

<http://pathmicro.med.sc.edu/Portuguese/immuno-port-chapter7.htm>

IMUNOLOGIA – CAPÍTULO SETE

REAÇÕES ANTIGENO-ANTICORPO E TESTES SELECIONADOS

Dr Gene Mayer

Tradução: PhD. Myres Hopkins

[EM INGLÊS](#)

[EM ESPANHOL](#)

[SHQIP - ALBANIAN](#)

[CONTATO](#)

[BUSCA](#)

[E-MAIL
DR MYRES HOPKINS](#)

[ESCOLA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DA CAROLINA DO SUL](#)

[« Previous](#)

[Next »](#)

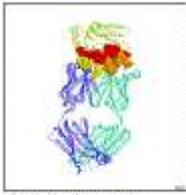
Male et al. Immunology
pp 67-74

OBJETIVOS

Descrever a natureza das reações Ag-Ac
Comparar e diferenciar afinidade e avidéz de anticorpos

Delienar a base para a especificidade e reatividade cruzada de anticorpos

Discutir os princípios dos testes cumumente usados em reações antígeno/anticorpo



From: Li, Y., Li, H., and O'Connell, V. J.,
Mol. Cell. Biochem. 25: 229, 2000

Figura 1

I. NATUREZA DAS REAÇÕES ANTÍGENO-ANTICORPO

A. Conceito de Chave e Fechadura

O sítio de combinação de um anticorpo é localizado na porção Fab da molécula e é construído a partir de **regiões hipervariáveis** de cadeias pesadas e leves. Estudos de cristalografia por raios X das interações antígeno-anticorpo mostram que o determinante antigênico se aninha em uma fenda formada pelo sítio de combinação do anticorpo como ilustrado na Figura 1. Dessa forma, nosso conceito de reações antígeno-anticorpo é o de uma chave (*i.e.* o antígeno) que cabe em uma fechadura (*i.e.* o anticorpo).

B. Ligações Não-covalentes

As ligações que unem o antígeno ao sítio de ligação do anticorpo são todas não-covalentes por natureza. Elas incluem pontes de hidrogênio, ligações eletrostáticas, forças de Van der Waals e hidrofóbicas. Ligações múltiplas entre o antígeno e o anticorpo garantem que o antígeno será ligado fortemente ao anticorpo.

C. Reversibilidade

Uma vez que as reações antígeno-anticorpo ocorrem via ligações não-covalentes, elas são por natureza reversíveis.

PALAVRAS CHAVE

Affinity
 Avidéz
 Especificidade
 Reatividade cruzada
 Aglutinação
 Hemaglutinação
 Aglutinina
 Titragem
 Pro-zona
 Hemaglutinação passiva
 Teste de Coombs Direto
 Teste de Coombs Indireto
 Inibição de hemaglutinação
 Ponto de equivalência
 Excesso de anticorpo
 Excesso de antígeno
 Imunodifusão radial
 Imunoeletroforese
 Contraimunoeletroforese
 Radioimunoensaio
 Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima
 RIA/ELISA Competitivo
 RIA/ELISA Não Competitivo
 Imunofluorescência
 Citometria de fluxo
 Fixação do complemento

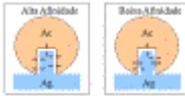


Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5

II. AFINIDADE E AVIDEZ

A. Afinidade

Afinidade de um anticorpo é a força da reação entre um único determinante antigênico e um único sítio de combinação no anticorpo. É a soma das forças de atração e repulsão que operam entre o determinante antigênico e o sítio de combinação do anticorpo, como ilustrado na Figura 2.

Afinidade é a constante de equilíbrio que descreve a reação antígeno-anticorpo, como ilustrado na Figura 3. A maioria dos anticorpos têm uma elevada afinidade por seus antígenos.

B. Avides

Avides é uma medida da força total de ligação de um antígeno contendo muitos determinantes antigênicos e anticorpos multivalentes. A avides é influenciada tanto pela valência do anticorpo como pela valência do antígeno. Avides é mais que a soma de afinidades individuais. Isto é ilustrado na Figura 4.

Repetindo, afinidade se refere à força de ligação entre um único determinante antigênico e um sítio de combinação de um anticorpo particular, enquanto que avides se refere à força total de ligação entre antígenos e anticorpos.

III. ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE CRUZADA

A. Especificidade

Especificidade se refere à habilidade de um sítio de combinação de anticorpo em particular de reagir com apenas um antígeno. Em geral, há um elevado grau de especificidade nas reações antígeno-anticorpo. Anticorpos podem distinguir diferenças em 1) estrutura primária de um antígeno, 2) formas isoméricas de um antígeno, e 3) estrutura secundária e terciária de um antígeno.

B. Reatividade cruzada

Reatividade cruzada se refere à habilidade de um sítio de combinação de anticorpo em particular de reagir com mais de um determinante antigênico ou a habilidade de uma população de moléculas de anticorpos de reagir com mais de um antígeno. A Figura 5 ilustra como reações cruzadas podem ocorrer. Reações cruzadas aparecem porque o antígeno envolvido na reação cruzada compartilha um mesmo **epitopo** com o antígeno imunizador ou porque ele

tem um epitopo que é estruturalmente semelhante ao epitopo no antígeno imunizante (multi-especificidade).

IV. TESTES DE REAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO

A. Fatores que afetam a medição de reações antígeno-anticorpo

A única forma de se saber se uma reação antígeno-anticorpo ocorreu é descobrir um jeito de detectar direta ou indiretamente os complexos formados entre o antígeno e o anticorpo. A facilidade da escolha sobre qual deles poderá detectar as reações antígeno-anticorpo vai depender de vários fatores.

1. Afinidade

Quanto maior a afinidade do anticorpo pelo antígeno, mais estável será a interação. Nesse caso, a facilidade com que se pode detectar a interação é maior.

2. Avidéz

Reações entre antígenos multivalentes e anticorpos multivalentes são mais estáveis e portanto mais fáceis de detectar.

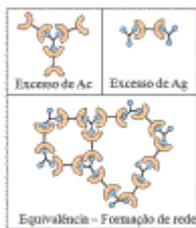


Figura 6

3. Razão entre antígeno e anticorpo

A razão entre o antígeno e o anticorpo influencia a detecção dos complexos antígeno-anticorpo porque o tamanho dos complexos está relacionado com a concentração do antígeno e do anticorpo. Isto é mostrado na Figura 6.

4. Forma física do antígeno

A forma física do antígeno influencia em como se detecta sua reação com um anticorpo. Se o antígeno é particulado, geralmente se observa a aglutinação do antígeno pelo anticorpo. Se o antígeno é solúvel, geralmente se pesquisa a precipitação de um antígeno após a produção de grandes complexos antígeno-anticorpo insolúveis.



Figura 7

B. Testes de Aglutinação

1. Aglutinação/Hemaglutinação

Quando um antígeno é particulado, a reação de um anticorpo com o antígeno pode ser detectada pela aglutinação (agrupamento) do antígeno. O termo geral aglutinina é usado para descrever anticorpos que aglutinam antígenos particulados. Quando o antígeno é um eritrócito é usado o termo **hemaglutinação**. Todos os anticorpos podem teoricamente aglutinar antígenos particulados mas IgM, devido à sua elevada valência, é particularmente uma boa aglutinina e se pode às vezes inferir que um anticorpo deve ser da classe IgM se for um bom anticorpo aglutinador.

a. Teste de aglutinação qualitativo

Testes de aglutinação podem ser usados de maneira qualitativa para investigar a presença de um antígeno ou um anticorpo. O anticorpo é misturado com o antígeno particulado e um teste positivo é indicado pela aglutinação do antígeno particulado. (Figura 7).

Por exemplo, células vermelhas do sangue de um paciente podem ser misturadas com um anticorpo dirigido a um antígeno de grupo sanguíneo para determinar o tipo sanguíneo da pessoa. Em um segundo exemplo, o soro de um paciente é misturado com células vermelhas do sangue de um tipo sanguíneo conhecido para pesquisar pela presença de anticorpos para aquele tipo sanguíneo no soro do paciente.

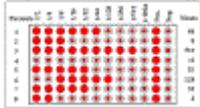


Figura 8

b. Teste de aglutinação qualitativo

Testes de aglutinação podem também ser usados para medir o nível de anticorpos para antígenos particulados. Neste teste, é realizada uma diluição seriada de uma amostra a ser testada para anticorpos e a seguir é adicionado um número fixo de células vermelhas sanguíneas, bactérias ou outro antígeno particulado. Em seguida é determinada a diluição máxima que ainda permite aglutinação. A diluição máxima que ainda permite aglutinação visível é chamada de **título**. Os resultados são descritos como a recíproca entra a diluição máxima que ainda permite aglutinação visível. A Figura 8 ilustra o teste quantitativo de hemaglutinação.

Efeito prozona – Ocasionalmente é observado que quando a concentração do anticorpo é elevada (i.e. diluições menores) não há aglutinação, mas quando a amostra é posteriormente diluída ocorre a aglutinação (Veja Paciente 6 na Figura 8). A ausência de aglutinação em altas concentrações de anticorpos é chamada de efeito **prozona**. A ausência de aglutinação no efeito prozona é devida ao excesso de anticorpos resultando em complexos muito pequenos que não se aglomeram para produzir aglutinação visível.

c. Aplicações dos testes de aglutinação

i. Determinação dos tipos sanguíneos ou de anticorpos para antígenos de grupos sanguíneos.

ii. Avaliar infecções bacterianas

ex. O aumento em título de um anticorpo dirigido a uma bactéria em particular indica uma infecção por aquele tipo bacteriano. N.B. um quadruplo em aumento do título é geralmente considerado como um aumento significativo de título de anticorpos.

d. Considerações práticas

Embora o teste seja de fácil execução, é apenas semi-quantitativo.



Figura 9

2. Hemaglutinação passiva

Os testes de aglutinação só funcionam com antígenos particulados. Entretanto, é possível se cobrir eritrócitos com um antígeno solúvel (ex. Antígeno viral, um polissacarídeo ou hapteno) e usar as células vermelhas sanguíneas cobertas em um teste de aglutinação com anticorpos para o antígeno solúvel (Figura 9). Isso é chamado de hemaglutinação passiva. O teste é realizado tal como o teste de aglutinação. As aplicações incluem a detecção de anticorpos para antígenos solúveis e detecção de anticorpos para antígenos virais.



Figura 10

3. Teste de Coombs (Teste de Antiglobulina)

a. Teste de Coombs Direto

Quando anticorpos se ligam a eritrócitos, eles nem sempre resultam em aglutinação. Isso pode se dever à relação antígeno/anticorpo, em que o antígeno em excesso, o anticorpo em excesso ou em alguns casos cargas elétricas nas células vermelhas sanguíneas prejudicam a eficiência da ligação cruzada entre as células. Esses anticorpos que ligam mas não causam aglutinação das células vermelhas sanguíneas são às vezes referidos como anticorpos incompletos. Isso não quer dizer de forma nenhuma que os anticorpos sejam diferentes em sua estrutura, embora isso seja o que se pensava que fosse o caso. Pelo contrário, esta é uma definição apenas funcional. Para detectar a presença de anticorpos não-aglutinadores nas células vermelhas sanguíneas, simplesmente se adiciona um segundo anticorpo diretamente contra a imunoglobulina (anticorpo) que cobre as células vermelhas. Esta anti-imunoglobulina pode agora fazer reação cruzada com as células vermelhas sanguíneas e levar à aglutinação. Este teste é ilustrado na Figura 10 e é conhecido como teste de Coombs Direto.



Figura 11

b. Teste de Coombs Indireto

Se for necessário saber se uma amostra de soro tem anticorpos dirigidos contra uma célula vermelha sanguínea em particular e você quer se assegurar de que também vai detectar anticorpos não-aglutinadores potenciais na amostra, é realizado um teste de Coombs Indireto (Figura 11). Este teste é feito incubando as células vermelhas sanguíneas com a amostra de soro, lavando-se para retirar quaisquer anticorpos não ligados e depois adicionando um segundo reagente anti-imunoglobulina para fazer ligação cruzada com as células.



c. Aplicações

Entre estas se incluem a detecção de anticorpos (Rh) anti-fator rhesus . Anticorpos contra o fator Rh geralmente não aglutinam células vermelhas sanguíneas. Portanto, células vermelhas de crianças Rh⁺ nascidas de mães Rh⁻, que têm anticorpos anti-Rh, devem estar cobertas por esses anticorpos. Para verificar isso, é realizado um teste de Coombs direto. Para ver se a mãe tem anticorpos anti-Rh no seu soro se realiza um teste de Coombs Indireto.

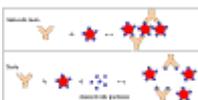


Figura 12

4. Inibição de Hemaglutinação

O teste de aglutinação pode ser modificado para ser usado na medição de antígenos solúveis. Este teste é chamado inibição de hemaglutinação. É chamado inibição de hemaglutinação porque é medida a habilidade de um antígeno solúvel de inibir a aglutinação por anticorpos de células vermelhas sanguíneas cobertas por antígenos. Neste teste, uma quantidade fixa de anticorpos dirigidos ao antígeno em questão é misturada com uma quantidade fixa de células vermelhas sanguíneas cobertas com o antígeno (veja hemaglutinação passiva acima). Também estão incluídas na mistura diferentes quantidades da amostra a ser analisada para a presença do antígeno. Se a amostra contém o antígeno, o antígeno solúvel irá competir com o antígeno que cobre as células vermelhas sanguíneas pela ligação com os anticorpos, inibindo dessa forma a aglutinação das células vermelhas sanguíneas, como ilustrado na Figura 12.

Pela diluição seriada da amostra você pode quantificar o antígeno na sua amostra desconhecida pelo seu título. Este teste é geralmente usado para quantificar antígenos solúveis e é sujeito às mesmas considerações práticas do teste de aglutinação.

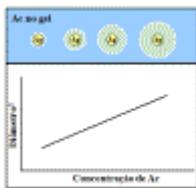


Figura 13

C. Testes de precipitação

1. Imunodifusão Radial (Mancini)

Na imunodifusão radial o anticorpo é incorporado no gel de ágar quando este for derramado e diluições diferentes do antígeno são aplicadas nos poços perfurados no agar. À medida que o antígeno se difunde no gel ele reage com o anticorpo e quando o ponto de equivalência é atingido é formado um anel de precipitação, conforme é ilustrado na Figura 13.

O diâmetro do anel é proporcional ao log da concentração do antígeno, uma vez que a quantidade de anticorpo é constante. Portanto, ao correr diferentes concentrações de um antígeno padrão pode-se gerar uma curva padrão a partir da qual se pode quantificar a quantidade de um antígeno em uma amostra desconhecida. Por essa razão, este é um teste quantitativo. Se aparecerem no teste mais de um anel, ocorreram mais de uma reação antígeno/anticorpo. Isso pode ser devido à mistura de antígenos ou de anticorpos. Este teste é comumente usado em laboratório clínico para a determinação dos níveis de imunoglobulina em amostras de pacientes.

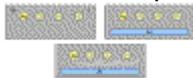


Figura 14

2. Imunoeleetroforese

Em imunoeleetroforese, uma mistura complexa de antígenos é aplicada em um poço perfurado em um gel de ágar e os antígenos são submetidos à eletroforese, de forma que os antígenos são separados de acordo com suas cargas. Após a eletroforese, um sulco é feito no gel e os anticorpos são adicionados. À medida que os anticorpos se difundem no ágar são produzidas linhas de precipitação na zona de equivalência quando ocorre uma reação antígeno/anticorpo, conforme ilustrado na Figura 14.

Este teste é usado para a análise qualitativa de misturas complexas de antígenos, embora uma medida grosseira da quantidade (espessura da linha) pode ser obtida. Este teste é comumente usado para a análise de componentes no soro de um paciente. O soro é colocado no poço e anticorpos para soro total é colocado no sulco. Através da comparação com o soro normal, é possível determinar se há deficiências em um ou mais componentes do soro ou se há uma super-abundância de algum dos componentes do soro (espessura da linha). Este teste pode também ser usado para avaliar a pureza das proteínas de soro isoladas.



Figura 15

3. Eletroforese contracorrente

Neste teste o antígeno e o anticorpo são colocados em poços perfurados no gel de ágar e o antígeno e o anticorpo são submetidos à eletroforese um contra o outro, onde eles formam uma linha de precipitação como ilustrado na Figura 15. Este teste somente funciona se forem conseguidas as condições em que em que o antígeno e o anticorpo tenham cargas opostas. Este teste é primariamente qualitativo, embora a partir da espessura da banda você possa obter alguma medida da quantidade. Sua maior vantagem é a rapidez.

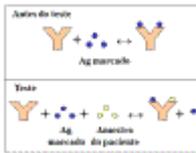


Figura 16



Figura 17

D. Radioimunoensaio (RIA)/Ensaio Enzimático de Imunoabsorção (ELISA)

Radioimunoensaios (RIA) são ensaios baseados na medição da radioatividade associada com complexos imunes. Em um teste particular, o marcador pode ser tanto o antígeno como anticorpo. Ensaios enzimáticos de Imunoabsorção (ELISA) são aqueles que são baseados na medição de uma reação enzimática associada com complexos imunes. Em um teste em particular, a enzima deve esta ligada ao antígeno ou ao anticorpo.

1. RIA/ELISA Competitivo para Detecção de Ac

O método e o princípio do RIA e ELISA para a medição de antígeno é mostrado na Figura 16. Pelo uso de quantidades conhecidas de um antígeno padrão não marcado pode-se gerar uma curva padrão, relacionando a radioatividade da enzima ligada versus quantidade do antígeno. A partir desta curva padrão pode-se determinar a quantidade de um antígeno em uma amostra desconhecida.

O ponto crucial do teste é a separação dos complexos imunes do restante dos componentes. Isso pode ser conseguido em muitas maneiras diferentes que servem como base para o nome atribuído ao ensaio:

a. Precipitação por sulfato de amônia

Sulfato de amônia (concentração final 33 - 50%) irá precipitar imunoglobulinas mas não muitos antígenos. Esta também é chamada técnica de Farr.

b. Anticorpo anti-imunoglobulina

A adição de um segundo anticorpo dirigido contra o primeiro anticorpo pode resultar na precipitação de complexos imunes e conseqüentemente na separação dos complexos e antígenos livres.

c. Imobilização do Anticorpo

O anticorpo pode ser imobilizado na superfície de uma pérola de plástico ou cobrindo a superfície de uma placa de plástico e assim os complexos imunes podem facilmente ser separados dos outros componentes pela simples lavagem das pérolas ou da placa (Figura 17). Este é o método mais comumente usado hoje em dia e é referido como RIA ou ELISA de fase Sólida. No laboratório clínico, RIA e ELISA competitivo são comumente usados para quantificar proteínas séricas, hormônios e metabólitos de drogas.

TESTE ELISA

Flash

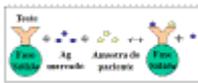


Figura 18

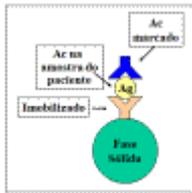


Figura 19

2. RIA/ELISA não-competitivo para Ag ou Ac

RIA e ELISAs não competitivos são também usados para a medição de antígenos e anticorpos. Na Figura 18, a pérola é coberta pelo antígeno e é usada para a detecção de anticorpo na amostra desconhecida. A quantidade do segundo anticorpo marcado ligado está relacionada com a quantidade de anticorpo na amostra desconhecida. Este ensaio é comumente empregado para a medição de anticorpos da classe IgE dirigidos contra um alérgeno em particular, pelo uso de um antígeno e anticorpos anti-IgE como reagente marcador. Isto se chama de teste RAST (teste radio-alérgico-absorvente). Na figura 19, a pérola está coberta com anticorpo e é usada para medir um antígeno desconhecido. A quantidade do segundo anticorpo marcado que liga é proporcional à quantidade do antígeno que se liga ao primeiro anticorpo.



Figura 20

E. Testes para Antígenos Associados a Células

1. Imunofluorescência

Imunofluorescência é a técnica pela qual um anticorpo marcado com uma molécula fluorescente (fluoresceína, rodamina ou um dos vários outros corantes fluorescentes) é usado para detectar a presença de um antígeno dentro ou sobre uma célula ou tecido, pela fluorescência emitida pelo anticorpo ligado.

a. Imunofluorescência Direta

Na imunofluorescência direta, o anticorpo específico para o antígeno é diretamente marcado com o **fluorocromo** (Figura 20).

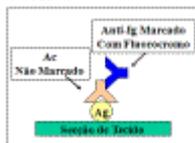


Figura 21

b. Imunofluorescência Indireta

Na imunofluorescência indireta, o anticorpo específico para o antígeno não é marcado e um segundo anticorpo anti-imunoglobulina dirigido ao primeiro anticorpo é marcado com o **fluorocromo** (Figura 21). Fluorescência indireta é mais sensível do que a imunofluorescência direta, uma vez que há amplificação do sinal.

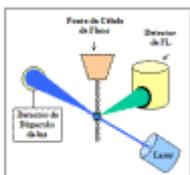


Figura 22

c. Citometria de Fluxo

Citometria de fluxo é comumente usada em laboratório clínico para identificar e enumerar células contendo um antígeno particular. As células em suspensão são marcadas com um marcador fluorescente pela imunofluorescência direta ou indireta. As células são então analisadas no citômetro de fluxo.

A Figura 22 ilustra o princípio da citometria de fluxo. Em um citômetro de fluxo as células saem de uma célula de fluxo e são iluminadas por um raio laser. A quantidade de raios laser que é dispersa para fora das células durante a passagem das mesmas pelo laser pode ser medida, o que proporciona informação a respeito do tamanho das células. Além disso, o laser pode excitar o fluorocromo nas células e a luz fluorescente emitida pode ser medida por um ou mais detectores.

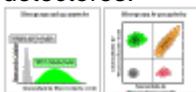


Figura 23

O tipo de dado que é obtido pela citometria de fluxo é mostrado na Figura 23. Em um histograma mono-paramétrico o aumento da fluorescência (ex. Fluorescência verde) é plotado no eixo dos x e o número de células exibindo aquela quantidade de fluorescência é plotado no eixo dos y. A fração de células que são fluorescentes pode ser determinado pela integração da área sob a curva. Em um histograma bi-paramétrico, o eixo dos x é um parâmetro (ex. Fluorescência vermelha) e o eixo dos y é o segundo parâmetro (ex. Fluorescência verde). O número de células é indicado pelo contorno e pela intensidade da cor.

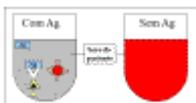


Figura 24

F. Fixação do Complemento

Complexos antígeno/anticorpo podem também ser medidos por suas habilidades de fixar o complemento porque um complexo antígeno/anticorpo irá "consumir" o complemento se estiver presente, enquanto que antígenos livres ou anticorpos não irão. Testes para complexos antígeno/anticorpo que se baseiam no consumo do complemento são denominados testes de fixação de complemento e são usados para quantificar reações antígeno/anticorpo. Este teste só irá funcionar com anticorpos que fixam complementos (IgG e IgM são os melhores).

O princípio do teste de fixação do complemento está ilustrado na Figura 24. O antígeno é misturado com o soro teste para ser investigado para presença de anticorpos e é aguardada a formação de complexos antígeno/anticorpo. Um tubo controle no qual nenhum antígeno é adicionado também é preparado. Se nenhum complexo antígeno/anticorpo estiver presente no tubo, nenhum complemento será fixado. Entretanto, se complexos antígeno/anticorpo estiverem presentes eles irão fixar o complemento e conseqüentemente diminuir a quantidade de complemento no tubo. Após se aguardar a fixação do complemento por quaisquer complexos antígeno/anticorpo, é adicionada uma quantidade padrão de células vermelhas sanguíneas, previamente cobertas com anticorpos anti-eritrócitos. A quantidade de células vermelhas sanguíneas cobertas por anticorpos é predeterminada para ser suficiente para usar todo o complemento inicialmente adicionado, se este ainda estivesse lá. Se todo o complemento ainda estivesse presente (*i.e.*, nenhum complexo antígeno/anticorpo se formou entre o antígeno e o anticorpo em questão), todas as células vermelhas serão lisadas. Se complexos antígeno/anticorpo são formados entre o antígeno e o anticorpo em questão, algum

complemento será consumido e, portanto, quando as células vermelhas cobertas com anticorpo são adicionadas nem todas elas irão lisar. Pela simples medição da quantidade de lise de células vermelhas pelos complexos antígeno/anticorpo pela medição da liberação de hemoglobina no meio, pode-se quantificar indiretamente os complexos antígeno/anticorpo no tubo. Testes de fixação de complemento são mais comumente utilizados para pesquisa de anticorpos em uma amostra teste mas eles podem ser modificados para medição do antígeno.