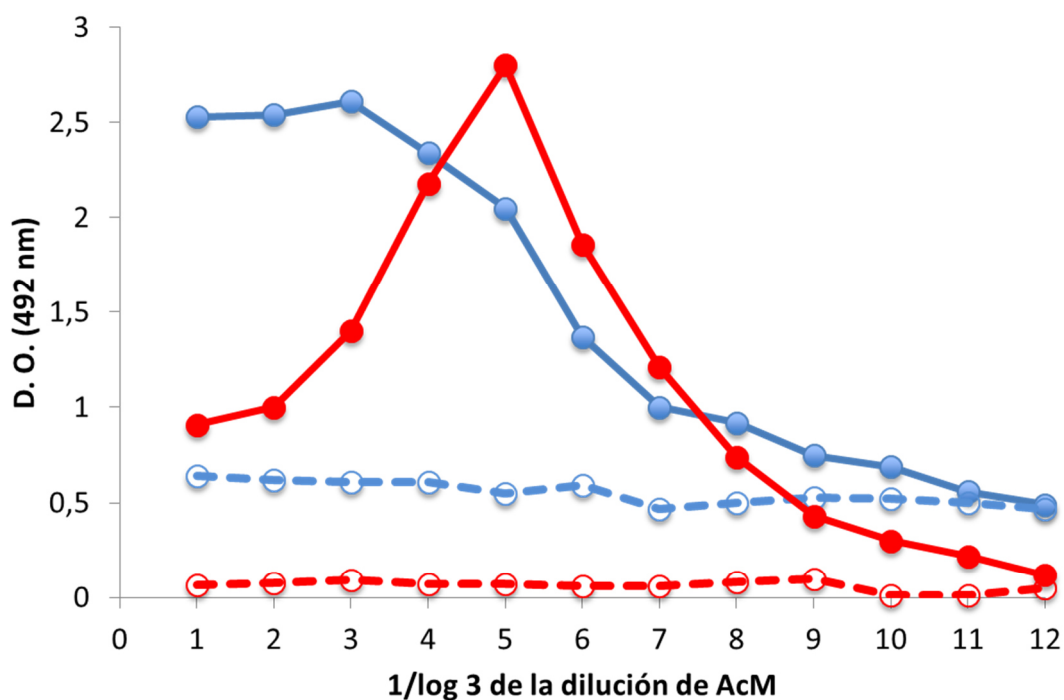


Figura 3.2. Cinética de unión del AcM al componente C1q. ELISAc (●) SIM 194.43.5.2 y ELISAi (●) SIM 194.35.4.1. Línea discontinua (○) y (○) control negativo.

3.1.1.1.2. Componente C4

En la figura 3.3 se muestran las reactividades de los 6 AcM analizados frente al componente C4 por ELISAc (●) y por ELISAi (●). La dilución seleccionada en este caso fue 1:81, por ser a esta dilución donde se observaban mejor las diferencias de reactividad de los distintos AcM. El AcM SIM 192.4.2.1 (nº 1 en la figura) fue el seleccionado para utilizarse en inmunoensayos de captura de Ag y el AcM SIM 192.5.6.3 (nº 3 en la figura) para la detección de Ag tipo ELISAi.

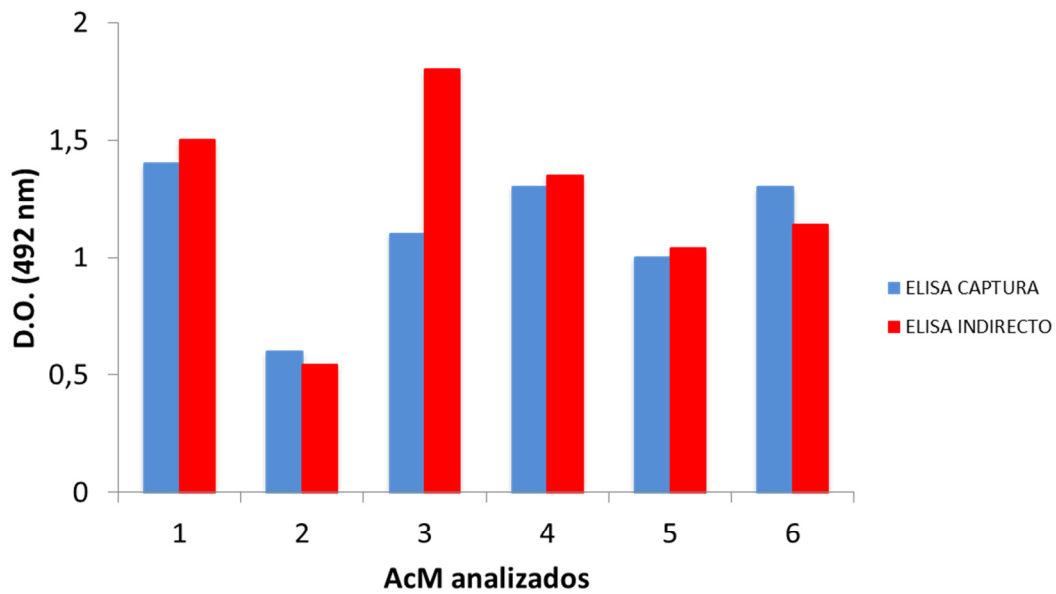


Figura 3.3. Reactividad frente al componente C4 a la dilución 1:81 por ELISAc (●) y por ELISAi (●) de los AcM: 1) SIM 192.4.2.1, 2) SIM 192.4.2.2, 3) SIM 192.5.6.3, 4) SIM 192.15.1.1, 5) SIM 192.15.3.6 y 6) SIM 192.15.7.6.

En la figura 3.4 se muestra el curso cinético de la interacción de los AcM seleccionados. Estos AcM muestra un perfil de reactividad similar al descrito en el caso del C1q, salvo que el efecto prozona apenas se observa en ninguno de los dos ensayos.

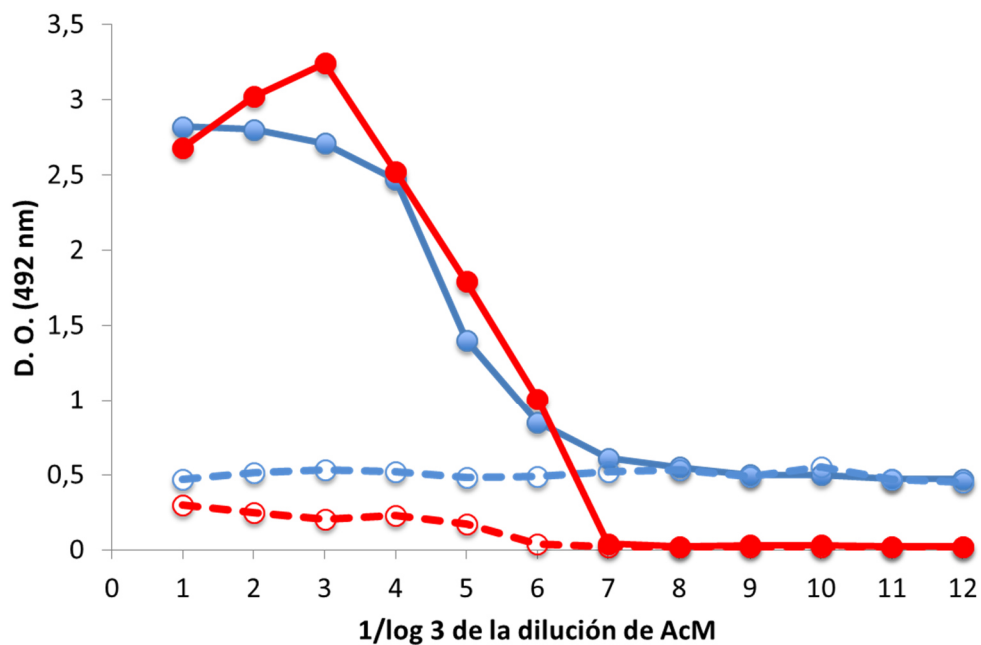


Figura 3.4. Cinética de unión del AcM al componente C4. ELISAc (●) SIM 192.4.2.1 y ELISAi (●) SIM 192.5.6.3. Línea discontinua (○) y (○) control negativo.

3.1.1.2 Componentes de la vía alternativa

3.1.1.2.1 Factor B

Se analizaron 5 AcM frente al fB, pero ninguno de ellos tenía las características adecuadas para ser utilizado en inmunoensayos de captura de Ag. En la figura 3.5 se muestra la reactividad por ELISAI (●) de los 5 AcM analizados. En este caso, la dilución donde mejor se observaban las diferentes reactividades era 1:2.187, siendo a esta el AcM SIM 212.8.3.4 (nº 2 en la figura) el que presentaba la reactividad más alta.

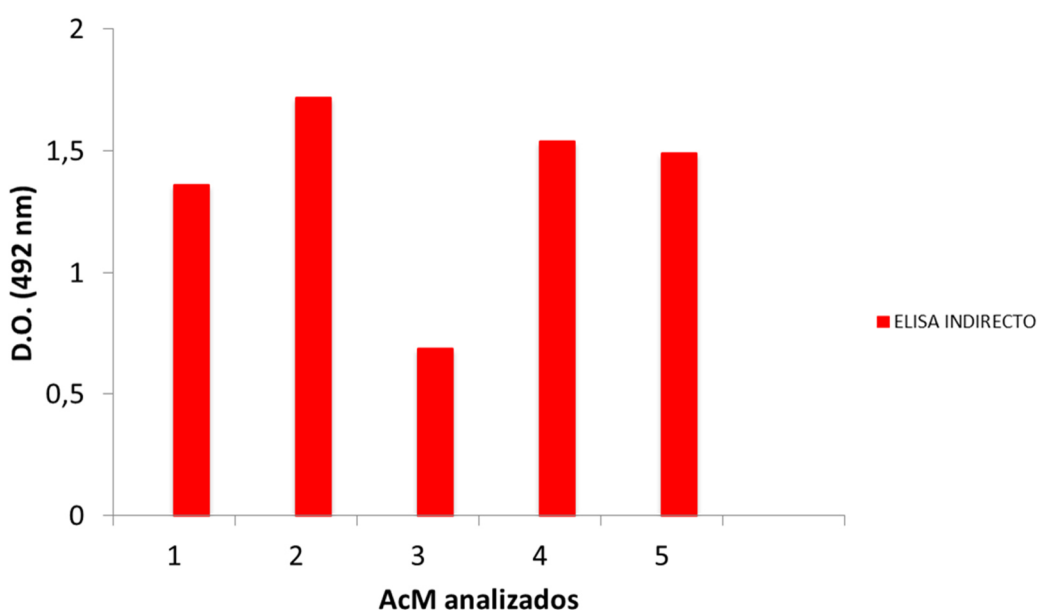


Figura 3.5. Reactividad frente al fB por ELISAI (●) a una dilución 1:2.187 de los AcM: 1) SIM 212.6.4.5, 2) SIM 212.8.3.4, 3) SIM 212.13.3.3, 4) SIM 212.19.4.1 y 5) SIM 212.31.4.5.

La figura 3.6 se muestra la cinética de unión del AcM SIM 283.8.3.4 al fB. El perfil cinético es diferente a los hasta ahora comentados, pero no hay que olvidar que el reconocimiento por el Ag es característico y único para cada Ac. En la cinética presentada se observan dos cursos cinéticos. En el primer tramo, entre las diluciones 1:3 a 1:27, sin llegar a un efecto prozona, tiene lugar una saturación por el exceso de AcM con respecto al Ag. A la siguiente dilución de 1:81 cae bruscamente la cantidad de Ac detectado en su unión al Ag, punto a partir de cual vuelve a darse un efecto de saturación hasta la dilución 1:2.187. El efecto manifestado podría atribuirse a la presencia de dos AcM con cinéticas muy diferentes. En nuestro caso, por motivos metodológicos, no puede ser esta la justificación, ya que se trata de un único AcM. Otra

posible explicación, que se considera más adecuada, es que al inicio de la reacción la concentración de AcM es saturante con respecto al número de epítopos antigénicos. A las primeras diluciones de 1:3 a 1:81 el AcM se fijarían monovalentemente “dos moléculas de Ac-una molécula de Ag” (cada molécula de AcM estaría uniéndose por un solo parátopo) y a partir de esta dilución se estabilizaría la unión al Ag a través de interacciones bivalentes, cada molécula de Ac estaría uniéndose al epítipo por los dos parátomos, forma tradicionalmente descrita para la interacción Ag-Ac. Por ello, el número de moléculas detectadas en el segundo tramo es menor. Una vez que la reacción se estabiliza con una estequiometría de orden 1, es decir, “1 epítipo:(2 parátomos)-1 Ac”, la reacción transcurre en ese orden hasta la última dilución analizada.

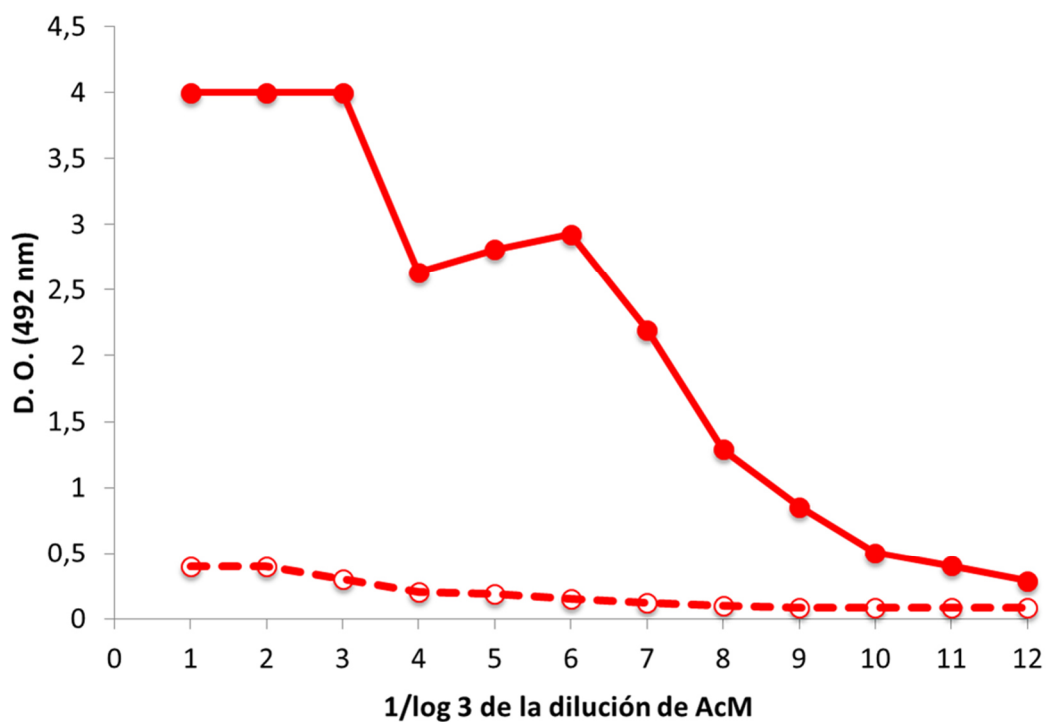


Figura 3.6. Cinética de unión del AcM al fB. ELISAI (●) SIM 212.8.3.4.
Línea discontinua (○) control negativo.

3.1.1.2.2 Properdina

Se midió la reactividad de 6 AcM frente a la P y se seleccionaron aquellos que presentaron mejores características para cada tipo de inmunoensayos. Como se

muestra en la figura 3.7 el SIM 295.5.4.27 (nº 4 en la figura) mostró la reactividad más alta en ELISAc, mientras que el SIM 295.9.3.4 (nº 6 en la figura) fue el mejor para ELISAi.

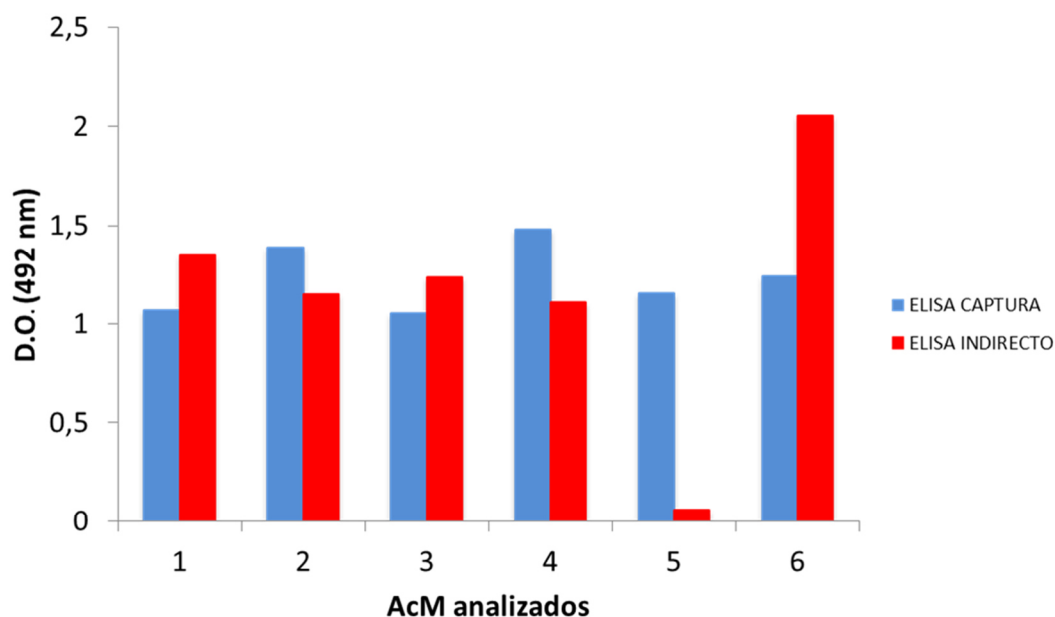


Figura 3.7. Reactividad frente a la P por ELISAc (●) a una dilución de 1:81 y por ELISAi a una dilución de 1:9 (●) de los AcM: 1) SIM 248.5.3.1, 2) SIM 295.5.3.4, 3) SIM 295.5.3.8, 4) SIM 295.5.4.27 y 5) SIM 295.5.5.15 y 6) SIM 295.9.3.4.

En el perfil cinético que se muestra en la figura 3.8 podemos ver que a las diluciones más bajas (1:3 – 1:9) aparece el efecto prozona ya comentado para el mismo tipo de análisis con otros Acs. Sin embargo, la diferencia que aquí observamos es que, al menos en las diluciones analizadas, no existe la zona logarítmica que sí hemos visto en el resto de análisis. Una justificación para este hecho podría ser que la reacción de unión $\text{Ag} + \text{Ac} \rightarrow \text{Ag-Ac}$ estuviera muy desplazada hacia la formación del complejo y, por tanto, que la constante de disociación fuera muy inferior a la de formación, situación que se da en los Acs que poseen una muy alta afinidad por el Ag que reconocen. En algunas ocasiones se da la circunstancia de no se puede revertir dicha unión, lo que debe tenerse en cuenta cuando los AcM se van a utilizar como inmunoabsorbentes para purificar Ag.

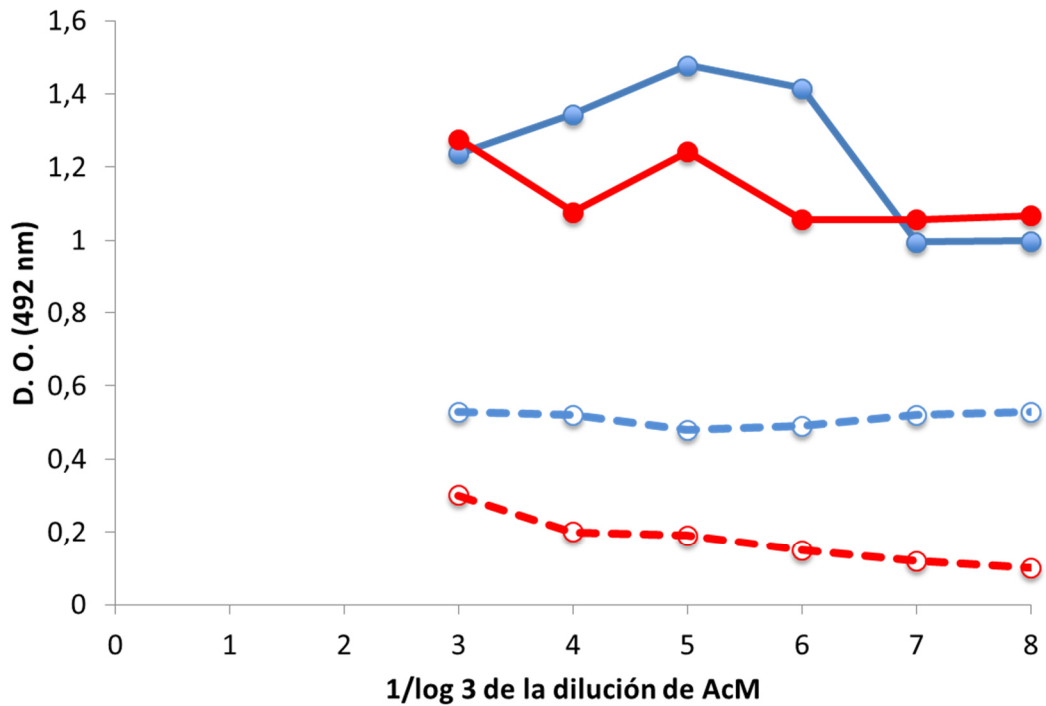


Figura 3.8. Cinética de unión del AcM a la P. ELISAc (●) SIM 295.5.4.27 y ELISAi (●) SIM 295.9.3.4. Línea discontinua (○) y (○) control negativo.

3.1.1.3 Componente C3

Dada la gran cantidad de AcM frente al componente C3 de que disponíamos en el laboratorio (un total de 17), se realizaron las pruebas para seleccionar los que presentaron mejores características para cada inmunoensayo (datos no mostrados), que fueron:

- ELISAc: SIM 27.93.39.20
- ELISAi: SIM 27.49.5.68

El resto de la caracterización se llevó a cabo mediante WB y CF.

3.1.1.4 Componentes de la Vía Lítica

3.1.1.4.1 Componente C5

Se llevó a cabo el análisis de los 6 AcM disponibles frente al componente C5. Las reactividades de los AcM disponibles frente al componente C5 a una dilución 1:2.187 se

muestran en la figura 3.9 por ELISAc (●) y por ELISAI (●). Tras las pruebas realizadas se decidió seleccionar el mismo AcM, el SIM 225.8.2.4 (nº 2 en la figura), por ser el mejor en ambos ensayos.

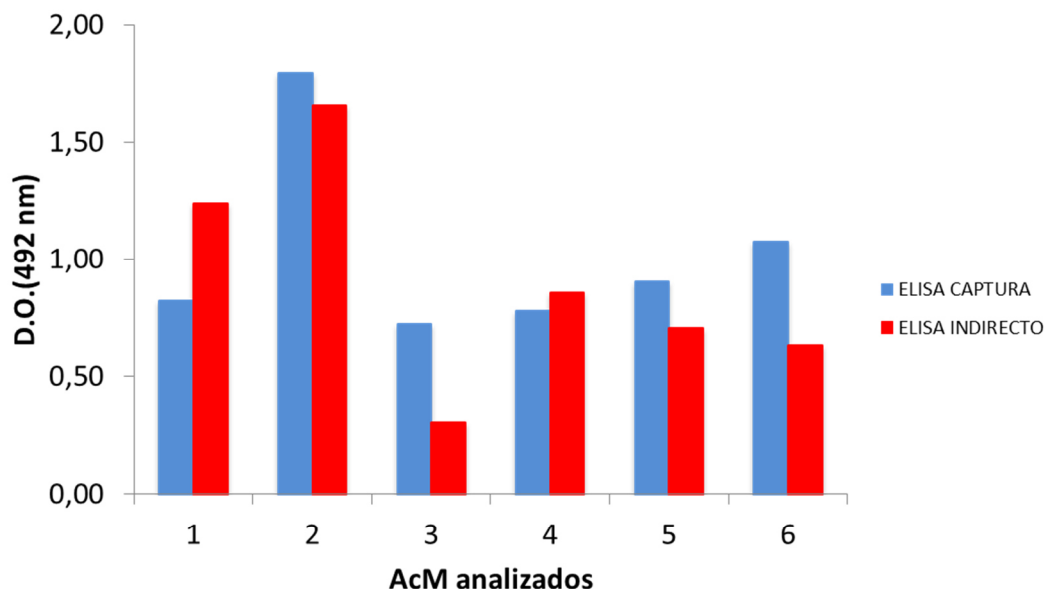


Figura 3.9. Reactividad frente al componente C5 por ELISAc (●) y por ELISAI (●) a una dilución 1:2.187 de los AcM: 1) SIM 225.1.3.4, 2) SIM 225.8.2.4, 3) SIM 225.9.2.4, 4) SIM 225.13.3.1, 5) SIM 225.16.3.3 y 6) SIM 225.19.3.2.

El efecto prozona que tenía lugar en la cinética de unión del AcM al C5 para ambos ensayos era tan extenso, desde la dilución 1:3 a 1:81, que hemos preferido obviar la representación gráfica para esas diluciones con objeto de facilitar su análisis. El perfil sigmoideo es semejante a los anteriormente representados; en el tramo inicial de la curva, se observaría el efecto de saturación de Ac por un exceso de este con respecto al Ag, para a partir de una dilución determinada, 1:81, producirse una rápida disminución de la detección de AcM, tramo logarítmico, donde la pendiente de la recta, como en los casos anteriores, se aproxima a 1.

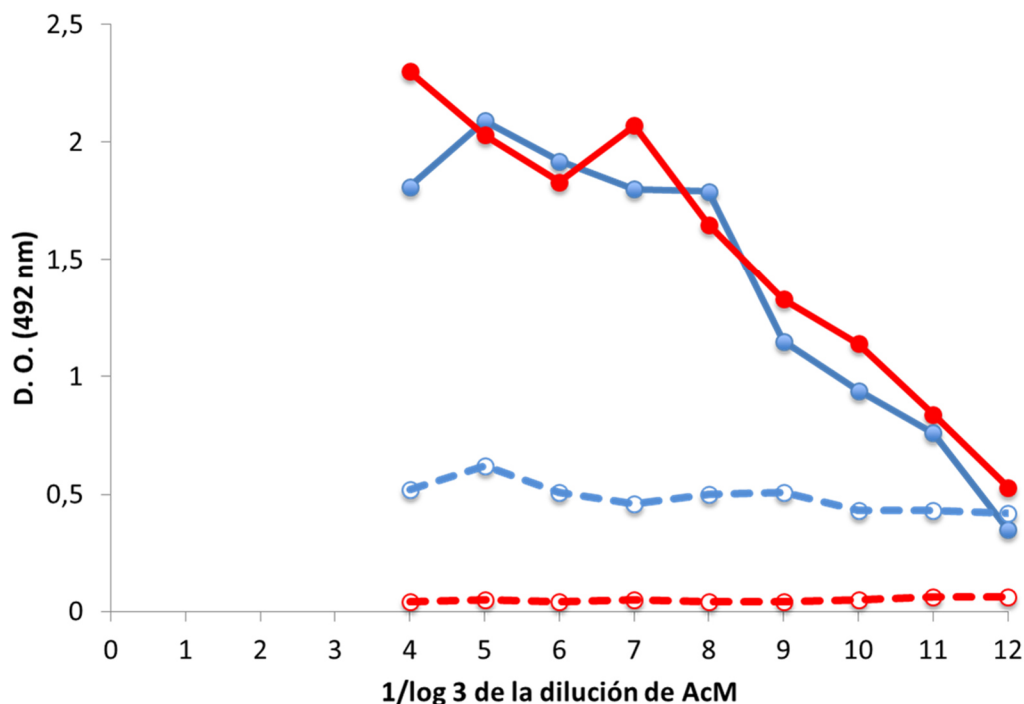


Figura 3.10. Cinética de unión al componente C5. ELISAc (●) SIM 225.8.2.4 y ELISAI (●) SIM 225.8.2.4. Línea discontinua (○) y (○) control negativo.

3.1.1.4.2 Componente C9

Se analizaron 6 AcM frente al componente C9. Tras la caracterización mediante ELISAc y ELISAI se decidieron seleccionar los siguientes AcM frente a esta proteína.

La figura 3.11 muestra, a la dilución 1:64, la reactividad de los distintos AcM caracterizados por ELISAc (●) y por ELISAI (●). El AcM, SIM 235.6.2.7 presentaba una elevada reactividad por ELISAI en comparación con el resto de AcM analizados. Sin embargo, por ELISAc los AcM presentaron valores de reactividad más similares, siendo los más altos el SIM 235. 35.16.6 y el SIM 235.16.6.7, pero al final se decidió seleccionar este último debido a que presentaba un mejor rendimiento en el proceso de obtención del AcM que engloba el cultivo del hibridoma y purificación el Ac.

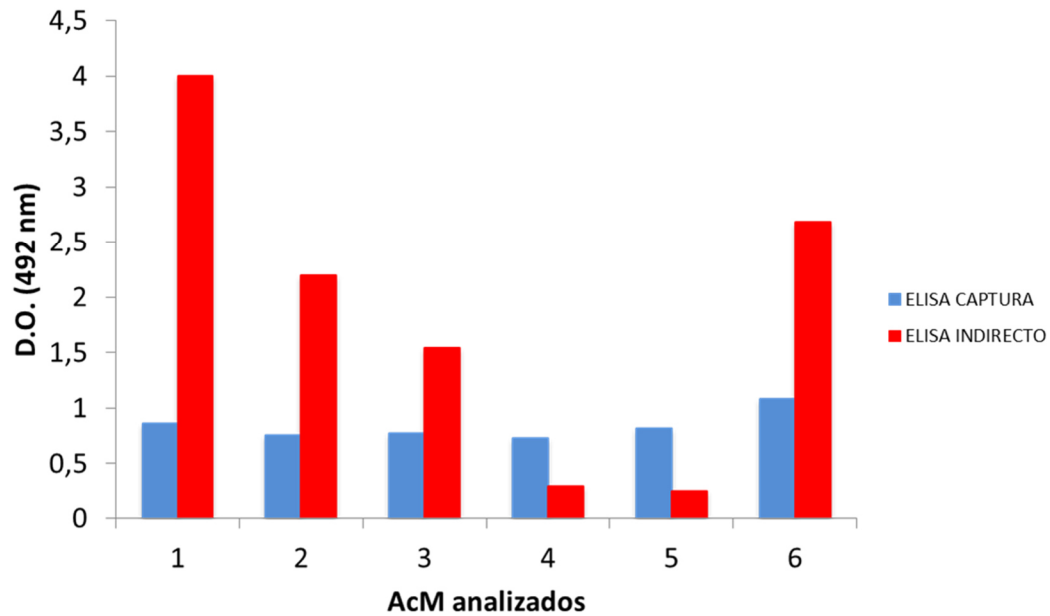


Figura 3.11. Reactividad frente al componente C9 por ELISAc (●) y por ELISAI (●) a una dilución 1:64 de los AcM: 1) SIM 235.6.2.7, 2) SIM 235.6.4.7, 3) SIM 235.6.5.2, 4) SIM 235.6.12.3, 5) SIM 235.35.16.6 y 6) SIM 235.35.16.7.

En cuanto a las diluciones aplicadas en el ensayo, hay que señalar que las diluciones seriadas fueron de 1:2 y no de 1:3 como en casos anteriores (figura 3.12), debido sobre todo a que en el ensayo de captura de Ag la reactividad caía enseguida, estando ya por debajo de un 50% a diluciones inferiores de 1:16. Este hecho se podría atribuir, bien a que el hibridoma secrete muy poco AcM (las concentraciones de AcM en el medio de cultivo varían en un rango de entre 10 y 100 ug/ml), o bien a que la proporción de moléculas defectuosas de Ac, que siempre se producen, en este caso fueran mayores, lo que haría que el reconocimiento por el Ag se viera comprometido.

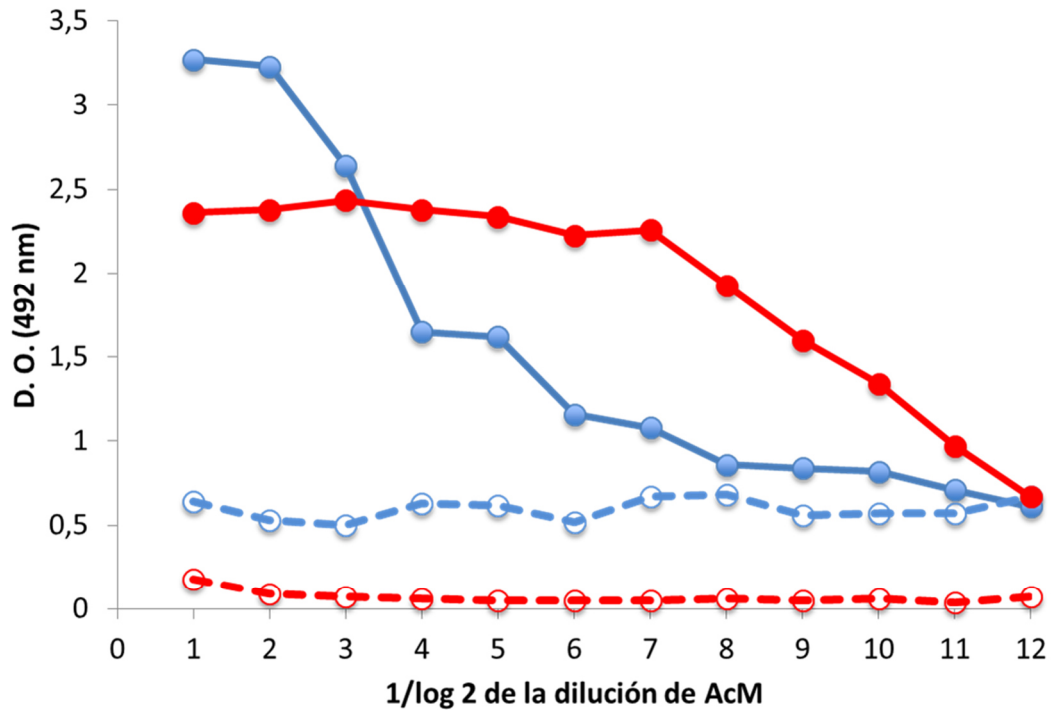


Figura 3.12. Cinética de unión al componente C9. ELISAc (●) SIM 235.35.16.7 y ELISAI (●) SIM 235.6.2.7. Línea discontinua (○) y (○) control negativo.

En la tabla 3.1 se muestra un resumen de los AcM seleccionados frente a las proteínas del complemento por ELISAc y ELISAI detallados anteriormente:

Tabla 3.1. Selección de AcM frente a los factores del C' por ELISAc y ELISAI.

	Anti C1q	Anti C4	Anti fB	Anti P	Anti C5	Anti C9
ELISAc	SIM 194.43.5.2	SIM 192.4.2.1	---	SIM 295.5.4.27	SIM 225 8.2.4	SIM 235.35.16.7
ELISAI	SIM 194.35.4.1	SIM 192.5.6.3	SIM 212.8.3.4	SIM 295.9.3.4	SIM 225.8.2.4	SIM 235.6.2.7

3.1.2 Caracterización de los anticuerpos monoclonales por Western Blot

Durante la selección de todos los AcM descritos hasta el momento también se realizó un análisis de su reactividad por WB. A continuación, se muestra el resumen de los AcM que se seleccionaron para cada una de las proteínas del complemento por ser los que se consideraron mejores para este inmunoensayo.

3.1.2.1 Componentes de la vía clásica, vía alternativa y Vía Lítica: C1q, C4, fB, P, fH, fD, C5 y C9

Las proteínas del complemento humano purificadas se separaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (figura 3.13), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los sobrenadantes de los AcM. Todos ellos reconocen el Ag correspondiente en condiciones no reductoras (A). Los componentes C1q y C4 reaccionaron con unas bandas adicionales causadas por la agregación y/o fragmentación de la proteína purificada. En condiciones reductoras (B), los AcM anti-C1q (SIM 194.13.2.1), fB (SIM 384.42.12.1) y fD (SIM 234.5.12.1) mostraron la reactividad prevista.

El AcM anti-C1q reconoció una banda a un peso molecular (Pm) de 21 kDa que se puede atribuir a la cadena C del componente C1q.

El AcM anti-fB reconoció una banda de 64 kDa; como el fB se escinde en los polipéptidos Ba (Pm= 30 kDa) y Bb (Pm= 60 kDa), el AcM anti-fB, probablemente, reaccionó con un epítipo del fragmento Bb.

El fD es una molécula monocaténaria con un Pm de ≈24,4 kDa; en condiciones no reductoras, el AcM anti-fD reaccionó con una banda de 22 kDa, mientras que en condiciones reductoras reconoció una banda a mayor Pm= 25 kDa, lo que es similar a la disminución de la movilidad electroforética descrita para fH [44].

En condiciones reductoras, los AcM anti-P, C9, C5, fH, y C4 no reconocieron la proteína correspondientes (figura 3.13).

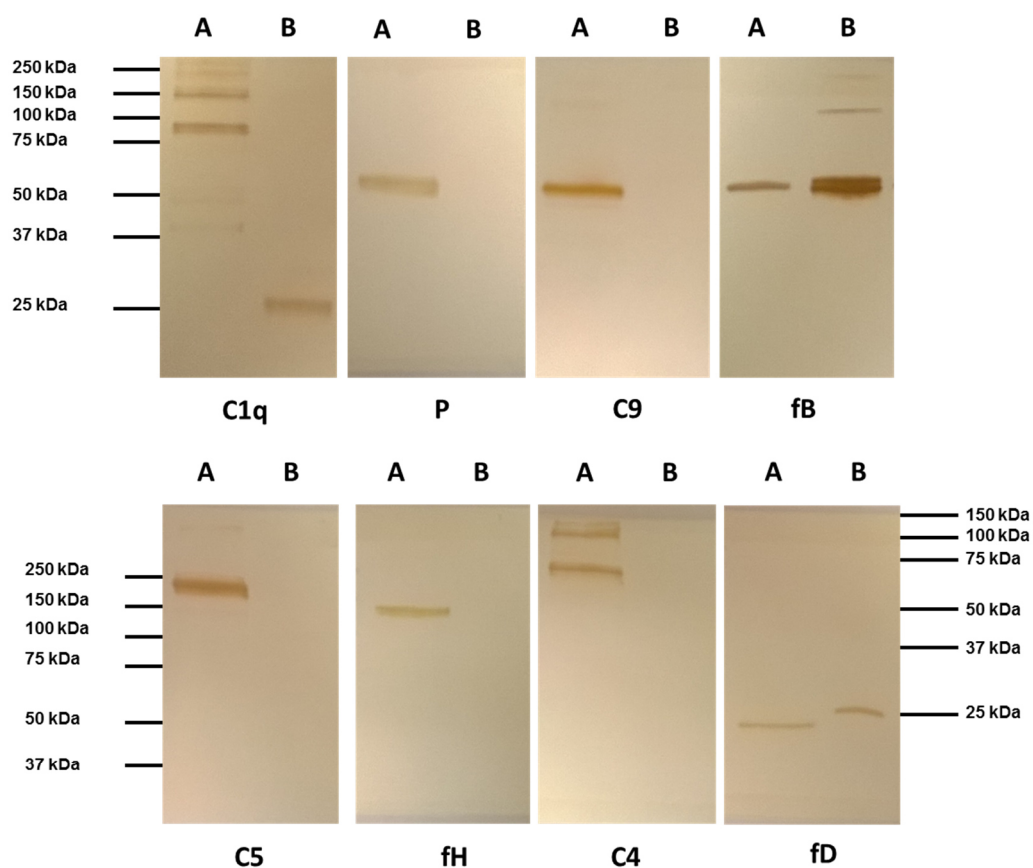


Figura 3.13. Análisis por WB de la reactividad de los AcM frente a los componentes del complemento purificados. La proteínas humanas se separaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B), seguido de una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con el sobrenadante de los AcM; anti-C1q (SIM 194.13.2.1), anti-P (SIM 246.1.1.1), anti-C9 (SIM 235.6.2.7), anti-fB (SIM 384.42.12.1), anti-C5 (SIM 225.3.2.1), anti-fH (SIM 214.12.3.8), anti-C4 (SIM 194.4.2.1) y anti-fD (SIM 234.5.12.1). El AcM unido se reveló con un Ac secundario marcado con HRP.

3.1.2.2 Componente C3 y productos de degradación

Se analizaron los AcM anti-C3 para determinar si reconocían de forma específica este componente o alguno de los productos de su degradación que se generan durante la activación del C³, como el C3d y el iC3b. Previamente, en su selección, se determinó la reactividad por ELISAc y ELISAi y con los 17 AcM se llevó a cabo un análisis por WB en condiciones reductoras. Los resultados previos mostraron que ningún AcM tenía reactividad por ELISAc para el componente C3, sin embargo, presentaban una elevada reactividad por ELISAi frente a este componente.

La reactividad por ELISA frente a los componentes C3d e iC3b sólo se analizó por ELISAI y se observó que más de la mitad de los AcM eran positivos para el fragmento C3d y sólo 6 de ellos eran positivos para el iC3b.

Cuando se llevaron a cabo análisis de WB se comprobó, que la mayoría de los AcM mostraron reactividad frente al C3, al igual que ocurrió en el ELISAI. Se sabe que tanto en el ELISAI, como en el WB, hay una desnaturalización parcial o total de las proteínas [18], por lo que asumimos que nuestros AcM interaccionaban mejor con el epítipo en la proteína desnaturalizada, probablemente debido a que la accesibilidad a la región inmunogénica está facilitada por la disminución de impedimentos estéricos, ya que se pierden las estructuras cuaternaria y terciaria [18]. De los 17 AcM todos reconocían a la proteína C3, excepto el SIM 320.6.2.1 que estaría reconociendo un neoepítipo generado en el fragmento iC3b tras la activación del C3. La mayoría de epítopos, 15 de los 17, están localizados en la cadena α . No hemos analizado por qué ocurre esto, pero podrían estar contribuyendo factores como la homología de las cadenas α y β con las correspondientes de ratón. La estructura molecular e incluso el procesamiento peptídico que se lleva a cabo para la presentación antigénica, un proceso del que quedan aún muchos aspectos por esclarecer [5]. En este contexto, podría justificarse el hecho de que todos los AcM que reconocían la cadena α también reconocían el iC3b y más concretamente la región dentro de este que contenía el componente C3dg (figura 1.6. de la introducción). En los AcM que reconocían la cadena β , como esta permanece intacta en todo el proceso de degradación sólo se analizó la reactividad frente al componente C3. Los resultados comentados, recogidos en la tabla 3.2, nos llevan a proponer que los AcM generados frente al componente C3, por sus funciones en el componente principal del C', van fundamentalmente frente a la región C3d, localizada en la cadena α del C3 y que ese reconocimiento se ve favorecido cuando la proteína está desnaturalizada.

Hay que destacar que la generación de AcM frente a neoepítopos es una tarea que entraña una alta dificultad y, de hecho, hasta el momento no hemos conseguido obtener un AcM específico para el producto C3dg.

Tabla 3.2. Reactividades por WB de los diferentes AcM frente al componente C3 y sus productos de degradación iC3b y C3d.

AcM	Western blot (reducido)				
	C3	iC3b	C3d	Cadena α	Cadena β
SIM 27.4.18.5	+	+	+	+	
SIM 27.4.59.92	+	+	+	+	
SIM 27.4.73.57	+	+	+	+	
SIM 27.4.83.23	+	+	+	+	
SIM 27.12.2.16	+	NA	NA		+
SIM 27.A49.1.53	+	+	+	+	
SIM 27.49.5.16	+	+	+	+	
SIM 27.93.39.20	+	NA	NA		+
SIM 309.12.1.4	+	+	-	+	
SIM 309.12.1.7	+	+	-	+	
SIM 309.12.1.7	+	+	+	+	
SIM 309.12.1.12	+	+	+	+	
SIM 320.6.2.1	-	+	-/+	+	
SIM 320.12.2.1	+	+	+	+	
SIM 320.12.2.2	+	+	+	+	
SIM 320.12.3.1	+	+	+	+	
SIM 320.12.3.3	+	+	+	+	

NA=no analizado

3.1.3 Caracterización de la reactividad de los anticuerpos monoclonales por citometría de flujo

Para confirmar que los AcM estaban reconociendo la forma activada de los componentes del C' realizamos un ensayo de CF en el que se emplearon promastigotes de *Leishmania amazonensis* opsonizados con SHN como superficie activadora [13]. Como control negativo, los promastigotes se opsonizaron con SHN con EDTA 10 mM, que bloquea la activación del Complemento.

Los histogramas de la figura 3.14 muestran la reactividad de los AcM seleccionados que mejores características presentaron para este inmunoensayo. En los AcM anti-C4, fH, C5, C9, C3 y C1q se muestra una distribución simétrica en forma de campana, lo que sugiere una distribución homogénea de los epítomos reconocidos por el AcM. Puesto que la unión del C1q a promastigotes no es dependiente de Ca^{2+} , la unión del AcM a los promastigotes opsonizados con SHN y SHN-EDTA fue similar. El fD es un componente soluble que no se une a la superficie activadora, por tanto, no se puede medir por CF.

Por último, los AcM anti-fB y anti-P produjeron una distribución asimétrica de mayor intensidad de fluorescencia y dividida en dos picos, probablemente debido al depósito heterogéneo del fragmentos de escisión de fB y P en la C3 convertasa de la VA y la C5 convertasa.

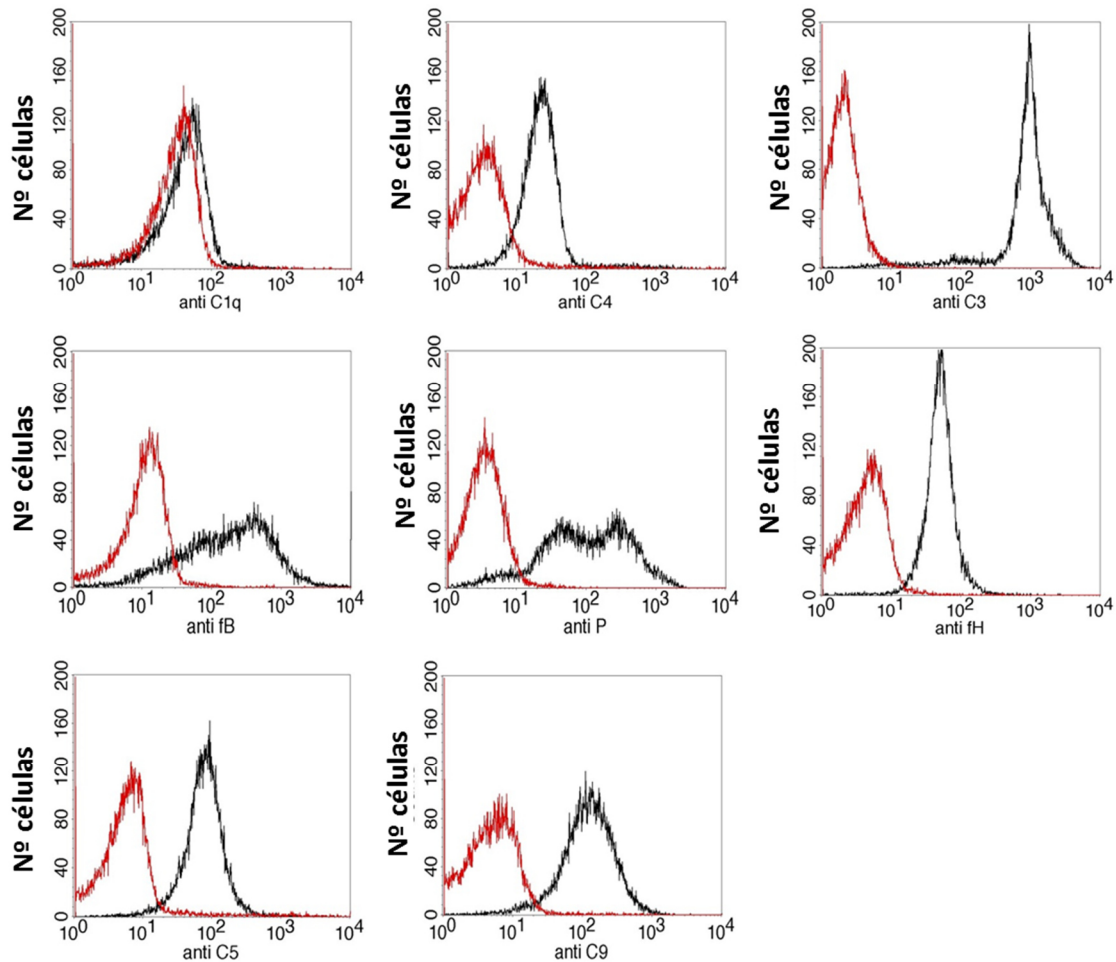


Figura 3.14. Análisis de la reactividad por CF de los AcM frente a promastigotes de *leishmania* opsonizados en SHN. Los promastigotes se opsonizaron (10 minutos a 37°C) con 50% de SHN (—) . 50% SHN-EDTA 10 mM (—) como control negativo. Los AcM seleccionados fueron; anti-C1q (SIM 194.13.2.1), anti-C4 (SIM 194.4.2.1), anti- C3 (SIM 27.49.5.68) anti-fB (SIM 384.42.12.1), anti-P (SIM 246.1.1.1), anti-fH (SIM 214.12.3.8), anti-C5 (SIM 225.3.2.1) y anti-C9 (SIM 235.6.2.7).

3.2. Obtención de nuevos anticuerpos monoclonales frente al fB, C5 y C5a

Como se ha mencionado anteriormente, entre los objetivos de esta Tesis Doctoral nos planteamos la obtención de nuevos AcM, si una vez caracterizados los de nuestra colección, no contábamos con los adecuados para el desarrollo de los siguientes objetivos. Este fue el caso de los Acs frente a: 1) la proteína nativa del fB; ninguno de los AcM frente al factor B obtenidos hasta el momento reconocían al fB por ELISAc o sobre la superficie activadora por CF; 2) el componente C5, ninguno de los AcM disponibles permitía reconocer a la proteína por WB y ELISAc. Era útil contar con un AcM anti-C5 para la captura de este componente, siempre es deseable poder confirmar por otra técnica que la proteína identificada es la correcta y, en este sentido, el WB es la técnica idónea. Además, aunque no estaba incluido entre los objetivos iniciales de esta Tesis, nos planteamos la obtención de un AcM que reconociera el fragmento de degradación del C5, el C5a, la anafilotoxina más potente de las que se generan tras la activación del C'.

3.2.1. Anticuerpos monoclonales frente a fB

El proceso de obtención de este AcM es común al de los otros obtenidos en esta Tesis, y que está descrito en el apartado de materiales y métodos, sin embargo, las condiciones de los ensayos de selección fueron más específicos, en concreto, la selección de AcM se llevó a cabo mediante:

- ELISAi frente a fB (1 µg/ml)
- ELISAc frente fB marcado con biotina
- WB frente a fB
- CF frente a promastigotes de *L. amazonensis* opsonizados por SHN

En este caso, al igual que en todos los AcM obtenidos en nuestro laboratorio, se asigna el código *SIM* A.X.Y.Z como identificación de un hibridoma, siendo en este caso el SIM 384.X.Y.Z, donde 384 el número de fusión, X el pocillo seleccionado de la fusión, Y el clon seleccionado del primer clonaje y Z el clon seleccionado del segundo clonaje. Finalmente se obtuvieron 6 AcM cuyas características se resumen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Características de los AcM frente al a fB.

AcM	ELISAI*	ELISAc*	WB	CF*	Isotipo
	fB	fB	fB		
SIM 384.13.3.2	2,9	2,64	Negativo	107	IgG1-K
SIM 384.20.6.2	1,9	2,07	Negativo	102	IgG1-K
SIM 384.33.2.2	2,1	1,23	Negativo	104	IgG1-K
SIM 384.38.3.1	2,1	1,26	(+/-)	88	IgG1-K
SIM 384.42.2.4	1,9	1,62	Negativo	89	IgG1-K
SIM 384.42.12.1	OVFL	0,88	Positivo	154	IgG1-K

* Valores de D.O. a 492nm. OVFL (overflow). D.O. $\geq$ a 4 unidades de DO.

* Media de fluorescencia

Las características de reactividad son muy similares para todos los AcM, con la salvedad del SIM 384.42.12.1 que es el único que funciona en WB y el que presenta mayor reactividad por CF.

3.2.2. Anticuerpos monoclonales frente a C5 y C5a

Para la obtención de estos Acs se realizaron dos fusiones simultáneas, una a partir de animales inoculados con el C5 (SIM 376) y la otra con el fragmento C5a-Des (SIM 378). Este diseño experimental estaba justificado porque en el desarrollo de los Ac algún Ag y los inmunoensayos utilizados en su selección coincidían.

Los inmunoensayos utilizados en la selección de estos AcM fueron:

- ELISAc del componente C5, C5a-Arg y C5a-Des marcados con biotina
- ELISAI frente a C5, C5a-Arg y C5a-Des
- WB frente a C5, C5a-Arg y C5a-Des

Se obtuvieron 5 AcM frente a C5 y 4 AcM frente a C5a, cuyas características se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Características de los AcM frente al C5 y C5a.

AcM	ELISAc	ELISAc	ELISAc	ELISAI	ELISA i	ELISAI
	C5	C5a Arg	C5a Des	C5	C5a Arg	C5a Des
SIM 376.11.2.1	0,44	0,08	0,07	2,2	0,2	0,3
SIM 376.39.4.2	OVF	0,09	0,08	2	0,2	0,3
SIM 376.55.1.1	OVF	0,1	0,1	1,7	0,2	0,4
SIM 376.72.2.2	OVF	0,1	0,08	2, .4.	0,4	0,7
SIM 376.32.1.1	1,2	0,09	0,09	1,9	0,4	0,5
SIM 378.16.1.1	0,09	2,6	2,6	2,6	3,1	3,2
SIM 378.17.1.1	0, 1	2,7	3	1,9	2,4	2,8
SIM 378.27.1.1	0,1	2,5	2,8	2,9	3,4	3
SIM 378.32.1.1	0,1	2,2	2,6	2	2,3	2,5

OVFL (overflow). D.O. $\geq$ a 4 unidades de D.O.

Los AcM obtenidos frente a C5 presentaban por ELISA una reactividad claramente superior frente a la molécula completa de C5, que frente a los fragmentos de degradación. Estos resultados preliminares sugerían que los epítopos reconocidos por estos AcM estaban localizados en una región diferente a la corresponde al C5a antes de fragmentarse (aminoácidos del 678-751 de la molécula de C5) [5] hecho que posteriormente pudimos confirmar en un WB con el C5a, en donde ninguno de los AcM anti C5 mostraron reactividad (datos no mostrados), mientras que sí lo hacían frente a la molécula completa C5, como puede verse en la figura 3.15.

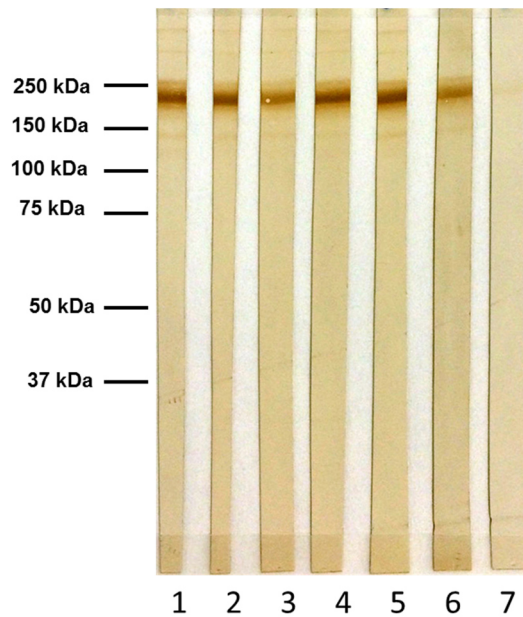


Figura 3.15. Reactividad por WB de AcM anti C5 en condiciones no reductoras: SIM 376.11.2.1 (1), SIM 376 39.4.1 (2), SIM 376.55.1.1(3), SIM 376.72.2.2(4), SIM 376.85.1.1 (5), Control + (6) y Control – (7).

Los Ac obtenidos frente al C5a (SIM 378) reconocían, tanto por ELISAi como por ELISAc, ambas formas del fragmento C5a, Arginado y Desarginado. Sin embargo, frente a la molécula completa C5 sólo eran positivos por ELISAi, lo que es atribuible, como hemos mencionado anteriormente para otros Acs, a la mejor accesibilidad del AcM a su epítipo al estar la proteína desnaturalizada, situación relativamente frecuente sobre todo con moléculas de tan alto peso molecular y estructura tan compleja como el C5 [5]. Esta situación no es comparable a la del fragmento C5a, molécula de bajo peso molecular y estructura espacial sencilla [5], de ahí que los Ac reconozcan al fragmento, tanto por ELISAc, (proteína nativa) como por ELISAi. En principio pretendíamos obtener AcM que permitieran diferenciar el C5a-Arg (la forma biológicamente activa) del C5a-Des (la forma biologicamente no activa), pero en ese momento no fue posible, como tampoco fue posible obtener un AcM que reconociera un neoepítipo en el fragmento C5a, todos los AcM reconocen al C5 en la molécula completa.

Ya se comentado anteriormente la dificultad que conlleva el generar AcM frente a neoepítopos, su consecución, que nuestro laboratorio está ya abordando, exigía un cambio de estrategia en cuanto al inmunógeno y a los métodos de selección.

3.3. Desarrollo de un ensayo para medir la funcionalidad de las tres vías del sistema del complemento: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas

El siguiente objetivo fue poner a punto un ensayo, en concreto un ELISAI que, mediante la activación selectiva del complemento por cada una de las vías y finalmente la detección del complejo C5b-9 permitiera determinar qué vía de activación era funcional en el suero analizado.

Para ello, en primer lugar se eligieron los reactivos y condiciones adecuadas, que se describen en el apartado 2.6 de *Materiales y Métodos*.

El primer paso fue seleccionar entre los AcM frente a los componentes C5 y C9 los que permitían detectar mejor el complejo C5b-9 en un ensayo tipo ELISAI. En la figura 3.16 se muestran los resultados obtenidos utilizando AcM anti-C5, mientras que en la figura 3.17 se presentan los resultados obtenidos con los AcM anti-C9.

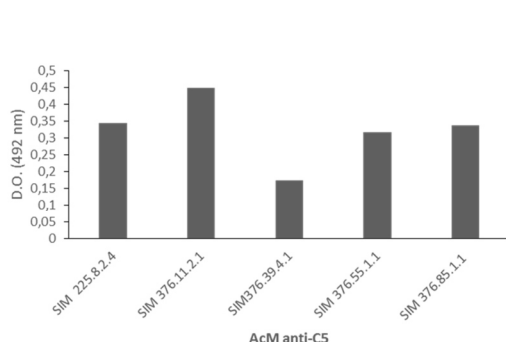


Figura 3.16. Selección del AcM frente al componente C5. D.O. obtenidas en un ELISA de activación del complemento por VC donde se determina la formación del MAC con 5 AcM anti-C5.

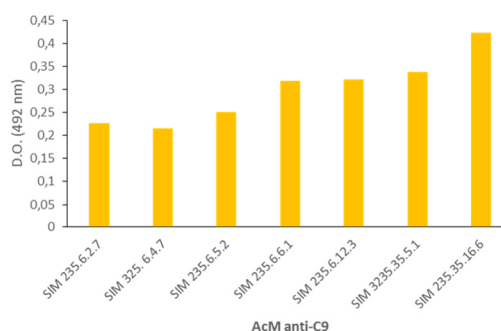


Figura 3.17. Selección del AcM frente al componente C9. D.O. obtenidas en un ELISA de activación del complemento por VC donde se determina la formación del MAC con 7 AcM anti-C9.

El AcM frente a C5 seleccionado fue el SIM 376.11.2.1 y el elegido frente al C9 fue el SIM 235.35.16.6. Posteriormente, se confirmó que reconocían el C5 y el C9 por la VA y por la VL, lo que era esperable, ya que el C5 y C9 activados que se generan son idénticos independientemente de la vía por la que se haya activado el C' [41].

Aunque ambos Ac detectaban el complejo citolítico C5b-9, se decidió emplear una mezcla de ambos. El detectar dos moléculas C5 y C9 supone una ventaja, en cuanto a intensidad de señal se refiere, siempre y cuando la unión al epítipo no se vea interferida por la presencia de ambos. El mejor resultado se dio al emplear una mezcla vol:vol del sobrenadante de cultivo a saturación de cada uno de los hibridomas (figura 3.18).

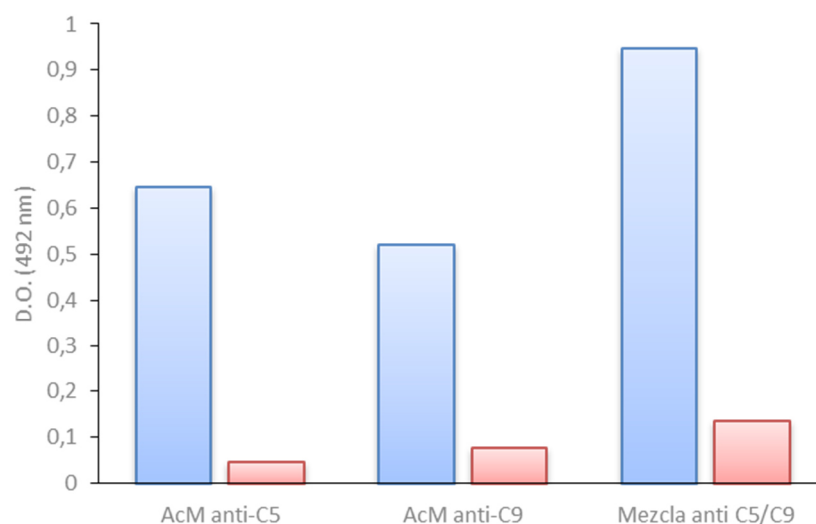


Figura 3.18. Reactividad de los AcM anti-C5, anti-C9 y mezcla equimolecular de ambos en SHN (■) y SHN-EDTA (■).

En cuanto a la selección de las superficies activadoras, nos basamos en las descritas por otros autores. Para la VC ensayamos con IgM o IgG a una concentración de 2,5 µg/ml frente a suero normal [43] y, como puede observarse en la figura 3.19, se obtienen mejores resultados cuando la activación del C' se lleva a cabo con IgG.

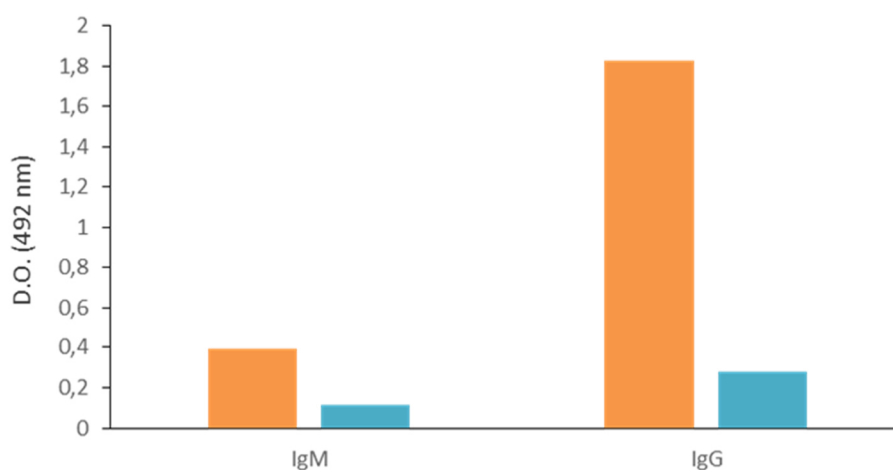


Figura 3.19. Selección del agente activador de VC. Las barras representan la formación del MAC que determinamos al activar el C' por VC con IgM o IgG en SHN (■) y SHN-EDTA (■).

Para seleccionar la superficie activadora por la VA, inicialmente utilizamos el LPS de *Salmonella typhosa* y el LPS de *Escherichia coli* a una concentración de 40 µg/ml [43].

Como los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, decidimos utilizar el zymosan, un activador clásicamente utilizado para la VA. Los resultados obtenidos con el zymosan fueron mejores que con LPS, como se muestra en la figura 3.20.

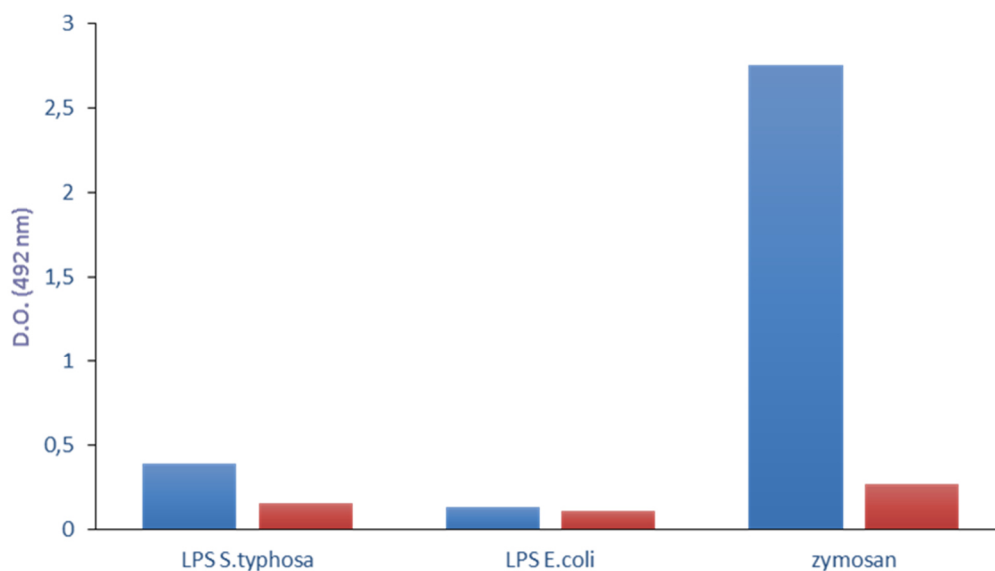


Figura 3.20. Selección del agente activador de VA. Las barras representan la formación del MAC que determinamos al activar el C' por VA con LPS de *S. typhosa*, LPS de *E. coli* y zymosan en SHN (■) y SHN-EDTA (■).

En el caso de la activación del C' por la VL empleamos como superficie activadora los mananos, una superficie que ha sido ampliamente utilizada [41]. El protocolo seleccionado se resume a continuación: 1) superficies activadoras para la VC IgG humana a una concentración de 2,5 µg/ml diluida en PBS; zymosan a 5 mg/ml diluido en tampón NaHCO₃/Na₂CO₃ 0,1 M, pH 10 para la VA; y para la VL mananos a 100 µg/ml diluido en el mismo tampón. 2) la dilución óptima de suero fue de 1:100 para la VC y la VL y de 1:20 para la VA. 3) para revelar la formación del complejo citolítico C5b-9 se añadió una mezcla vol:vol del sobrenadante del cultivo que contenía los AcM seleccionados anti-C5 (SIM 376.11.2.1) y anti-C9 (SIM 235.35.16.6).

Con el objetivo de estandarizar el método se analizaron los 191 sueros de la colección propia en las condiciones comentadas. Los resultados de funcionalidad obtenidos en ellos fueron los siguientes (tabla 3.5): todos los sueros analizados presentaban actividad por la VC, el 31% de los sueros presentaban una baja reactividad (menor al 100%), más

de la mitad de los sueros (66%) mostraron una actividad entre 100-200% y sólo un 3% de los sueros presentaron una alta actividad, mayor al 200% por esta vía.

Tabla 3.5. Porcentaje de actividad y sueros analizados por la VC.

%VC	Nº SUEROS	% SUEROS
<100%	60	31%
100-200%	127	66%
>200%	4	3%

Como se observa en la tabla 3.6, para la VA el 53% de los sueros mostraron una baja actividad (menor al 100%), un 37% una actividad entre 100-200% y sólo un 5% de los sueros presentaron una actividad superior al 200%. El 5% de los sueros analizados no presentaron actividad por la VA.

Tabla 3.6. Porcentaje de actividad y sueros analizados por la VA.

%VA	Nº SUEROS	% SUEROS
< 100%	101	53%
100-200%	71	37%
>200%	10	5%

Respecto a la VL (tabla 3.7), el 16% de los sueros analizados no presentaban actividad por esta vía. Un 30% de los sueros mostraron menos de un 100% de actividad, un 21% una actividad entre el 100-200% y el 35% presentaron una reactividad superior al 200%.

Tabla 3.7. Porcentaje de actividad y sueros analizados por la VL.

%VA	Nº SUEROS	% SUEROS
< 100%	57	30%
100-200%	40	21%
>200%	67	35%

Para validar nuestro ELISA analizamos en paralelo 20 sueros con un equipo comercializado por Eurodiagnostica (Wieslab Complement System Scream) y con el ensayo desarrollado en nuestro laboratorio. No se observaron diferencias significativas

en cuanto a la capacidad de activación de las tres vías. Únicamente, en el ELISA comercial se obtuvieron valores más altos de D.O. en la activación del complemento por la VC, probablemente debido a variaciones metodológicas. Generalmente, la capacidad para activar el complemento por la VC se mide empleando IgM. Este Ac es pentamérico y, por ello, tiene más capacidad para activar el complemento que la IgG, ya que tiene 5 regiones Fc para que se una C1q, mientras que la IgG únicamente tiene 1 ó 2 si está en forma dimérica. El hecho de que en nuestro ensayo hayamos tenido mejores resultados con IgG que con IgM podría ser debido a la naturaleza lábil de los Ac de isotipo IgM, que hace que se alteren con facilidad y pierdan su condición pentamérica.

3.4 Desarrollo y puesta a punto de un ensayo ELISA tipo sándwich para la determinación del complejo C5b-9 soluble

Para la consecución de este ensayo debimos, al igual que en el presentado anteriormente, realizar diversas aproximaciones experimentales para su puesta a punto.

3.4.1. Caracterización y selección de los anticuerpos monoclonales necesarios para desarrollar el ELISA.

El diseño del ELISA tipo sándwich para la determinación del SC5b-9 implica la utilización de dos AcM, uno de captura y otro de relevado. Nos pareció más acertado la utilización de un AcM anti-C5 para capturar y un anti-C9 de revelado con el objetivo de ver aumentada la intensidad de la señal de reconocimiento del complejo, ya que este está integrado por más moléculas de C9 que de C5. La selección de la pareja de Ac pasaba porque ambos reconocieran a los Ag cuando están formando parte del TCC (Terminal Complement Complex), complejo formado por la unión del MAC más el SC5b-9.

3.4.1.1. Selección del anticuerpo de revelado anti-C9

Para determinar qué AcM anti-C9 podía ser el más adecuado para este ensayo realizamos un ELISA tipo sándwich.

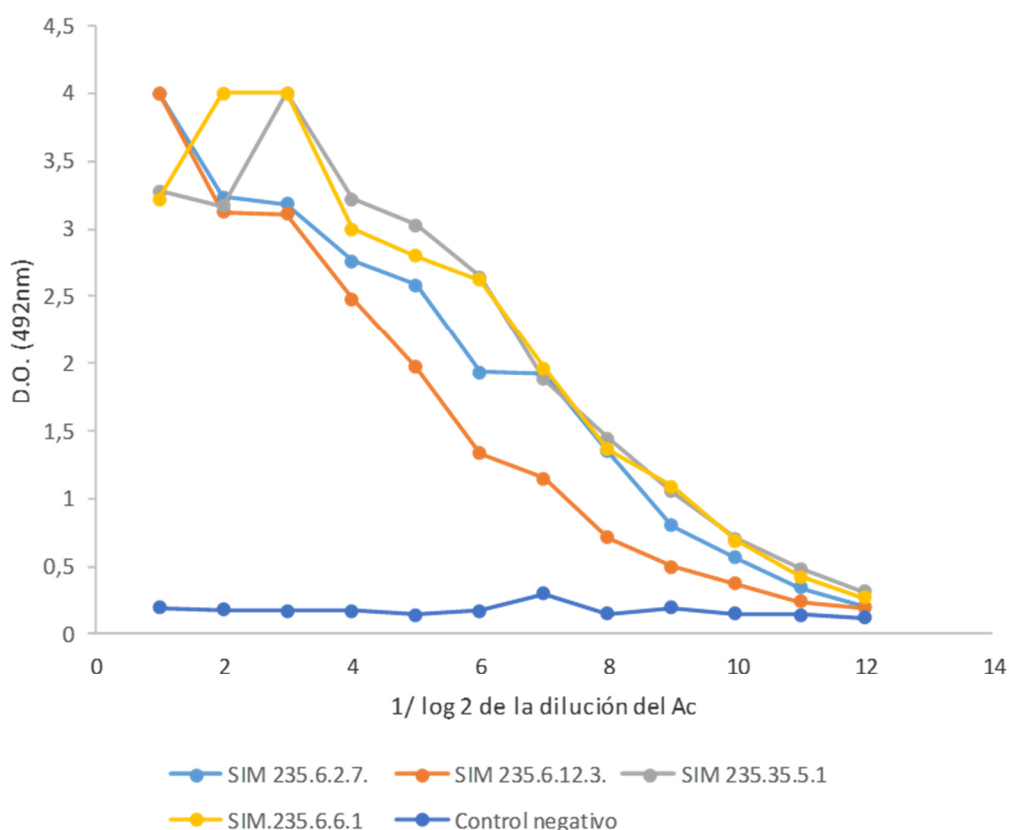


Figura 3.21. Selección del AcM anti-C9 que mejor detecta SC5b-9. La grafica muestra los resultados del ELISAc del complejo SC5b-9 a partir de SHN-Act empleando el sobrenadante de cultivo de 4 hibridomas productores de Ac anti-C9

El ELISA se llevó a cabo capturando con el AcM SIM 225.8.2.4 (Ac seleccionado en apartado 3.1.1.4.1 de *Resultados*), utilizando el complejo SC5b-9 obtenido a partir de la activación de suero siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.1 de *Materiales y Métodos* y revelamos con cada uno de los AcM anti-C9. Como se muestra en la figura 3.22 todos ellos, y de forma similar, reconocían al componente C9 formando parte del complejo.

A la vista de los resultados, cualquiera podía ser utilizado en el ensayo final, pero decidimos realizar una selección más exhaustiva. Para ello, cada uno de los Ac fueron purificados, marcados con biotina y probados en el mismo ensayo de forma independiente y también en combinaciones.

Como puede verse en la figura 3.22 los mejores resultados se obtuvieron cuando el revelado se realizó con una mezcla equimolecular de los AcM SIM 235.6.2.7 y SIM 235.6.6.1 a una dilución 1:100.

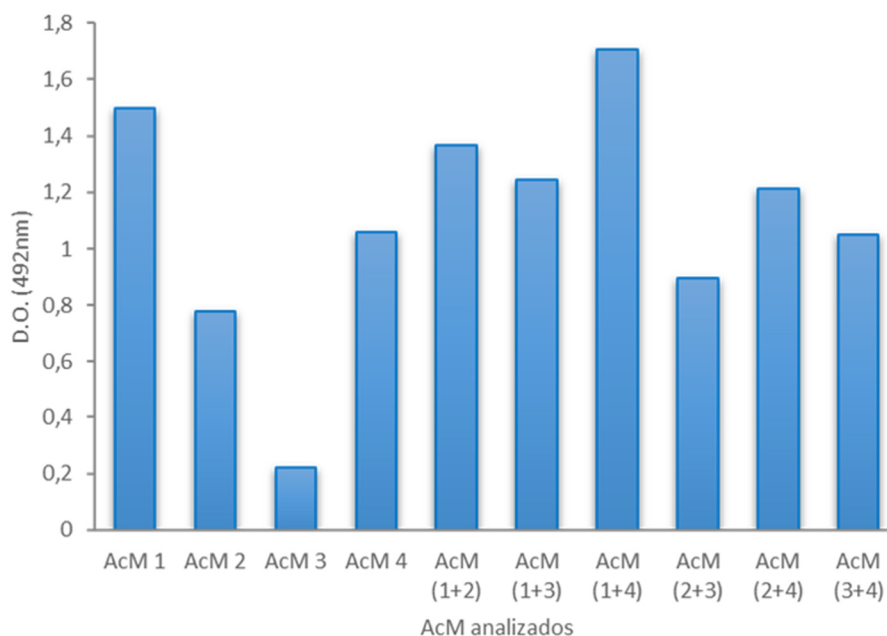


Figura 3.22. Selección del AcM anti-C9 biotinilado. Las barras representan la D.O. que obteníamos en el ELISA sándwich cuando detectamos SC5b-9 empleando SIM 235.6.2.7 (AcM 1), SIM 235.6.12.3 (AcM 2), SIM 235.35.5.1 (AcM 3), SIM 235.6.6.1 (AcM 4) o combinaciones de los mismos.

3.4.1.2 Selección del anticuerpo monoclonal anti-C5

En primer lugar comprobamos que el AcM SIM 225.8.2.4 seleccionado era adecuado para este ensayo. Tanto este AcM como los de la fusión SIM 376 eran buenos Ac de captura, pero debíamos desechar inicialmente los que fueran de isotipo IgG1. El hecho de que el anti-C9 fuera de isotipo IgG1 condicionaba el isotipo del Ac de captura. Si queríamos trabajar con sobrenadantes de cultivo, menos laborioso que si se utilizan Ac purificados y marcados, el isotipo de los dos Ac, captura y revelado, debe ser diferente. Los que cumplían ambos requisitos: capturar el componente C5 y tener isotipo de otra subclase diferente a la IgG1 podrían ser utilizados. En esa situación se encontraban el AcM SIM 376.39.4.1, el SIM 376.35.5.1 y el SIM 376.72.2.2. En la figura 3.23 se muestran los resultados de los tres inmunoensayos que empleamos para la selección del AcM de captura del C5.

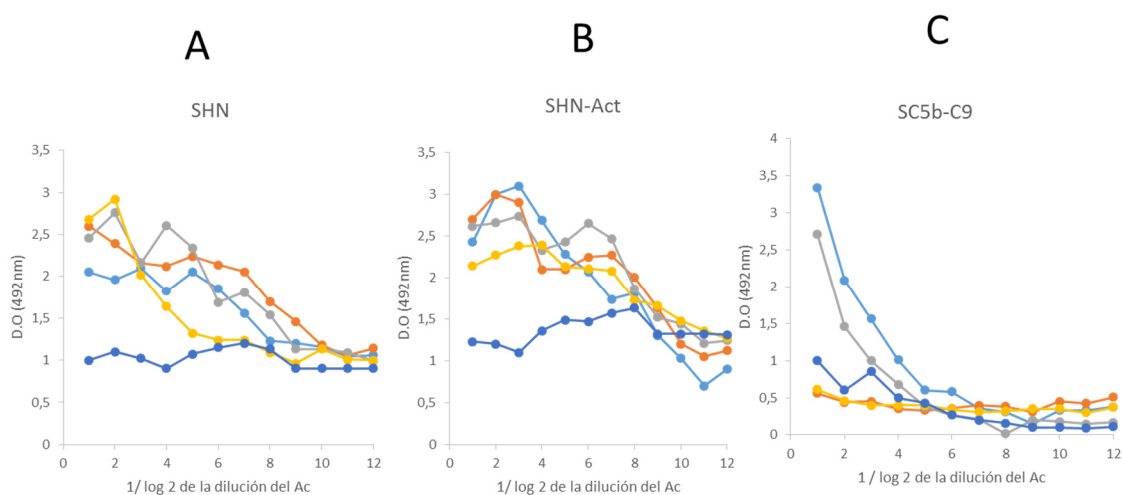


Figura 3.23. Selección de AcM de captura frente al componente C5. Se midió la capacidad de los SIM 225.8.2.4 (●), SIM 376.39.4.1 (●), SIM 376.55.1.1 (●), SIM 376.72.2.2. (●) y control negativo (AcM negativo) (●) para capturar C5b a partir de SHN (A), SHN-Act (B) y SC5b-9 purificado (C).

Se realizó un ELISA de captura de la proteína C5 en una muestra de SHN marcado con biotina. El resultado obtenido fue similar con todos los AcM utilizados, aunque se apreciaba un pequeño aumento en la reactividad del SIM 376.39.4.1 (figura 3.23A).

Posteriormente, llevamos a cabo una captura del componente C5, pero en un SHN en el que previamente se había activado el C' como se describe en el apartado 2.6.2.1 de *Materiales y Métodos* y al que denominamos SHN-Act. Como se observa en la figura 3.23B de nuevo todos los AcM reconocían el componente C5, pero ahora sí estaba insertado en el complejo TCC.

Por último, realizamos el ELISA sándwich capturando el complejo SC5b-9 del suero activado y revelando con los AcM anti-C9 seleccionado (figura 3.23C). Esta era la forma de confirmar que el AcM anti-C5 capturaba este componente del complejo y no sólo a la forma nativa. El Ac que mejor se adaptaba a este ensayo fue el SIM 225.8.2.4., quizás porque el epítipo que reconoce este Ac en el C5 dentro del complejo es más asequible que los epítipos para el resto de AcM o porque los impedimentos estéricos entre ambos Ac, captura y revelado, son menores.

La mayoría de los AcM desarrollados en nuestro laboratorio frente a los componentes del complemento son sometidos a una selección por CF para ver si reconocen al componente activado sobre una superficie activadora como son, en nuestro caso, los promastigotes de *Leishmania* opsonizados con SHN (apartado 2.5.4 de *Materiales y*

Métodos). No es de extrañar que de la colección de Ac que existen en el laboratorio frente a las proteínas de complemento un alto porcentaje reconozca al componente en su forma activada como es el caso del AcM seleccionado para este ensayo anti-C5 y anti-C9.

3.4.2. Purificación del complejo SC5b-9

La preparación de este complejo se llevó a cabo para disponer de un producto estándar que pudiera utilizarse en el ELISA sándwich en el caso de querer realizar ensayos cuantitativos. Para separar este complejo, previamente formado en un SHN (2.6.2.1 de *Materiales y Métodos*) del resto de proteínas, realizamos una purificación por inmunoafinidad realizando dos purificaciones consecutivas, la primera empleando el AcM anti-C5 y la segunda el anti-C9. Ambos Ac fueron purificados y acoplados a una matriz de glyoxal (2.6.2.1 de *Materiales y Métodos*) y empaquetados independientemente en dos columnas. 20 ml de suero activado se hizo pasar primero por la columna “anti-C5” y, posteriormente, el producto eluido de esta, previo tratamiento, se pasaba a través de la columna “anti-C9”. La figura 3.24 muestra el perfil de elución de las proteínas retenidas empleando como eluyente NH_4OH 1M.

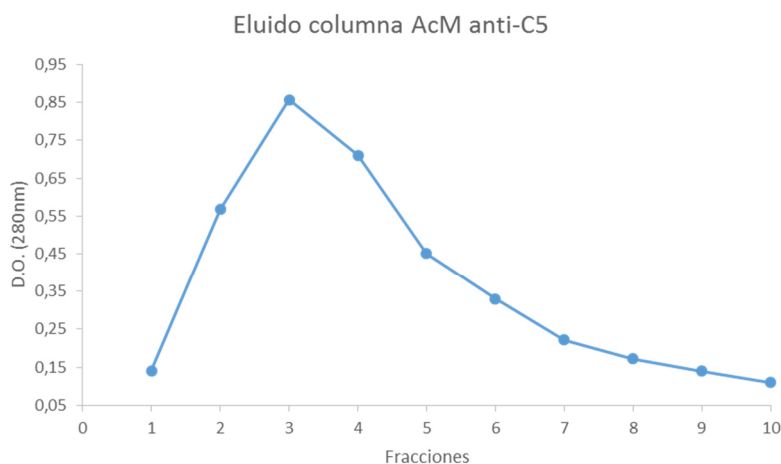


Figura 3.24. Elución de columna de afinidad AcM anti-C5. La figura muestra el perfil de elución de las proteínas del SHN-Act retenidas al pasar por la columna del AcM anti-C5.

Antes de proceder a la obtención final del producto de interés, el SC5b-9, comprobamos mediante ELISA tipo sándwich que este complejo se encontraba formado parte del producto eluido en la mezcla de las fracciones seleccionadas. El resultado se muestra en

la figura 3.25. Se muestra que el eluido de la columna presenta la misma cantidad de SC5b-9 que una dilución 1:10 del SHN-activado.

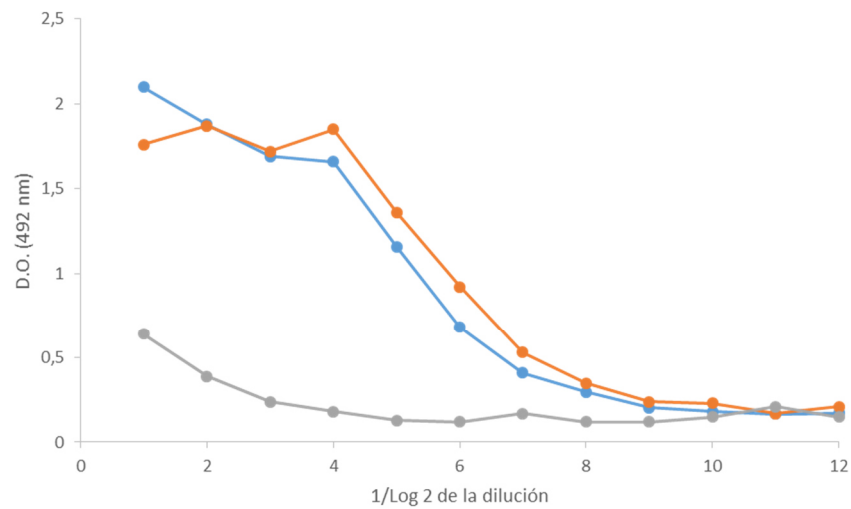


Figura 3.25. ELISA sandwich de determinación de SC5b-9. Se analizó la cantidad de SC5b-9 que había en SHN-Act (●), Eluido de columna anti-C5 (■), y filtrado de columna anti-C5 (●).

Una vez confirmada la presencia del complejo se procedió a pasar el eluido de la primera columna a través de la segunda columna de inmunofinidad anti-C9. El perfil de elución tras el paso por la segunda columna se representa en la figura 3.26.

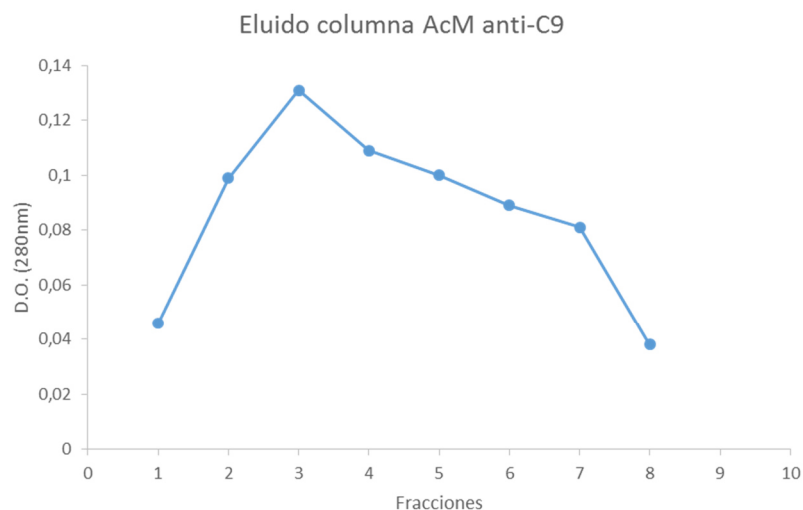


Figura 3.26. Elución de columna de afinidad AcM anti-C9. La figura muestra el perfil de elución de las proteínas del SHN-Act retenidas al pasar por la columna del AcM anti-C9, después de pasar a través de ella el eluido de la columna de afinidad del AcM anti-C5.

Las fracciones 2, 3, y 4 se mezclaron, se dializaron frente a PBS, se valoró la cantidad de proteína por espectrofotometría y se analizaron por SDS-PAGE y WB en condiciones no reductoras. El resultado se muestra en la figura 3.27.

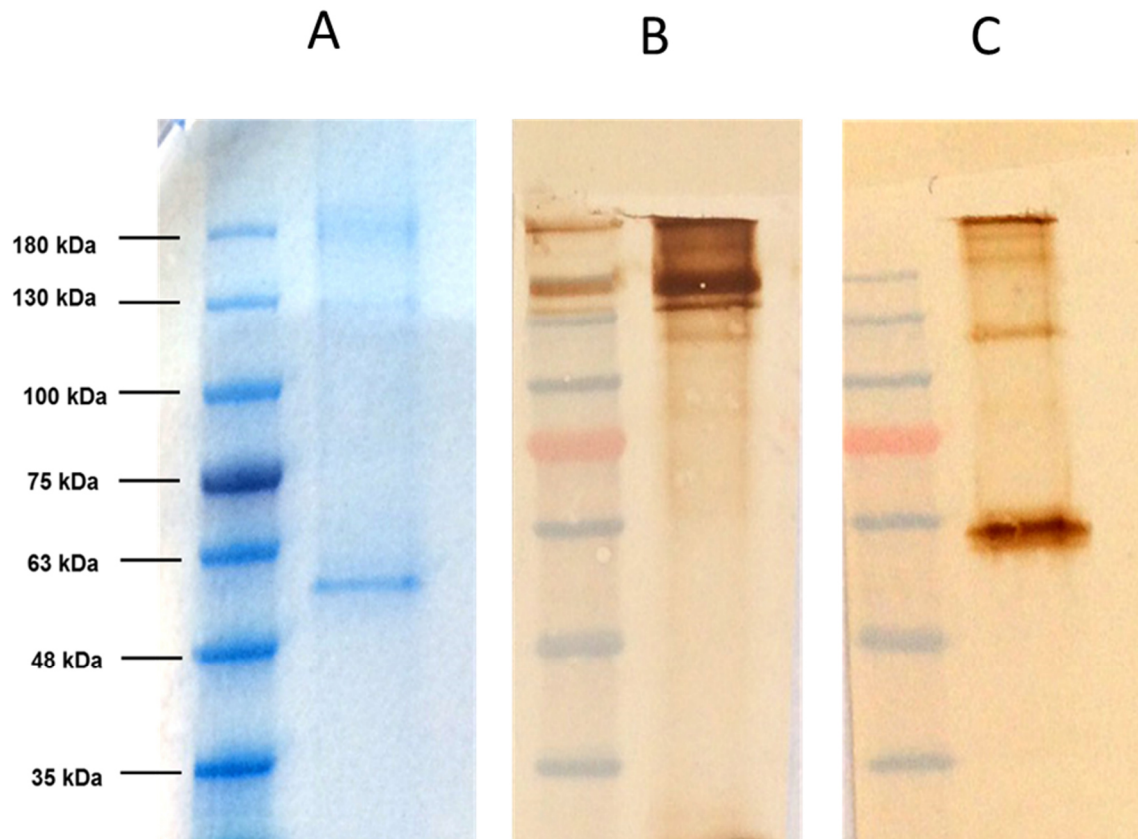


Figura 3.27. Análisis de la purificación de SC5b-9. Las fracciones eluidas de la columna de anti-C9 se analizaron por SDS-PAGE (A), y posterior WB en condiciones no reductoras revelando con un AcM anti-C5 (B) o anti-C9 (C).

En la tinción observamos bandas de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 200 y 60 kDa. Por WB se comprobó la presencia del componente C5b (180 kDa), y del componente C9; aparece una banda mayoritaria a la altura de 60 kDa, y otra de 120 kDa, que podría corresponder a dímeros de C9, como ya describieron *Tedesco et al.*, [21].

3.4.3. Análisis de la concentración SC5b-9 en muestras de la seroteca

Las condiciones finalmente establecidas para el ELISA sándwich fueron capturar el componente C5 con el Ac SIM 225.8.2.4 y revelar con una mezcla equimolecular de SIM 235.6.2.7 y SIM 235.6.6.1 marcados con biotina a una dilución 1:100.

En estas condiciones calculamos en primer lugar el límite de detección de nuestro ensayo de ELISA.

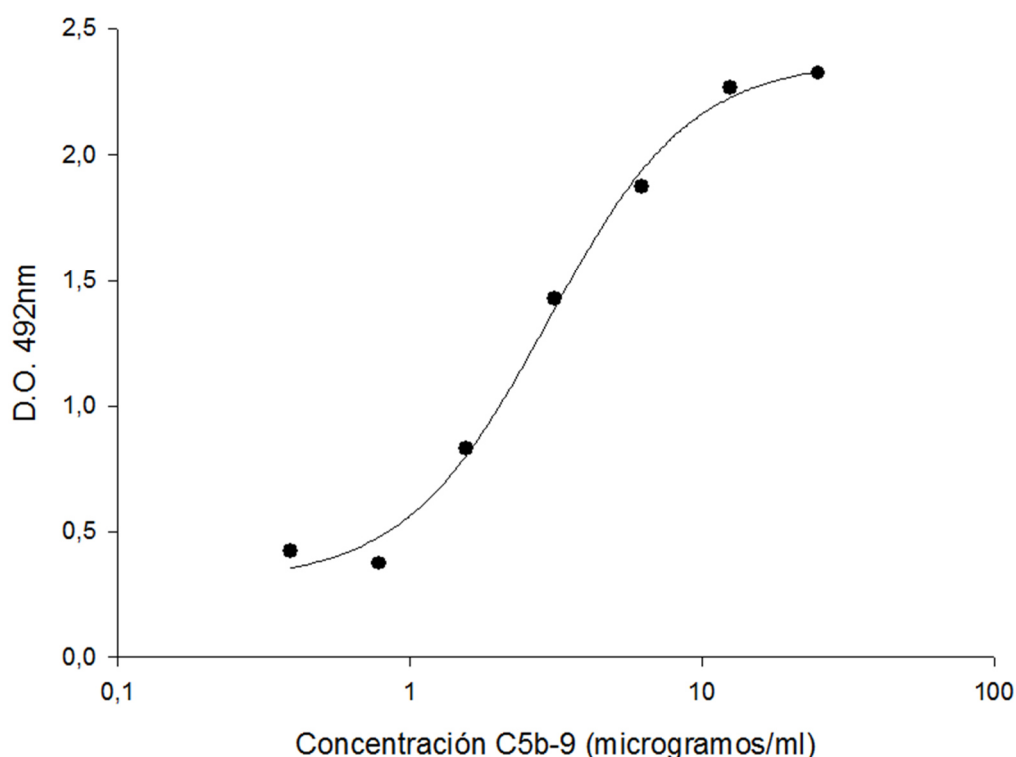


Figura 3.28. Ajuste a una curva logística de cuatro parámetros de los valores obtenidos en ELISA sandwich para determinación SC5b-9. El ajuste nos permite determinar EC₅₀ y el límite de detección del inmunoensayo.

En la figura 3.28 se muestra el resultado que obtenemos cuando realizamos un ajuste de los valores obtenidos en el ELISA a una curva logística de cuatro parámetros. En estas condiciones nuestro ELISA tiene un EC₅₀ que se define como la concentración de antígeno que produce el 50% de la D.O., es de 2,96 µg/ml y un límite de detección de 0,549 µg/ml.

Como el valor medio en los sueros normales debe de ser inferior a 0,870 $\mu\text{g/ml}$ [7] los resultados sugieren que nuestro ELISA es un método adecuado para caracterizar este complejo en suero humano.

A continuación, analizamos la concentración de SC5b-9 que contenía el SHN-Act y que empleamos como control positivo en todos los ensayos. Realizamos tres determinaciones por duplicado, y comprobamos que en estas condiciones el SHN-Act tiene una concentración de $1,01 \pm 0,18 \text{ mg/ml}$ de SC5b-9.

Tras analizar los 191 sueros que constituían la seroteca detectamos el SC5b-9 en 21 de ellos (11%). En estos 21 medimos la concentración aproximada de SC5b-9 empleando el estándar purificado. Las concentraciones que tenían estaban comprendidas entre 0,5-50 $\mu\text{g/ml}$, como se muestra en la tabla 3.8. Salvo una de las muestras, en todos los sueros en los que detectamos elevación de SC5b-C9 la concentración era superior a lo que se considera normal ($<0,87 \mu\text{g/ml}$) [7].

La elevación del SC5b-9 se debe a una activación del sistema del C', por lo que empleando el ELISA desarrollado en el apartado 2.6.2.2 de *Materiales y Métodos* analizamos las tres vías de activación en los sueros que presentaban una elevación del complejo soluble. No se observó ninguna relación entre el porcentaje de activación y la elevación del SC5b-9 en los sueros.

El hecho de que estos 21 sueros tengan aumentados los niveles de SC5b-9 no implica necesariamente una patología, ya que también se produce una activación del complemento de modo soluble durante la recogida de las muestras y/o durante el almacenamiento a -80°C [30]. La exposición del suero de rata a temperaturas elevadas da como resultado una generación rápida de SC5b-9, pérdida gradual de actividad VA pero no una pérdida importante de actividad VC y VL. Por lo tanto, la autoactivación ligada a VA es la probable fuente de SC5b-9 [25]. En nuestro estudio, un 16,5% de los sueros que tenían una disminución de la activación de la VA presentaban elevación de las concentraciones de SC5b-9.

Tabla 3.8. Concentración de SC5b-9 determinada en suero por ELISA.

Suero	Concentración SC5b-9 (µg/ml)
1	54,29
2	19,78
3	20,60
4	32,00
5	27,96
6	5,07
7	12,74
8	2,65
9	4,87
10	15,16
11	5,68
12	20,60
13	12,43
14	0,58
15	41,68
16	5,88
17	9,71
18	4,27
19	4,17
20	20,70
21	5,68

La determinación de la concentración de C5a y de TCC son indicativos de la escisión de C5 y, por lo tanto, de la activación de la ruta lítica del complemento. Por cada molécula de TCC detectado también se genera una molécula de C5a. Esta es una molécula pequeña, con una vida media *in vivo* muy breve (menos de un minuto), en cambio el SC5b-9 es un complejo macromolecular soluble más estable que el C5a, por lo que es

preferible la determinación del mismo como un marcador para la escisión de C5 y, por tanto, de activación del C'.

Los niveles de C5a y SC5b-9 están relacionados con los niveles de activación de la vía terminal y se pueden medir como índice de diagnóstico/pronóstico de enfermedades que conllevan la activación y consumición del C. Como ya se ha comentado, en la mayoría de los casos la determinación de estos dos compuestos está estrechamente relacionada. Pero esto no es así siempre, por ejemplo, los resultados generados por *Mollnes et al.*, mostraron que sólo el SC5b-9 se correlacionaba con brotes de lupus en una comparación de analitos relacionados con el complemento, incluyendo C5a [19]. Esto sugiere que, dado que C5a se forma en paralelo con TCC, la unión de C5a a receptores *in vivo* podría disminuir la relevancia diagnóstica de esta molécula en ciertos estados de la enfermedad. Otros estudios realizados por *Bergseth et al.*, [4] mostraron que SC5b-9 aumenta más rápidamente y que este aumento es sostenido en comparación con C5a. Teniendo esto en cuenta, está claro que el SC5b-9 y el C5a se forman en paralelo y pueden detectarse por igual en la mayoría de las condiciones patógenas. Ambas moléculas son marcadores sensibles de la activación de la vía terminal, pero dada su estabilidad y su vida media en suero parece más adecuada la detección SC5b-9 que C5a.

3.5. Aplicaciones diagnósticas

3.5.1. Caracterización de la activación del complemento en muestras de pacientes con disfunciones del Sistema del Complemento

Para evaluar la utilidad diagnóstica de nuestros Ac se llevaron a cabo ensayos en muestras de pacientes obtenidas a través del Servicio de Inmunología del Hospital la Paz. En concreto, nos remitieron 3 muestras de plasma de un paciente que se emplearon para determinar la presencia de fD y pro-fD. Se procesaron y analizaron conjuntamente con el plasma de cada uno de los progenitores del paciente y de dos plasmas de sujetos control procesado en iguales condiciones que el resto de las muestras.

Las muestras se procesaron por SDS-PAGE con posterior desarrollo de un WB. La presencia de fD o pro-fD se puso de manifiesto en el WB empleando el anticuerpo monoclonal SIM 234.5.12.1. Como se observa en la figura 3.29 en uno de los plasmas control y en la última muestra del paciente aparece una proteína con un peso molecular ligeramente superior al del fD y que corresponde al pro-fD.

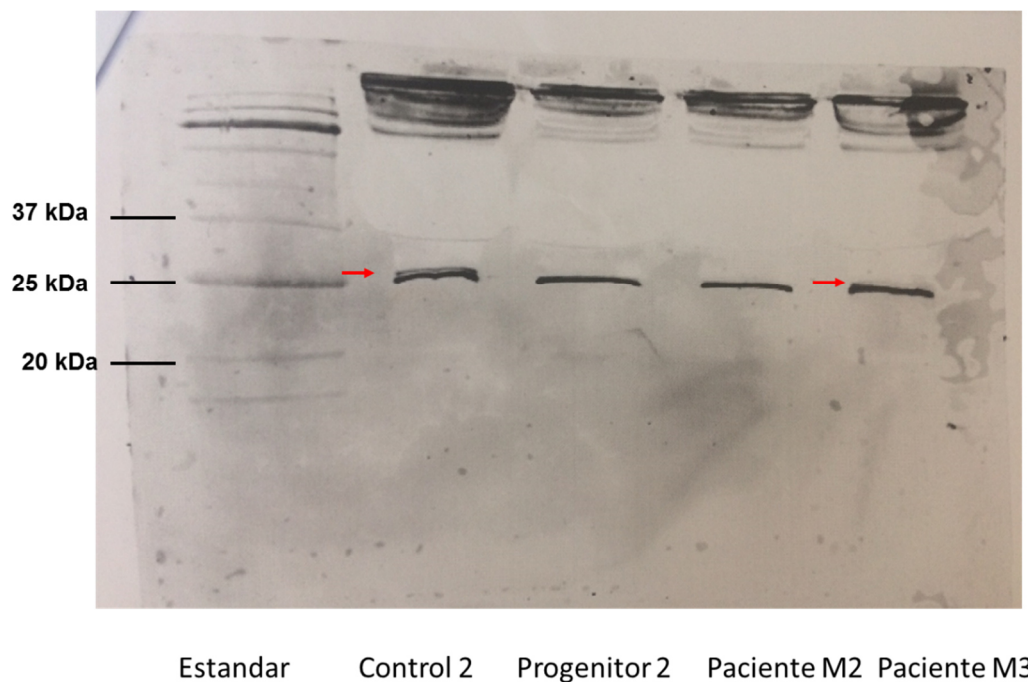


Figura 3.29. Análisis por WB de fD y pro-fD. Las muestras correspondientes a un suero control, suero de uno de los progenitores y dos muestras del paciente (M2 y M3) se analizaron en un gel SDS-PAGE 15% y posterior WB revelado con el AcM SIM 234.5.12.1. Las flechas rojas marcan la detección de una proteína de un peso molecular ligeramente superior a fD correspondiente a pro-fD.

El fD o adipsina es una proteína de 25 kDa requerida para la actividad de la VA. El factor D es una serín-proteasa que circula en la sangre de forma activa. Hasta hace unos años existía cierta controversia sobre si se producía como una proenzima o se secretaba en forma activa. Actualmente está aceptado que la proteasa MASP-3 de la VL convierte el pro-fD a la forma activa. De hecho, se ha observado que los ratones deficientes en MASP-1 y MASP-3 carecen de la VA [38]. Pero este no debe ser el único mecanismo de activación de fD, ya que en pacientes con Síndrome 3MC (Síndrome Malpuech–Michels–Mingarelli–Carnevale), que se caracterizan por un déficit en MASP-1 y MASP-3, existe una cierta actividad de la VA [12].

Generalmente, la presencia de pro-fD se ha asociado a patologías del C, como el síndrome 3MC, pero en trabajos recientes llevados a cabo en muestras de pacientes con

este síndrome, *Stheffen Thiel et al*, observaron que el suero normal también puede contener una cierta cantidad de pro-fD y además, que la ratio fD/pro-fD es muy variable, habiendo individuos que presentan cantidades similares de las dos isoformas e individuos en los que no aparece pro-fD [38]. Hasta la publicación de este trabajo, no se había detectado pro-fD en sueros normales probablemente debido a dos causas; la primera es que en la purificación de fD hay un primer paso que consiste en una cromatografía de intercambio iónico, de modo que como fD y pro-fD tienen distinto punto isoeléctrico se separaran en distintas fracciones, y la segunda causa es que la purificación de la proteína se analiza mediante ensayos funcionales de actividad, y como pro-fD no es activa no puede ser detectada [38].

Tras observar la presencia de pro-fD en el suero tanto del individuo control como en una de las muestras del paciente, procedimos a valorar la capacidad de activación del complemento por las tres vías. Los resultados se muestran en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Porcentaje de activación del complemento en muestras de plasma. El valor corresponde al % respecto al suero positivo estándar establecido en la Unidad de Inmunología Microbiana del Instituto Carlos III de Majadahonda.

	% Vía Clásica	% Vía Alternativa	% Vía Lectinas
Control 1	195	163	101
Control 2	181	125	163
Progenitor 1	139	117	390
Progenitor 2	126	112	38
Paciente M1	119	32	33
Paciente M2	108	86	34
Paciente M3	77	133	33
Control interno	100	100	100
Control Negativo	0	0	0

Podemos ver que, tanto las muestras del paciente, como la de sus padres pueden considerarse en el rango del comportamiento de SHN. Ahora bien, cuando analizamos la capacidad para activar el complemento por la VL, en la muestra del progenitor 2 y las tres muestras del paciente se observó una disminución del 70%. Esta disminución podría ser debida a una alteración en algunas de las proteasas que inician esta VL y,

concretamente, en MAPS-3 (ya que en la muestra M3 del paciente detectamos pro-fD), aunque no necesariamente tiene que estar ligada a esta proteasa puesto que, como ya hemos comentado, junto con la MASP-3 debe de existir alguna otra proteasa capaz de activar fD.

3.5.2. Ensayos de inhibición empleando los anticuerpos monoclonales

Actualmente el tratamiento de algunas enfermedades en las que está implicado el C pasa por la inhibición de la activación de alguna de sus vías mediante el empleo de AcM. El abordaje utilizado más frecuentemente es la inhibición de la formación de las convertasas, tanto de la C3-convertasa, como de la C5-convertasa. Para comprobar si alguno de los AcM obtenidos a lo largo de este trabajo podían ser propuestos como herramientas terapéuticas para regular la activación del C, analizamos en un ensayo de hemólisis la capacidad de 6 Ac para inhibir, tanto la VC (Hemólisis de eritrocitos de carnero), como la VA (Hemólisis de eritrocitos de conejo). Los datos se muestran en la figura 3.29 y figura 3.30.

Los AcM utilizados fueron:

- Anti-C1q: SIM 194.13.2.1
- Anti-P: SIM 246.1.1.1
- Anti-C3: SIM 27.A.49
- Anti-C5: SIM 225.3.2.1
- Anti-C9: SIM 236.6.2.7
- Anti-C5a: SIM 278.16.1.1

Cuando analizamos la hemólisis de eritrocitos de carnero (VC) observamos que los AcM anti C3 y anti C9 inhiben la hemólisis en torno a un 40%, mientras que el AcM anti C1q únicamente la inhibe un 15%. Los AcM anti P, C5 y C5a no inhiben la hemólisis de eritrocitos de carnero.

Vía Clásica

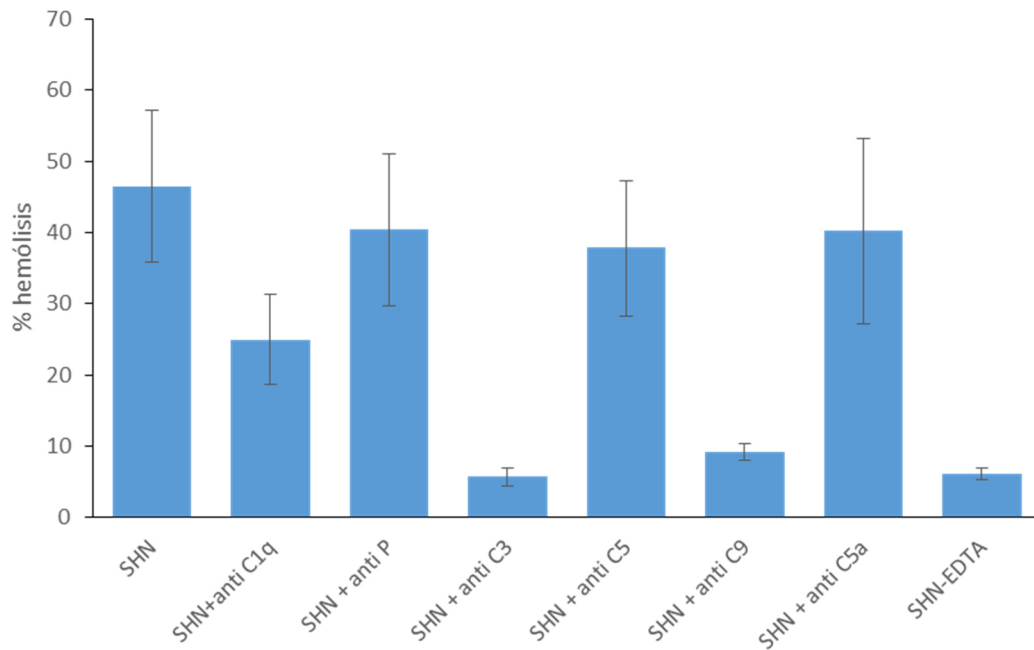


Figura 3.30. Inhibición de la hemólisis de eritrocitos de carnero empleando AcM frente a factores de complemento. La gráfica muestra el porcentaje de hemólisis que obtenemos en presencia de SHN, SHN preincubado con distintos AcM, o SHN-EDTA. Los datos representan la media $\pm$ ES de los valores obtenidos para cinco sueros humanos.

Cuando analizamos la lisis de eritrocitos de conejo, activadores clásicos de la VA, observamos que únicamente el anticuerpo anti- P era capaz de inhibir la hemólisis. Ni el Ac anti-C3, ni el anti-C9, que inhibían la hemólisis por la VC, inhibían ahora la VA. Esto podría ser debido a que se considera que la VC es la vía iniciadora de la activación del complemento y la VA es la amplificadora. Se ha estimado que cuando se activa el complemento de forma soluble en suero empleando agregados de Ig y zymosan, la cantidad de C3 convertasa que se produce por la VC es 100 veces menor que la que se produce por la VA [26].

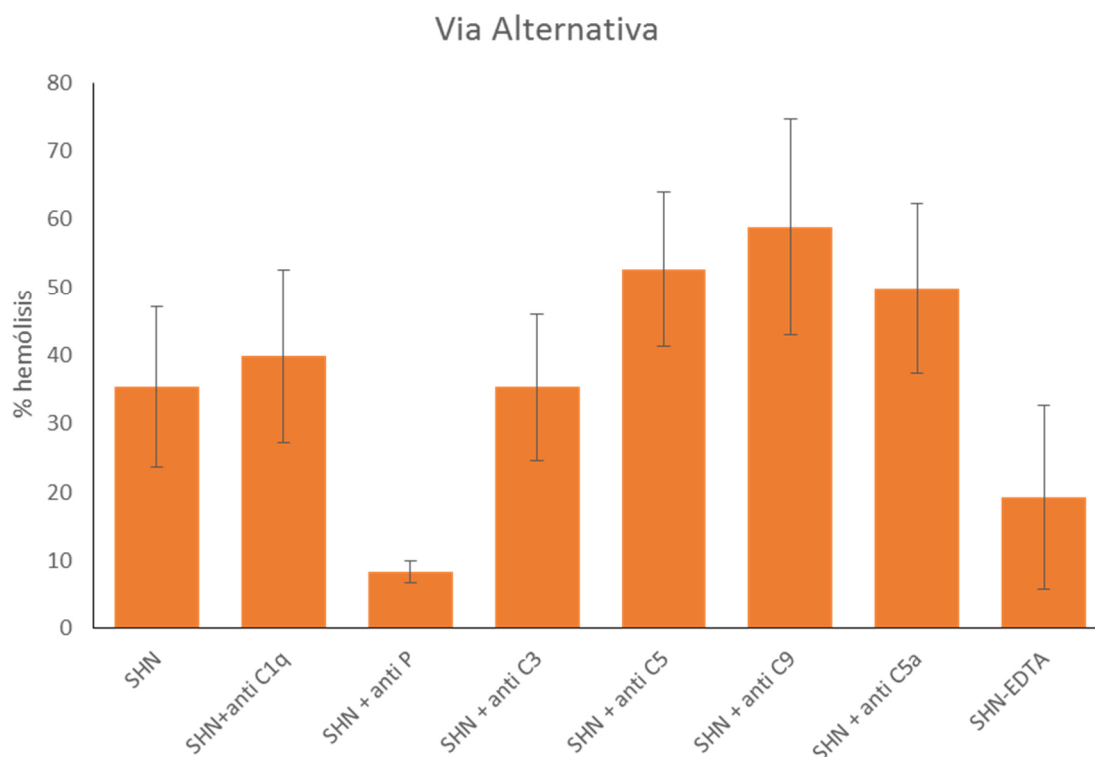


Figura 3.31. Inhibición de la hemólisis de eritrocitos de conejo empleando AcM frente a factores de complemento. La gráfica muestra el porcentaje de hemólisis que obtenemos en presencia de SHN, SHN preincubado con distintos AcM, o SHN-EDTA. Los datos representan la media $\pm$ ES de los valores obtenidos para cinco sueros humanos.

3.5.3. Detección de inmunocomplejos en pacientes con penfigoide ampolloso

Para investigar la posible utilidad de los Ac desarrollados para inmunofluorescencia se realizó un estudio en cortes de criostato de piel de un paciente con penfigoide ampolloso, una enfermedad autoinmune en la que se ha descrito que se producen depósitos de IC en la unión dermo-epidérmica. La figura 3.31 corresponde al marcaje utilizando un anticuerpo anti-C3 SIM 27.A.49 en el que se aprecia claramente inmunorreactividad en el tejido del paciente (figura 3.31A), pero no en el tejido de un sujeto sano (figura 3.31B). Tampoco se observó señal cuando se omitió el Ac primario ni cuando se utilizó el anticuerpo SIM 6 como control negativo (datos no mostrados).

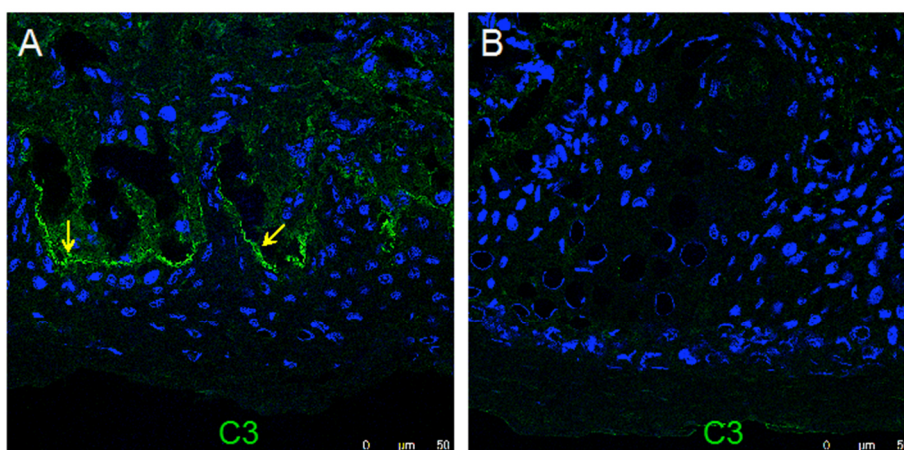


Figura 3.32. Localización por inmunofluorescencia en cortes de piel de un paciente con PA (A) o de un sujeto control (B) de C3 utilizando el anticuerpo SIM 27.A.49. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Las flechas amarillas señalan el marcaje en verde.

La señal de C3 que se detecta en la muestra de piel del paciente muestra un patrón lineal debido a la acumulación continua de la proteína a lo largo de la unión entre las dos capas de la piel.

Un marcaje similar en la unión dermo-epidérmica, pero más débil, se obtuvo utilizando un anticuerpo anti-C9 (SIM 235.6.2.7) en cortes de piel del paciente con PA, como se muestra en la imagen representativa de la figura 3.32A, mientras que se obtuvo una señal intensa utilizando un anticuerpo anti-P (SIM 246.1.1.1) en las mismas muestras del paciente; se presenta una imagen representativa en la figura 3.33A, sin embargo, no se observó inmunorreactividad con ninguno de los anticuerpos en la muestra de tejido sano (figuras 3.32B y 3.33B, respectivamente).

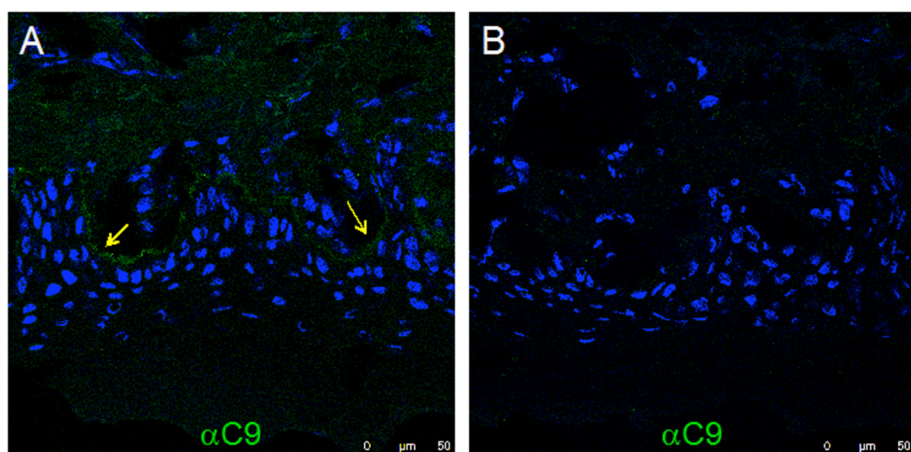


Figura 3.33. Localización por inmunofluorescencia en cortes de piel de un paciente con PA (A) o de un sujeto control (B) de C9 utilizando el anticuerpo SIM 235.6.2.5. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Las flechas amarillas señalan el marcaje en verde.

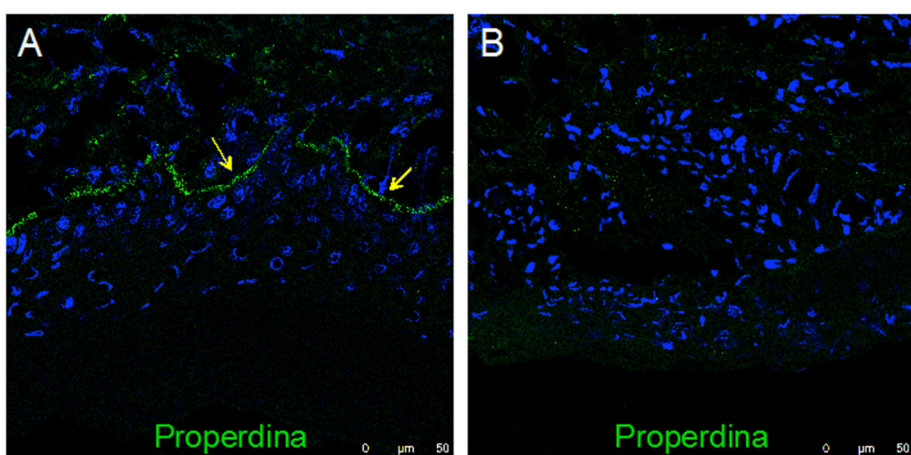


Figura 3.34. Localización por inmunofluorescencia en cortes de piel de un paciente con PA (A) o de un sujeto control (B) de P utilizando el anticuerpo SIM 246.1.1.1. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Las flechas amarillas señalan el marcaje en verde.



Conclusiones

4. CONCLUSIONES

1. La caracterización de los AcM de nuestra colección ha revelado la utilidad de los mismos para ser empleados en el desarrollo de inmunoensayos con fines diagnósticos, en concreto, para la determinación de la funcionalidad de las VC, VA y VL y para la determinación y cuantificación del producto SC5b-9 en el suero humano.
2. Disponemos de AcM específicos para caracterizar las disfunciones asociadas a la VC (anti-C1q y C4), a la VA (anti-P y fB) y a la Vía Lítica (anti-C5 y C9).
3. Con los AcM anti-C3 o productos de degradación de los mismos se ha demostrado que la región correspondiente al C3dg, localizada en la cadena α de la molécula de C3, es una zona altamente inmunogénica.
4. La bondad de los AcM anti-C5 se demuestra por el hecho de que todos pueden ser utilizados para cualquiera de las técnicas empleadas y en todos los inmunoensayos desarrollados con fines diagnósticos.
5. Tras haber obtenido y analizado alrededor de un centenar de AcM frente a distintos componentes del C', y comprobar que sólo uno de ellos reconoce un neoepítipo, se pone en evidencia que para la obtención de AcM frente a neoepítipos sería necesario utilizar una estrategia diferente.
6. El AcM anti-fD SIM 234.5.12.1 constituye una nueva herramienta para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la desregulación del complemento, ya que permite detectar las formas inactivadas del fD en el suero.

7. Los AcM SIM 27. A.49 (anti-C3) y SIM 235.6.2.5 (anti-C9) podrán ser utilizados en el diagnóstico de enfermedades asociadas a procesos de desregulación del complemento que cursan con depósitos de IC.
8. El análisis e inhibición de la lisis por Complemento permite proponer al AcM anti-P y al anti-C9 como herramientas terapéuticas, siendo el anti-C9 de mayor utilidad por inhibir solo la fase final de la activación, dejando íntegro el proceso de opsonización por C3b, importante en enfermedades infecciosas.
9. Ponemos a disposición del Sistema Nacional de Salud y de los investigadores nuevos ensayos de valoración de la actividad de la VC, VA y VL, así como de cuantificación del componente soluble SC5b-9, que cumplen los requisitos para ser utilizados con, al menos, las mismas garantías que los ensayos comerciales disponibles.
10. Los trabajos experimentales como el presente, englobados en proyectos públicos de I+D+i, demuestran que es posible la ciencia traslacional. Sin embargo, es necesario que las OTRIs asuman las competencias que les corresponden facilitando la interacción investigador-ámbito hospitalario para que lleguen a la clínica los avances obtenidos en los laboratorios de investigación básica.



Bibliografía

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdulkarim A, Craig TJ. Angioedema, Hereditary. 2018;
2. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J.Clin.Invest* 2017; 127:780-789
3. Barnum SR. Therapeutic Inhibition of Complement: Well Worth the Risk. *Trends Pharmacol.Sci.* 2017; 38:503-505
4. Bergseth G, Ludviksen JK, Kirschfink M, Giclas PC, Nilsson B, Mollnes TE. An international serum standard for application in assays to detect human complement activation products. *Mol.Immunol.* 2013; 56:232-239
5. Bernard J.Morley and Mark J.Walport. The complement, FactsBook, 2000
6. Blatt AZ, Pathan S, Ferreira VP. Properdin: a tightly regulated critical inflammatory modulator. *Immunol.Rev.* 2016; 274:172-190
7. Blom AM, Corvillo F, Magda M, Stasioljc G, Nozal P, Perez-Valdivia MA, Cabello-Chaves V, Rodriguez de CS, Lopez-Trascasa M, Okroj M. Testing the Activity of Complement Convertases in Serum/Plasma for Diagnosis of C4NeF-Mediated C3 Glomerulonephritis. *J.Clin.Immunol.* 2016; 36:517-527
8. Campistol JM, Arias M, Ariceta G, Blasco M, Espinosa M, Grinyo JM, Praga M, Torra R, Vilalta R, Rodriguez de CS. An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia.* 2013; 33:27-45
9. Claire L.Harris. Expanding horizons in complement drug discovery: challenges and emerging strategies , 2017
10. D.Díaz Martín MÚCALSMÁdMS. Respuesta inmune innata y sus implicaciones fisiopatológicas., 2017
11. Dixon BP, Gruppo RA. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr.Clin.North Am.* 2018; 65:509-525
12. Dobo J, Kocsis A, Gal P. Be on Target: Strategies of Targeting Alternative and Lectin Pathway Components in Complement-Mediated Diseases. *Front Immunol.* 2018; 9:1851
13. Dominguez M, Moreno I, Lopez-Trascasa M, Torano A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J Exp Med* 2002; 195:451-9

14. Galfre G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 1981; 73:3-46
15. Geerlings MJ, de Jong EK, den Hollander AI. The complement system in age-related macular degeneration: A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Mol.Immunol.* 2017; 84:65-76
16. Giang J, Seelen MAJ, van Doorn MBA, Rissmann R, Prens EP, Damman J. Complement Activation in Inflammatory Skin Diseases. *Front Immunol.* 2018; 9:639
17. Goding JW. Antibody production by hybridomas. *J Immunol Methods* 1980; 39:285-308
18. Goding, J. W. *Monoclonal Antibodies: principles and practice.* 2004. Academic Press. (GENERIC)

Ref Type: Generic

19. Grossman TR, Hettrick LA, Johnson RB, Hung G, Peralta R, Watt A, Henry SP, Adamson P, Monia BP, McCaleb ML. Inhibition of the alternative complement pathway by antisense oligonucleotides targeting complement factor B improves lupus nephritis in mice. *Immunobiology* 2016; 221:701-708
20. Harley y Klein. *Microbiología*, 2018
21. Hogasen K, Mollnes TE, Nurnberger W, Pausa M, Fukumori Y, Tedesco F. Characterization of soluble terminal complement complex assembled in C8beta-deficient plasma and serum. *Scand.J.Immunol.* 1998; 48:261-268
22. Huamin Henry. *AngioedemaTreatment & Management*, 2018
23. Johnson NM, Phillips MA. New Treatments for Hereditary Angioedema. *Skin Therapy.Lett.* 2018; 23:6-8
24. Kemper C, Hourcade DE. Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance. *Mol.Immunol.* 2008; 45:4048-4056
25. Kotimaa J, van der Pol P, Leijtens S, Klar-Mohammad N, Schilders G, Daha MR, Rutjes H, van KC. Functional assessment of rat complement pathway activities and quantification of soluble C5b-9 in an experimental model of renal ischemia/reperfusion injury. *J.Immunol.Methods* 2014; 412:14-23
26. Kusunoki Y. [Terminal complement complex (TTC) levels in plasma and urine from glomerular diseases: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibody against neoantigens of TCC]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1990; 65:74-85
27. Le KN, Gibiansky L, van Lookeren CM, Good J, Davancaze T, Loyet KM, Morimoto A, Strauss EC, Jin JY. Population Pharmacokinetics and

28. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015; 6:262
29. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol.* 2015; 6:257
30. Morgan AR, O'Hagan C, Touchard S, Lovestone S, Morgan BP. Effects of freezer storage time on levels of complement biomarkers. *BMC.Res.Notes* 2017; 10:559
31. Morgan BP, Walters D, Serna M, Bubeck D. Terminal complexes of the complement system: new structural insights and their relevance to function. *Immunol.Rev.* 2016; 274:141-151
32. Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Dev.Comp Immunol.* 2011; 35:1296-1308
33. Nielsen CH, Fischer EM, Leslie RG. The role of complement in the acquired immune response. *Immunology* 2000; 100:4-12
34. Nilsson UR, Nilsson B. Simplified assays of hemolytic activity of the classical and alternative complement pathways. *J.Immunol.Methods* 1984; 72:49-59
35. Nonaka M. Evolution of the complement system. *Curr.Opin.Immunol.* 2001; 13:69-73
36. Ossipow V, Laemmli UK, Schibler U. A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21:6040-6041
37. P.Bernad CB. Dermatitis ampollas autoinmunitarias subepidérmicas [Abstract]. *EMC_Dermatología* 2016;
38. Pihl R, Jensen L, Hansen AG, Thogersen IB, Andres S, Dagnaes-Hansen F, Oexle K, Enghild JJ, Thiel S. Analysis of Factor D Isoforms in Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale Patients Highlights the Role of MASP-3 as a Maturase in the Alternative Pathway of Complement. *J.Immunol.* 2017;
39. Preissner KP, Podack ER, Muller-Eberhard HJ. SC5b-7, SC5b-8 and SC5b-9 complexes of complement: ultrastructure and localization of the S-protein (vitronectin) within the macromolecules. *Eur.J.Immunol.* 1989; 19:69-75

40. Riedemann NC, Habel M, Ziereisen J, Hermann M, Schneider C, Wehling C, Kirschfink M, Kentouche K, Guo R. Controlling the anaphylatoxin C5a in diseases requires a specifically targeted inhibition. *Clin.Immunol.* 2017; 180:25-32
41. Roos A, Bouwman LH, Munoz J, Zuiverloon T, Faber-Krol MC, Fallaux-van den Houten FC, Klar-Mohamad N, Hack CE, Tilanus MG, Daha MR. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Mol.Immunol.* 2003; 39:655-668
42. Schuh R, Kremmer E, Ego E, Wasiliu M, Thierfelder S. Determination of monoclonal antibody specificity by immunoadsorption and western blotting. *J.Immunol.Methods* 1992; 152:59-67
43. Seelen MA, Roos A, Wieslander J, Mollnes TE, Sjoholm AG, Wurzner R, Loos M, Tedesco F, Sim RB, Garred P, Alexopoulos E, Turner MW, Daha MR. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J.Immunol.Methods* 2005; 296:187-198
44. Sim RB, DiScipio RG. Purification and structural studies on the complement-system control protein beta 1H (Factor H). *Biochem.J.* 1982; 205:285-293
45. Tak W and Mary E.Saunders. *The immune response basic and clinical principles*, 2006
46. Taylor P, Botto M, Walport M. The complement system. *Curr.Biol.* 1998; 8:R259-R261
47. Thurman JM, Kulik L, Orth H, Wong M, Renner B, Sargsyan SA, Mitchell LM, Hourcade DE, Hannan JP, Kovacs JM, Coughlin B, Woodell AS, Pickering MC, Rohrer B, Holers VM. Detection of complement activation using monoclonal antibodies against C3d. *J.Clin.Invest* 2013; 123:2218-2230
48. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 2001; 344:1058-1066
49. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* 2001; 344:1140-1144
50. Zuraw BL. Clinical practice. Hereditary angioedema. *N.Engl.J.Med.* 2008; 359:1027-1036