

241115



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Reactividad Inmunológica entre
IgG Humana e IgG
de Cerdo ”**

TESIS que Para Obtener el Título de

BIOLOGA

P R E S E N T A :

REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | Página |
|----------------------------|--------|
| Introducción | 1 |
| Diseño experimental | 13 |
| Métodos | 14 |
| Resultados | 23 |
| Discusión | 37 |
| Conclusiones | 42 |
| Referencias bibliográficas | 43 |

INTRODUCCION

A partir de la década de los sesentas se inició el estudio de las moléculas dotadas de información desde el punto de vista evolutivo, tales como los ácidos nucleicos (DNA y RNA) y las proteínas, cuya síntesis dirige el DNA en forma específica. A través de estos estudios, en particular los relacionados con las proteínas, se han propuesto relaciones filogenéticas a nivel molecular entre diversos grupos, sobre la base de que el número de diferencias que se encuentren en la secuencia de una determinada proteína en dos especies, refleja de alguna manera el tiempo que ha transcurrido desde que ambas especies se separaron de su ancestro común (1). Así se construyeron árboles filogenéticos con dos ventajas importantes sobre los que se basan en otros tipos de estudios: primera, la información que se obtiene es cuantificable (se puede decir el número de aminoácidos o de nucleótidos que son distintos) y segunda, es posible comparar tipos muy diversos de organismos si se elige la molécula adecuada (2). Pero la posibilidad de comparar las proteínas de dos distintas especies no sólo tiene un interés filogenético, sino también el de lograr una mejor comprensión de la estructura molecular y de la relación que ésta guarda con la función biológica.

Al determinar la secuencia de aminoácidos es necesario purificar la proteína en altas concentraciones y repetir el método para que la secuencia obtenida sea estadísticamente válida. Esta complicación se evita utilizando la electroforesis en gel que es una técnica tan sensible que puede detectar proteínas que sólo difieran en un aminoácido entre un total de cientos, si la sustitución origina un cambio en la carga total de la molécula, la

que entonces migrará de diferente manera en el campo eléctrico (3). Por otra parte, la estructura de proteínas de diferentes especies se puede comparar utilizando diversos métodos entre los que se incluye el análisis de la secuencia de aminoácidos y la reactividad inmunológica cruzada. Este último empezó a ser usado en 1904, por Nuttall, quien fue el pionero, y a partir de 1964 Boyden lo desarrolló más ampliamente como herramienta para estudiar la evolución proteica. Este método es sensible tanto a la secuencia de aminoácidos de las proteínas, como a su conformación espacial, de tal forma que si se prueba la reactividad cruzada entre dos proteínas intactas y esas mismas, "extendidas" por medios químicos o enzimáticos, los resultados que se obtengan pueden ser muy diferentes. (4)

Prager y Wilson determinaron que si dos proteínas difieren en más de un 40% en su secuencia de aminoácidos, no se puede detectar semejanza inmunológica entre ellas. Sin embargo, en otros experimentos se determinó que si una proteína nativa se descomponía en unidades menores, se podía encontrar cruzamiento inmunológico y homologías de secuencia que no se encontraban si se trabajaba con las moléculas completas (5). Esta propiedad es la que se ha aprovechado en el estudio evolutivo de proteínas homólogas de diferentes especies. (6)

Estos métodos se han aplicado en el estudio de las inmunoglobulinas, las cuales constituyen una familia muy compleja de proteínas relacionadas estructuralmente. El estudio del origen genético de estas proteínas constituye por sí mismo un campo de investigación muy interesante, pues con lo que hasta ahora se

sabe acerca del tema es suficiente para producir un cambio sustancial en los conceptos que hasta hace poco se consideraban fundamentales en lo que se refiere a la diferenciación celular y la síntesis de proteínas.

Unicamente con el fin de dar una idea de lo anterior, baste mencionar el trabajo de Leder (7) quien ha descubierto indicios de que en la síntesis de los millones de anticuerpos diferentes que tiene capacidad para producir un organismo a lo largo de su vida, intervienen sólo unos cientos de genes que codifican para las regiones variables de cualquier clase de anticuerpos y unas cuantas decenas para las regiones constantes de cada clase. Dichos genes se recombinan para formar anticuerpos diferentes y esto establece una contradicción con el principio anteriormente reconocido de que para cada cadena proteica existía un solo gene en el DNA. Aquí resulta que a partir de unos cuantos genes se pueden sintetizar millones de proteínas distintas, y que cada una de éstas es el resultado de la transcripción de más de un gene.

Por otra parte, se ha encontrado que en células embrionarias diferenciadas, la localización de los genes para las regiones que componen las inmunoglobulinas es diferente a la disposición que presentan en los linfocitos B maduros. Esta evidencia modifica la anterior suposición de que el genoma se conservaba intacto en las células diferenciadas y sólo se inactivaban algunos genes; parece ser que no sólo sucede esto, sino que además se reordenan los genes para hacer más eficiente la síntesis de proteínas. (8)

Así, es fácil darse cuenta de que las inmunoglobulinas consti-

tuyen un grupo de protefmas cuyo estudio es importante bajo cualquier enfoque que se le dé.

Cuando se estudia a las inmunoglobulinas desde el punto de vista filogenético es posible obtener información acerca de la evolución de las diferentes clases de inmunoglobulinas, así como de la evolución de las diferentes cadenas polipeptídicas que las constituyen, es decir, de las cadenas pesadas y ligeras, y de la evolución de la estructura de sus regiones. También es posible obtener información acerca de su función biológica, la cual está en estrecha relación con la estructura de sus dominios. (9)

Los datos con los que se cuenta actualmente en este campo se refieren a estudios de inmunoglobulinas en distintos vertebrados no mamíferos y sus posibles homologías con las inmunoglobulinas de los mamíferos. Los criterios que se emplean en el establecimiento de tales homologías tienen diferentes bases. Así, se habla de criterios primarios, los cuales apoyan por sí mismos la homología entre inmunoglobulinas de diferentes especies, que consisten en el análisis de la secuencia de aminoácidos y la reactividad antigénica cruzada (mediante el empleo de antisueros monoespecíficos); se habla de criterios secundarios, que se refieren a ciertos fenómenos como la asociación de la IgA con un componente secretorio, relativos a la función específica de cada clase de inmunoglobulina, y por último, se habla también de criterios terciarios que se refieren a características biológicas y fisicoquímicas de algunas inmunoglobulinas, pero que no son privativas de una clase en especial, como la fijación de complemento, transporte intestinal o placentario, composición de aminoácidos y carbohidratos, y el peso molecular de

la proteína completa y sus cadenas constituyentes. (10)

A partir de los estudios filogenéticos de inmunoglobulinas, se ha determinado que para establecer homologías entre diferentes especies de mamíferos era posible basarse en criterios del tipo terciario, como el peso molecular de las proteínas completas y de los polipéptidos que las constituyen, el contenido de carbohidratos y su composición de aminoácidos; con estos criterios en conjunto, se puede distinguir cada clase de inmunoglobulinas en los mamíferos. (11)

A pesar de que son muy heterogéneas y por eso el estudio de su estructura ha sido difícil, las inmunoglobulinas se han investigado con interés debido a su importante función biológica y a las distintas teorías que hasta ahora se han propuesto para explicar su diversidad.

Al principio, varios investigadores propusieron la manera en que los antígenos podrían inducir la formación de los anticuerpos, de tal forma que pudieron distinguirse dos tendencias principales: la primera sostenía que el antígeno actuaba como molde sobre el cual los anticuerpos tomaban la conformación específica para actuar en su contra, y que las secuencias de aminoácidos eran siempre las mismas para todos los anticuerpos. La otra tendencia era en el sentido de que los anticuerpos con cierta especificidad son distintos en su secuencia de aminoácidos, de la misma forma en que otras proteínas difieren entre sí. Estas teorías sirvieron como base para el desarrollo de técnicas que han permitido llegar al estado actual del conocimiento. Así, para hacer estudios detallados de la estructura de las moléculas de inmunoglobulinas, era necesario contar con proteínas

homogéneas en cantidad suficiente. Dichas proteínas se aislaron a partir de sueros de personas enfermas de mieloma múltiple, enfermedad en la que proliferan células plasmáticas indiferenciadas que producen un solo tipo de inmunoglobulina, en grandes cantidades. La estructura de esas inmunoglobulinas es muy semejante a la de Igs normales, lo que ha resultado de gran ayuda en su estudio.

Debido a su tamaño, la secuenciación de las inmunoglobulinas era difícil por lo que había que fragmentarlas para lo que se empezó a emplear la hidrólisis con enzimas proteolíticas, seguida por la separación de los fragmentos activos.

Porter, en 1959, fragmentó inmunoglobulinas de conejo con papaína, y luego separó los productos por cromatografía en carboxicelulosa. Obtuvo tres fracciones con el mismo contenido de material. Las dos primeras tenían pesos moleculares de 50 000 e inhibían específicamente la precipitación de antígenos por anticuerpos intactos. En el tercer pico los pesos moleculares eran de 80 000, se cristalizaban y no inhibían la precipitación antigénica. (12)

Este método se aplicó en el análisis de las inmunoglobulinas de diferentes especies y se demostró que esos fragmentos se pueden obtener de anticuerpos de cualquier origen y que los sitios de combinación antigénica se conservaban intactos a pesar de la digestión.

Se demostró que los dos tipos de fragmentos correspondían a dos componentes estructurales de la molécula intacta, por el hecho de que todos los determinantes antigénicos de la molécula nativa que se detectaron por técnicas de difusión en geles, se en-

contraban también en los fragmentos y porque no parecían compartir ningún determinante antigénico entre ellos. Por el tamaño y la cantidad de los fragmentos, se sugirió un modelo para la estructura de la molécula de anticuerpo que consistía en dos fragmentos que se combinan con el antígeno (Fab) unidos a un fragmento cristalizante (Fc). Este modelo encajaba con observaciones de las características fisicoquímicas hechas hasta entonces (1959), pero proponía que la molécula estaba formada por una sola cadena polipeptídica.

Sin embargo, se pensó que si tenía dos sitios de unión antigénica debía tener al menos dos cadenas polipeptídicas componentes. Así, se empezó a buscar la presencia de subunidades polipeptídicas.

Deutsch y Morton habían encontrado en 1958 que al tratar las macroglobulinas con mercaptoetanol, cambiaba su intervalo de sedimentación; este reactivo rompe los puentes disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, pero no así los enlaces peptídicos.

Edelman y Poulik, por su parte, con diversos solventes, además del mercaptoetanol, que rompían los enlaces covalentes y no covalentes entre las cadenas, y por cromatografía en columnas y electroforesis en geles de almidón, encontraron dos tipos de cadenas polipeptídicas a las que denominaron ligeras y pesadas, que originalmente están unidas por enlaces disulfuro. Estas cadenas estaban en todas las inmunoglobulinas que estudiaron.

Fleischman determinó, por otra parte, basado en datos provenientes de los análisis enzimáticos, antigénicos y genéticos de estas proteínas, que la unidad fundamental de una inmunoglobulina es una molécula de cuatro cadenas. En la figura 1 se observa

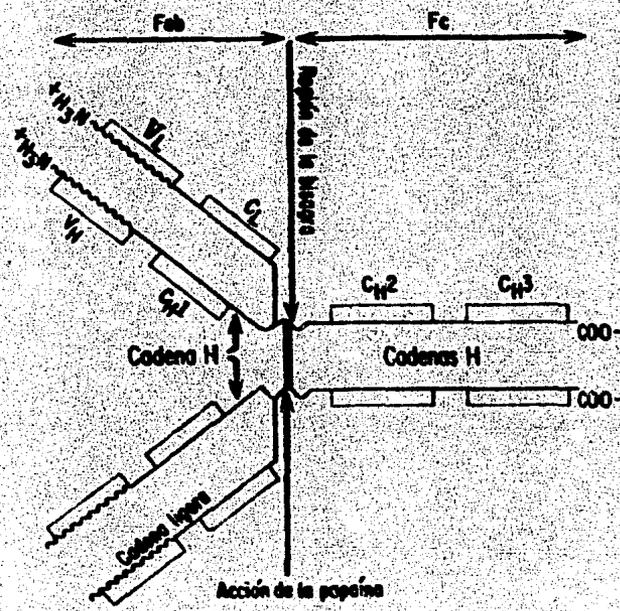


Fig. 1. Esquema de la estructura de una molécula de IgG. Se muestran los dominios variables (V_L y V_H) y los dominios constantes de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L), y cómo están constituidos los fragmentos (Fab y Fc) que se forman por la digestión con papaína.

un esquema de esta estructura. (13)

En estudios posteriores para determinar más detalladamente la estructura de las inmunoglobulinas, se encontró que las cadenas polipeptídicas constan de un dominio variable y tres o cuatro dominios constantes, según la clase de inmunoglobulina; así, en IgG e IgA hay tres dominios constantes y uno variable, y en IgM, IgD e IgE hay un dominio variable y cuatro constantes.

Se conocen cinco clases principales de moléculas de inmunoglobulinas que se distinguen por la naturaleza química de sus cadenas pesadas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Entre ellas se han encontrado subclases que son sumamente parecidas en sus propiedades fisicoquímicas, por lo que es muy difícil separarlas por electroforesis o cromatografías, pero poseen marcadores antigénicos específicos para la subclase, los cuales se encuentran presentes en las cadenas pesadas.

Las cadenas ligeras no caracterizan por sí mismas una clase. De ellas se conocen dos tipos: kappa y lambda, que se distinguen inmunológicamente porque las cadenas de un mismo tipo comparten determinantes antigénicos que no comparten con las cadenas del otro tipo. En cualquiera de las clases de inmunoglobulinas se pueden encontrar los dos tipos de cadenas ligeras. En la IgG humana se encuentran preferentemente cadenas del tipo kappa. (14)

Por su tamaño y complejidad, las inmunoglobulinas son antigénicas. Sus propiedades antigénicas se parecen a las de otras proteínas: 1) un animal puede producir anticuerpos contra determinantes antigénicos que no son propios de él; 2) los determinantes antigénicos consisten en fragmentos de las cadenas polipeptídicas, que se pliegan en forma específica de acuerdo con su

estructura primaria, en la superficie de una molécula de proteína, y 3) la parte más inmunogénica de una proteína extraña es aquella en la que la estructura primaria es muy distinta del componente homólogo propio. Los anticuerpos son altamente específicos contra un cierto determinante antigénico al que se expone a un animal. (15)

Al determinante antigénico lo constituye una porción de la molécula de antígeno que es la que se combina con el sitio activo del anticuerpo y determina la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. En una molécula de antígeno puede haber numerosos determinantes antigénicos distintos; esto varía con el tamaño y la complejidad química de la molécula. De esta manera, puede suceder que las poblaciones de anticuerpos provenientes de diferentes animales varíen en su especificidad contra el antígeno, y estas variaciones también pueden ocurrir en un mismo individuo; esto conduce a la posibilidad de que en un suero determinado no se encuentren todos los anticuerpos específicos para los determinantes antigénicos de una molécula de antígeno. Por otra parte, para que un antígeno produzca una respuesta inmunológica reconocible es necesario cuidar las condiciones experimentales de inmunización. Primero hay que considerar al antígeno mismo, el cual debe ser extraño al organismo que lo recibe, tener una estructura química compleja y un cierto tamaño. En cuanto a este último, aún no se ha establecido un tamaño mínimo, aunque se ha visto que al aumentar éste aumenta la capacidad inmunogénica; lo mismo sucede con la estructura química: al aumentar la complejidad aumenta también la capacidad para inducir una respuesta inmunológica. (16)

Otro factor que hay que considerar en un experimento cuando se quiere obtener anticuerpos, es la capacidad genética del animal inmunizado para responder contra un antígeno particular; esta capacidad es transmitida a través de un carácter dominante autosómico. Además, se sabe que existen diferentes loci (genes Ia, en el complejo genético que codifica para los antígenos de histocompatibilidad) que controlan, limitando o modificando, la fuerza y el carácter de la respuesta inmunológica. Para demostrar el control genético en las respuestas inmunitarias, y en general para su estudio, se han usado muchos y diversos antígenos que, en general, pueden agruparse en tres categorías: los antígenos conjugados que consisten en la unión de una proteína inerte y un grupo químico (hapteno) pequeño que en forma libre no produce respuesta inmunológica, pero ligado a la proteína sí produce una respuesta reconocible; antígenos sintéticos que consisten en polímeros de L-aminoácidos, por lo común, y antígenos naturales.

Por último, también hay que considerar la vía de administración de los antígenos, la dosis y el uso de adyuvantes. (17)

Cuidando todos estos factores descritos, en la inmunización de unos cerdos se esperaba obtener una respuesta inmunológica contra IgG humana. (18) Se inmunizaron 10 cerdos con esta proteína y sólo dos de ellos produjeron anticuerpos. Se pensó que podrían existir determinantes antigénicos comunes a las dos moléculas y efectivamente, se encontró que un antisuero contra cadenas gamma humanas reconocía a una proteína en el suero del cerdo, equivalente electroforéticamente a la IgG humana; cuando se utilizó un antisuero contra cadenas gamma del cerdo, se encontró que reconocía un equivalente electroforético en el suero

humano. Esto mismo se hizo con cadenas ligeras (kappa y lambda) y no se encontró reactividad cruzada.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es comparar inmunológicamente la IgG humana y la IgG de cerdo, y establecer en qué sitios de las moléculas reside su semejanza inmunológica.

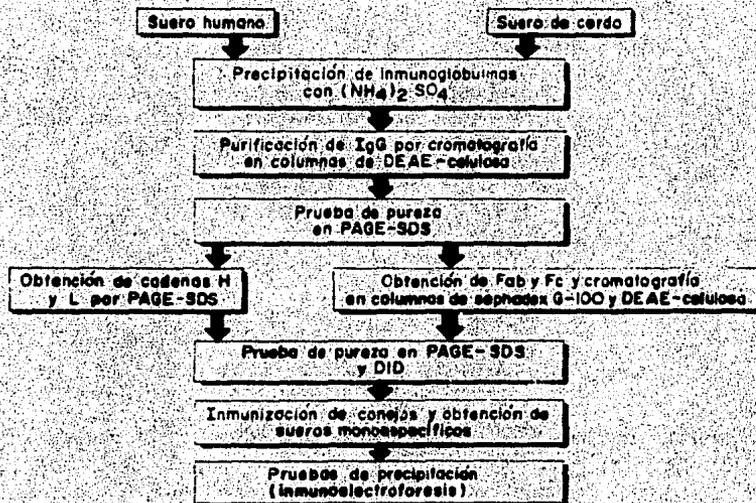


Fig. 2. Diseño experimental.

METODOS

En la figura 2 se ilustra el diseño experimental empleado en este trabajo.

Para hacer la comparación inmunológica entre la IgG de cerdo y la IgG humana fue necesario tener las proteínas en forma pura y, posteriormente, fragmentarias. Los fragmentos se emplearon en la inmunización de conejos con el fin de obtener anticuerpos monoespecíficos y estudiar con ellos la reactividad inmunológica cruzada entre la IgG de ambas especies.

Las fuentes de las que se extrajeron las proteínas fueron mezclas de sueros de diversos cerdos (2000 ml) y de sueros humanos (300 ml).

OBTENCION DE INMUNOGLOBULINAS

Precipitación con sulfato de amonio al 33%

Esta técnica se utiliza para remover la hemoglobina libre en sueros hemolíticos, con la obtención de un precipitado de inmunoglobulinas con sulfato de amonio al 33% concentración final y posterior diálisis para eliminar el sulfato de amonio. Esto permite tener un concentrado de inmunoglobulinas a partir del cual se facilita la posterior purificación de IgG por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa. Se siguió este método de acuerdo con lo que describe Spiegelberg. (19)

BTENCION DE IgG

Cromatografía en DEAE-celulosa

Se trata de una técnica de cromatografía por intercambio iónico. Las proteínas se separan debido a la diferencia en sus cargas. La DEAE-celulosa (dietilaminoetil-celulosa) es un intercambiador iónico con carga positiva que se emplea para separar proteínas. A un pH de 8 y con una solución amortiguadora de molaridad baja (fosfatos 0.01 M) se eluye la IgG a partir de la mezcla de proteínas obtenida en la precipitación con sulfato de amonio.

Se montaron dos columnas de DEAE-celulosa de 2.5 cm de diámetro por 49 cm de altura; cada una con un volumen de 235 ml (equivalentes, aproximadamente, a 20 g en peso seco de la celulosa) y se equilibraron con amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 8.

Una se empleó en la purificación de IgG de cerdo y la otra, en la purificación de IgG humana. Se utilizaron muestras de 5 ml (equivalentes a 170 mg de proteínas) en cada ocasión que se efectuó la purificación, y se colectaron fracciones de 5 ml cada una. Estas cantidades de mezcla de proteínas se utilizaron porque, de acuerdo con datos experimentales por trabajos anteriores en el laboratorio, se obtienen mejores resultados de purificación si se utilizan 15 mg de proteínas por gramo de peso seco de la DEAE-celulosa. Siendo el peso seco de ésta equivalente a 20 gramos, su capacidad de absorción sería de 300 mg, capacidad que queda sobrada al haberse empleado 170 mg de mezcla de proteínas en cada muestra aplicada a las columnas. (20)

De las fracciones colectadas se leyeron densidades ópticas (a

una longitud de onda de 280 nm) para determinar los perfiles de elución.

OBTENCION DE CADENAS PESADAS Y LIGERAS

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de acrilamida (EGPA-SDS) para obtener en forma pura las cadenas ligeras de las IgG, y las cadenas gamma; en este caso se emplearon geles preparativos en los que se usaba seis veces más volumen que el empleado en geles analíticos. Estos geles se hicieron reaccionar con una solución de acetato de sodio 4M (21) para revelar los sitios hasta los que se desplazaron las cadenas pesadas y las cadenas ligeras; el acetato de sodio 4M hace precipitar al SDS que no quedó en contacto con las proteínas, de tal forma que se observan bandas transparentes en los sitios donde se encuentran aquellas. Así no se alteran los determinantes antigénicos y se pueden emplear en la inmunización de conejos.

OBTENCION DE Fab y Fc

En esta etapa del diseño experimental se empleó el método descrito por Spiegelberg (22). Con este procedimiento se obtienen dos fragmentos Fab y un Fc de cada molécula de IgG, como producto de la digestión con papaína, y material residual de cadenas peptídicas.

Para activar la papaína se utilizó EDTA a una concentración de 0.002 M (0.75 mg/ml), 2-mercaptoetanol 0.1 M, y se incubó la digestión a 37°C durante 3 horas.

Al cabo de tres horas de digestión, el producto se puso a dializar contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M para eliminar el EDTA y el mercaptoetanol, de tal forma que quedara oxidada e inactivada la enzima. (23)

Para obtener los fragmentos (Fab y Fc) por separado y eliminar las IgG que hubieran quedado completas, se realizaron dos cromatografías. La primera fue para separar la IgG no digerida, empleando una columna de sephadex G-100, en amortiguador tris-EDTA pH 8. La segunda cromatografía, de intercambio iónico, se hizo para separar los Fab de los Fc mediante columnas de DEAE-celulosa. Los Fab se eluyeron en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M y los Fc se separaron con el mismo amortiguador en concentración 0.05 M, ambos a pH 8. Para probar la pureza de los fragmentos obtenidos se hicieron pruebas de IEF, DID y EGPA-SDS.

En la preparación de las muestras para la cromatografía en sephadex G-100 fue necesario concentrarlas; esto se hizo en una celda de ultrafiltración Amicon, con membrana PM30 a través de la cual pasan los residuos producidos en la digestión cuyo peso molecular sea inferior de 30 000.

INMUNIZACION DE CONEJOS

Las cadenas pesadas, las cadenas ligeras y los fragmentos Fab y Fc que se obtuvieron por los métodos de purificación descritos, se utilizaron como antígenos para obtener anticuerpos específicos en conejos.

Se utilizaron 16 conejos Nueva Zelanda, hembras jóvenes, de 3kg de peso, a los que se inmunizó de acuerdo con el siguiente cuadro:

| Antígeno | Conejos que recibieron antígeno humano | Conejos que recibieron antígeno de cerdo |
|----------------|--|--|
| Cadenas gamma | 2 | 2 |
| Cadenas kappa/ | | |
| lambda | 2 | 2 |
| Fab | 2 | 2 |
| Fc | 1 | 1 |
| Suero completo | 1 | 1 |

En la inmunización de estos animales se empleó adyuvante completo de Freund para potenciar las respuestas (24), de la siguiente manera:

2 inmunizaciones con ACF, una cada quince días

3 inmunizaciones sin adyuvante, una cada semana

Los antígenos se llevaron a una concentración de 1 mg/ml. Para las inmunizaciones se emplearon 300 µg de antígeno (300 µl) completados a 500 µl con PBS a los que se agregaron 500 µl de ACF. Para probar la respuesta a las inmunizaciones, se tomaron muestras de sangre de cada conejo y se realizaron inmunolectroforesis.

PRUEBAS DE PUREZA

Electroforesis en gel de poliacrilamida con el detergente dodecil sulfato de sodio (EGPA-SDS)

Esta técnica se usó para probar la pureza de la IgG obtenida por cromatografía y para separar cadenas pesadas y ligeras mediante agente reductor, el 2-mercaptoetanol, que impide la formación de puentes disulfuro. Se utiliza un campo eléctrico para hacer que las proteínas, cargadas negativamente por acción del deter-

gente, se muevan a través de un polímero de acrilamida en el que avanzan más o menos de acuerdo con su peso molecular y, en consecuencia, quedan separadas. Para revelar la presencia de las proteínas en los sitios hasta donde se hayan desplazado, se tiñe el gel con azul de Coomassie, el cual reacciona únicamente con las proteínas; el metanol y el ácido acético con los que está preparado las hace precipitar, y así se advierten manchas azules en los sitios donde se encuentran. La técnica se siguió de acuerdo con Osborn. (25)

Doble inmunodifusión

Esta técnica para estudiar la reacción antígeno-anticuerpo consiste en hacer que las mezclas reaccionantes se difundan en una matriz de agar. En el agar se excavan hoyos y en ellos se vierten las mezclas que se quieren probar. En esta forma, un antisero puede hacerse reaccionar contra muchos antígenos al mismo tiempo, para demostrar las relaciones antigénicas. Las soluciones en los pozos se difunden radialmente y esto crea un gradiente de concentración alrededor de los pozos. Cuando los antígenos y anticuerpos se encuentran mutuamente en las concentraciones equivalentes, se precipitan y forman bandas visibles en el agar. De acuerdo con la forma en que se presenten estas bandas se podrá hablar de reacciones de identidad (si las bandas de dos pozos contiguos se unen para formar una línea continua) o de reacciones en las que no hay identidad (si las bandas se cruzan) y de reacciones de identidad parcial (si suceden las dos cosas). (26)

Inmunolectroforesis

Es una técnica para el estudio de antígenos y anticuerpos, basada en dos de sus propiedades: su capacidad para difundirse en

geles de agar y formar precipitados de antígenos y anticuerpos específicos, y su movilidad característica en un campo eléctrico.

Para detectar la presencia de antígenos en una solución, primero se separan sus componentes por medio de una electroforesis. Se cubre un portaobjetos con una capa de agar (Merck) al 1%, disuelto en solución amortiguadora de barbital (Lab. Helena) 0.05 M, pH 8. Se hace una perforación en el agar, en la que se coloca el antígeno y se hace pasar una corriente eléctrica para efectuar la electroforesis, con un amperaje 1.5 mA por cada portaobjetos. (27)

Debido al pH alcalino del amortiguador, las proteínas del suero se cargan negativamente y migran hacia el ánodo. Sin embargo, también tiene lugar un efecto de electroósmosis debido a las moléculas del agar cargadas negativamente que, por su inmovilidad, determinan que el agua del medio se cargue positivamente y migre hacia el cátodo; este fenómeno altera el movimiento normal de las moléculas del suero, principalmente el de las gammaglobulinas que suelen desplazarse sólo ligeramente hacia el ánodo. Esto no ocurre cuando se utiliza agarosa.

La duración de la electroforesis se midió por el desplazamiento de la albúmina, teñida con azul de bromofenol, hacia el ánodo, aproximadamente 1.5 cm desde el pozo en el que se puso la muestra al principio. Al concluir, se hace un canal en el gel a determinada distancia del pozo, según las concentraciones a las que se encuentren antígenos y anticuerpos, y en él se deposita el antisuero. Este canal está en posición paralela a la dirección de la corriente en la electroforesis.

A partir del momento en que la corriente se interrumpe, los componentes del suero que se han separado en forma característica, de acuerdo con las condiciones empleadas, empiezan a difundirse en todas direcciones. Los anticuerpos que se colocan en el canal también se difunden.

Cuando los anticuerpos se encuentran con su antígeno, se forman complejos antígeno-anticuerpo insolubles y por ello aparecen en el agar las bandas de precipitación que revelan su presencia.

Para que esto suceda, sin embargo, deben concurrir varios factores que interactúan entre sí y cuyas condiciones óptimas se determinarán de acuerdo con los requerimientos de cada experimento:

El volumen del pozo

La distancia entre el pozo y el canal

La fuerza iónica del amortiguador y un pH entre 6.5 y 8.2 para evitar precipitaciones inespecíficas

La fuerza del campo eléctrico que evite la difusión del antígeno

El tiempo de electroforesis

La temperatura

El tiempo que se dejen difundir antígenos y anticuerpos

Las concentraciones de cada uno

Se emplearon dos sistemas para las reacciones de precipitación por inmunoelectroforesis. Uno consistía en probar un antisuero específico contra cualquiera de los antígenos utilizados, con suero humano en un pozo y suero de cerdo en el otro; lo que se quería ver con este sistema era la pureza del antígeno empleado en la inmunización y si se obtenía alguna reacción cruzada. En estas reacciones se utilizaron dos pozos para antígenos (suero humano y suero de cerdo) y un canal central para el antisuero (véase figura 3a).

El segundo sistema empleado consistía en dos canales para anti-sueros y un pozo central para el antígeno. Con ellas se quería verificar si en las reacciones cruzadas obtenidas con las primeras inmunolectroforesis, había identidad antigénica (figura 3 b).



Fig. 3. Sistemas de IEF

RESULTADOS

Precipitación con sulfato de amonio

A partir de 2000 ml de suero de cerdo y 300 ml de suero humano se obtuvieron 900 ml de Igs de cerdo, en concentración de 34mg/ml, y 170 ml de Igs humanas, en concentración de 32 mg/ml, que se guardaron en alícuotas de 20 ml a una temperatura de -20°C . Estas fracciones se usaron posteriormente para aislar la IgG a través de columnas de cromatografía de DEAE-celulosa.

Cromatografía en DEAE-celulosa y prueba de pureza con EGPA-SDS

Se procesaron 12 muestras de Igs de cada especie; en la figura 4 se muestran los perfiles de elución que se obtuvieron como resultado de cada cromatografía.

En geles analíticos de EGPA-SDS se probó el contenido de proteínas en cada pico y se obtuvieron patrones de bandas como los que se muestran en las figuras 5 y 6.

A partir de los resultados de la electroforesis, se juzgó que las proteínas no estaban suficientemente puras para proseguir a la obtención de fragmentos, por lo que se decidió volver a purificar; como resultado de esta segunda cromatografía se obtuvieron perfiles de elución como los que se muestran en la figura 7. Al hacer la prueba de pureza en EGPA-SDS, se obtuvieron las bandas que se observan en la figura 8.

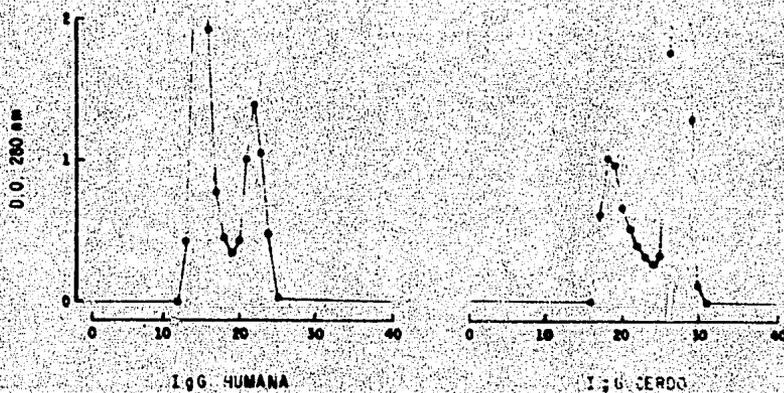


Fig. 4. Resultados de cromatografías en columnas de DEAE-celulosa, para purificar IgG a partir de una muestra de inmunoglobulinas, precipitadas del suero total con sulfato de amonio al 33%.

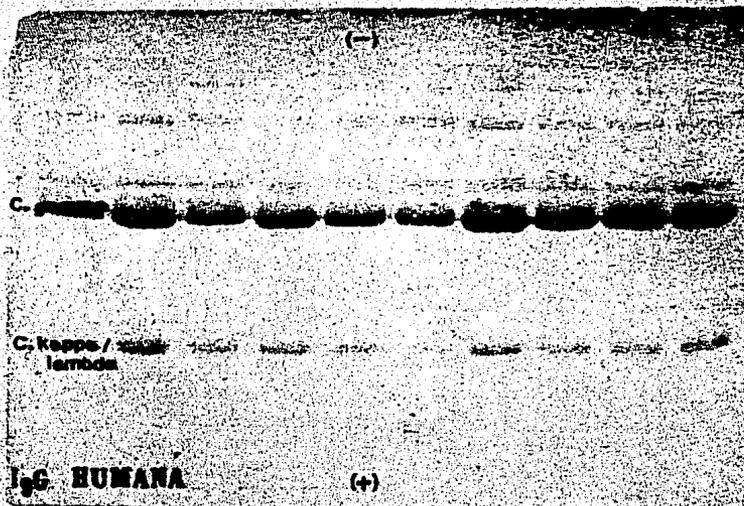


Fig. 5. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida-SDS, de los productos de diferentes cromatografías en columnas de DEAE-celulosa para purificar IgG humana. Obsérvese que existen contaminantes aparte de las cadenas pesadas y ligeras por lo que se decidió una nueva purificación con todas estas muestras en un solo lote.

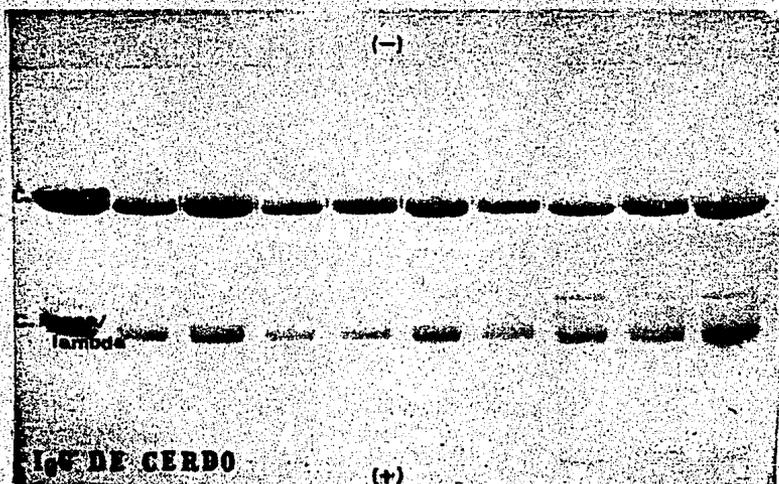


Fig. 6. Electroforesis analítica de los primeros productos obtenidos en la purificación de IgG de cerdo por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa. Se procedió, en este caso, de la misma manera que con la IgG humana.

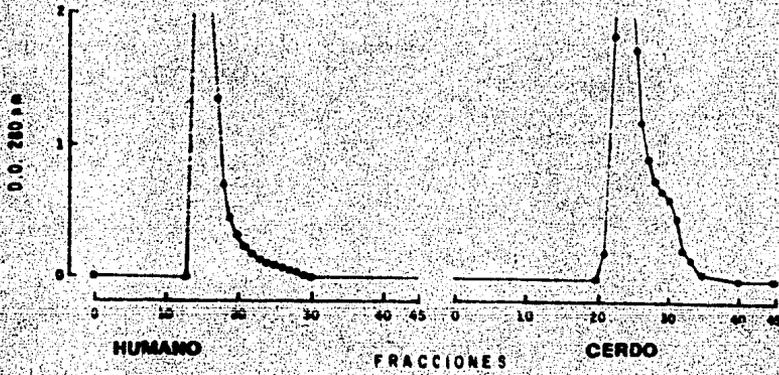


Fig. 7. Recromatografía en DEAE-celulosa de las fracciones obtenidas en la purificación anterior de IgG.

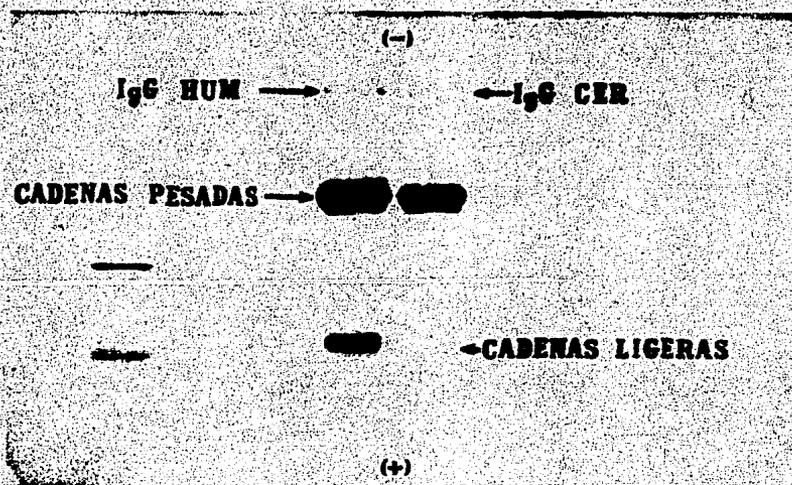


Fig. 8. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida-SDS, de las muestras de IgG humana e IgG de cerdo obtenidas en la segunda cromatografía en DEAE-celulosa. Se puede observar la pureza alcanzada.

En total, se purificaron 555.74 mg de IgG humana y 439.525 mg de IgG de cerdo (no se procesó el total de las Igs obtenidas en la precipitación con sulfato de amonio). La determinación de las concentraciones de estas proteínas se hizo por el método colorimétrico de Lowry.

Obtención de cadenas pesadas y cadenas ligeras

La muestra para la electroforesis en geles preparativos de acrilamida, contenía un total de 15 mg de proteína, de donde se obtuvieron 10mg de cadenas pesadas y 5 mg de cadenas ligeras. Se cortaban del gel las bandas correspondientes a cadenas pesadas (en la parte superior del gel) y a cadenas ligeras (en la parte inferior del gel).

Obtención de Fab y Fc

Las cantidades empleadas para la digestión fueron las siguientes:

| | Digestión IgG humana | Digestión IgG de cerdo |
|--|----------------------|-------------------------|
| IgG | 350 mg en 27 ml | 301 mg en 34 ml |
| EDTA 0.002M (Sigma PM 372.2) | 20.1 mg | 25.3 mg |
| 2-mercaptoetanol 0.1M (Sigma 1.1163 g/ml PM seco 78.1) | 189 μ l | 237 μ l |
| Papaína recristalizada 1 mg/100 mg de IgG (Sigma, 25mg/ml en etanol) | 3.5 mg (140 μ l) | 3.01 mg (120.4 μ l) |

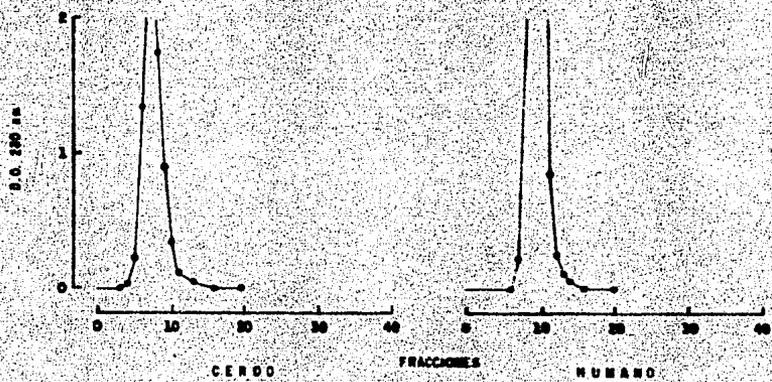


Fig. 9. Cromatografía en sephadex G-100. El pico corresponde a la fracción donde se encuentran los fragmentos, con pesos moleculares semejantes. No se obtuvo la fracción que contendría la IgG no digerida, por lo que se piensa que la digestión fue completa.

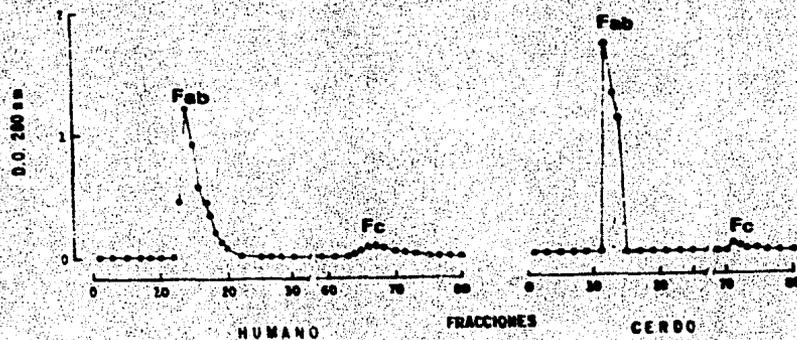


Fig. 10. Purificación de fragmentos Fab y Fc por cromatografía en DEAE-celulosa. Se puede apreciar que la cantidad de Fc obtenido es mínima, debido a que el 2-mercaptoetanol utilizado para activar la papaína en este método, reduce considerablemente la cantidad de Fc que se obtiene.

Los resultados de la cromatografía en sephadex G-100 para separar la IgG no digerida, se muestran en la figura 9. Después se hizo cromatografía en DEAE-celulosa y se obtuvieron perfiles como los que se muestran en la figura 10. La diferencia entre las concentraciones de Fab y Fc obtenidas se debe a que al emplear 2-mercaptoetanol para la digestión, se produce pérdida considerable de Fc. (28)

Para probar la pureza de los fragmentos obtenidos se hizo otra electroforesis en acrilamida. Asimismo se realizaron DIDs (doble inmunodifusiones) en las que se probó la reactividad entre anticuerpos dirigidos contra cadenas ligeras (κ y λ) y cadenas μ , alfa y delta (cadenas pesadas características de otras inmunoglobulinas), y los fragmentos Fc obtenidos: los resultados fueron negativos.

El rendimiento obtenido fue el siguiente:

| | Fab | Fc |
|--------|---|--|
| Cerdo | Aproximadamente 16% del total de Fab de la muestra (32 mg) | Aproximadamente 1.8% del total de Fc de la muestra (1.8 mg) |
| Humano | Aproximadamente 10.34% (24 mg) | Aproximadamente 3.44% (4.0 mg) |

Inmunización de conejos e inmunolectroforesis

Los dieciséis conejos produjeron un buen título de anticuerpos, excepto uno que murió inesperadamente y fue sustituido. Se obtuvieron, por tanto, dieciséis antisueros; su especificidad se

probó por inmunoelectroforesis, empleando sueros completos como antígenos y se obtuvieron precipitaciones homólogas y heterólogas. En los sistemas inversos de IEF (figura 3b) se apreciaron reacciones de identidad. En los cuadros 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos en ambos sistemas, y en las figuras 11-16 se muestran algunos de ellos.

CUADRO 1

| antisuero \ antígeno | suero humano | suero de cerdo |
|-------------------------------|--------------|----------------|
| cadenas gamma de cerdo | + | + |
| cadenas kappa/lambda de cerdo | + | + |
| Fab de cerdo | + | + |
| Fc de cerdo | + | + |
| suero total de cerdo | + | + |
| cadenas gamma humanas | + | + |
| cadenas kappa/lambda humanas | + | + |
| Fab humano | + | + |

Resultados de IEF para probar la reactividad de los antisueros; como pue de observarse todos ellos reaccionan indistintamente con cualquiera de los antígenos.

CUADRO 2

| Anticuerpo vs. | Antígeno | Anticuerpos vs. | Reacción de identidad |
|-------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------|
| Cadenas ligeras humanas | IgG humana | Cadenas ligeras de cerdo | + |
| Fc humano | IgG humana | Fc de cerdo | + |
| Cadenas gamma humanas | IgG de cerdo | Cadenas gamma de cerdo | + |
| Cadenas ligeras humanas | IgG de cerdo | Cadenas ligeras de cerdo | + |
| Fc humano | IgG de cerdo | Fc de cerdo | + |
| Fab humano | Fab humano | Fab de cerdo | + |

Resultados de inmunolectroforesis para estudiar reactividad cruzada e identidad antigénica. Se asientan únicamente los sistemas en los que esta última se obtuvo.

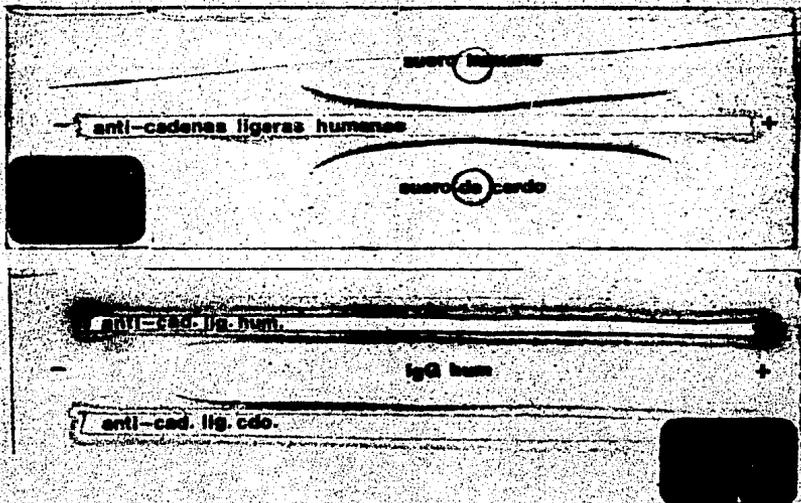


Fig. 11

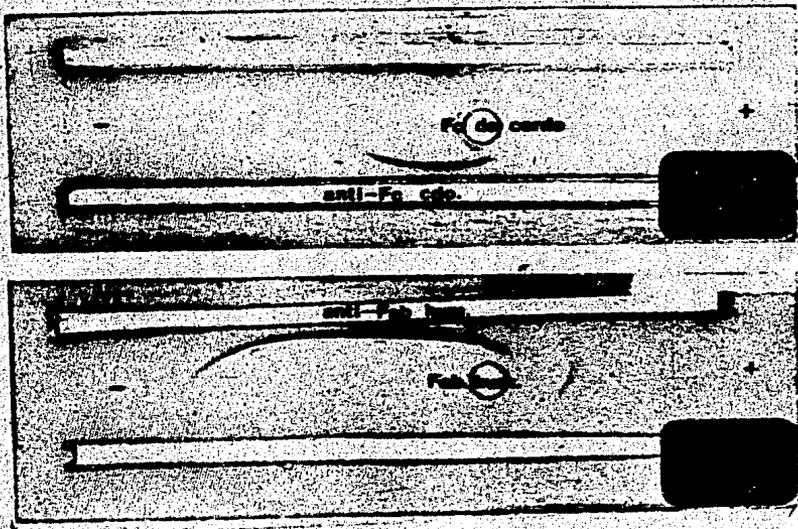


Fig. 12

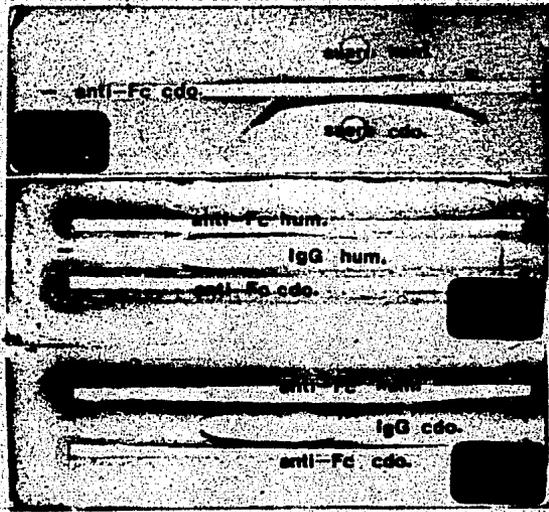


Fig. 13

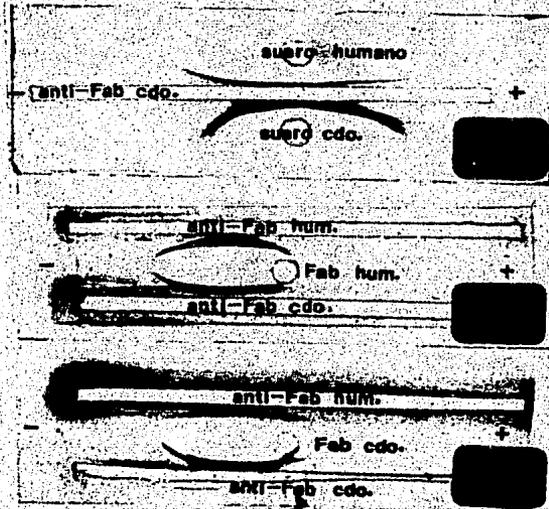


Fig. 14

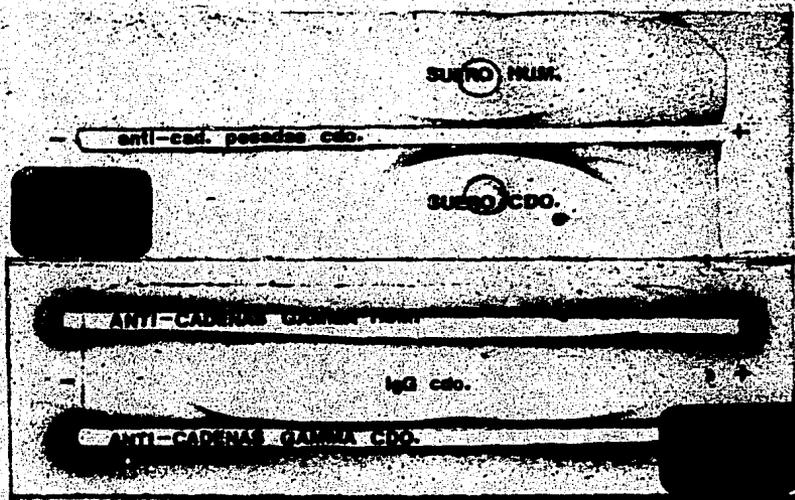


Fig. 15

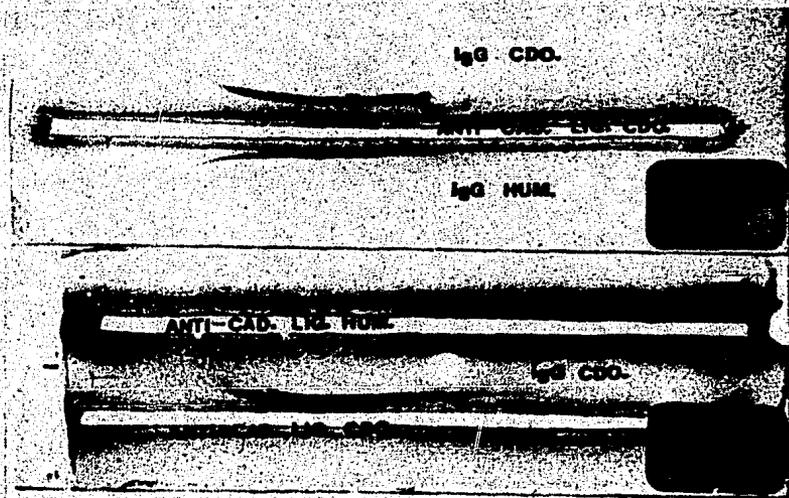


Fig. 16

DISCUSION

Entre los factores importantes para determinar la semejanza inmunológica entre las proteínas de este estudio, se encuentra la pureza de los antígenos utilizados para la producción de antisueros. A continuación se discuten los criterios empleados para determinarla.

En lo que se refiere a la obtención de cadenas gamma y cadenas kappa y lambda, se obtuvo una primera prueba de pureza con la electroforesis en gel de acrilamida porque este método permite que las proteínas migren en forma característica según sus pesos moleculares; así, cada banda obtenida como resultado de la electroforesis corresponde a proteínas homogéneas con características parecidas.

Sin embargo, también es sabido que en las diferentes fracciones producidas por electroforesis se pueden encontrar subfracciones. Entre éstas, las diferencias no radican en la movilidad electroforética, pero sí en la actividad bioquímica. De ahí que se haya empleado el método de inmunoelectroforesis para determinar si los antisueros producidos en los conejos estaban dirigidos contra un solo antígeno o contra más de uno (29). Esta técnica combina la electroforesis con las reacciones de precipitación inmunológica, como ya se explicó en la metodología, y se esperaba obtener con cada antisuero probado, una sola banda de precipitación específica contra el antígeno correspondiente, excepto en el caso en que el antígeno fuera suero total. En todos los casos, los antisueros se probaron contra sueros completos, de tal forma que si se obtenía una banda, se podía confiar en la pureza de los antígenos.

nos empleados para la estimulación (30). Este es un método altamente confiable pues el aparato inmune puede reaccionar contra mínimas concentraciones de contaminantes y producir abundantes anticuerpos; la presencia de esos anticuerpos se revelaría al hacerlos reaccionar contra una mezcla de antígenos como el suero completo. Los resultados obtenidos así fueron satisfactorios, pues apareció sólo una banda en la inmunolectroforesis, excepto en el caso de cadenas ligeras, en donde se encontraron dos arcos de precipitación. Dichos arcos estaban muy cercanos, a veces eran paralelos y otras, se unían; de acuerdo con Williams (31) esto indica que se trata de dos sustancias con movilidad electroforética semejante o que había exceso de antígeno que provocó que se disociara la banda o, dado que el antígeno usado era suero completo, había reacción en contra de varias inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) que poseen las mismas cadenas ligeras. Para probar si los anticuerpos efectivamente estaban dirigidos contra tales cadenas, se hicieron reaccionar los antisueros contra IgG completa y se obtuvieron bandas con la forma y en el sitio esperados (32), figura 11. Así se determinó que el antisuero obtenido servía para realizar las reacciones de precipitación y que los resultados serían confiables.

En la prueba de pureza de los fragmentos Fab y Fc se utilizó también la IEF, al igual que con las cadenas pesadas y ligeras, y además se probó su composición en DID. El Fc se probó contra antisueros comerciales dirigidos contra cadenas kappa, lambda, alfa, delta y mu (laboratorio Miles) y no se obtuvo ningún resultado contradictorio; al probarlo en IEF contra su antisuero, se obtuvo una banda que, de acuerdo con la bibliografía (33),

sí corresponde al Fc: es corta y su movimiento tiende hacia el ánodo.

El Fab se probó también por IEF (34) y por DID, contra anti-Fab comercial y se obtuvieron bandas de precipitación. En la IEF la banda es larga y tiende al cátodo. El movimiento de la IgG completa es intermedio entre las movibilidades de los fragmentos. (véase figura 12).

Con base en lo anterior se consideró que sí había pureza en los antígenos con los que se había inmunizado a los conejos y que sí se podía continuar con las pruebas para ver si había reactividad cruzada.

Las respuestas de los conejos a la inmunización con Fab, Fc y sueros totales fueron buenas en lo que se refiere a la intensidad de las reacciones de precipitación, lo que hace considerar que las concentraciones de anticuerpos y la afinidad de los mismos eran adecuadas; pero los antisueros obtenidos contra cadenas kappa y lambda, y cadenas gamma fueron débiles. No obstante, con estos antisueros se pudieron obtener reacciones cruzadas y de identidad antigénica en algunos casos. La no respuesta adecuada a estos antígenos puede deberse a la concentración de los mismos en las estimulaciones antigénicas, dado el sistema de inmunización utilizado.

Reacciones cruzadas

Como se indica en los cuadros 1 y 2, todos los antígenos produjeron reacciones inmunológicas en los conejos y los antisueros obtenidos produjeron reacciones homólogas y heterólogas en los

sistemas en que se probaron.

El que se produzca la reacción cruzada significa que los anticuerpos reconocen sus determinantes antigénicos específicos en el antígeno contra el que se pone a reaccionar, por ejemplo: el suero anti-Fc de cerdo (figura 13) reconoce sus determinantes antigénicos en el suero humano y en el suero de cerdo, por lo que se observan precipitaciones contra los dos.

Para saber si los anticuerpos estaban reaccionando con los mismos determinantes antigénicos en los dos sueros (humano y de cerdo), se utilizó un sistema distinto de IEF (figura 13), el cual facilitara la observación de una reacción de identidad, y ésta se encontró. La identidad se reconoce porque las dos bandas de precipitación formadas se unen al menos en uno de sus extremos, y cuando esto sucede es indicativo de que los determinantes antigénicos en las moléculas de ambas especies son iguales o, por lo menos, muy parecidos; pero además indica que no hay otros determinantes antigénicos distintos. De lo anterior se desprende que el Fc de cerdo y el Fc humano comparten determinantes antigénicos, de tal forma que éstos son reconocidos por los antisueros específicos producidos contra cualquiera de ellos.

Los resultados obtenidos con los otros antígenos se interpretaron en forma similar; Fab, cadenas pesadas y cadenas ligeras (figuras 14, 15 y 16).

En todos los casos se observa la identidad antigénica, sin embargo, esto no significa que hay igualdad estructural y así, hay que señalar que se encontraron diferencias electroforéticas: siempre que se hicieron pruebas de EGPA-SDS se observó que

las cadenas ligeras de cerdo avanzan más que las cadenas ligeras humanas (véase figura 8), lo cual indica que su peso molecular es inferior.

Se había propuesto (35) que de encontrarse semejanza entre estas moléculas (IgG humana y de cerdo), esto podría aprovecharse para la producción de antisueros heterólogos que no causarían hipersensibilidad al ser administrados a seres humanos. Los resultados de este estudio marcan un parecido importante entre las dos proteínas si se considera que la semejanza inmunológica tiene cierta correlación con la secuencia de aminoácidos (36), de tal forma que si existe parecido entre secuencias hasta del 60%, como mínimo, es posible que se produzca la reacción heteróloga. Esto, junto con la observación de la identidad antigénica, podría alentar una mayor experimentación encaminada a la producción de sueros heterólogos de cerdo para consumo humano.

CONCLUSIONES

En resumen, los puntos más sobresalientes son:

- * Con las técnicas empleadas se obtuvieron antígenos suficientemente puros.
- * Los anticuerpos producidos pueden considerarse monoespecíficos.
- * Se encontraron diferencias electroforéticas entre las cadenas ligeras de la IgG humana y la IgG de cerdo, que sugieren diferencias en tamaño y, por lo tanto, en peso molecular.
- * Se encontró parecido inmunológico entre cadenas gamma, cadenas kappa y lambda, fragmentos Fab y Fc de la IgG de ambas especies.
- * La semejanza inmunológica encontrada incluye también la identidad antigénica entre los fragmentos estudiados.
- * Aunque probablemente la IgG humana y la IgG de cerdo no son idénticas estructuralmente, actúan en forma muy parecida antígenicamente, lo cual explica por qué los cerdos inmunizados con IgG humana no respondieron.
- * Por lo anterior, se puede esperar que la respuesta humana a una inmunización con IgG completa de cerdo no será muy significativa si se considera que se encontró identidad antigénica en todos los fragmentos estudiados de ambas moléculas, y quizás sea una alternativa interesante para poner a prueba cuando se piensa en seroterapia heteróloga en humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ayala, Francisco L.: "Mecanismos de la evolución". En: Investigación y Ciencia, núm. 26, noviembre, 1978, pág. 33.
2. Arnheim, N.: "The Evolution of Proteins". En: Antigens, vol. I (Sela, M., ed.) Academic Press, Londres, 1973, pág. 379.
3. Ayala, Francisco L., op. cit., pág. 24.
4. Arnheim, N., op. cit., pág. 389.
5. Prager, M.E. y C.A. Wilson: "The Dependence of Immunological Cross-Reactivity upon Sequence Resemblance among Lisozimes." En: The Journal of Biological Chemistry, vol. 246, núm. 19, 1971, pág. 5986.
6. Arnheim, N. op. cit., pág. 380.
7. Leder, P.: "The genetics of antibody diversity." En: Scientific American 246:5, mayo, 1982.
8. Idem, págs. 74-75.
9. Kubo, R.T., B. Zimmerman y H.M. Grey. "Phylogeny of Immunoglobulins". En: Antigens, vol. I (Sela, M., ed.), Academic Press, Londres, 1973, págs. 417-419.
10. Idem, pág. 470.
11. Gally, J.A. "Structure of Immunoglobulins." En: Antigens, vol. I (Sela, M., ed.), Academic Press, Londres, 1973, pág. 162.
12. Idem, pág. 167.
13. Idem, pág. 169.
14. Idem, pág. 173.
15. Idem, pág. 250-252.

16. Fudenberg, H.H., D.P. Stites, et.al.: Manual de Inmunología Clínica. Ed. El Manual Moderno, S.A., 2a. ed., México, 1980 págs. c. 41-42.
17. Idem, pág. 170.
18. Fragoso, C.P.: Cuantificación de IgG humana por el método de inmunodifusión radial, utilizando anticuerpos de cerdo. México, 1981, U.N.A.M., Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, p.c. 40-41.
19. Spiegelberg, H.L.: "Theoretical Considerations of Antigen-Antibody Reactions and Isolation of IgG and its Fragments." En: Immunoassays in the Clinical Laboratory, págs. 9-11.
20. Williams, C.A., M.W. Chase: Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. II, Academic Press, Londres-Nueva York, 1968.
21. Ratchford, C. y H. Dahmus. "Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrilamide gels." En: Anal. Bioch., vol. 93, 1979, págs. 257-260.
22. Spiegelberg, H.L., op.cit., p.c. 11.
23. Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology, Section B; Chemical Characterization of Immunoglobulins and their sub units. Blackwell, 2a. ed., p.c. 10.11-10.13.
24. Fudenberg, H.L., op. cit., p.c. 358.
25. Osborn, M. y Weber, K. "The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis." J. Biol.Chem., vol. 244, 1969, págs. c. 4406-4412.
26. Fudenberg, H.L., op. cit., p.c. 59.
27. Campbell, D.H., J.S. Garvey, et.al.: Methods in Immunology,

- 2a. ed., W.A. Benjamin, Inc., Nueva York, 1970, págs. 260-267.
28. Spiegelberg, H.L., op. cit., pág. 11.
29. Williams Jr. C.A.. "Immunoelectrophoresis". En: Scientific American, vol. 202, 1960, pág. 130.
30. Idem, pág. 131.
31. Idem, pág. 133.
32. Spiegelberg, H.L. op. cit., pág. 17.
33. Idem, pág. 12.
34. Idem, pág. 12.
35. Fragoso, C.P., op. cit., págs. 40-41.
36. Prager, M.E. y C.A. Wilson, op.cit.