

24.27



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

PROTEINAS DE EMBARAZO:

**DISEÑO Y DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA
PARA LA CUANTIFICACION DE ALFA-FETOPROTEINA
EN EL SUERO DE MUJERES EMBARAZADAS.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a :
Adriana Ramírez Moreno





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

C O N T E N I D O

	Página
Abreviaturas	1
Introducción	2
Planteamiento del problema	18
Objetivos	19
Hipótesis	20
Material y métodos	21
Resultados	57
Discusión	95
Conclusiones	110
Resumen	111
Referencias bibliográficas	112

A B R E V I A T U R A S

Alfa-fetoproteínaAFP
Suero comercial anti-AFP.S anti-AFP
Suero de conejo anti-AFP.SC anti-AFP
Suero de cabra hiperimmune anti-AFPSCH anti-AFP
Suero monoespecífico de cabra anti-AFP.SMC anti-AFP
Suero de caballo anti-suro normal humano.SCa anti-SNH
Suero de conejo anti-cabra unido a peroxidasaSCO anti-Ig de cabra-PO
Suero estandar comercial de AFPSECAPP
Suero de mujer normalSMN
Suero de mujer embarazadaSME
Suero de hombre normal.SHN
Suero normal humanoSNH
Suero de cordón umbilicalSCU
Líquido amnióticoL.A.
Gamma-globulinaGG
AnticuerpoAc
AntígenoAg
Anticuerpo-enzimaAc-E
InmunolectroforesisIEF
Inmunolectroforesis bidimensional.IEF-B
Inmunolectroforesis de cohete.IEF-C
Inmunodifusión radialID-R
Inmunoensayo enzimáticoELISA
RadioinmunoensayoRIA
Electroforesis en geles de poliacrilamidaEFGP
Electroforesis en bloque de almidónEFBA
Electroforesis en acetato de celulosaEFAC
Cáncer hepático primario.CHP
Defectos del cierre del tubo neuralDTN
Adyuvante completo de FreudACF
Adyuvante incompleto de FreudAIF
Albúmina sérica bovina.ASB
Densidad ópticaD.O.
Fluorodinitrobenzeno.FDNB
HidroximetilaminometanoTris
N, N, N', N'-tetrametiletildiamina.TEMED
Orto-fenilendiaminaOPD
Peroxidasa de rábano fuertePRF
Polietilenglicol.PEG
Revoluciones por minutorpm
Solución reguladora salina-fosfatosPBS

I N T R O D U C C I O N

La alfa-fetoproteína (AFP) es una glicoproteína asociada al embarazo cuya cuantificación ha sido ampliamente aceptada como un parámetro auxiliar en la detección de fetos con defectos en el cierre del tubo neural (DTN), en otras malformaciones fetales severas y en algunas enfermedades malignas humanas, debido a que en éstos casos su concentración se encuentra generalmente aumentada.

Hirzfeld en 1932 sugirió que debido a la considerable similitud morfológica entre los tejidos cancerosos y embrionarios, éstos deberían compartir características antigénicas semejantes (51).

Pederson en 1944 fué el primero en detectar en el suero fetal de becerros una proteína con movilidad electroforética alfa₁ la cual estaba ausente en el suero de bovinos adultos, a ésta proteína la llamó fetuina. Posteriormente Bergstrand y Czar en 1956 detectaron por primera vez en el suero fetal humano mediante electroforesis en papel, una proteína análoga a la fetuina que no fué detectada en el suero de adultos sanos. Esta proteína se designó con el nombre de alfa-fetoproteína por mostrar una movilidad electroforética entre la albúmina y la región de las alfa₁-globulinas (7).

Abelev y cols. en 1963 reportaron la presencia de una globulina fetal en el suero de ratas y ratones que presentaban hepatomas primarios, la cual no fué detectada en el suero de éstos animales con otro tipo de tumores (2).

Tatarinov en 1964 y Abelev en 1967 encontraron que en el suero de pacientes con carcinoma hepático primario

(GHP) se encontraban los niveles de AFP generalmente elevados (1, 72). Posteriormente Masopust en 1968 observó un incremento similar en el suero de pacientes con teratoblastoma maligno de testículo y ovario (39). Debido a éstos hallazgos la AFP fué el primer antígeno embrionario relacionado a tumores cancerosos, confirmando la teoría de Hirzfeld.

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA AFP

La AFP purificada a partir de suero fetal humano, de hepatoma, de líquido ascítico y de teratocarcinoma parecen ser fisicoquímicamente idénticas. La AFP es una glicoproteína con movilidad electroforética α_1 , constituida por una cadena polipeptídica simple, con un peso molecular de 64 000 a 70 000 daltons, contiene 4.3% de carbohidratos (2.2% de hexosa no nitrogenada, 1.2% de hexosamina, 0.9% de ácido siálico)(58), su secuencia de aminoácidos es muy similar a la de la albúmina (60) con un punto isoeléctrico de 4.76 y coeficiente de sedimentación entre 4.5 a 5.5 (40) su coeficiente de extinción a 280 nm es de 5.3 (46) y presenta una gran afinidad por los estrógenos como el 17- β -estradiol con una constante de afinidad de $10^8/M$ (3). Presenta microheterogeneidad al mostrar 2 constantes de afinidad por la concanavalina A y 2 movilidades electroforéticas (70). La AFP presenta la formación de polímeros que aparecen como artefactos después de congelamientos y descongelamientos sucesivos ya que en el suero nativo no están presentes, pero ambas formas reaccionan con el suero anti-AFP (58).

LOCALIZACION DE LA AFP

I) Condiciones Normales

a) Síntesis de la AFP.- La AFP se puede detectar en

embrión humano a los 29 días después de la concepción - (25) ya que para ésta etapa del desarrollo el primordio hepático ya es capaz de producir además de la AFP otras proteínas como la prealbúmina, albúmina, la alfa₁-antitripsina, la alfa₂-macroglobulina, C₃, beta₁-lipoproteína, inhibidor del C₁-estearasa, hemopexina y transferrina las cuales son secretadas al torrente circulatorio - del feto (23, 24).

Entre los 32 a 35 días después de la concepción los lóbulos hepáticos pueden ser evidentes y aparentemente se inicia la síntesis de la ceruloplasmina y la alfa₁-glicoproteína ácida; a ésta edad gestacional el saco vitelino es una estructura bien desarrollada y sintetiza prealbúmina, albúmina, alfa₁-antitripsina y transferrina en adición a la AFP. Con excepción de la albúmina, éstas proteínas son sintetizadas en cantidades iguales o más grandes que las producidas por el hígado del embrión. Después de ésta etapa el saco vitelino se va degenerando anatómica y fisiológicamente por lo que la síntesis de las proteínas mencionadas va disminuyendo lentamente, excepto la albúmina. A los 60 días de la gestación el saco vitelino ha disminuido significativamente su producción de AFP, - prealbúmina, alfa₁-antitripsina y transferrina y a las - 11.5 semanas de gestación sintetiza cantidades casi nulas de prealbúmina, alfa₁-antitripsina y cantidades muy pequeñas de AFP, albúmina y transferrina (23, 24).

La síntesis de AFP también toma lugar en el tracto gastrointestinal del feto, pero su aporte es muy pequeño comparado con el del hígado fetal y el saco vitelino. Ocasionalmente se ha detectado que el riñón fetal y la placenta pueden producir trazas de AFP (25).

b) Niveles de AFP en el suero fetal.- Alrededor de

la semana 6.5 de la gestación la concentración de la AFP en el suero fetal es de 67 $\mu\text{g/ml}$ (22), durante las siguientes 3 semanas de la gestación la concentración se incrementa aproximadamente 30 veces alcanzando niveles cercanos a 2 000 $\mu\text{g/ml}$, ésto al parecer se debe a un incremento en la síntesis hepática ya que en ésta etapa gestacional el saco vitelino ha cesado casi por completo la síntesis de AFP, por ésta razón el incremento de la AFP en el suero fetal durante las semanas 6.5 a las 9.5 de la gestación se puede atribuir a exclusiva síntesis hepática.

Durante la semana 10 a la 13 de la gestación la concentración de AFP en el suero fetal alcanza un nivel de 3 000 $\mu\text{g/ml}$, virtualmente toda la AFP presente en ésta etapa del desarrollo fetal es de origen hepático; a pesar de que la cantidad de AFP sintetizada por el feto sigue aumentando hasta la 20 semana de la gestación, a partir de la semana 14 hasta la semana 30 ó 32 la concentración de AFP disminuye de manera exponencial llegando a una concentración aproximada de 200 $\mu\text{g/ml}$. Después de la semana 32 ó 34 su concentración disminuye lentamente hasta el término del embarazo, detectandose niveles de 13 a 86 μg por ml al momento del nacimiento.

c) Niveles de AFP en el suero de recién nacido.- Al momento del parto la concentración de AFP en el suero de cordón umbilical es de 10 a 15 $\mu\text{g/ml}$ (49). La concentración de AFP en el suero de recién nacido es aproximadamente 13 000 veces más elevada que la encontrada en el suero de adultos normales y 625 veces más elevada que en el suero de la madre al momento del parto (14), ésta concentración disminuye rápidamente durante las primeras semanas de vida. En la primera semana la AFP tiene una vi-

da media de 5 días y después de ésta es cercana a los 3 días, posteriormente decrece gradualmente hasta una concentración de 2 ng/ml que corresponde a los niveles encontrados en el suero de adultos normales (19, 41, 59).

Pocos son los casos en los que niños sanos mayores de 1 año de edad presentan una concentración de AFP por arriba de 200 ng/ml.

Se ha reportado que el suero de niños al momento del nacimiento tienen 1.8 veces más AFP que el suero de niñas, pero ésta diferencia desaparece después de la primera semana, sin embargo no se ha encontrado diferencia en los sueros de las madres de los niños o niñas durante el embarazo ó al momento del parto (14).

d) Niveles de AFP en el líquido amniótico.- Del 95- al 98% de las proteínas que se encuentran en el líquido amniótico son de origen materno (29) siendo una de las excepciones la AFP ya que es una proteína aportada por el feto a través de la orina (22, 66). La concentración más alta de AFP en el líquido amniótico se detecta alrededor de la semana 13 de la gestación alcanzando un valor medio de 15 µg/ml, posteriormente disminuye paralelamente a como lo hace en el suero fetal.

e) Niveles de AFP en el suero materno.- Foy y cols. en 1970 fueron los primeros en demostrar el incremento de AFP en el suero de mujeres embarazadas (21). Durante el embarazo la concentración de AFP se incrementa en el suero materno debido al paso de ésta a través de la placenta o membranas amnióticas por gradiente de concentración del feto hacia la madre (27, 66). En el primer trimestre la concentración de AFP no rebasa el rango del adulto normal, pero a partir de la semana 16 en la que la concentración es de 45 ng/ml se incrementa gradualmente

hasta alcanzar un nivel máximo de 450 ng/ml durante el tercer trimestre (30 a 32 semanas de concepción), mientras en éste mismo período la concentración de AFP sérica fetal disminuye de 2×10^6 ng/ml a 2×10^5 ng/ml, sin embargo la concentración máxima de AFP en el suero materno se alcanza en las semanas 30 a 32 de la concepción - (27, 68).

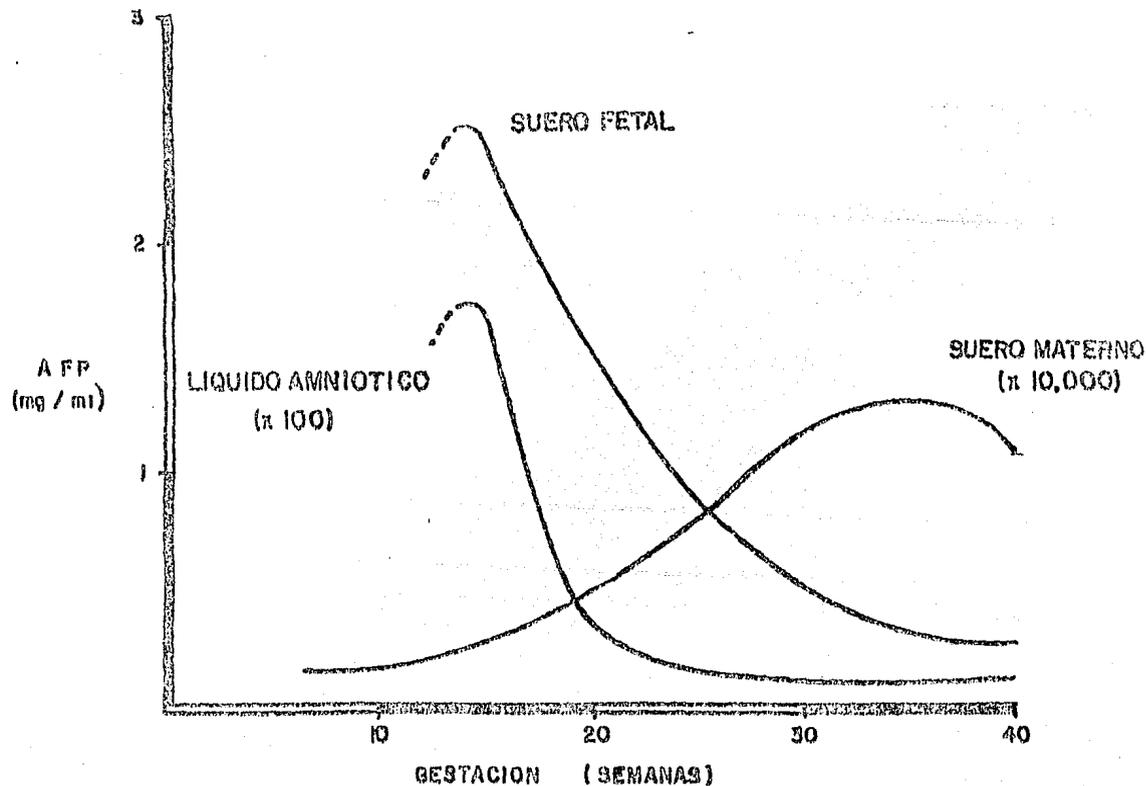
En el momento del parto la concentración de AFP en el suero materno es cercana a los 50 ng/ml.

II) Condiciones patológicas

a) Niveles de AFP en el suero de recién nacidos.- Se han encontrado niveles aumentados de AFP en el suero fetal y de recién nacidos asociados a ciertos casos de embarazos complicados (12, 53, 81, 83). En casos de niños recién nacidos de madres diabéticas (53) o sometidas a isoinmunización Rh severa (12) se han encontrado niveles anormalmente elevados de AFP comparados con los niveles encontrados en niños sanos, mientras que los neonatos de madres toxémicas presentan concentraciones por debajo del nivel normal. Se desconoce la razón de éstas discrepancias, sin embargo se propone que la activación de las células hematopoyéticas en el hígado fetal en el caso de isoinmunización Rh severa y la relativa inmadurez de la función hepática del feto de madres diabéticas pueden explicar los niveles elevados de AFP en el suero de cordón, mientras que los niveles bajos de AFP en neonatos de madres toxémicas pueden reflejar una maduración acelerada del hígado fetal.

En otros casos como en los neonatos con ataxia telangiectasia (81) o hepatitis neonatal (83) se pueden en

CONCENTRACIONES MEDIAS DE AFP EN EL SUERO FETAL, LIQUIDO AMNIOTICO Y SUERO MATERNO DE EMBARAZOS NORMALES



contrar concentraciones elevadas de AFP.

b) Niveles de AFP en el líquido amniótico.— En 1972 Brock y Sutcliffe publicaron la existencia de cierta asociación entre presencia de DTN en fetos y niveles elevados de AFP en el líquido amniótico (9, 11). Estudios posteriores realizados por otros grupos de investigadores confirmaron tal asociación (44, 45, 65, 71, 76, 80, 82).

Dentro de las enfermedades asociadas al incremento de AFP en el líquido amniótico están: anencefalia, espina bífida, hidrocefalia, exocefalia, encefalocele, meningocele, mielomeningocele, miocele, omfalocele, craneorraquisquisis, atresia esofágica, atresia duodenal, nefrosis congénita, trisomía G-21 y trisomía E, entre otras.

En los casos de DTN el feto presenta en el suero una concentración normal de AFP, por lo tanto, el incremento en el líquido amniótico se atribuye a la filtración del fluido cerebroespinal o bien a la transudación o sangrado de los capilares del feto directamente expuestos al líquido amniótico (62). Esta hipótesis se apoya en la observación de que en fetos con espina bífida "cerrada" la concentración de AFP está normal o ligeramente aumentada. En los casos de anencefalia se confiere el incremento de AFP en el líquido amniótico a la depresión de la deglución fetal (56), lo que contribuye al desarrollo de hidramnios; en los casos de nefrosis congénita se considera que es debido a la presencia de proteinuria, y en las malformaciones del tracto gastrointestinal, al decremento de la deglución y digestión del líquido amniótico.

En la Gran Bretaña se realizaron estudios colaborativos entre varios hospitales con el fin de analizar la especificidad y selectividad de la cuantificación de la AFP en el líquido amniótico para la detección de DTN. Los

resultados demostraron que se lograron detectar el 95% de los casos con anencefalia y el 86% de los casos con es pina bífida, éstos porcentajes de detección se incrementa ban sí el estudio se realizaba antes de la semana 24 de - la gestación (77).

Por lo anteriormente expuesto la cuantificación de la AFP en el líquido amniótico tiene un gran valor diag- nóstico en madres de fetos con DTN y, asociado con un exá men por ultrasonido, puede ayudar a establecer un crite- rio para realizar un aborto selectivo y evitar el naci- miento de niños con problemas de éste tipo.

c) Niveles de AFP en el suero materno.- De manera - independiente Brock y Leek en 1973 observaron que una e- levación anormal de AFP en el líquido amniótico en presen- cia de DTN se refleja generalmente en el suero materno, - alcanzando concentraciones muy por arriba de las que co- rresponden al embarazo normal. Se considera que ésto se debe al paso de la AFP a través de las membranas amnióti- cas (8, 33). Estos hallazgos fueron posteriormente confir- mados por otros investigadores (8, 10, 62, 63, 69).

Se han detectado concentraciones elevadas de AFP en el suero de madres con embarazo múltiple (27).

Debido a que la práctica de la amniocentesis lleva el riesgo de provocar pérdida fetal, la posibilidad de cuantificar la AFP en el suero materno es de gran utili- dad para evitar tal riesgo. Apoyados en ésto en 1977 se reportó un estudio colaborativo realizado en el Reino U- nido con el objeto de evaluar la eficiencia de la prueba de la AFP sérica materna para detectar DTN (76). En él se estableció que 2.5 veces el valor de la media normal era el límite de referencia por arriba del cual se consideró que existía riesgo de presentar DTN, se observó que el -

mejor tiempo para detectar embarazos con riesgo de DTN estaba entre la 16 a la 18 semana de gestación ya que se lograron detectar el 88% de los casos de anencefalia y el 79% de los casos con espina bífida.

Esto demostró que la cuantificación de la AFP en el suero materno no es diagnóstica para DTN pero sí selecciona a mujeres embarazadas con alto riesgo de tener fetos afectados, sobre todo cuando la ultrasonografía no es muy útil en la detección de éstos problemas.

Estudios similares se han llevado a cabo en otros países como Suecia, Holanda, Inglaterra, Canadá y Estados Unidos en los que se ha confirmado que la cuantificación de la AFP sérica materna es útil como prueba de tamizaje en la detección de fetos con DTN con una eficiencia del 92 al 96%, además de que también es indicativa de otras posibles complicaciones durante el embarazo por lo que se ha establecido como prueba de rutina en la gineco-obstetricia (69).

Otras posibles complicaciones que pudieran haber durante el embarazo que no están relacionadas a DTN y sin embargo están asociadas a incrementos de AFP son:

-Amenaza de aborto y muerte intrauterina: Wald y cols. encontraron que había una probabilidad 6 veces mayor de amenaza de aborto espontáneo en pacientes que presentaban incrementos anormales de AFP durante el segundo trimestre del embarazo. Se ha observado que existe amenaza de aborto en el momento que se incrementa la AFP o pocos días después. La amenaza de aborto con niveles incrementados de AFP está asociada a muerte intrauterina durante los 3 trimestres del embarazo (66, 67, 79).

-Isoinmunización Rh severa: Pacientes con isoimmunizaciones severas en donde el feto requiere de transfusio

nes intrauterinas es común encontrar niveles incrementados de AFP en el suero materno (13).

-Nefrósia congénita: En ocasiones las madres de fetos con nefrósia congénita presentan niveles incrementados de AFP en el suero, probablemente por exceso de trans fusión transaplacentaria o transamniótica de ésta proteí na ya que en éstos casos la placenta es muy grande (63, - 74).

-Toxémia y sufrimiento fetal: Se encuentran incremen tos de AFP en el tercer trimestre en el caso de existir - toxémia y sufrimiento fetal (15, 67).

-Mola hidatidiforme y neoplasia trofoblástica: Debido a que es difícil distinguir entre un embarazo normal y una mola hidatidiforme o neoplasia trofoblástica se ha tomado como referencia el que sí hay concentraciones de AFP menores que las encontradas en un embarazo normal - es indicativo de ausencia de feto (64).

-Otras condiciones: La presencia de fetos con gas trosquisis, ataxia telangiectasia, sufrimiento fetal y tirosinemia hereditaria pueden presentar incrementos en la concentración de AFP en el suero materno (67, 81).

d) Niveles de AFP en el suero de pacientes con car cinoma hepático primario (CHP).- Abelev y cols. en 1963 descubrieron una alfa-globulina embrionaria en el suero de ratas y ratones con hepatoma primario, la cual no se presentaba en éstos animales con otro tipo de tumores - (2).

Tatarinov en 1964 y Abelev en 1967 detectaron que existían elevaciones de la concentración de AFP en el sue ro de pacientes con CHP (1, 72).

Observaciones posteriores confirmaron que existían niveles incrementados de AFP en pacientes con CHP (73,

74) y teratocarcinoma (1, 39); en base a ésto se propuso la cuantificación de la AFP como una prueba diagnóstica para éstas enfermedades malignas.

En 1966 se realizó un estudio colaborativo por la - International Agency of Research on Cancer en el que se evaluó la eficiencia de la prueba de la AFP para detectar CHP (54). Las muestras analizadas se obtuvieron de Centros Médicos de Jamaica, Kenia, Uganda, República del Congo, Nigeria, Senegal, Singapur y se analizaron en Francia y la U.R.S.S.. En éste estudio se encontró que el 66% de aquellos pacientes que presentaban CHP confirmado clínica e histopatológicamente mostraban concentraciones elevadas de AFP en el suero, el 32.4% presentó resultados negativos y un 6.5% presentó resultados discordantes, como grupo control se estudiaron sueros de pacientes con padecimientos tales como cirrosis hepática, hepatitis, otras lesiones hepáticas, carcinomas extrahepáticos, enfermedades infecciosas, metabólicas y nutricionales y de éstos solo el 2.1% mostraron niveles incrementados de AFP, el 1.9% mostró resultados positivos o discordantes y el 96% dió resultados francamente negativos. Algunos pacientes del grupo control que mostraron incrementos de AFP presentaron teratoblastoma maligno del testículo. De los pacientes con CHP confirmado, cuya prueba dió resultados negativos por la técnica modificada de Ouchterlony, se pudo comprobar por el método del radioinmunoensayo que los niveles de AFP medidos eran anormalmente altos.

Aunque niveles anormales de AFP pueden aparecer en varias enfermedades del hígado es relevante su relativa especificidad para el CHP.

Se ha aplicado exitosamente la cuantificación de la AFP en el seguimiento de la terapia contra tumores produc

tores de AFP ya que en pacientes intervenidos quirúrgicamente con remisión total del tumor la concentración de - AFP sérica baja rápidamente, pero en el caso de existir residuos tumorales o metástasis ésta se incrementa paulatinamente y en el caso de pacientes sometidos a quimioterapia o radioterapia puede indicar la eliminación o crecimiento del carcinoma (42).

e) Niveles de AFP en el suero de pacientes con tumores indiferenciados no seminomatosos de testículo y ovario.- En forma simultánea Abelev (1967) y Masopust (1968) demostraron que aquellos pacientes que presentaban teratocarcinoma del ovario y testículo (1, 39) tenían niveles de AFP en el suero anormalmente elevados y que los pacientes con tumores indiferenciados presentaban concentraciones elevadas de AFP no así los pacientes con tumores bien diferenciados.

Se observó que en los casos de pacientes con tumores no seminomatosos de ovario y testículo la concentración de AFP se elevaba en el suero conforme avanzaba la enfermedad, por lo que se consideró que la concentración de AFP puede ser utilizada como indicador bioquímico del progreso o remisión de la enfermedad durante la terapia, además es de gran ayuda en el pronóstico de la aparición de la patología ya que antes de que ésta se manifieste clínicamente, la concentración de la AFP aumenta en el suero (28, 39, - 68).

f) Niveles de AFP en el suero de pacientes con otros tumores y enfermedades.- Se ha reportado la existencia de niveles elevados de AFP en pacientes con carcinoma gástrico y pancreático (75, 78) y en algunas enfermedades metabólicas congénitas o inmunológicas tales como la tirosinemia congénita (51), la cirrosis de la niñez indú (43) y -

en la ataxia telangiectasia (81). En 1975 Chandra detectó niveles incrementados de AFP en pacientes con fibrosis cística y también se pudieron detectar incrementos ligeros en los pacientes de éstos enfermos por lo que se sugirió que la cuantificación de la AFP pudiera ser de gran utilidad para la detección de portadores heterocigóticos con riesgo a desarrollar ésta enfermedad (18) sin embargo otros investigadores no han podido detectar incrementos de AFP en relación con la fibrosis cística.

ANTISUEROS ANTI-AFP

La AFP homóloga no es inmunogénica en su especie de origen, mientras que la AFP heteróloga es un potente inmunógeno que induce la formación de anticuerpos de reacción cruzada con la AFP de la especie inmunizada, esto ha sido observado en conejos inmunizados con AFP humana (47) y en monos inmunizados con AFP de conejo (48, 61). Estos hallazgos han originado gran interés ya que se considera que existe la posibilidad de usar tales inmunizaciones para la inmunoterapia o posible profilaxis de tumores productores de AFP como en el CHP, pero los resultados hasta ahora no han sido concluyentes.

MÉTODOS DE PURIFICACION DE LA AFP

Se han utilizado diferentes procedimientos para la purificación de la AFP a partir de diversas fuentes como son: suero fetal humano de menos de 20 semanas de gestación o bien el hígado fetal (especímenes ideales pero de difícil obtención), suero de cordón umbilical obtenido al momento del parto, líquido amniótico, suero de pacientes con CHP o teratocarcinoma, líquido ascítico u homogenizado de hígado fetal o de tumor. Entre las técnicas -

que se han usado se encuentran la precipitación por sala do con sulfato de amonio (48), a partir de inmunoprecipi tados o utilizando matrices insolubles como la Sefarosa activada con bromuro de cianógeno ya sea acoplada a anti cuerpos anti-AFP de baja afinidad o bien a concanavalina A, éstas dos últimas alternativas han permitido obtener preparaciones más puras de AFP debido a que se elimina la albúmina que es el mayor contaminante del material purifi cado por otros procedimientos (55, 57).

MÉTODOS DE CUANTIFICACION DE LA AFP

Se han descrito varios métodos inmunológicos para la detección y cuantificación de la AFP.

Para concentraciones de AFP por arriba de los 500 μg por ml se han usado diversas técnicas de inmunoprecipi tación en gel, entre las técnicas cuantitativas en gel se encuentran la inmunodifusión radial que puede cuantificar concentraciones mayores a los 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (37), mientras - que la inmunolectroforesis de cohete puede detectar cer ca de 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (31) aumentando su sensibilidad a 20 ng por ml utilizando AFP marcada con ^{125}I (50).

Las técnicas semicuantitativas como la aglutinación en partículas de latex detecta concentraciones de 250 ng por ml y el ensayo por fijación de complemento puede de tectar concentraciones de entre 40 a 80 ng/ml (20, 51).

Se han diseñado técnicas más sensibles como los mé- todos autorradiográficos, los de radioinmunoensayo y la técnica de inmunoensayo-enzimático (ELISA) para cuantifi car concentraciones por abajo de 40 ng de AFP por ml.

Los métodos autorradiográficos directos e indirectos que utilizan AFP ó anticuerpos anti-AFP marcados con ^{125}I se pueden detectar hasta 2 ng/ml pero son de poca a

plicación clínica principalmente por su complejidad y al to costo (50, 52).

Existen varias técnicas de radioinmunoensayo (RIA) para cuantificar AFP en concentraciones del orden de - 1-50 ng/ml, en éstas técnicas se utiliza al antígeno o al anticuerpo marcado con ^{125}I (19, 41), el sistema más utilizado es el constituido por doble anticuerpo pero se han hecho diversas modificaciones para mejorar la sensibilidad, pudiendo cuantificar concentraciones hasta de - 500 pg/ml.

La aplicación de la técnica de ELISA para la cuanti ficación de la AFP ha proporcionado una excelente alter nativa dentro del laboratorio de diagnóstico clínico y - de investigación ya que además de ofrecer una gran sensi bilidad (del orden de 3 a 1000 ng/ml), los reactivos im plicados son estables, no radiactivos ni muy costosos, es rápida y da un alto grado de reproducibilidad y se puede efectuar con equipo sencillo de laboratorio; se han esta blecido varias modificaciones que han mejorado la sensi bilidad y especificidad de la prueba (5, 6, 35, 36). To- do lo anterior hace que las técnicas de ELISA sean fuerte- mente competitivas con el método de RIA, este último aun que es más sensible presenta el inconveniente de que los reactivos que son requeridos además de ser de alto costo tienen una vida media corta, se manejan radioisotopos - que representan un riesgo para el técnico que lo realiza y se necesita equipo complicado como un contador de cen- telleo gamma que incrementa aún más su costo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La frecuencia de nacimientos de niños con defectos del tubo neural de madres mexicanas va en aumento constante. Se ha visto que éstos tienen una incidencia de 6 a 7 por cada 1 000 nacimientos aproximadamente, lo que muestra que el riesgo de nacimientos de niños con DTN es considerable, dada la alta tasa de crecimiento que se da en el país.

Esto obliga a las instituciones encargadas de la salud a adoptar alguna medida para lograr la disminución del número de nacimientos de niños con éste tipo de enfermedades y por ello se deben de tener técnicas o métodos auxiliares para la detección de fetos con defectos del tubo neural. Una de ellas es la cuantificación de la AFP, que aunque no es una prueba definitiva, junto con el examen por ultrasonido y la historia clínica de la paciente, ayuda al médico a decidir si el embarazo se lleva a término o no.

Creemos que es necesario el establecimiento de una técnica confiable para la cuantificación de la AFP de acuerdo con las necesidades y posibilidades técnicas del país, que ayude tanto en el área clínica como en el área económica, que evite la importación de reactivos, que sea de fácil acceso a pacientes con embarazo de alto riesgo y que sea practicable en laboratorios con equipo sencillo.

Por ésto, la técnica deberá ser reproducible, confiable, rápida, sencilla, no costosa y debe existir la posibilidad de que los reactivos biológicos sean producidos por un laboratorio nacional.

O B J E T I V O S

PARTICULARES

- A) Obtención de un suero monoespecífico de cabra anti-
alfa-fetoproteína.
- B) Purificación de la alfa-fetoproteína a partir de --
suero de cordón umbilical mediante algún procedimiento
inmunoquímico.
- C) Realización de varias técnicas inmunológicas que por
medio del suero monoespecífico permita la cuantificación
de la alfa-fetoproteína en líquidos biológicos
(especímenes clínicos).
- D) Estandarización de la técnica seleccionada.
- E) Aplicación de la técnica estandarizada en la cuanti-
ficación de la alfa-fetoproteína en muestras están--
dar y líquidos biológicos de interés.

GENERAL

Montar y desarrollar una técnica reproducible y con-
fiable para la cuantificación de la alfa-fetoprotef-
na en el suero de mujeres embarazadas y en los líquido
s amnióticos correspondientes.

H I P O T E S I S

"Si se obtiene el suero monoespecífico, éste será aplicable en técnicas inmunológicas para cuantificar la alfa-fetoproteína, lo que a su vez, permitirá el diagnóstico de enfermedades perinatológicas".

M A T E R I A L Y M E T O D O S

MATERIAL

Material biológico:

a) Suero de cordón umbilical (SCU).- Se extrajo a partir de la sangre arterial y venosa del cordón umbilical obtenida inmediatamente después del parto. La sangre se dejó coagular a 37°C durante 30 min, posteriormente el coágulo se retrajo a 4°C durante 30 min y se removió, el suero resultante se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min y se conservó a -20°C hasta su uso.

b) Líquido amniótico (LA).- Mediante amniocentesis se obtuvieron 103 muestras de líquido amniótico a diferentes edades gestacionales de mujeres que presentaron ciertas complicaciones durante el embarazo. Las muestras se centrifugaron a 3 000 rpm durante 30 min y se conservaron en presencia de merthiolate al 0.01% a -20°C hasta su uso.

c) Suero de mujer embarazada (SME).- Mediante venolisis se obtuvo la sangre de mujer embarazada a diferentes semanas de gestación con y sin alguna patología durante el embarazo. La sangre se dejó coagular a 37°C durante 1 h, se removió el coágulo y el suero se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min conservandose a -20°C hasta su uso.

d) Suero de mujer normal y suero de hombre normal (SMN, SHN).- Se colectaron los especímenes sanguíneos en bolsas de sangrado con anticoagulante, el plasma se obtuvo por centrifugación a 3 000 rpm durante 15 min y se desfibrinó posteriormente con la adición de CaCl_2 al 0.025 M, el suero resultante se guardó en presencia de merthiolate al 0.01% a -20°C hasta su uso.

e) Suero anti-AFP comercial (S anti-AFP).- Obtenido de la compañía Behring Institute.

f) Suero estándar comercial de AFP (SEC AFP).- Obtenido de la compañía Behring Institute, AG Marburg OTOD - A9690220 (12704) con 322 000 ng de AFP/ml.

g) Suero de caballo anti-SNH (SCa anti-SNH).- Obtenido de la compañía Capell 8041V001A1.

h) Suero de conejo anti-inmunoglobulina de cabra marcado con peroxidasa (SCo anti-Ig cabra-PO).- Obtenido de la compañía Capell.

MÉTODOS

Obtención del suero anti-AFP

Con objeto de obtener un volumen adecuado de suero anti-AFP para la realización del presente trabajo, se efectuaron procedimientos que permitieron extrapolar los resultados a diferentes escalas, de ésta manera inicialmente el suero anti-AFP se obtuvo de conejo y posteriormente de cabras.

1) Preparación de inóculo:

1.1) Inóculo de conejos.- A partir de SCU y S anti-AFP se realizó una curva de precipitación cuantitativa en tubo de ensayo (curva B que se muestra después), la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) se llevó a cabo a -37°C durante 1 h (baño de agua Cuting Co. 66648) y posteriormente se incubó a 4°C durante 24 h, el precipitado formado se recuperó por centrifugación a 3 000 rpm durante 30 min a 4°C y los sobrenadantes se analizaron mediante inmunoelectroforesis bidimensional (IEF-B) empleando como antígeno SCU. Para extrapolar los resultados a mayor escala, se seleccionó aquella proporción de Ag-Ac que presentó el menor número de bandas en la IEF-B así como la

mayor formación de precipitado. El procedimiento de precipitación a mayor volumen se llevó a cabo bajo las mismas condiciones anteriores y el precipitado fue recuperado y lavado con solución salina fisiológica mediante centrifugación (centrifuga clínica Solbat 2304) hasta que la absorbancia del sobrenadante fue menor de 0.01 a 280 nm (Espectrofotometro Shimadzu UV-18, cat. 204-27128). El precipitado lavado se resuspendió en solución salina al 0.85% la preparación se conservó en alícuotas de 2 ml cada una a -20°C hasta su uso.

1.2) Inóculo de cabras.- Para la preparación de los primeros inóculos aplicados en cabras se siguió el procedimiento anteriormente descrito utilizando SCU y el suero de conejo anti-AFP (SC anti-AFP), éste último obtenido en el laboratorio, los inóculos posteriores se prepararon con suero de cabra inmunizada con AFP-GG de conejo o cabra, obteniéndose una concentración de proteína de 1.6 mg/ml en el inóculo.

2) Programa de inmunización y sangrado de animales de experimentación:

2.1) Inmunización y sangrado de conejos.- El inóculo se aplicó semanalmente por vía subcutánea o intramuscular alternadamente, las 2 primeras dosis se emulsificaron con adyuvante completo de Freud (ACF) en una proporción 1;1, las 4 dosis siguientes se emulsificaron con adyuvante incompleto de Freud (AIF). El animal se sangró por vía intracardiaca durante las 4 últimas semanas del programa de inmunización, antes de ser inoculados. Después de la coagulación de la sangre, el suero se recuperó por centrifugación a 3 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y se conservó en alícuotas a -20°C .

2.2) Inmunización y sangrado de cabras.- La inmunización fue quincenal, las 5 primeras dósis de inóculo se aplicaron por vía subcutánea en varios sitios del lomo, 4 dósis fueron emulsificadas antes de su aplicación con ACF (1:1), la quinta con AIF, posteriormente se anlicaron intramuscularmente 4 dósis sin adyuvante. El sangrado se efectuó quincenalmente con una semana de diferencia a la aplicación del inóculo. Durante el procedimiento de sangrado se utilizaron bolsas especiales para éste propósito con anticoagulante (Bolsang CPD sistema Fenwal de 500 ml). El plasma se obtuvo por centrifugación de la sangre a 3 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, la fibrina se eliminó empleando CaCl_2 a una concentración final de 0.025 M (Merck 4101784), el suero resultante se recuperó por filtración y se conservó a -20°C con azida de sodio al 0.02% (Merck 3047663) hasta su uso.

Al paquete de eritrocitos obtenido al separar el plasma se le adicionó CaCl_2 a una concetración final de 0.025 M y una vez formado el coágulo fue fragmentado, el suero resultante se recuperó por succión y fue centrifugado a 3 000 rpm durante 15 min; para eliminar la hemo--globina y otros contaminantes se obtuvo la fracción gamma-globulina (GG) mediante precipitación con sulfato de amonio al 33% de saturación, con ésta preparación se enriqueció el suero de cabra correspondiente.

3) Análisis del grado de reactividad del suero de conejo anti-AFP (SC anti-AFP) y el suero de cabra hiperinmu ne anti-AFP (SCH anti-AFP).- El análisis se realizó me--diante inmunoelectroforesis de Grabar y Williams (IEF) e IEF-B empleando como antígenos SCU, SMN o suero normal -humano (SNH, resultante de una mezcla de SMN y SHN en una relación 1:1).

Obtención del suero monoespecífico anti-AFP (SMC anti-AFP):

El SCH anti-AFP se sometió a 3 procesos diferentes de inmunoadsorción con SNH con la finalidad de elegir aquel procedimiento que mostrara mayor adsorción para extrapolarlo a mayor escala.

1) Inmunoadsorción:

1.1) Procedimiento # 1.- Adsorción con SNH: Empleando suero centrifugado inmediatamente antes de su uso a 3 000 rpm durante 15 min.

Se hicieron curvas de titulación Ag-Ac de acuerdo a la tabla que se ilustra en seguida. En ambos casos los tubos se mezclaron perfectamente, se incubaron 1 h a 37°C y posteriormente 24 h a 4°C. Los precipitados formados se recuperaron y lavaron 3 veces por centrifugación con solución salina al 0.85% a 3 000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes de las 2 series se analizaron por inmunoelectroforesis de cohete (IEF-C) y a los precipitados se les cuantificó el contenido de proteínas por el método Lowry (34).

1.2) Procedimiento # 2.- Adsorción con SNH liofilizado: se realizó un procedimiento similar al anteriormente descrito pero en éste caso se utilizó SNH liofilizado sin reconstituir y se emplearon los gramos equivalentes a los mililitros del SNH como se indica en la tabla del procedimiento # 1.

En base a los resultados obtenidos en los procedimientos 1 y 2 se seleccionó aquella proporción del SCH anti-AFP y el SNH que mostró una mayor formación de precipitado así como su sobrenadante el menor número de bandas de precipitación al ser analizado por IEF-B.

1.3) Procedimiento # 3.- Adsorción con proteínas

PROTOCOLO DE LAS CURVAS DE PRECIPITACION

TUBO	CURVA A			CURVA B	
	SCH \propto AFP (ML)	SNH (ML)	NaCl 0.85% (ML)	SCH \propto AFP (ML)	SNH (ML)
1	1	-	1	1	-
2	1	0.1	0.9	0.9	0.1
3	1	0.2	0.8	0.8	0.2
4	1	0.3	0.7	0.7	0.3
5	1	0.4	0.6	0.6	0.4
6	1	0.5	0.5	0.5	0.5
7	1	0.6	0.4	0.4	0.6
8	1	0.7	0.3	0.3	0.7
9	1	0.8	0.2	0.2	0.8
10	1	0.9	0.1	0.1	0.9
11	1	1	-	-	1

de SNH insolubilizadas de acuerdo al método de Avrameas (4).

-Insolubilización de proteínas del SNH (inmunoadsorbente): Se sometió a diálisis un volumen de 100 ml de SNH empleando 4 l de solución salina 0.85% a 4°C durante toda la noche con la finalidad de eliminar los posibles contaminantes que pudieran interferir en el proceso de insolubilización de las proteínas del SNH, posteriormente se ajustó el pH a 7 ó a 5 adicionando al suero dializado 10 ml de solución reguladora de fosfatos 1 M, pH 7, o bien solución reguladora de acetato 1 M pH 5 (Potenciómetro Beckman Zeromatic SS-3 mod. 96, car. 9608), cuando fue necesario el pH se ajustó con NaOH 1 N ó HCl 1 N, inmediatamente se adicionó lentamente y con agitación constante 30 ml de una solución de glutaraldehído al 2.5% (Sigma No. G-1631) y se dejó reaccionar en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. El gel formado se fraccionó con ayuda de una jeringa sin aguja y posteriormente con aguja, las partículas resultantes se lavaron de manera repetitiva por centrifugación con solución salina fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7 hasta obtener una densidad óptica (D.O.) del sobrenadante a 280 nm igual o menor de 0.01. El sedimento fue resuspendido en 200 ml de solución reguladora de glicina-HCl 0.02 M, pH 2.8 (Sigma No. G-2879), se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y la suspensión obtenida se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min, el sedimento se lavó posteriormente por centrifugación varias veces con PBS 0.01 M, pH 7, hasta que la D.O. del sobrenadante fue menor de 0.02 a 280 nm. Las proteínas así insolubilizadas se resuspendieron en el mismo PBS con merthiolate a una concentración de 1:10 000 y se conservaron a 4°C hasta su uso.

-Inmunoadsorción: Antes de efectuarse la inmunoadsorción del SCH anti-AFP o el SC anti-AFP, el inmunoadsorbente se centrifugó a 16 000 rpm durante 30 min a 4°C (Centrifuga Sorball superspeed RC-5B), posteriormente se mezcló con el suero anti-AFP correspondiente a una concentración del 33% utilizando como conservador azida de sodio al 0.02%. La suspensión se dejó reaccionar 1 h a -37°C con agitación constante y posteriormente de 1 a 9 días a 4°C, cada 24 h se tomó una alícuota de la mezcla y se centrifugó a 16 000 rpm durante 30 min, el sobrenadante obtenido se analizó mediante IEF-B usando como antígenos SCU y SMN o SNH. El sobrenadante se conservó a -20°C hasta su uso.

-Reconstitución del inmunoadsorbente: El inmunoadsorbente empleado se lavó con PBS 0.01 M, pH 7, usando de 3 a 4 veces el volumen del suero adsorbido, el procedimiento se repitió hasta obtener una D.O. del líquido de lavado menor de 0.04 a 280 nm, posteriormente se resuspendió en solución reguladora de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.8, incubándose toda la noche a 4°C y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min. El inmunoadsorbente se lavó posteriormente varias veces con PBS hasta que el sobrenadante tuvo una D.O. cercana a 0 a 280 nm. Eliminada la glicina del inmunoadsorbente se mantuvo en suspensión en PBS con merthiolate (concentración 1:10 000) y azida de sodio (concentración 0.02%) a 4°C hasta su uso. En estas condiciones el inmunoadsorbente pudo reutilizarse.

-Deslipidización de sueros (30): En un vaso de precipitados colocado dentro de un baño de congelamiento se hizo una mezcla de 30 ml de éter dietílico con 100 ml del suero a deslipidizar. La mezcla suero-éter se agitó vigo

rosamente con una varilla de vidrio hasta que solidificó. Se dejó así por 10 min más y posteriormente se introdujó el vaso a un baño de agua tibia hasta que el material - congelado se desprendió, el botón aún congelado se vació a un embudo de vidrio sin papel filtro que estaba directamente conectado a un embudo de separación perfectamente cerrado. Al material congelado se le permitió descongelarse a temperatura ambiente y el líquido se colectó dentro del embudo de separación, el sistema se dejó en reposo a 4°C y sin mover durante toda la noche tapando el embudo únicamente con un trozo de papel aluminio. Posteriormente, mediante corrimiento, se colectó el suero (fase inferior) y con la ayuda de un rotavapor se eliminó el éter residual. Al suero obtenido se le adicionó azida de sodio a una concentración final del 0.02% y se procedió a esterilizarlo haciéndolo pasar a través de membranas Millipore de 0.45 μ y se conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

Análisis inmunoelectroforético de sueros y antígenos:

1) Inmunoelectroforesis de Grabar y Williams (IEF):

1.1) Preparación de placas.- Se preparó mediante ebullición una solución de agarosa al 1% (Sigma No. --- A-6877) en regulador de barbituratos 0.1 M, pH 8.6 (Beckman Paragon B-2 No. 655780) y antes de filtrarse en caliente a través de una gasa de algodón se le adicionó merthiolate a una concentración final del 0.1%, de ésta solución se vertieron 25 ml sobre una placa de plástico tipo Hyland (13.8 X 8.4 X 0.8 cm) colocada sobre una superficie nivelada horizontalmente, la solidificación del agar se llevó

a cabo a temperatura ambiente. Las placas se guardaron - hasta su uso a 4°C en una cámara húmeda perfectamente sellada.

Momentos antes de su uso las placas fueron ranuradas de acuerdo a un diagrama previamente seleccionado extrayendo únicamente los cilindros de agarosa de 3 mm de diámetro para la formación de los pozos donde fueron aplicados los antígenos (SCU, SMN, SNH, etc.) antes de efectuarse la corrida electroforética.

1.2) Corrimiento electroforético.-

-Aplicación de las muestras: Se aplicaron en cada pozo 10 µl del Ag de acuerdo al diagrama seleccionado y se utilizó como indicador del frente de corrimiento electroforético una pequeña cantidad de azul de bromofenol (Beckman B-4).

-Electroforesis: Se utilizó un equipo Hyland (No. 077-922) aplicandose en cada compartimento de la cámara electroforética 35 ml de solución reguladora de barbituratos 0.1 M pH 8.6, las burbújas de aire que quedaron en las esponjas se eliminaron por compresión. El corrimiento se llevó a cabo a 40 mA durante 90 min a temperatura ambiente o bien se suspendió hasta que el azul de bromofenol se desplazó de 6 a 7 cm desde el punto de aplicación.

1.3) Aplicación del antisuero.-

Los canales del gel previamente ranurados se removieron de las placas de agarosa y se llenaron con 100 µl del suero correspondiente.

1.4) Inmunodifusión.-

Las placas se incubaron durante 24 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente y posteriormente se hizo la lectura de las bandas de precipitación.

1.5) Tinción de las placas.- Las placas se dializaron contra varios cambios de solución salina 0.85% durante varios días y después contra agua destilada. Se dejaron secar a 37°C sobre una placa de vidrio y se tificaron con azul de Coomassie al 0.25% diluido en ácido acético-etanol-agua (1:4.5:4.5), posteriormente se eliminó el excedente de colorante mediante diálisis con la misma solución de ácido acético-etanol-agua sin colorante.

2) Inmunolectroforesis bidimensional (IEF-B)(32):

2.1) Preparación de placas.- Mediante ebullición se preparó una solución de agarosa al 1% en regulador de barbituratos 0.1 M, pH 8.6 y se hicieron placas de agarosa de 1 mm de grosor vertiendo 4.9 ml de la solución sobre placas de vidrio de 7 X 7 cm colocadas sobre una superficie perfectamente horizontal. La agarosa se dejó solidificar a temperatura ambiente y las placas se guardaron en una cámara húmeda a 4°C hasta su uso (no después de 24 h de su preparación). Las placas momentos antes de usarse se perforaron de acuerdo a un diagrama previamente seleccionado, haciendo 2 pozos por placa cada uno de 3 mm de diámetro.

2.2) Corrimiento electroforético.-

-Aplicación del antígeno: Se aplicaron 5 µl de los antígenos de interés evitando que se derramaran sobre la superficie de la agarosa. Uno de los antígenos se preparó con azul de bromofenol para emplearse como indicador del frente de corrimiento electroforético.

-Electroforesis en primera dimensión: Para efectuar el corrimiento electroforético se utilizó una fuente de poder Gelman (Gelman Instruments mod. 38206, serie 82) y una cámara electroforética construida en el la

boratorio (25 X 17 X 6 cm). En la cámara se virtieron - 450 ml de solución reguladora de barbituratos 0.1 M pH - 8.6, las placas se colocaron sobre un puente y se estableció contacto con la solución reguladora mediante unas mechas de papel filtro Whatman # 1 (6.5 X 3 cm). El primer corrimiento electroforético se efectuó aplicando 13 mA - (aproximadamente 80 volts) durante 3 h o bien hasta que el azul de bromofenol se desplazó cerca de 2 cm desde el punto de aplicación del Ag.

-Aplicación del antisuero: Para aplicar a la placa de agarosa el antisuero, por absorción se deshidrató una área de gel colocando sobre su superficie una hoja de papel filtro Whatman # 1 (5.2 X 4.9 cm) de acuerdo a la figura 1 durante 30 a 60 seg. Posteriormente el papel filtro se removió e inmediatamente se colocó sobre un extremo de la zona deshidratada (ventana) una hoja de papel celofán impermeable de las mismas dimensiones que las del papel filtro empleada en la deshidratación. Entre el papel celofán y la agarosa se virtieron de 100 a 200 μ l de antisuero, el cual se distribuyó homogéneamente por capilaridad en toda el área del gel deshidratado (ventana) - al colocar gradualmente el papel celofán sobre la superficie del gel (Figura 2). Las placas se colocaron dentro de una cámara húmeda durante 10 a 15 min para permitir que el suero se difundiera dentro del gel.

-Inmunolectroforesis en segunda dimensión: La siguiente electroforesis se efectuó perpendicularmente con respecto a la primera, aplicando 5 mA (aproximadamente 40 volts) durante 18 h a 4°C.

2.3) Tinción de las placas.- Las placas se dializaron contra varios cambios de solución salina 0.85% y

APLICACION DEL SUERO POR LA TECNICA DE LEBEQ
PARA LA IEF-B

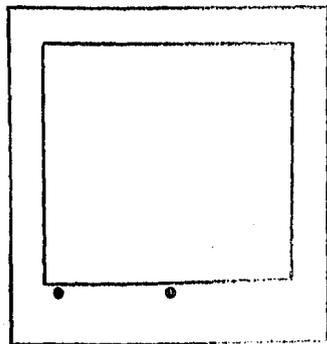


FIGURA 1

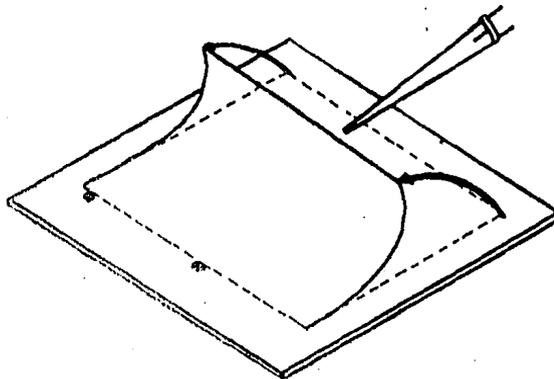


FIGURA 2

después contra agua destilada. Se secaron a 37°C y se tineron con azul de Coomassie eliminándose el excedente de colorante con una solución de ácido acético-etanol-agua (1:4.5:4.5).

3) Purificación de la fracción gamma-globulina (GG):

Con el objeto de saber el grado de adsorción efectuado en el SCH anti-AFP se separó la fracción gamma-globulina mediante precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio al 33% de saturación empleando una solución saturada de sulfato de amonio a pH 7.8 (Merck 201217). El procedimiento consistió de las siguientes etapas:

1.- Un volumen de suero se transfirió a un tubo provisto de una barra magnética y se colocó sobre un agitador magnético.

2.- Al tubo se le hizo una marca que coincidiera con el nivel del volumen del suero.

3.- Se adicionó lentamente y con agitación constante una parte de solución saturada de sulfato de amonio recién ajustada a pH 7.8 por cada 2 partes de suero.

4.- Terminada la adición del sulfato de amonio se dejó agitando la suspensión durante 15 min más.

5.- Después de éste tiempo la suspensión se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.

6.- El precipitado resultante se disolvió en solución salina 0.85% pH 7.8 empleando un volumen suficiente para alcanzar la marca que correspondía al volumen original del suero.

7.- Los procedimientos de los incisos 3, 4, 5 y 6 se repitieron 2 veces más.

8.- El último precipitado obtenido se disolvió en solución salina-boratos reconstituyendo un tercio del volumen original del suero. La solución salina-boratos emplea

da se preparó como sigue: 95 partes de solución salina - 0.85% + 5 partes de solución madre de boratos (6.184 g de ácido bórico + 9.536 g tetraborato de sodio decahidratado + 4.384 g de cloruro de sodio, ajustando el pH a 8.4 antes de aferrar a 1 l⁺).

9.- Para eliminar el sulfato de amonio, la preparación se dializó a 4^oC contra solución salina-boratos durante varios días realizando 3 cambios diarios de la solución dializante. Se probó la presencia de iones sulfatos en el líquido dializante empleando una solución saturada de cloruro de bario el cual forma un precipitado de sulfato de bario en presencia de iones sulfato.

10.- Terminada la diálisis la muestra se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente para eliminar material insoluble y el sobrenadante se guardó en congelación a -20^oC hasta su uso.

11.- A una alícuota de la GG obtenida se le cuantificó el contenido de proteínas por el método de Lowry.

4) Cuantificación de proteínas por el método de Lowry (36):

1.- Se mezclaron 50 ml de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1 N con 0.5 ml de CuSO₄ al 1% y 0.5 ml de tartrato de Na y K al 2% (v/v). La mezcla se preparó al momento de usarse.

2.- En tubos de ensayo de 13 X 100 se colocaron por duplicado 0.1 ml de la muestra problema y del estandar - (400 µg de albúmina sérica bovina/ml) se ajustó el volumen de cada muestra a 1 ml con solución salina 0.85% y se adicionó con agitación 3 ml de la mezcla de reactivos, dejándose en reposo de 10 a 15 min. En la serie se incluyó por duplicado un ml de solución salina al 0.85% como control de reactivos.

3.- Después de éste tiempo se adicionó a cada tubo 0.1 ml del reactivo de Folin Cicolteau (Reactivo de Folin, Sigma No. 2790) y se agitaron inmediatamente dejándose en reposo 30 min a temperatura ambiente.

4.- Al término de éste tiempo se determinó la D.O. de cada tubo a 600 nm en un fotocolorimetro (Bauch and Lomb, Espectronic 20) ajustando el aparato a cero con el control de reactivos.

5.- Para conocer la concentración de proteínas de las muestras, la D.O. obtenida se interpoló en una curva estandar que abarcaba un rango de concentraciones desde 20 a 200 μg de proteína por ml.

Purificación de la AFP

Con objeto de obtener una muestra rica en AFP se hizo una separación electroforética en bloque de almidón de las proteínas del SCU.

1) Fraccionamiento de proteínas del SCU mediante electroforesis preparativa en bloque de almidón (EPBA) - (16):

1.1) Lavado de las partículas de almidón: Quinientos grs de almidón se dejaron hidratar durante 18 h en 500 ml de agua destilada. Las partículas más pequeñas que permanecieron en suspensión se eliminaron por decantación y el sedimento se lavó 12 veces mediante vacío, 10 de los cuales se hicieron con solución salina 0.85% y los 2 últimos con solución reguladora de barbituratos 0.075 M, pH 8.6. Cada vez la pasta seca resultante se vació a un recipiente que contenía 400 ml del líquido de lavado, se mezcló vigorosamente hasta formar una suspensión homogénea y se vertió nuevamente al embudo büchner para someterse al vacío. El almidón lavado se dejó por lo menos 18 h

en solución reguladora antes de usarse.

1.2) Preparación del bloque de almidón: El almidón se resuspendió en el menor volumen posible de solución reguladora de tal manera que permitió la formación de una pasta densa y homogénea, la que se vertió en una placa de material acrílico de 23.5 X 14 X 0.9 cm previamente nivelada y provista de una hoja de plástico y de un par de mechas de papel filtro de poro mediano colocadas en los extremos de la placa. El almidón se dejó drenar hasta que se perdió el brillo de la pasta debido al exceso de líquido.

1.3) Aplicación de la muestra: En el bloque de almidón se ranuró un canal de 1.5 X 13 X 0.9 cm a 4 cm del extremo catódico, a éste se le extrajo el almidón y se substituyó por una pasta preparada con almidón lavado seco y 16 ml de SCU previamente dializado contra la misma solución reguladora y teñida con azul de bromofenol (éste colorante se fija exclusivamente a la albúmina por lo que puede servir como indicador del frente de corrimiento electroforético). El bloque se dejó drenar nuevamente hasta que el canal perdió el brillo y se cubrió con la hoja de plástico.

1.4) Corrimiento electroforético: El bloque se colocó dentro de una cámara electroforética que contenía 1.5 lt de solución reguladora de barbituratos 0.075 M, pH 8.6, de tal manera que solo las mechas tuvieran contacto con la solución reguladora. Al sistema se le aplicó una corriente de 60 mA (aproximadamente 270 volts) durante 18 a 22 h a 4°C o hasta que el colorante se desplazó cerca de 18 cm del punto de aplicación.

1.5) Identificación, elución y tratamiento de las fracciones separadas: Una vez concluido el corrimient

to electroforético se tomó una impresión del fraccionamiento de proteínas, colocando una tira de papel filtro de poro fino de 1 X 23.5 cm sobre el bloque de almidón - la cual se removió hasta que se humedeció perfectamente (aproximadamente 10 min), y posteriormente se sometió a un proceso de tinción empleando una solución de Rojo de Fonceau al 0.5% preparada en ácido tricloroacético al 5%, el exceso de colorante se eliminó mediante lavados sucesivos con una solución de ácido acético al 7%. Se midió el ancho de cada una de las bandas y de acuerdo a esto se separaron 5 fracciones de proteínas (albúmina, alfa₁, alfa₂, beta y gamma-globulinas). Utilizando una probeta se midió el volumen de cada fracción de almidón, se transfirieron a un vaso de precipitados, se agitaron con un volumen equivalente de solución salina-boratos pH 8.4, se eluyeron por filtración al vacío y ésta operación se repitió 4 veces más. Se formaron mezclas de cada serie de eluidos, se vertieron a tubos de diálisis y se concentraron casi a seciedad con goma arábica o goma guar, se dializaron contra varios cambios de solución salina-boratos pH 8.4 a - 4°C, se centrifugaron a 3 000 rpm durante 30 min y a los sobrenadantes se les cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry. Para evaluar la eficiencia de la separación electroforética se analizó cada fracción por IEF-B contra SCH anti-AFP y electroforesis en acetato de celulosa (EFAC).

2) Electroforesis en acetato de celulosa (EFAC): La membrana de acetato de celulosa se remojó en solución reguladora de barbituratos 0.1 M, pH 8.6, durante 10 min, se secó entre dos papeles absorbentes y se colocó en una cámara de electroforesis (Gelman Instruments Co.) la cual

llenó con la misma solución de barbituratos. Después de haberse aplicado las muestras (de 1 μ l cada una) se hizo pasar una corriente de 200 volts durante 20 min. Posteriormente se secó la membrana entre dos papeles absorbentes, se introdujo dentro de una solución colorante de Rojo de Ponceau al 0.5% en ácido tricloroacético al 5%, en seguida se decoloró mediante lavados sucesivos en ácido acético al 5%, una vez eliminado el excedente el colorante, la membrana se deshidrató al pasarla 2 min en una mezcla de 95 ml de etanol + 5 ml de isopropanol (mezcla A) y se transparentó al sumergirla durante 1 min en una solución formada por 70 ml de la mezcla A y 30 ml de ciclohexanona. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente colocada sobre una placa de vidrio y se leyó en un densitómetro (Gelman) a 520 nm.

3) Preparación del inmunoabsorbente de Sefarosa:

3.1) Activación de Sefarosa 4B-3L: Un volumen de 20 ml de Sefarosa 4B-3L (Sigma) drenada se vertió a un embudo büchner y se lavó 10 veces por filtración al vacío con alícuotas de 20 ml de agua destilada fría. La Sefarosa lavada se resuspendió en un volumen de agua y se transfirió a un vaso de precipitados, el cual se introdujo en un baño de hielo colocado sobre un agitador magnético. Inmediatamente se le adicionó gota a gota y con agitación constante 6 ml de una solución recién preparada de BrCN a una concentración de 100 mg/ml (concentración final= 30 mg de BrCN/ml de Sefarosa), el pH se mantuvo entre 10.5 y 11 adicionando NaOH 2 N inicialmente y al final NaOH 0.1 N, la preparación se agitó durante 25 min y después se vertió a un embudo büchner y se lavó por filtración al vacío con 10 volúmenes de agua destilada fría,

resuspendiendo perfectamente la Sefarosa activada en cada lavado.

3.2) Acoplamiento de la proteína: La Sefarosa activada se lavó 10 veces con una solución de NaHCO_3 0.1 M-NaCl 0.5 M pH 8.3 y casi seca se hizo reaccionar durante 24 h con 270 mg de la fracción GG del SMC anti-AFP dializada previamente en la solución de lavado (concentración de 13.05 mg de GG/ml de Sefarosa). Después de éste tiempo la proteína que no reaccionó se recuperó mediante succión y la Sefarosa acoplada a la GG se lavó con 10 volúmenes de la solución de lavado, se resuspendió en 20 ml de etanolamina 1 M pH 8.0 (Sigma No. H-5012), se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó 10 veces con la solución de lavado, 5 veces con agua des-tilada fría, 10 veces con PBS 0.01 M pH 7.4 frío y se almacenó en el mismo PBS en presencia de merthiolate a una concentración del 0.1%.

4) Elución de la AFP con solución de glicina-HCl: - El inmunoadsorbente de Sefarosa acoplada a la fracción GG se transfirió a una jeringa de 20 ml y se lavó exhaustivamente con PBS pH 7.4 hasta que el líquido de elución dió una absorbancia menor de 0.002 a 280 nm, posteriormente se pasó a través de ella una solución de glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8, durante 10 min y se volvió a lavar con PBS hasta obtener una D.O. menor de 0.002 a 280 nm en el eluido. La Sefarosa se dejó drenar casi a sequedad y se embebió con una mezcla de las fracciones más ricas de AFP obtenidas de los bloques de almidón, se tapó la salida de la jeringa, se dejó adsorber la AFP durante toda la noche a 4°C, los componentes no adsorbidos se eluyeron por

gravedad, la columna se lavó con PBS hasta obtener una D.O. menor de 0.002 a 280 nm en el líquido de lavado. Se procedió a la elución de la AFP pasando una solución reguladora de glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8 a través del inmunoadsorbente hasta que se colectaron 10 fracciones de 10 ml cada una, las fracciones se neutralizaron a pH 7 con una solución saturada de hidroximetilaminometano (Tris) (Sigma No. T-1503), se leyó su D.O. a 280 nm y posteriormente se mezclaron formando 2 lotes (lote 1: fracciones 1-5; lote 2: fracciones 6-10), éstos se concentraron por deshidratación con goma guar hasta casi 1/10 del volumen original, posteriormente se dializaron contra varios cambios de PBS y se centrifugaron a 3 500 rpm durante 30 min. Los sobrenadantes se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (EFGP) e IEF-B empleando SCH anti-AFP y se guardaron a -20°C hasta su uso.

5) Adsorción con proteínas insolubilizadas de SCA anti-SNH:

5.1) Insolubilización de las proteínas del SCA anti-SNH (inmunoadsorbente): A pH 5 se insolubilizaron las proteínas de 2 ml de SCA anti-SNH de acuerdo a la técnica descrita por Avrameas (4).

5.2) Inmunoadsorción: Antes de efectuarse la inmunoadsorción, el inmunoadsorbente obtenido del proceso anterior se centrifugó a 16 000 rpm durante 30 min a 4°C , posteriormente se mezcló con la solución del lote 1 (aproximadamente 2.5 ml). La suspensión se dejó reaccionar 2 h a temperatura ambiente con agitación constante, se centrifugó a 16 000 rpm durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se analizó mediante EFGP e IEF-B usando SCH anti-AFP y SMC anti-AFP.

5.3) Reconstitución del inmunoadsorbente: Las pro

teínas insolubilizadas del SCA anti-SNH utilizado se regeneró de acuerdo a la técnica descrita por Avrameas (4). - En estas condiciones el inmunoadsorbente se pudo reutilizar.

6) Electroforesis en geles de poliacrilamida (EPGP): Para conocer el grado de purificación (número de bandas - de proteínas) de algunos de los reactivos preparados en el laboratorio se procedió a analizarlos mediante EPGP al 10%. Los geles fueron preparados de la siguiente manera:

- 6.1) Gel de corrimiento: Se preparó en un matraz kitazato una mezcla formada por:
- 1.- 10 ml de una solución de acrilamida-bis acrilamida al 30.8% (preparada con 7.5 g de acrilamida (Sigma No. A-8887) + 0.2 g de bisacrilamida (Sigma M-7256) en agua bidestilada, la solución se filtró antes de aforar a 25 ml).
 - 2.- 7.5 ml de solución reguladora de Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (4.54274 g de Tris, el pH se ajustó con HCl 1 N antes de aforar a 25 ml con agua bidestilada).
 - 3.- 9.6 ml de agua bidestilada.
 - 4.- Cuando se trabajó en condiciones de reducción se adicionaron 0.6 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS)(Beckman) al 10% y el volumen de agua se ajustó a 9 ml.

Esta mezcla se desgasó mediante vacío agitando suavemente durante 20 min. Para acelerar la polimerización de la acrilamida se adicionó 7.5 μ l de N, N, N', N'-tetrametiletildiamina (TEMED)(Sigma No. T-8133) y 37.5 μ l de persulfato de amonio al 10% (0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua) recién preparado, se vertió rápidamente 19 ml de esta mezcla en el molde de la cámara del equipo de electroforesis (Bio-Rad Mod. 220 Dual-Vertical-Slab), para obtener una superficie perfectamente horizontal del gel, antes de que polimerizara la mezcla se colocó una ca-

pa de agua de aproximadamente 1 cm de altura con la ayuda de una jeringa con aguja y se dejó en reposo 18 h a temperatura ambiente.

6.2) Gel espaciador: Una vez asegurada la polimerización del gel de corrimiento se eliminó la capa de agua por vaciamiento absorbiendo el remanente con papel filtro, sobre la superficie del gel se aplicó 4 ml de la mezcla - del gel espaciador la cual se preparó con:

- 1.- 1.25 ml de solución de acrilamida-bis acrilamida al 30.8%.
- 2.- 1.87 ml de solución reguladora de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (1.51425 g de Tris ajustando el pH con HCl 1 N antes de aforar a 25 ml con agua bidestilada).
- 3.- 4.05 ml de agua bidestilada.
- 4.- Cuando se trabajó en condiciones de reducción se adicionaron 75 μ l de SDS al 10% ajustando el volumen de agua a 3.98 ml.

Esta mezcla se desgasó mediante vacío suavemente durante 20 min y después se adicionó 3.7 μ l de TEMED y 25 μ l de persulfato de amonio al 10%, se mezcló y de inmediato se vertió sobre el gel de corrimiento colocándolo antes de su polimerización un molde ("peine") para la formación de los sitios de aplicación de las muestras (canales) evitando la formación de burbujas. Una vez que el gel espaciador polimerizó se llenaron los compartimentos de la cámara con solución reguladora de corrimiento Tris 0.024 M-glicina 0.191 M, pH 8.3 (3 g de Tris + 14.4 g de glicina/ l de solución reguladora)(al trabajarse en condiciones de reducción se adicionó 1 g de SDS por litro de solución reguladora) y el molde ("peine") se extrajo evitando que los canales se deformaran o quebraran. En estas condiciones se efectuaron 5 lavados a los canales - con solución reguladora de corrimiento y posteriormente

se realizó una preelectroforesis a 25 mA durante 15 min.

6.3) Aplicación de las muestras: Las muestras se analizaron en dos condiciones:

1.- Muestras analizadas sin reducir.- Las muestras se mezclaron con una solución de sacarosa al 40% (con azul de bromofenol) en una relación 1:1.

2.- Muestras analizadas reducidas.- Las muestras se mezclaron en una relación 1:1 con la siguiente solución: 0.4 ml de solución reguladora de Tris 0.5 M, pH 6.8, + 0.4 ml de SDS al 10% + 0.4 ml de glicerol + 0.72 ml de agua + 200 µl de mercaptoetanol (Sigma) + azul de bromofenol. Esta mezcla se sometió a un proceso de calentamiento en baño de agua a ebullición durante 5 min.

Las muestras se vertieron en cada canal evitando que se mezclaran con la solución reguladora de corrimiento. - En el caso de que la muestra fuera una proteína purificada, se colocaron 14 µg de la proteína por cada canal.

6.4) Corrimiento electroforético: Para la migración de las muestras en el gel espaciador se aplicaron 15 mA por placa (Fuente de poder Camag, 67803) y una vez que el indicador penetró en el gel de corrimiento se incrementó el amperaje a 30 mA por placa. La electroforesis se suspendió hasta que el colorante se desplazó cerca de 12 cm (4 h a temperatura ambiente) desde el punto de aplicación.

6.5) Tinción y secado de las placas: El gel se sacó de la cámara y se introdujo en una solución fijadora-colorante (1.25 g de azul de Coomassie + 225 ml de metanol + 225 ml de agua destilada + 45 ml de ácido acético) durante 2 ó 3 h y para eliminar el excedente de colorante el gel se dializó en una solución de ácido acético-meta-

PURIFICACION DE LA AFP

FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEINAS DEL SCU
 MEDIANTE ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN BLOQUE
 DE ALMIDON

LAVADO, CONCENTRACION E IDENTIFICACION DE
 LAS α_1 -GLOBULINAS DEL SCU (AFP)

ADSORCION DE LA AFP SOBRE SEPHAROSA 4B-CL ACTIVADA
 CON BrCN ACOPLADA A GG MONOESPECIFICA ANTI-A F P

Toda la noche, 4°C

LAVADO DE COLUMNA CON PBS
 (D.O. \leq 0.002 A 280 NM)

ELUCION DE LA AFP CON SOL. REGULADORA
 GLICINA-HCl pH 2.8

MEZCLA DE LAS FRACCIONES Y CONCENTRACION
 CON GOMA ARABIGA

DIALISIS EXHAUSTIVA CONTRA PBS

3000 rpm, 30 min.

ANALISIS:
 EFGP
 IEF-B

ADSORCION CON PROTEINAS DE
 SUERO DE CABALLO ANTI-SNH
 INSOLUBILIZADAS CON GLUTA-
 RALDEHIDO.

4 h, t.a.
 16 000 rpm
 30 min.

ANALISIS:
 EFGP
 IEF-B

nol-agua (1:4.5:4.5) efectuando varios cambios y cuidando que no se excediera el proceso de decoloración. Los geles se dejaron secar a 4°C durante varios días sobre una placa de vidrio cubierta con ega-pack.

Quantificación de la AFP

1) Inmunolectroforesis de cohete (IEF-C):

1.1) Preparación de las placas: Se preparó por ebullición una solución de agarosa al 1% en solución reguladora de barbituratos 0.1 M, pH 8.6, $\mu = 0.75$. Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura de 56°C dentro de un baño de agua se tomaron 14.4 ml y se mezclaron con 0.72 ml de SMC anti-AFP (concentración final del 5%) vertiéndose rápidamente sobre una placa de vidrio (8 X 18 cm) previamente calentada y colocada sobre una superficie perfectamente horizontal, la mezcla se distribuyó homogéneamente por toda la superficie de la placa evitando que se formaran burbújas, grumos o se derramara. Una vez solidificada la mezcla a temperatura ambiente se hicieron a lo largo del extremo catódico de la placa 21 pozos de 3 mm de diámetro con una separación de 7.5 mm entre uno y otro a una distancia de 1.25 cm de la orilla de la placa, posteriormente se guardaron dentro de una cámara húmeda a 4°C hasta su uso (no se empleó después de 24 h).

1.2) Aplicación de las muestras: La cámara de electroforesis conteniendo 450 ml de solución reguladora de barbituratos 0.1 M, pH 8.6, se colocó en un baño de hielo y dentro de ésta se puso la placa de agarosa. En cada pozo de la placa se colocaron 5 μ l de las muestras problema y del estándar, una de ellas teñida con azul de bromofenol para utilizarse como indicador del frente de corrimiento.

1.3) Inmunolectroforesis: La placa se puso en -

contacto con la solución reguladora por medio de un par de mechas de papel filtro Whatman # 1 (17.5 X 3.5 cm), - la electroforesis se llevó a cabo a 12 mA (aproximadamente 70 volts) durante 18 h a 4°C.

1.4) Tinción de las placas: Las placas se dializaron contra varios cambios de solución salina fisiológica y después contra agua destilada. Se secaron a 37°C, se tiñeron con azul de Coomassie al 0.25% y el exceso de colorante se eliminó con solución decolorante de ácido acético-etanol-agua (1:4.5:4.5).

1.5) Se procedió a medir la longitud y base de los cohetes formados por las bandas de precipitación, tomando como referencia la orilla superior de los pozos.

2) Inmunodifusión radial (ID-R):

2.1) Preparación de las placas: Se preparó por calentamiento a ebullición 20 ml de una solución de agarosa al 1% en solución salina al 0.85% conteniendo polietilenglicol 6 000 (PEG)(Sigma No. P-2139)(0.4 g), ésta solución se introdujo en un baño de agua y cuando alcanzo una temperatura de 56°C se le adicionó 0.2 ml de merthiolate al 1% y 1.6 ml de SMC anti-AFP (concentración final del 8%). Se mezcló perfectamente, se vertió de inmediato sobre una placa tipo Hyland colocada en una superficie perfectamente horizontal y se dejó solidificar a temperatura ambiente. De ésta manera se obtuvo una placa de agarosa de un espesor aproximado de 2 mm. La placa se perforó siguiendo un diagrama previamente seleccionado haciendo pozos de 3 mm de diámetro con una separación de 12.5 mm entre uno y otro. Inmediatamente se procedió a la aplicación del Ag o bien se guardó perfectamente sellada a 4°C.

2.2) Aplicación de las muestras: En cada pozo se colocaron exactamente 5 μ l de las muestras de interés. - Para la obtención de la curva de calibración se aplicaron diluciones seriadas de SECAFP.

2.3) Inmunodifusión: En éstas condiciones la placa se guardó herméticamente cerrada dentro de una cámara húmeda a temperatura ambiente y el Ag difundió de 24 a 96 h. Los halos de precipitación se midieron a intervalos de 24 h.

2.4) Tinción de las placas: Para conservar la placa de la prueba se sometió primero a una diálisis contra varios cambios de solución salina al 0.85% y después contra agua destilada, posteriormente la capa de agarosa se desprendió de la placa de plástico y se transfirió a una placa de vidrio, se secó a 37°C y se tiñó con azul de Coomassie al 0.25%. La decoloración se efectuó con solución de ácido acético-etanol-agua (1:4.5:4.5).

3) Inmunoensayo enzimático (ELISA):

Para el montaje de la técnica de ELISA se prepararon los conjugados anticuerpo-enzima (Ac-E) de acuerdo a los siguientes métodos:

I.- Método de 2 pasos con glutaraldehído (Avrameas)(32): Se disolvieron 10 mg de peroxidasa de rábano fuerte (PRF) de R.Z.= 1.4 (Sigma tipo II, No. P-8250) en 0.2 ml de una solución de glutaraldehído al 1.25% en solución reguladora de fosfatos 0.1 M, pH 6.8, la mezcla se dejó reaccionar 18 h a temperatura ambiente y posteriormente se sometió a diálisis contra PBS pH 7.4, a 4°C. El dializado se aforó a 1 ml con solución salina 0.15 M y se le adicionó 5 mg de la fracción GG del SMC anti-APP y 0.1 ml de solución reguladora de carbonato-bicarbonato -

1 M, pH 9.5, para asegurar la reacción de la mezcla se incubó 24 h a 4°C con agitación constante, en seguida se le adicionó 0.1 ml de una solución de lisina 0.2 M (Sigma), después de 2 h la mezcla se dializó contra varios cambios de PBS pH 7.4 a 4°C y el dializado resultante se sometió a proceso de precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 50% de saturación, empleando para ello una solución saturada de sulfato de amonio pH 7.0, la precipitación se realizó 3 veces y el precipitado formado se recuperó mediante centrifugación, se solubilizó y reconstituyó al volúmen inicial con agua destilada antes de efectuarse la siguiente precipitación, el último precipitado se disolvió en el menor volúmen de agua destilada y se dializó a 4°C contra varios cambios de PBS pH 7.4, la preparación se centrifugó a 4 000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se sometió a un proceso de separación cromatográfica en una columna de Sephadex G-100 de 50 X 1.5 cm (Sigma) equilibrada con PBS pH 7.4. Los eluidos que contenían el conjugado Ac-E (primer pico al leerse a 280 nm), se mezclaron, se concentraron mediante deshidratación con goma arábiga (Sigma No. G-9752) y posteriormente se dializaron varias veces contra PBS pH 7.4, el dializado se centrifugó a 4 000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se mezcló con albúmina sérica bovina (ASB) de tal manera que al aforar la mezcla a 5 ml la concentración de la ASB fuera del 5%, el preparado se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml (previamente esterilizado mediante membranas millipore de 0.45 μ) que se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso.

II.- Método de oxidación con meta-periodato de sodio (Nakane)(32): Se disolvieron 5 mg de PRF de R.Z.= 3.2 (Sigma tipo VI, No. P-8375) con 1 ml de una solución de -

bicarbonato de sodio 0.3 M, pH 8.1 recién preparada, esta solución se hizo reaccionar con 0.1 ml de fluorodinitrobenzenceno (FDNB)(Merck) al 1% diluido en etanol absoluto y se mezcló durante 1 h sin agitación magnética a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó 1 ml de una solución de metaperiodato de sodio 0.06 M (Merck -- 1393124) recientemente preparada en agua bidestilada, se mezcló durante 30 min a temperatura ambiente virando el color de la mezcla de café a amarillo-verdoso. En seguida esta mezcla se puso en contacto con 1 ml de etilenglicol 0.16 M (Merck 2575787) en agua bidestilada y se le permitió reaccionar con agitación. La mezcla se dializó durante 18 h a 4°C contra 3 cambios de un l cada uno de solución reguladora de carbonato-bicarbonato de sodio 0.01 M, pH 9.5, a los 3 ml del dializado resultante se le hizo reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente con 5 mg de la fracción GG del SMC anti-AFP previamente solubilizada y dializada contra solución de carbonato-bicarbonato 0.01 M, pH 9.5, al preparado se le adicionó 5 mg de borohidruro de sodio y se le dejó reaccionar durante 18 h a 4°C con agitación suave, después se centrifugó a 3 000 rpm durante 30 min y la muestra se aplicó a una columna de Sephadex G-100 de 50 X 1.5 cm equilibrada con PBS 0.01 M, pH 7.4, las fracciones colectadas se leyeron a 280 y 403 nm, aquellas que comprendieron el primer y segundo pico se mezclaron por separado y se concentraron por deshidratación con goma arábiga, los concentrados se centrifugaron a 4 000 rpm, 30 min y los sobrenadantes se mezclaron con ASB en una concentración final de 10 mg por ml, posteriormente se esterilizaron por filtración empleando membranas millipore de 0.45 μ en presencia de merthiolate (1:10 000), las fracciones se conservaron a

-20°C dividiendo los 5 ml de la mezcla resultante en alícuotas de 0.5 ml hasta su uso.

Para el montaje de la técnica de ELISA se utilizaron varias fases sólidas y una de ellas fueron discos de papel filtro activados con bromuro de cianógeno (BrCN):

-Activación de discos de papel activados con BrCN: A 2 g de discos de papel filtro Whatman # 1 de 0.5 cm de diámetro previamente humedecidos con 20 ml de agua bidestilada fría, (el excedente de agua se eliminó por decantación), se le adicionó 60 ml de una solución de BrCN al 3.33 por ciento preparada al momento de usarse, a ésta mezcla se le ajustó el pH entre 10.5 y 11 con NaOH 1 N manteniéndose así durante 15 min, enseguida el BrCN (Merck 820193) se eliminó por succión y los discos se sometieron a 12 lavados con duración de 2 min cada uno, con porciones de 50 ml de NaHCO_3 0.005 M, posteriormente se lavaron 2 veces con agua bidestilada y enseguida 2 lavados de 50 ml cada uno con acetona al 25, 50, 75 y 100% sucesivamente. Los discos lavados se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en un lugar seco hasta su uso.

-Acoplamiento de proteína a los discos activados: Se preparó una mezcla de 200 μl de proteína (Ac anti-AFP, -SCU, AFP purificada) en 40 ml de NaHCO_3 0.1 M, se adicionó a 1 g de discos activados secos y se dejaron reaccionar durante 24 h a 4°C en agitación muy suave, posteriormente se lavaron 2 veces con duración de 10 min cada uno, con porciones de 100 ml de NaHCO_3 0.1 M, enseguida se les adicionó 40 ml de etanolamina 0.05 M en NaHCO_3 0.1 M, pH 8.0 dejándose reaccionar durante 2 h, después de éste tiempo se lavaron 2 veces con solución reguladora de acetatos 0.1 M, pH 4.0, finalmente se realizaron 2 lavados

empleando en cada uno 100 ml de solución reguladora de incubación (solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH - 7.4 + NaCl 0.9% + ASB 0.3% + NaN_3 0.05% + Tween 20 al 5%) y se dejaron en el menor volumen posible de solución reguladora de incubación a 4°C hasta su uso.

Para observar si efectivamente se había acoplado proteína a los discos de papel activados, una porción de éstos se introdujeron dentro de una solución de NaOH 0.1 N y rápidamente a ésta solución se le procedió a cuantificar la concentración de proteína por el método de Lowry.

Para ratificar la actividad enzimática de los conjugados Ac-E preparados en el laboratorio por los 2 métodos descritos anteriormente, se probaron inicialmente en presencia de orto-fenilendiamina (OPD) (Sigma) en solución reguladora de citratos 0.1 M pH 5.0 haciendo una dilución 1:500 y 1:1 000 en PBS, se colocaron 100 μl de OPD al 0.04% preparada con H_2O_2 al 0.01% y se dejó reaccionar durante 30 min en obscuridad, parandose la reacción adicionando 20 μl de H_2SO_4 8 N.

Para observar la actividad inmunológica y enzimática de los conjugados Ac-E se analizaron mediante una prueba de ELISA en gel:

-Inmunoensayo enzimático (ELISA) en gel: Sobre cada portaobjetos se vertieron 2.1 ml de una solución de agarosa al 1% preparada por ebullición en solución reguladora de barbituratos 0.1 M, pH 8.6, una vez solidificada la agarosa se removió la zona localizada entre 1 a 3.3 cm - del extremo catódico, sustituyendose por una mezcla de 0.3 ml de agarosa al 2.6% preparada en solución reguladora de barbituratos 0.1 M pH 8.6 a 56°C adicionada de 0.5 ml de la solución del conjugado Ac-E a probar. Los anti-

genos que se probaron fueron 5 μ l de SCU y de SMN que se colocaron en pozos de 3 mm de diámetro a 0.9 cm del extremo catódico. Se efectuó la IEF-C a 12 mA durante 18 h, - posteriormente las placas se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C, se dializaron exhaustivamente varios días contra solución salina 0.85% y luego - contra agua bidestilada. Para evidenciar la reacción enzimática las placas se sumergieron durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad en una solución-sustrato - empleada para la técnica de ELISA preparada de la siguiente manera: 15 mg de 4-Cloro-1-naftol + 5 ml de metanol + 25 ml de PBS pH 7.4 + 25 μ l de H₂O₂ al 30%. Para detener la reacción, las placas se colocaron dentro de H₂SO₄ 2 N durante 3 min, se enjuagaron al chorro de agua y después con agua destilada, por último se dejaron secar a 37°C durante 18 h.

3.1) Montaje de la técnica de ELISA: Para el montaje y estandarización de la técnica de ELISA se probaron cada uno de los componentes involucrados en los sistemas:

A) Sistemas:

- a) Fase sólida~Ac~AFP~Ac-E
- b) Fase sólida~Ac~Bloqueador~AFP~Ac-E
- c) Fase sólida~Ac~AFP~Bloqueador~Ac-E
- d) Fase sólida~Ac~AFP~Ac~Anti-Ac-E

B) Fase sólida:

- a) Placas comerciales Microtiter (Dynatech Microelisa)
- b) Esferas de vidrio esmerilado de aproximadamente 5 mm de diámetro.
- c) Discos de membranas de acetato de celulosa (Beckman). Se trabajaron en tubo de ensayo y en placa Dynatech.
- d) Discos de papel filtro activados con BrCN acopla-

dos a proteína. Se trabajaron en tubo de ensayo y placas Dynatech.

C) Soluciones reguladoras para el forramiento de la fase sólida:

- a) Citratos 0.1 M, pH 5.0
- b) Salina fosfatos 0.01 M, pH 7.4
- c) Salina boratos 0.1 M, pH 8.4
- d) Carbonato-bicarbonato 0.1 M, pH 9.5

D) Anticuerpos acoplados a la fase sólida (1^{er} Ac):

- a) SMC anti-AFP diluciones de 1:1 a 1:10.
- b) SC anti-AFP mono-específico: diluciones de 1:1 a 1:200.
- c) Fracción GG del SMC anti-AFP: diluciones de 1:1 a 1:1 000.

d) SMC anti-AFP en diluciones de 1:250 a 1:4 000 - tratado con glutaraldehído: El SMC anti-AFP se diluyó en un volumen equivalente de PBS pH 6.0 + 2 volúmenes de agua bidestilada + 2 volúmenes de glutaraldehído 0.02 M, - se incubó durante 20 min a 37°C y se le adicionó posteriormente 1 volumen de PBS 0.1 M pH 8.5.

E) Tiempo de incubación: Se probaron diferentes tiempos de incubación para cada etapa de los sistemas, en la primera etapa de adsorción del Ac a la fase sólida se realizó mediante incubaciones de 1 a 2 h ó bien de 18 a 36 h a 37°C con las placas herméticamente cerradas, los acoplamientos de las etapas posteriores se realizaron incubando durante 30 min ó 1 h a la misma temperatura. En el caso del sistema "a" se adsorbió el primer Ac hasta sequedad incubando de 18 a 36 h a 37°C.

F) Fuente de AFP:

- a) SCU: se probaron diluciones de 1:1 a 1:10 000 en PBS 0.01 M, pH 7.4.

b) SMN: se probaron diluciones de 1:1 a 1:200 en PBS 0.01 M, pH 7.4.

c) AFP purificada: se probaron diluciones de 1:1 a 1:20 en PBS 0.01 M, pH 7.4 (solo se probó en discos activados con BrCN).

d) SMN absorbido con sefarosa 4B-CL acoplada a GG anti-AFP (concentración "cero" de AFP): se prepararon diluciones de 1:1 a 1:1 000 en PBS 0.01 M, pH 7.4.

G) Anticuerpo marcado con peroxidasa (2° Ac):

a) Se utilizó el preparado por el método de 2 pasos con glutaraldehído en diluciones de 1:500 a 1:1 000 en PBS 0.01 M, pH 7.4.

b) En el sistema "d" se utilizó un Ac de conejo anti-inmunoglobulina de cabra marcado con peroxidasa (SCO anti Ig cabra-PO)(Capell) diluido 1:500 en PBS 0.01 M, pH 7.4.

H) Solución de lavado: Se utilizó PBS-Tween 20 (Sigma) al 0.05%, en los ensayos que se realizaron en tubo, se utilizaron 200 μ l en cada lavado, cuando se utilizaron placas Dynatech, los pozos se lavaron empleando dos veces el volumen de la solución del Ac. El número de lavados varió entre 3 a 6 en cada etapa.

I) Solución-sustrato:

a) En tubo de ensayo o placa Dynatech para ELISA: se preparó en la obscuridad poco antes de emplearse una solución de OPD al 0.04% en solución de citratos 0.1 M pH 5.0 + 0.01% de H_2O_2 . Se utilizaron 100 μ l de ésta solución para cada muestra incubando 30 min en la obscuridad a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo con 20 μ l de H_2SO_4 8 N, y se procedió a leer a 492 nm.

b) En gel:

-Las placas se sumergieron durante 30 min en la obscuridad en la siguiente solución: 3-amino-9-etilcarbazol al 0.04% en solución reguladora de acetatos 0,05 M, -

pH 5.0 + 5% de N,N-dimetilformamida + 0.01% de H_2O_2 . Para detener la reacción se colocaron dentro de H_2SO_4 2 N durante 3 min, se enjuagaron al chorro del agua y después con agua destilada, por último se dejaron secar a $37^\circ C$ durante 18 h.

-Las placas se sumergieron durante 30 min a temperatura ambiente en la obscuridad en una solución de: 4-Cloro-1-naftol al 0.015% en 16% de metanol + 84% de PBS pH - 7.4 + 0.025% de H_2O_2 . La reacción se detuvo con H_2SO_4 y las placas se enjuagaron con agua corriente y agua destilada y se dejaron secar a $37^\circ C$ durante 18 h.

J) Procedimiento de lavado: en cada etapa se utilizaron - 100 μl de cada solución y después de cada tiempo de incubación la solución se eliminó por succión efectuandose los lavados como se indicó en el inciso "H".

R E S U L T A D O S

Análisis del grado de reactividad de los sueros anti AFP.- Durante el programa de inmunización y sangrado de los animales de experimentación (conejos y cabras) y desde su inicio se fue analizando la reactividad de los sueros obtenidos en cada sangrada mediante la técnica de IEF e IEF-B empleando como antígenos SCU y SNH, al mismo tiempo se observó que el suero de conejo reaccionó contra un mayor número de proteínas antigénicas que el suero de cabra, encontramos que en cierto momento del programa de inmunización la reactividad estaba principalmente dirigida hacia la AFP (Figura 1 y 3).

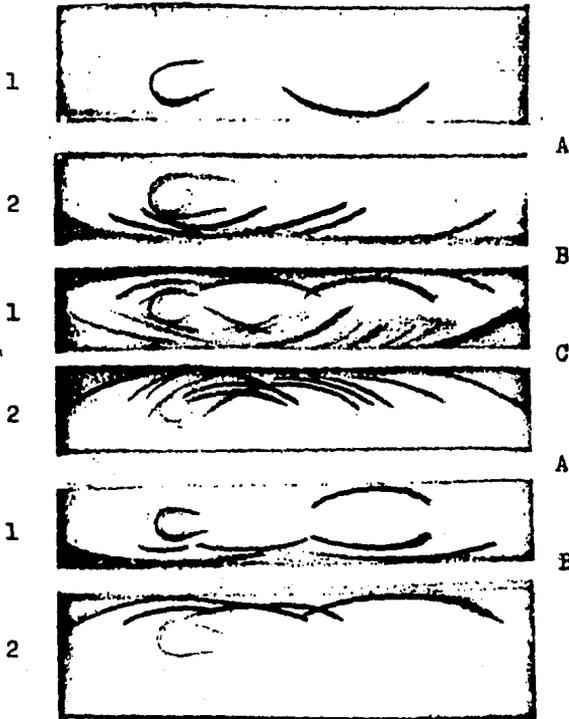
Prueba control: Mediante IEF se hizo reaccionar un -SCa anti-SNH contra SCU y SNH el cual no fue capaz de reaccionar contra la AFP presente en el SCU (Figura 1).

Obtención del suero monoespecífico anti-AFP.-

a) Conejos: Para la eliminación de los anticuerpos contaminantes en el suero de conejos fue suficiente absorberlo durante 24 h con proteínas de SNH insolubilizadas con glutaraldehído. El suero adsorbido se probó por IEF e IEF-B contra SCU y SNH el cual mostró reaccionar únicamente contra la AFP (Figura 2). Este suero se utilizó para la preparación de los inóculos de las cabras, lo que permitió aumentar la pureza del inóculo e incrementar la escala del sistema.

b) Cabras: Para la eliminación de los anticuerpos contaminantes, los sueros de cabra se sometieron a los procesos de adsorción descritos en la página 25. De acuerdo a los resultados obtenidos el procedimiento más eficiente correspondió al # 1, curva A, ya que al probarse median

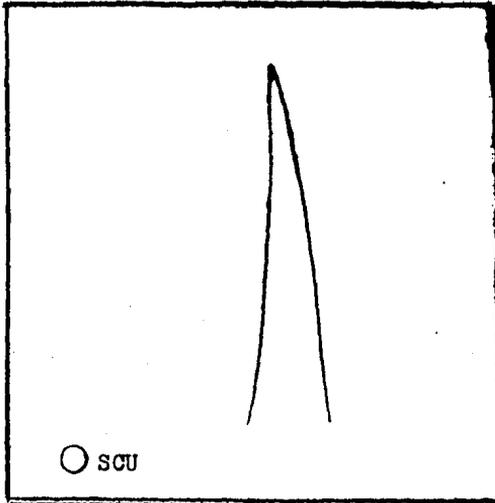
FIGURA 1
 REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE CONEJO ANTI-AFP



IEF: Se probaron como antígenos el - SCU (1) y el SNH (2) contra suero mono-especifico de conejo anti-AFP (A), suero de conejo anti-AFP sin adsorber (B) y suero de caballo anti-SNH (C).

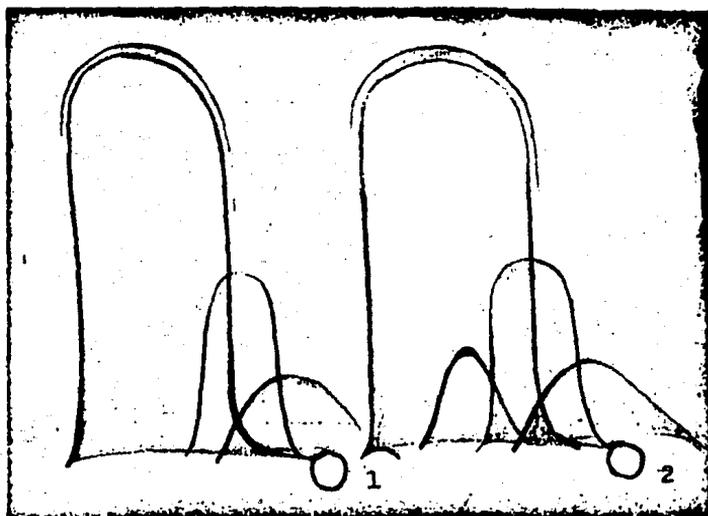
FIGURA 2

SUERO MONOESPECIFICO DE CONEJO ANTI-AFP



Mediante IEF-B se comprobó la -
monoespecificidad hacia la AFP del
suero de conejo anti-AFP adsorbido -
con proteínas de SNH insolubilizadas
con glutaraldehído.

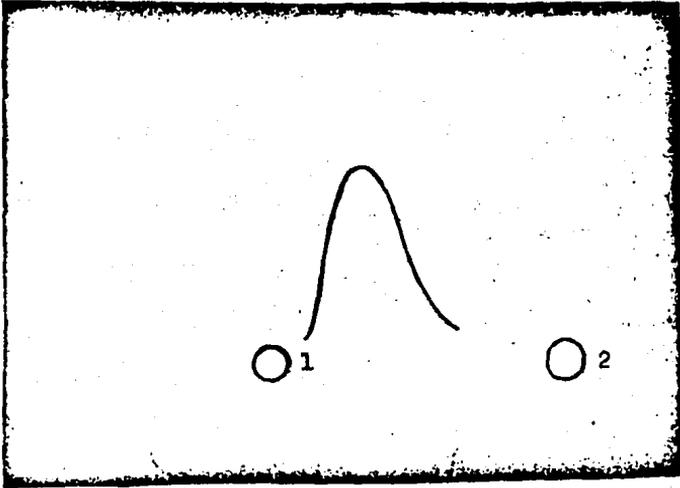
FIGURA 3
REACTIVIDAD DE LOS SUEROS DE CABRA ANTI-AFP



Mediante IEF-B se probó el suero de cabra hiperinmune anti-AFP contra SNH (1) y SCU (2).

FIGURA 4

SUERO MONOESPECIFICO DE CABRA ANTI-AFP



Mediante IEF-B se analizó la fracción GG del -
suero monoespecífico de cabra anti-AFP contra -
SNH (1) y SCU (2).

te IEF-B se formó con el SCU una sola banda de precipitación. Los sueros obtenidos de la adsorción realizados con SNH liofilizado o insolubilizado con glutaraldehído además mostraron reactividad hacia una proteína con corrimiento electroforético de gamma-globulina, la cual estaba presente tanto en SCU como en SNH, no obstante que se dejaron reaccionar hasta 9 días.

Al efectuarse el análisis de las curvas de precipitación (los sobrenadantes se analizaron por IEF-C y en el precipitado se cuantificó el contenido de proteínas) se le dió mayor prioridad al contenido protéico debido a que en la prueba de IEF-C no se pudo observar claramente un pico máximo de adsorción ya que fluctuaba alrededor de una relación anterior o posterior a aquella en donde se en contraba la máxima concentración de proteína.

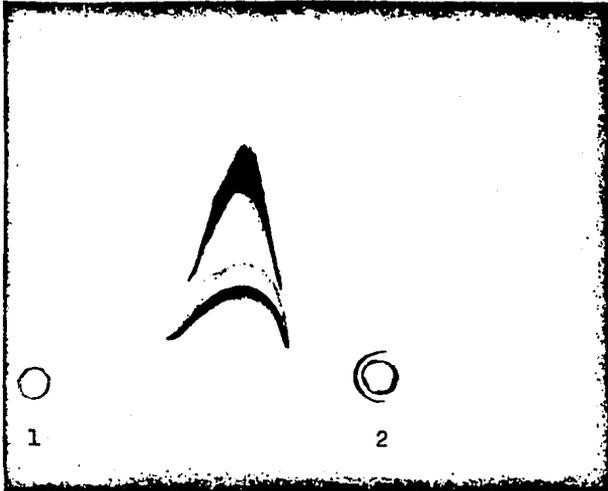
Una vez que se demostró mediante IEF-B que el suero de cabra únicamente reaccionaba contra la AFP del SCU, se procedió a probar mediante IEF-B la reactividad de 100 μ l de la fracción GG de éste suero (68.3 mg/ml) contra 10 μ l de SCU y 10 μ l de SNH, los resultados obtenidos confirmaron la monoespecificidad del suero de cabra anti-AFP (Figura 4).

Este procedimiento se extrapoló a mayor escala y se utilizó de rutina para adsorber grandes volúmenes de suero de cabra, con el objeto de asegurar la adsorción se trataron posteriormente con SNH insolubilizado con glutaraldehído y la fracción GG obtenida de cada lote se analizó mediante IEF-B.

Aparición de una doble banda de precipitación de corrimiento alfa.- Durante el proceso de análisis mediante IEF-B de los sueros adsorbidos se observó la aparición de una banda de precipitación adicional que no se había de-

FIGURA 5

APARICION DE UNA DOBLE BANDA
DE PRECIPITACION DE CORRIMIENTO ALFA



Mediante IEF-B se comprobó la aparición de una doble banda de precipitación de corrimiento alfa en una muestra de SCU (1) congelada y descongelada varias veces al hacerla reaccionar contra suero monoespecífico de cabra anti-AFP. La muestra 2 es SNH.

tectado anteriormente y que se encontraba ubicada exactamente bajo la banda correspondiente a la AFP. Se consideró que posiblemente la aparición de ésta banda de precipitación se debía a que en todas las IEF-B se habían utilizado la misma alícuota de SCU, la cual se sometió - por consiguiente a varios procesos de congelamiento y descongelamiento los cuales posiblemente modificaron la estructura de la AFP, para verificar ésta suposición se procedió a congelar y descongelar varias veces una alícuota de SCU que en un análisis preliminar por IEF-B se había demostrado la formación de una sola banda de precipitación). Al realizar posteriormente una IEF-B con 5 μ l de ésta alícuota y 200 μ l de SMC anti-AFP se confirmó el surgimiento de una nueva banda de precipitación (Figura 5).

Deslipidización de los sueros de cabra.- Inicialmente durante el análisis electroforético de los sueros adsorbidos de cabra anti-AFP se observó la aparición de una zona ligeramente teñida que no parecía ser una banda típica de precipitación resultante de la reacción Ag-Ac, se consideró que posiblemente se debía a lípidos de alto peso molecular que no se podían eliminar fácilmente mediante la diálisis por lo que se procedió a deslipidizar los sueros de cabra anti-AFP. La deslipidización fue efectiva para la eliminación de los lípidos, pero los sueros perdieron un poco la reactividad y no eliminó la aparición de la zona ligeramente teñida por lo que se optó - por eliminar éste procedimiento ya que además resultaba de alto costo.

Purificación de la AFP y análisis de su pureza.- La

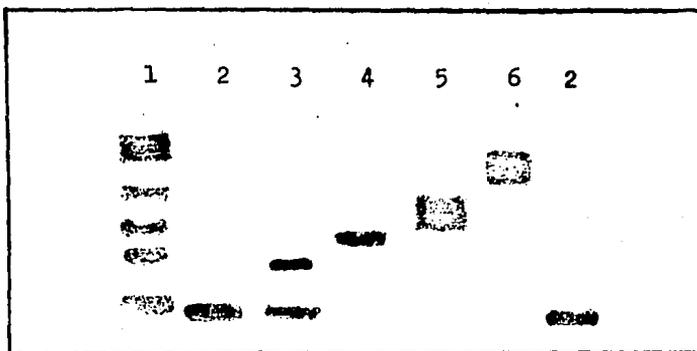
purificación de la AFP se hizo a partir de aquellas fracciones de proteínas obtenidas por EFBA que presentaron el mayor contenido de AFP al ser analizados mediante EFAC - (Figura 6) e IEF-B (Figura 7), una vez seleccionadas, se adsorbieron sobre Sefarosa 4B-CL acoplada a la fracción - GG anti-AFP. La elución de la AFP adsorbida se efectuó - por cambio de pH con solución reguladora de glicina-HCl, - pH 2.8, el diagrama de elución se ilustra en la gráfica 1. La proteína eluida se analizó mediante EFGP en presencia de SDS y mercaptoetanol (Figura 8) e IEF-B contra SCH anti-AFP, por éstas técnicas se detectó la presencia de AFP y por lo menos 2 proteínas contaminantes, para eliminar - los contaminantes se procedió a adsorber el eluido con - SCA anti-SNH insolubilizado con glutaraldehído y el sobre - nadante obtenido se analizó nuevamente mediante EFGP con y sin SDS y mercaptoetanol, obteniéndose una sola banda - de tinción (Figura 8 y 9). El eluido se analizó mediante IEF-B contra SCH anti-AFP y se empleó como prueba control SMC anti-AFP, en ambos casos se demostró la formación de una sola banda de precipitación correspondiente a la AFP purificada (Figura 10 y 11).

De los 68 ml de SCU que se procesaron y que tenían u na concentración de AFP de 10 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvieron 2.5 ml de AFP purificada con una concentración de 90 000 ng/ml - por lo que el rendimiento fue del 26% aproximadamente.

Obtención del peso molecular de la AFP mediante EFGP

Para verificar que la preparación de AFP obtenida en el - laboratorio correspondía a la reportada en la literatura se procedió a determinar su peso molecular, para ello se realizó una EFGP de una mezcla de proteínas de peso mole

FIGURA 6
ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA



Las fracciones de proteínas del SCU obtenidas -
por medio de EFBA se analizaron mediante EFAC.

Fracciones: 1.- SCU

2.- Albúmina

3.- Alfa₁-globulinas

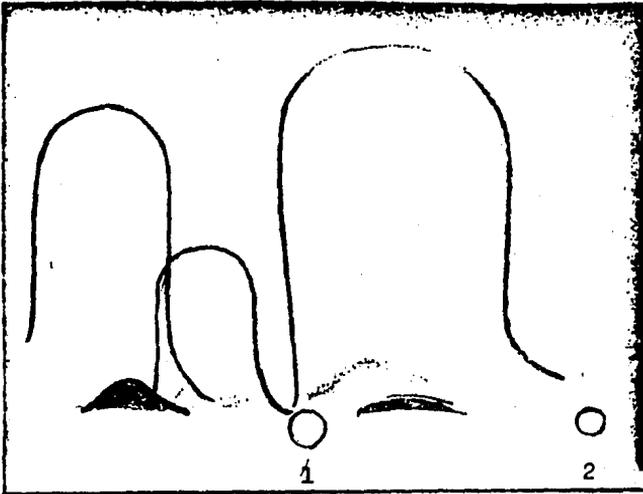
4.- Alfa₂-globulinas

5.- Beta-globulinas

6.- Gamma-globulinas

FIGURA 7

LOCALIZACION DE LA FRACCION ENRIQUECIDA DE AFP



Mediante IEF-B se analizaron las fracciones de proteínas del SCU obtenidas de la EPBA haciéndolas reaccionar contra suero de cabra hiperinmune anti-AFP.

Fracciones: 1.- Alfa₁-globulinas
2.- Albúmina

GRAFICA 1

ELUCION DE LA AFP A PARTIR DE SEPHAROSA ACTIVADA CON
BrCN ACOPLADA A GG MONOESPECIFICA DE CABRA ANTI-AFP

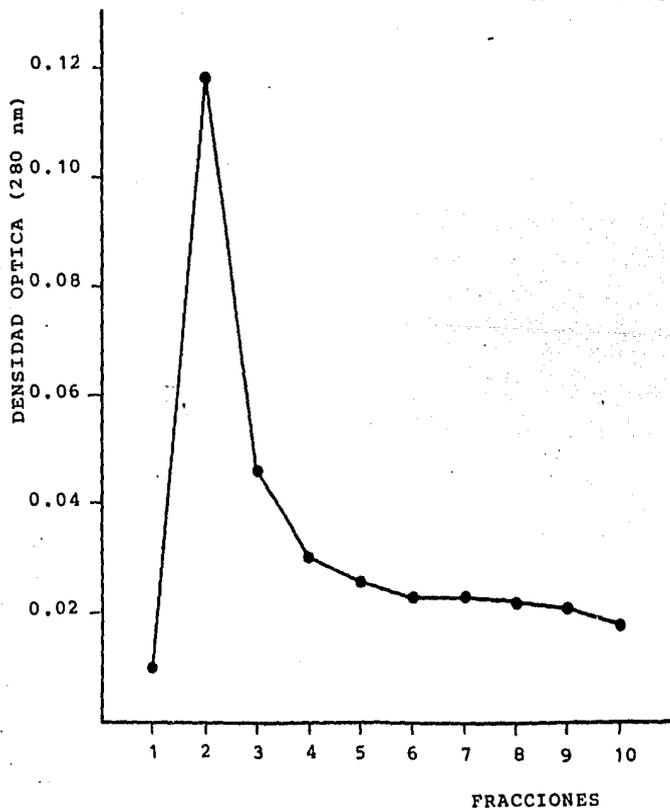
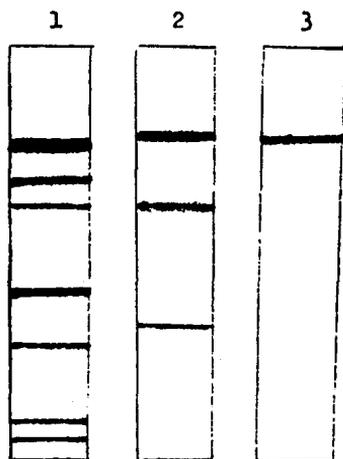


FIGURA 8
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA
EN PRESENCIA DE SDS Y MERCAPTOETANOL

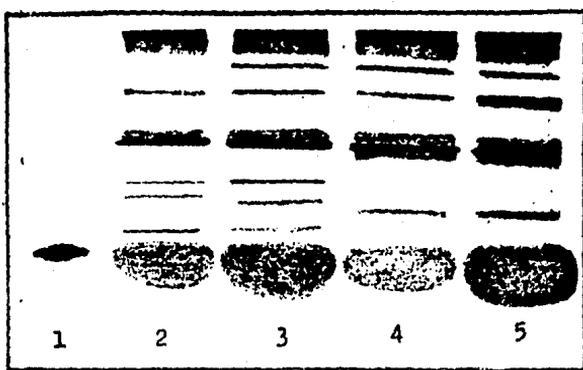


Los eluidos obtenidos durante el -
proceso de purificación de la AFP y una
mezcla de proteínas de peso molecular co
nocido se analizaron mediante EFGP.

Muestras: 1.-Marcador de peso molecular
2.-AFP semipurificada
3.-AFP purificada

FIGURA 9

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA
EN AUSENCIA DE SDS Y MERCAPTOETANOL

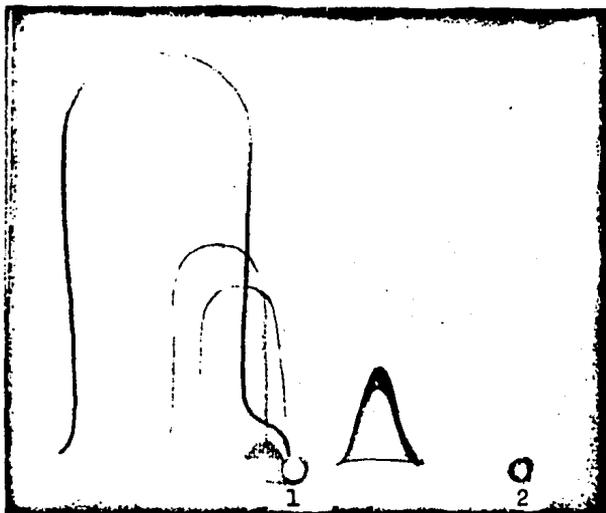


El eluido obtenido del último paso de la purificación de la AFP se comparó con los componentes del SCU y SMN mediante EFGP.

- Muestras: 1.- AFP purificada
2.- SCU diluido 1:10
3.- SCU diluido 1:5
4.- SMN diluido 1:10
5.- SMN diluido 1:5

FIGURA 10

ANALISIS DE LA PUREZA DE LA AFP PURIFICADA



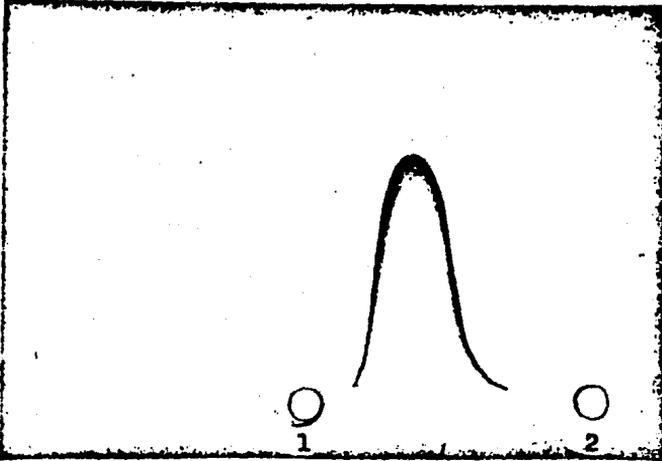
Mediante IEF-B se analizó la AFP purificada haciendola reaccionar contra suero de cabra hiperinmune anti-AFP observandose que en la preparación purificada solo se detectó AFP.

Muestras: 1.- SMN
2.- AFP purificada

o

FIGURA 11

COMPROBACION DE LA OBTENCION DE AFP PURIFICADA



Mediante IEF-B se analizó la AFP purificada haciéndola reaccionar contra el suero mo noespecífico de cabra anti-AFP confirmando - que la proteína purificada era AFP.

Muestras: 1.- SMN
2.- AFP purificada

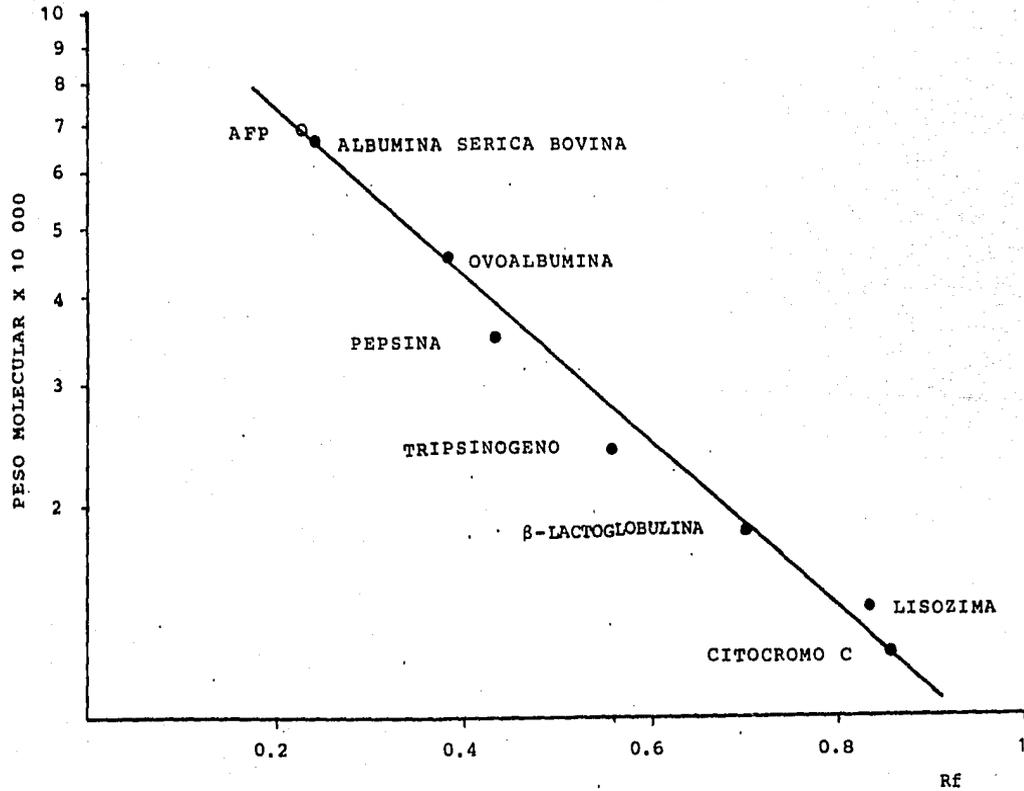
T A B L A # 1

PROTEINA	PESO MOLECULAR (daltons)	RF
1.- Albúmina sérica bovina	66 000	0.246
2.- Ovoalbúmina	45 000	0.381
3.- Pepsina	34 700	0.432
4.- Tripsinógeno	24 000	0.556
5.- β -lactoglobulina	18 400	0.701
6.- Lisozima	14 300	0.832
7.- Citocromo C	12 384	0.856
A F P	68 000	0.224

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el líquido de corrimiento}}{\text{Distancia recorrida por la proteína}}$$

GRAFICA 2

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA



cular conocido (Figura 8:1) y con la obtención de sus Rf (Tabla 1) se construyó una curva estandar (Gráfica 2) en la que se interpoló el valor del Rf de la proteína purificada (Rf= 0.224), calculandose un peso molecular de - 68 000 daltons que cae en el rango reportado en la literatura para la AFP.

Acondicionamiento de los sueros empleados para la estandarización de las técnicas utilizadas para la cuantificación de la AFP.- Se procedió a esterilizar una porción de SMC anti-AFP primeramente haciéndolo pasar a través de un prefiltro y después a través de una membrana Millipore de 0.45 μ , éste procedimiento permitió eliminar una gran cantidad de lípidos que durante todo el proyecto provocaron muchos problemas sobre todo porque al descongelarse o al restituirse el suero liofilizado se volvía turbio y si se trataba de eliminar la turbidés mediante centrifugación se formaba una capa superficial de lípidos imposible eliminar totalmente y permanecían las muestras muy turbias. El SMC anti-AFP filtrado se guardó en alícuotas de 10 ml a -20°C hasta su uso.

Técnicas empleadas para la cuantificación de la AFP: Se montaron y estandarizaron las técnicas de ID-R e IEF-C y se intentó montar y estandarizar la técnica de ELISA usando para ello el SMC anti-AFP.

Estandarización de la ID-R.- Se determinaron los siguientes parámetros:

1.- Grosor de la capa de agarosa: Se probaron placas de 1 y 2 mm de grosor y esta última se seleccionó como la más adecuada.

2.- Diluyente de la agarosa: Se probó solución reguladora de barbituratos 0.1 M, pH 8.6 y solución salina 0.85%. La última fue la que se utilizó de rutina debido principalmente al costo ya que con ambas los resultados fueron idénticos.

3.- Tamaño de los pozos: Se hicieron pozos de 3 mm de diámetro ya que en pozos más pequeños la muestra se derramaba.

4.- Separación de los pozos: Se probaron separaciones de 1.0 y 1.25 cm de distancia entre los pozos, prefiriéndose la mayor distancia ya que con ella se evitó el entrecruzamiento de los halos de precipitación de los pozos vecinos.

5.- Tamaño de la muestra: Se adicionó a cada pozo 5 μ l de la muestra de interés.

6.- Adición de polietilenglicol (PEG): La adición de PEG fue con la finalidad de evitar la deshidratación de la capa de agarosa y favorecer la precipitación. Se probaron concentraciones del 0.3, 0.4, 0.5, 2, 3, 4 y 5% siendo lo más conveniente la del 2% ya que en las concentraciones más bajas no mejoraron el sistema y las más altas modificaron inconvenientemente la textura de la capa de agarosa. En las placas control (sin PEG) se observó un tiempo de difusión mayor de 96 h para la concentración máxima de Ag y los halos resultantes eran más difusos dificultándose la lectura.

7.- Adición de glicerol: Este hidratante se probó en concentraciones del 1 y 2%, pero se eliminó la posibilidad de utilizarlo debido a que la adición de PEG ayudó adecuadamente al sistema.

8.- Concentración del SMC anti-AFP: Se probaron concentraciones del SMC anti-AFP del 4, 6, 8 y 10% prefiriéndose la del 8% debido a que los halos formados no eran muy di-

fusos ni muy grandes y cuando se aplicaban concentraciones pequeñas de Ag el halo de precipitación se podía observar a simple vista y sin teñir.

9.- Curva estándar: A partir de un SECAPP con una concentración de 322 000 ng de AFP/ml se hicieron diluciones seriadas en solución salina 0.85% abarcando un rango de concentración de 503 a 322 000 ng/ml. Debido a que en el sistema solo se pudo observar la formación de un halo bien definido a partir de una concentración de 2012 ng por ml se consideró esta concentración como el límite inferior para la curva estandar (Gráfica 3) siendo su coeficiente de correlación (r) de 0.96.

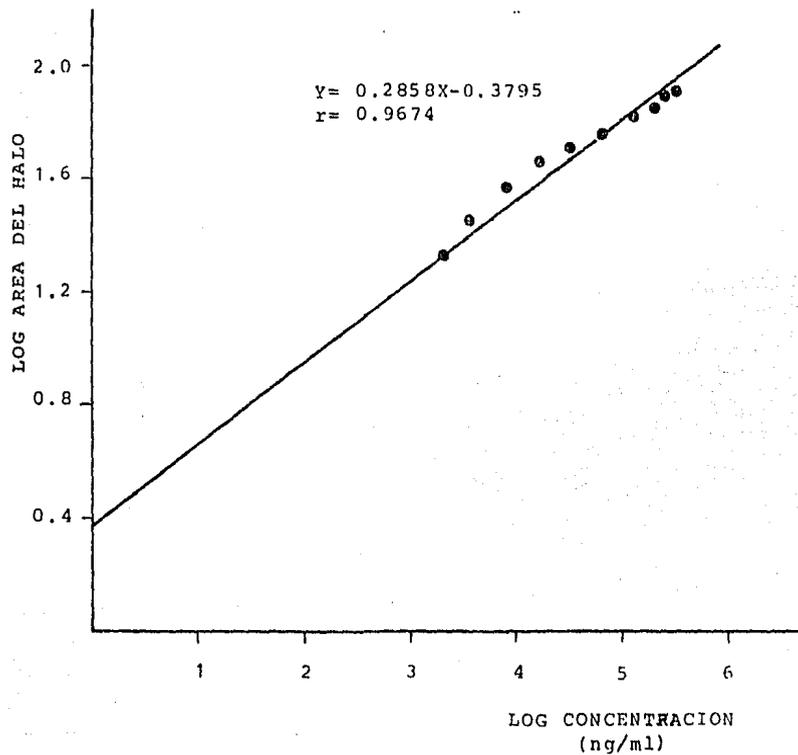
10.- Tiempo de difusión: La difusión se efectuó a temperatura ambiente con la placa bien sellada y dentro de una cámara húmeda, la medición de los halos se efectuó en cada período de 24 h con una regla de Partigen. Se observó que la máxima concentración de Ag dejó de difundir a las 72 h, las 3 siguientes diluciones a las 48 h y las 6 últimas diluciones a las 24 h, por lo que se estableció como tiempo de difusión estándar 72 h, sin embargo en todas las pruebas efectuadas para la cuantificación de AFP en los líquidos biológicos los halos se midieron cada 24 h.

11.- Error de intra-ensayo e inter-ensayo: Para la obtención del error intra-ensayo, a una muestra de SCU se le cuantificó 5 veces la concentración de AFP durante el mismo ensayo, obteniéndose un error del 1.4%. Para la obtención del error inter-ensayo a una muestra de SCU se le cuantifico la concentración de AFP por duplicado en 5 ensayos diferentes obteniéndose un error del 6%.

Al finalizar las 96 h de difusión se observó que la

GRAFICA 3

INMUNODIFUSION RADIAL
CURVA ESTANDAR



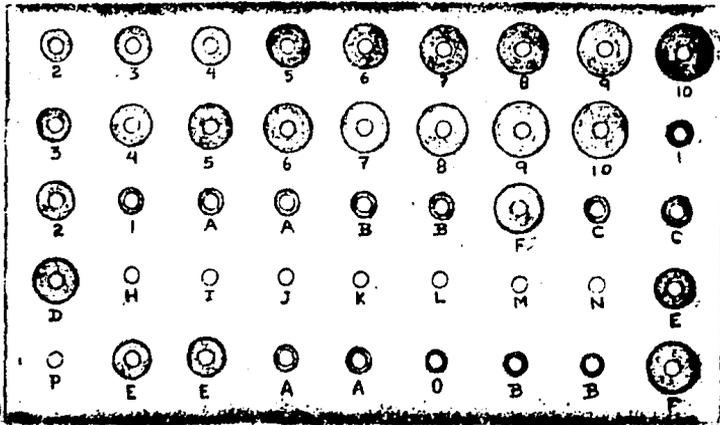
capa de agarosa no perdió humedad de manera significativa ya que aparentemente no se modificó su textura.

Una vez estandarizadas las condiciones del sistema se procedió a cuantificar la concentración de AFP en: 103 muestras de L.A. de mujeres embarazadas a diferentes edades gestacionales (la mayoría fueron obtenidas después de la 35^a semana de gestación) que presentaron algunas complicaciones durante el embarazo o bien de mujeres embarazadas con sospecha de DFN, algunos SCU de productos normales a término y un SCU de un producto anencéfalo -- (Figura 12). Noventa y ocho L.A. mostraron resultados negativos (no se formaron halos de precipitación), los resultados de las demás muestras biológicas se ilustran en la tabla 2, los cuales fueron obtenidos interpolando el logaritmo del tamaño del halo de precipitación en la curva estándar correspondiente (Gráfica 3).

Estandarización de la IEF-C: Se establecieron los siguientes parámetros:

- 1.- Marca de agarosa: Se probó agarosa "Sigma" y agarosa "LKB" solubilizadas en solución reguladora de barbituratos 0.1 M, pH 8.6, $p=0.75$. Debido a que no hubo una diferencia significativa entre ambas, por razones de costo y accesibilidad se utilizó de manera rutinaria la agarosa "Sigma".
- 2.- Grosor de la capa de agarosa: Las placas se hicieron de 1 mm de grosor con la finalidad de no utilizar gran cantidad de SMC anti-AFP.
- 3.- Tamaño de los pozos: Se hicieron pozos de 3 mm de diámetro.
- 4.- Separación entre los pozos: Se probaron separaciones

FIGURA 12
INMUNO-DIFUSION RADIAL



Cuantificación de AFP en diferentes muestras biológicas

-Curva estándar: Se construyó analizando por duplicado diluciones seriadas de SECAPP abarcando un rango de concentraciones de 503 a 322 000 ng - de AFP/ml; los pozos correspondientes a la curva son los numerados del 1 al 10.

-Líquidos amnióticos: Se probaron por duplicado los L.A. de mujeres embarazadas que presentan alguna complicación durante el embarazo y que dieron a luz un producto normal (muestras aplicadas a los pozos del H al O) o un producto anencéfalo confirmado (pozos A, D y E) o con sospecha - de DFN (pozos B y C).

-SCU: Se analizó en los pozos F un SCU diluido 1:2 de un producto anencéfalo post-parto.

-SMN: Se analizó como prueba control una muestra de SMN que corresponde al pozo P.

de 0.5 y 0.75 cm entre pozo y pozo, prefiriéndose la última distancia de separación debido a que cuando se manejaba la más corta las bandas de precipitación se unían.

5.- Tamaño de la muestra: A cada pozo se le adicionó 5 μ l de la muestra de interés.

6.- Concentración del SMC anti-AFP: Se probaron concentraciones del SMC anti-AFP de 2, 4, 5, 6, 7 y 8% seleccionándose la del 5% debido a que a ésta concentración los cohetes formados (bandas de precipitación) presentaban una forma más afilada, cuando se aplicaron concentraciones elevadas de Ag los cohetes formados no eran muy largos y se podían medir a simple vista y sin teñir.

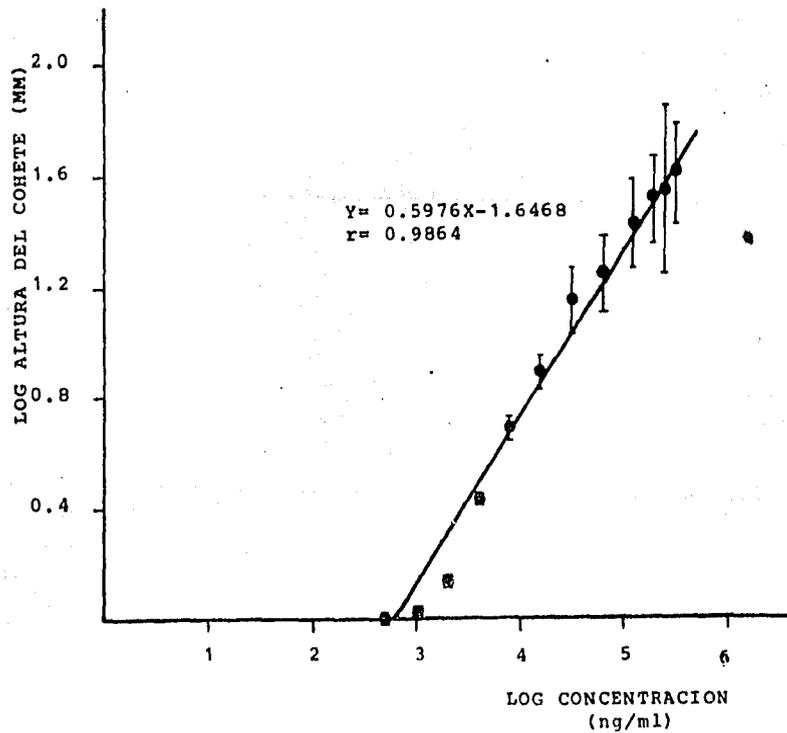
7.- Amperaje: Se efectuaron corrimientos electroforéticos a 5, 10, 12 y 15 amperes. Se obtuvieron mejores resultados a 12 amperes ya que cuando se aplicó amperaje bajo las bandas de precipitación eran cortas, anchas y sus puntas muy redondeadas, cuando se aplicó amperaje más alto del elegido las bandas de precipitación eran poco evidentes, muy altas y deformes.

8.- Tiempo y temperatura de corrimiento: La IEF se efectuó a 4°C para que no se deshidratara la capa de agarosa y el corrimiento se realizó durante 18 h o hasta que el indicador del frente de corrimiento tocaba el extremo más lejano de la placa.

9.- Curva estándar: A partir de un SECAPP con una concentración de 322 000 ng de AFP/ml se hicieron diluciones seriadas abarcando un rango de concentración de 251-322 000 ng/ml, sin embargo en nuestro sistema sólo se pudieron detectar concentraciones por arriba de 500-1 000 ng/ml por lo que ésta concentración se tomó como límite inferior de la curva estándar (Gráfica 4 y 5). Para la realización de la curva estándar se consideró la altura y el área de los

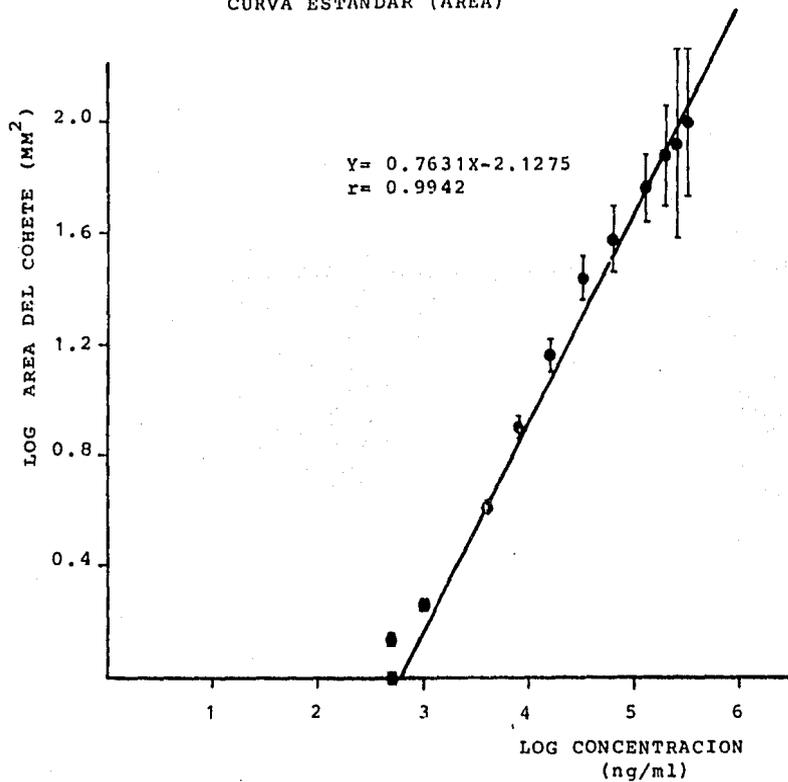
GRAFICA 4

INMUNOELECTROFORESIS DE COHETE
CURVA ESTANDAR (ALTURA)



GRAFICA 5

INMUNOELECTROFORESIS DE COHETE
CURVA ESTANDAR (AREA)



cohetes formados obteniéndose en ambos casos un "r" mayor de 0.95 por lo que fue indistinto utilizar cualquiera de los 2 parámetros.

10.- Error intra-ensayo e inter-ensayo: El valor obtenido para el error intra-ensayo fue de 8.2% y para el error inter-ensayo fue del 28.16%.

Estandarizadas las condiciones del sistema se probaron las mismas muestras biológicas que las analizadas mediante ID-R y los resultados obtenidos se ilustran en la tabla 2 y en la figura 13, los resultados que no aparecen en la tabla dieron resultados negativos por este método.

Debido a que en las 2 técnicas anteriores (ID-R e IEF-C) para la obtención de las curvas estándar se utilizaron las mismas concentraciones de Ag, ambas técnicas se relacionaron de la manera que se ilustra en la gráfica 6, en donde se determinó el método más sensible por el valor del parámetro "b" de la ecuación de la recta.

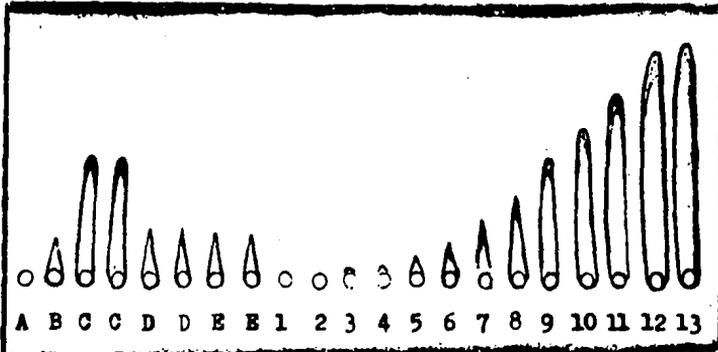
Montaje de la técnica de ELISA:

-Análisis de los conjugados Ac-E preparados en el laboratorio:

1.- Conjugado Ac-E preparado por el método de Avrameas: Para la purificación del Ac-E se efectuó una separación cromatográfica en Sephadex G-100. Los 2 ml obtenidos del proceso de conjugación se hicieron pasar a través de la columna equilibrada y eluida con PBS pH 7.4, se colectaron 68 fracciones de 2.1 ml cada una a una velocidad de 142 ml/h y cada fracción se leyó a 280 nm. Como se observa en la gráfica 7 se obtuvieron 3 picos, el primer pico fue el mayor y estuvo comprendido entre las fracciones 11 y 18 correspondiendo al conjugado Ac-E, el segundo pi-

FIGURA 13

INMUNOELECTROFORESIS DE CONJUNTO



Quantificación de AFP en diferentes muestras biológicas

-Curva estándar: Se construyó con diluciones seriadas de un SECAPP abarcando un rango de 271-322 000 ng/ml. Los pozos correspondientes a la curva son los numerados del 1 al 13.

-Líquidos amnióticos: Se probaron los L.A. de mujeres embarazadas con complicaciones durante el embarazo y con sospecha de DTN (pozo B) así como de mujeres embarazadas con productos anencefalo confirmado (muestras aplicadas a los pozos C, D y E).

-Suero de mujer normal: Se aplicó en el pozo A una muestra de SMN como control.

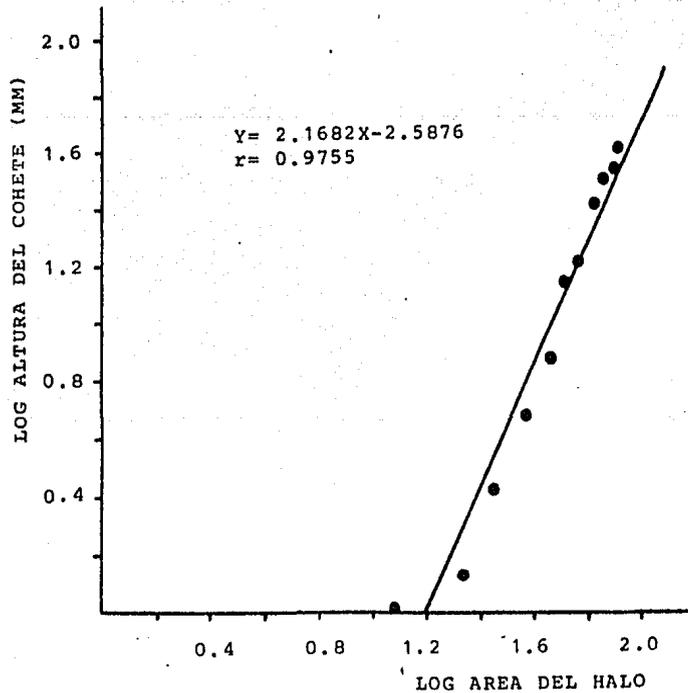
QUANTIFICACION DE AFP

CASOS CLINICOS

	TECNICAS		P.A.
	ID-R	IEF-C	
	ng/ml		
LIQUIDO AMNIOTICO:			
JIMENEZ SANCHEZ	23 388	12 132	?
PEREZ SOSA	24 688	25 467	+
SANCHEZ FIGUEROA	102 756	137 880	+
XILOL MALACATE	22 914	16 788	?
LEON LEON	504 326	562 341	+
SUERO DE CORDON UMBILICAL:			
PRODUCTO NORMAL	65 677	42 169	
PRODUCTO ANENCEFALO	562 341	501 187	
AFP PURIFICADA (LAB.):	82 594	102 287	

P.A. = Producto Anormal

GRAFICA 6
RELACION ID-R--IEF-C



co comprendido entre las fracciones 22 a 26 apenas fue visible y el tercero comprendido entre las fracciones 44 a 48 fue más evidente que el segundo. Después de analizarlos, el primer pico se mezcló con ASB en una concentración final del 5% en PBS y se esterilizó mediante filtración utilizando membranas millipore de 0.45μ (concentración aproximada= 1 mg de GG anti-AFP/ml de conjugado).

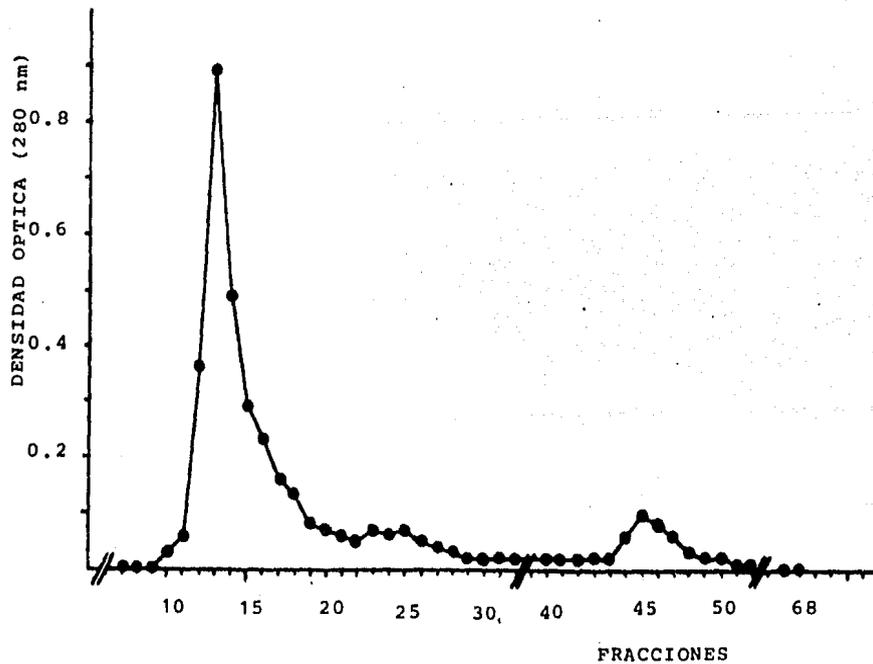
2.- Conjugado Ac-E preparado por el método de Nakane: Para la purificación del Ac-E se hizo pasar la preparación obtenida a través de una columna de Sephadex G-100 equilibrada y eluida con PBS pH 7.4. Se colectaron 46 fracciones de 2.1 ml (50 gotas) cada una, las que se leyeron a 280 y 403 nm, la velocidad de flujo fue de 142 ml/h, el diagrama de elución se ilustra en la gráfica 8 donde se observa la presencia de dos picos bien definidos y el comienzo de un tercer pico. El primer pico (fracciones 15 a 22) fue el correspondiente al conjugado Ac-E y el segundo (fracciones 23 a 26) probablemente corresponda a Ac marcado con un menor número de moléculas de PRF. El primer y segundo pico por separado se mezclaron con ASB a una concentración final de 10 mg de ASB/ml (concentración aproximada= 1 mg de GG anti-AFP/ml de conjugado).

La actividad enzimática se probó haciendo reaccionar a ambos conjugados Ac-E con OPD en solución reguladora de citratos pH 5.0, el color desarrollado fue leído a 492 nm y se determinó que la mayor actividad correspondió al conjugado preparado por el método de Avrameas.

Para conocer la bifuncionalidad de los conjugados mediante la técnica de ELISA en gel se probaron diferentes sistemas. El primer sistema utilizado fue AFP~Ac-E en donde se evidenció la reacción del Ac al formarse un cohe- te típico de ésta prueba al reaccionar contra la AFP del

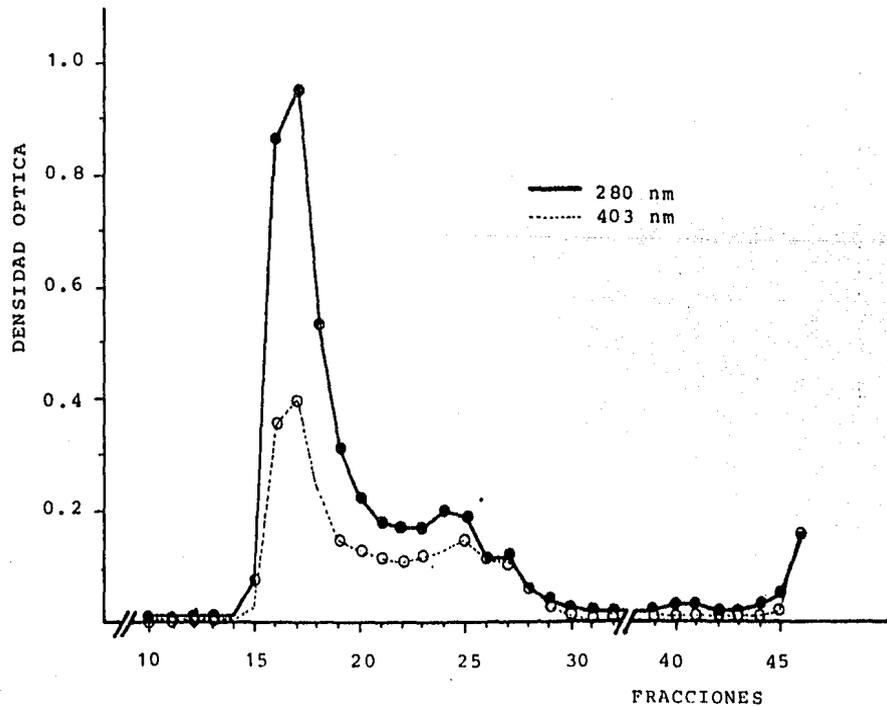
GRAFICA 7

SEPARACION CROMATOGRAFICA DEL ANTICUERPO ANTI-AFP MARCADO
CON PEROXIDASA MEDIANTE EL METODO DE 2 PASOS CON GLUTARALDEHIDO



GRAFICA 8

SEPARACION CROMATOGRAFICA DEL ANTICUERPO ANTI-AFP
MARCADO CON PEROXIDASA MEDIANTE EL METODO DE OXIDACION CON M-PERIODATO



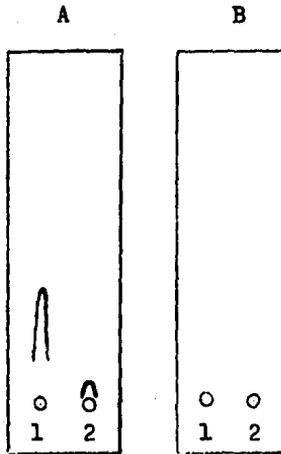
SCU y el SNH (Figura 14), la reacción enzimática se observó por el desarrollo de color debido a que el producto de la reacción enzimática de la PRP sobre el 4-Cloro-1-naftol es de color negro e insoluble en agua. De acuerdo a éste sistema ambas funciones solo fueron realizadas por el conjugado Ac-E preparado por el método de Avrameas, en cambio el preparado por el método de Nakane no mostró ni de Ac ni de enzima. En la prueba control se hizo reaccionar GG anti-AFP no marcada (concentración de 1 mg/ml) contra la AFP del SCU y el SMN pero no se observó la formación de una banda de precipitación (cohetes) que pudiera ser observada sin teñir o teñida con azul de Coomassie.

Otro sistema de ELISA en gel mediante el cual se probaron ambos conjugados fue Ac~AFP~Ac-E. En éste sistema la primera reacción se realizó mediante IEF-C y la segunda fue mediante la adición del conjugado Ac-E a la placa e incubación de acuerdo al método de Lebeco. Después de la diálisis (para eliminar lo que no reaccionó) se adicionó como sustrato el 4-Cloro-1-naftol o el 3-amino-9-etilcarbazol pero en éstos casos no se observó en ninguno de los conjugados ninguna reacción (ausencia de desarrollo de color negro o rojo respectivamente).

E L I S A E N G E L

Reactivo utilizado \ Sistema	AFP ~ Ac-E	Ac ~ AFP ~ Ac-E
Conjugado Ac-E (Avrameas)	+	-
Conjugado Ac-E (Nakane)	-	-

FIGURA 14
ELISA EN GEL



Mediante la técnica de ELISA en gel se probaron los conjugados - Ac-E preparados por los métodos de A vrameas (A) y Nakane (B) haciendolos reaccionar contra el SCU(1) y el SMN (2) evidenciando la reacción enzimática por medio del 4-Cloro-1-naftol.

Para el sistema $Ac \sim AFP \sim Ac-E$ que también fue mediante ELISA en gel sólo se pudo observar la primera etapa pero el acoplamiento del Ac-E a la AFP no se hizo nunca observable (ausencia de reacción enzimática debida a la elimi nación del conjugado).

Los sistemas montados para ELISA en gel también se efectuaron en discos de papel filtro activados con BrCN pero los resultados fueron semejantes para ambos casos, por ello el conjugado Ac-E preparado por el método de Avrameas fue el utilizado para la técnica de ELISA.

En el siguiente cuadro se ilustran los sistemas ELISA que fueron probados y las condiciones con las que se obtuvieron los mejores resultados (menores valores de fondo).

- SISTEMAS: a) Fase sólida~Ac~APP~Ac-E
 b) Fase sólida~Ac~Bloqueador~APP~Ac-E
 c) Fase sólida~Ac~APP~Bloqueador~Ac-E
 d) Fase sólida~Ac~APP~Ac~Anti Ac-E

Sistema	"a"	"b"	"c"	"d"
Condiciones				
Fase sólida	Placas para ELISA Dynatech	Bolitas de vidrio esmerilado	Bolitas de vidrio esmerilado	Placas para ELISA Dynatech
Sol. reg. para forramiento de la fase sólida.	PBS	PBS	PBS	PBS
Ac acoplado a la fase sólida.	Fracción GG anti-APP	Fracción GG anti-APP	Fracción GG anti-APP	Fracción GG anti-APP
Tiempo de incubación para primera etapa.	A sequedad 37°C, 18 h	En humedad 37°C, 24 h	En humedad 37°C, 24 h	En humedad 37°C, 24 h
Tiempo de incubación en las etapas posteriores.	37°C, 30'	37°C, 30'	37°C, 30'	37°C, 30'
Bloqueador proteico.	- - - - -	ASB	ASB	ASB
Conjugado Ac-E	Preparado <u>mé</u> todo Avrame- as. 1:500			
Sol. de lavado	PBS-Tw 20	PBS-Tw 20	PBS-Tw 20	PBS-Tw 20
No. de lavados en las etapas iniciales	3	3	3	3
No. de lavados en la última etapa.	6	3	3	3
Solución-sustrato	OPD al 0.04%	OPD al 0.04%	OPD al 0.04 %	OPD al 0.04%

Con el sistema que se obtuvieron mejores resultados fue el primero (a) ya que no presentó: Absorción inespecífica, valores de fondo en la prueba control y valores de fondo en la prueba - testigo.

Los demás sistemas presentaron valores de fondo elevados siendo más marcado en el cuarto sistema (d).

DISCUSION

Mediante estudios retrospectivos realizados en varios hospitales del país (Hospital Luis Castelazo Ayala, IMSS., Hospital G. A. Gonzáles, S.S., Hospital General, S.S., INPer, Centro Hospitalario 20 de Noviembre, ISSSTE, Hospital de la Mujer, S.S., entre otros) se ha demostrado que las malformaciones congénitas de mayor incidencia en nuestro medio son las correspondientes a los defectos del cierre del tubo neural (DTN) como son: anencefalia, craneosquisis, raquisquisis, craneorraquisquisis, espina bífida abierta y oculta siendo la incidencia entre 6 a 7 casos por cada 1 000 niños nacidos vivos. Este grupo de malformaciones se originan alrededor del 27-29 día después de la concepción y algunas de ellas no son compatibles con la vida (como en el caso de la anencefalia o la craneorraquisquisis) y los productos que las presentan mueren a las pocas horas o días de nacidos, sin embargo la mayoría de productos que presentan espina bífida sobreviven, siendo ésto un grave problema sobre todo porque las malformaciones que presentan no pueden ser corregidas por cirugía, terapia o tratamiento, quedando minus validos de por vida y generando por consiguiente un serio problema social en el grupo familiar. Los DTN son malformaciones consideradas teratógenicas y multifactoriales - por lo que el 90% de los casos provienen de padres que no presentan antecedentes familiares de éste tipo (13) y cuando se presenta un caso existe un alto riesgo de que el problema sea recurrente en embarazos subsecuentes.

A pesar de que México ocupa el segundo lugar a nivel mundial entre los países que presentan las incidencias más elevadas de DTN, no existe en los hospitales de aten-

ción gineco-obstetrica, métodos adecuados para su detección perinatal no obstante que en otros países se han desarrollado técnicas e implementado programas de tamizaje que permiten detectar los DTN desde el primer trimestre del embarazo con fines preventivos.

La primera demostración de que existía una relación directa entre la presencia de DTN e incrementos de AFP - en el líquido amniótico y en el suero de mujeres embarazadas fue realizado principalmente por Brock y su grupo de colaboradores (8, 9, 11), a partir de entonces en varios países desarrollados se han establecido la cuantificación de la AFP para la detección de DTN. A la fecha se han empleado diferentes técnicas para la cuantificación de la AFP entre las que se encuentran algunas muy sencillas de baja sensibilidad o hasta técnicas más sensibles como las autorradiográficas o el radioinmunoensayo.

Dada la ausencia total de éste control perinatal en el país, es necesario establecer una prueba clínica de rutina que ayude a detectar a edad temprana éste tipo de anomalías, evitando la importación de reactivos biológicos. Con éste fin en el laboratorio se diseñó un programa de trabajo para la preparación de los reactivos biológicos necesarios para el montaje de las técnicas de ID-R, IEF-C y ELISA. Para ello en la etapa inicial se preparó un suero de conejo anti-AFP/GG de conejo que fue capaz de reaccionar contra un gran número de antígenos - debido a que el inóculo se lavó poco y el suero anti-AFP con el que fue preparado no era altamente específico, sin embargo el suero de las cabras reaccionó contra menos de 6 proteínas antigénicas del SNH debido a que el -

precipitado del inóculo se lavó exhaustivamente además - de haber sido preparado con un suero de conejo mono-específico anti-AFP.

Durante la inmunización de los conejos se pudo detectar que no obstante que la AFP es un excelente inmunógeno y que todos los conejos se inocularon en las mismas condiciones, solo uno reaccionó adecuadamente contra la AFP y los restantes reaccionaron muy poco o no lo hicieron de manera detectable, en cambio la reactividad que presentaron los sueros de cabra contra la AFP/GG de conejo se incremento sucesivamente de tal manera que para probarlos muchas veces se tuvo que utilizar un menor volumen de suero o bien diluirlo, por lo que al parecer la AFP es más inmunogénica en las cabras que en los conejos. Dado el largo programa de inmunización al que se sometieron las cabras se obtuvieron anticuerpos policlonales de alta afinidad.

Con la prueba control se pudo observar que el suero anti-SNH no fue capaz de reaccionar contra la AFP, - por ello el SNH se pudo utilizar como inmunoadsorbente.

En el proceso de adsorción de los SCH anti-AFP con el SNH liofilizado o insolubilizado con glutaraldehído - no se eliminaron los "anticuerpos contaminantes" por lo que se optó eliminarlos con SNH aunque el efecto de dilución bajó la reactividad del suero pero de manera poco importante. Tal vez el suero pretratado no eliminó los "anticuerpos contaminantes" porque la proteína requerida para la adsorción se modificó durante el tratamiento. En el caso del SNH insolubilizado con glutaraldehído se sabe que al procesarse a pH 7 (como se hizo en el laboratorio) la concentración de proteína insolubilizada es del 4.5%, mayor que a pH 5 que es del 0.5% (4) por esto es -

muy probable que la proteína de interés se haya perdido durante los lavados, o bien, también pudo ser que se haya hidrolizado por tratamiento excesivo con la solución reguladora de glicina-HCl pH 2.8. En el caso del suero liofilizado pudo suceder que la proteína de interés se haya desnaturalizado durante el proceso de deshidratación.

La utilización de la técnica de Lebecq para la anlisis del suero a las placas de IEF-B fue de gran utilidad ya que evitó la preparación doble de agarosa, mayor requerimiento de tiempo, reactivos y volúmen de suero, - posible desnaturalización del Ac por exposición al calor y la probable separación de la fase de agarosa que contenía al Ac de la fase de agarosa que contenía al Ag, además en una sola placa se pudieron analizar diferentes - sueros utilizando un pequeño volúmen y en el caso de que reserse analizar una cantidad mayor de éste, se aplicó varias veces a la placa una vez que se difundió el de la aplicación anterior. La sensibilidad que ofreció ésta modificación fue muy semejante a la del método tradicional con pequeñas diferencias en cuanto a la nitidez de las - bandas de precipitación.

Una observación muy interesante fue la aparición de una doble banda de precipitación adicional con corrrimiento electroforético alfa. Debido que al momento de ser detectada desconocíamos que Rouslathi en 1971 había reportado éste hallazgo en el suero fetal humano como consecuencia de congelamientos y descongelamientos, el proceso que se siguió para verificar ésta información nos condujo a corroborar que la "nueva" banda de precipitación correspondía a un dímero o trímero de AFP ya que fueron capaces de ser reconocidos por el SMC anti-AFP y al parecer ambas formas de AFP se encuentran en concentraciones

diferentes.

Una vez ratificada la monoespecificidad de la fracción GG del SMC anti-AFP mediante IEF-B se procedió a purificar AFP por un método inmunoquímico. Uno de los mayores problemas que se presentan durante la purificación de la AFP es la eliminación de la albúmina debido a que ésta proteína presenta propiedades fisicoquímicas muy semejantes a las de la AFP (peso molecular, punto isoeléctrico, coeficiente de sedimentación, etc.).

Mansoor (38) y otros grupos de investigadores han eliminado la mayor parte de la albúmina mediante cromatografía de afinidad empleando Affi-gel azul, con la misma finalidad en el laboratorio se realizaron electroforesis preparativas en bloque de almidón, ésta técnica permitió la selección de las fracciones con migración electroforética alfa eliminando así la mayor parte de la albúmina y otras proteínas con migración electroforética de beta y gamma-globulinas.

Al efectuarse la elución de la AFP con solución reguladora de glicina-HCl pH 2.8 seguida por la inmediata neutralización del eluido a pH 7 no afectó las características de la proteína.

Cuando se analizó el grado de pureza del eluido mediante EFGP aparecieron trazas de proteínas contaminantes, éstos resultados podrían inducir a dudar sobre la monoespecificidad de la fracción GG anti-AFP, pero en base a las pruebas de IEF-B realizadas inicialmente así como el análisis mediante la técnica de ELISA en gel se considera que la fracción GG anti-AFP sí era monoespecífica y que la aparición de trazas de proteínas contaminantes más bien se debió a una absorción inespecífica ya que se dejó un tiempo de contacto excesivo entre la Sefa

rosa y las fracciones enriquecidas de AFP, las proteínas contaminantes se eliminaron fácilmente mediante el empleo de SCA anti-SNH insolubilizado con glutaraldehído, esto se confirmó mediante el análisis en EFGP e IEF-B en el que apareció una sola banda de tinción y precipitación, respectivamente, para la proteína purificada.

El valor de peso molecular de 68 000 daltons que se obtuvo para la preparación de AFP obtenida en el laboratorio cayó dentro del rango de pesos moleculares que se reportan en la bibliografía para la AFP (58), éste dato corroboró que la proteína purificada era AFP, otro análisis que contribuyó aún más en esta identificación fue haciéndola reaccionar contra el SMC anti-AFP. El método inmunocúmulo utilizado para la purificación fue conveniente, ya que la proteína que se obtuvo presentó buenas condiciones antigénicas, un grado de pureza aceptable y proporcionó un rendimiento aproximado al 30% el cual se acerca al reportado por Rouslahti (58).

En el proceso de estandarización de la técnica de ID-R fue de gran utilidad el uso del PEG por varias razones: evitó la deshidratación de la capa de agarosa, por esto se podían preparar varias placas a la vez y conservarlas a 4°C perfectamente selladas haciendo posible su uso después de varios días, favoreció la formación de los halos de precipitación haciéndolos más evidentes de tal manera que facilitó la medición tanto de los halos grandes como de los halos pequeños y redujo el tiempo de difusión; la técnica estandarizada fue bastante reproducible como lo indica el error de inter e intra-ensayo, ofreció una gran capacidad de procesamiento ya que en una sola placa se pudieron analizar hasta 45 muestras, la -

preparación de la placa fue sencilla y no requirió de reactivos o equipo complicado y la cantidad de muestra biológica para el análisis fue muy pequeña. La obstante la buena reproducibilidad del método, en cada ensayo se efectuó una curva estándar para mayor control evitando con ésto que los resultados estuvieran alterados debido a que durante la preparación de la placa el Ac pudiera haber sufrido desnaturalización por calentamiento o porque hubiera perdido paulatinamente su reactividad durante el almacenamiento (aunque ésto último no lo pudimos analizar). Uno de los defectos de que adolece ésta prueba es que presenta una baja sensibilidad ya que no permitió detectar claramente concentraciones por debajo de 2 μg por ml sin embargo fue lo suficientemente capaz de diferenciar aquellos líquidos amnióticos de casos patológicos con concentraciones elevadas de AFP. Al momento del parto en el SCU la concentración de AFP es aproximadamente 250 veces más elevada que la detectada en el líquido amniótico, por lo tanto mediante ésta técnica se pudo cuantificar la concentración de AFP en el SCU de recién nacidos sanos de embarazos normales y en aquellos casos correspondientes a los patológicos que aumentan la concentración de AFP en el SCU fue necesario diluir las muestras originales para que los rangos de concentración cayeran dentro de la curva estándar.

La IEF-C fue una técnica que mostró mayor sensibilidad comparada con la de la ID-R debido a que con ella se logró detectar concentraciones de AFP del orden de 0.5 a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En cada prueba que se realizó para cuantificar la concentración de AFP en líquidos biológicos fue necesario incluir una curva estándar debido a que durante el corrimiento electroforético había una variación -

considerable lo que ocasionaba que la altura de los cohetes variara de un ensayo a otro a pesar de que se trabajó tratando de conservar las mismas condiciones. Esto se demostró estadísticamente mediante un análisis de "Andeva" que indicó que la variación de debía al azar. Otro factor que afectó considerablemente la prueba fue la solución reguladora de corrimiento ya que debido a su alto costo se utilizaba varias veces por lo que era necesario incrementar el voltaje en cada corrida subsecuente para alcanzar una corriente de 12 mA, ésto se debió a que en cada corrida electroforética se evaporaba una pequeña cantidad de agua ocasionando así el incremento de la fuerza iónica (μ). Al igual que en la ID-R, en ésta técnica no se pudo detectar la concentración de AFP en muchos de los líquidos amnióticos debido a que la mayoría eran de productos normales a término y además fueron tomados despúes de la 35^a semana de la gestación en la que la concentración de AFP ya está por debajo de 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de líquidos amnióticos de productos con patología de DTN confirmada post-parto, solamente un L.A. fue tomado en la semana 16^a de la gestación, de los restantes no se obtuvo el dato. Con el fin de saber si coincidía la identificación de los líquidos amnióticos de los productos anormales en base al incremento de AFP se efectuó la cuantificación de AFP mediante un estudio a doble ciego empleando ambas técnicas. Los resultados obtenidos en ambos casos coincidieron en la identificación. Uno de los inconvenientes de ésta prueba es que los resultados son obtenidos después de varios días debido a que los procesos de diálisis y tinción a los que se someten las placas con muy largos. La lectura también puede realizarse con la placa en fresco pero muchas veces en concentraciones bajas de Ag no se pueden ver las bandas de precipitación haciendo imposible su medición.

Es incuestionable el potencial que ofrece el poder efectuar la cuantificación de AFP en el suero materno para la detección de DEN y otros problemas durante el embarazo, por ello se han diseñado técnicas que son capaces de detectar concentraciones de AFP por debajo de $1 \mu\text{g/ml}$, entre ellas se encuentra la técnica de RIA y de ELISA -- que son las más importantes, con el RIA se pueden detectar concentraciones hasta de 500 pg/ml pero además de ser sofisticada, se trabaja con material radiactivo, requiere de equipo automático y muy costoso, su ejecución es de tiempo prolongado, en cambio el ELISA aunque posee una sensibilidad un poco menor (3 ng/ml) es más rápida, de menos costo, los reactivos implicados son más estables y puede llevarse a cabo con equipo ordinario de laboratorio. Se considera que puede mejorarse la sensibilidad de la técnica de ELISA al grado de acercarse o igualar a la sensibilidad que ofrece la técnica de RIA dependiendo de las características del sistema que se maneje.

En el laboratorio se prepararon los reactivos necesarios para el montaje de un sistema ELISA. Los conjugados Ac-E preparados se evaluaron bajo las mismas condiciones. La cromatografía en Sephadex G-100 del lote preparado por el método de Avrameas reveló 3 picos, el primero correspondió al conjugado Ac-E, el segundo a los dímeros de peroxidasa y el tercero a la peroxidasa no conjugada, por lo tanto el primer pico fue el que se usó para el montaje del ELISA. En el caso de la cromatografía en Sephadex G-100 del lote preparado por el método de Nakane también se obtuvieron 3 picos, 2 de ellos muy claros y el último solo se empezó a formar, consideramos que durante el proceso de conjugación se pueden formar conjugados de diferente peso molecular debido al variado número

ro de moléculas de enzima que se acoplan a cada inmunoglobulina, sin embargo el primer pico se consideró como el conjugado Ac-E más importante ya que mostró mayor homogeneidad, mayor concentración de proteína y mayor contenido de peroxidasa acoplada, el segundo pico probablemente correspondía a inmunoglobulina marcada de manera más heterogénea (pico ralo) y no se utilizó debido a la baja concentración de proteína y peroxidasa, el tercer pico que fue apenas detectable quizá correspondía a peroxidasa libre. En base a que en la literatura se ha reportado que aproximadamente el 99% de la fracción GG se acopla a la enzima creemos que en ambos procesos de conjugación no se obtuvo algún pico con ésta proteína libre.

Al evaluar la actividad del Ac y la enzima de los conjugados de ambos lotes sólo el preparado por el método de Avrameas demostró que conservó ambas actividades al probarse bajo las condiciones del laboratorio. El lote que fue preparado por el método de Nakane demostró tener actividad enzimática pero no de actividad de Ac probablemente debido a que durante el tratamiento con el borohidruro de sodio se perdió una gran cantidad de Ac (teórico del 50 al 60%) y la pequeña cantidad que se conservó no pudo detectarse por el método utilizado, por consiguiente ésta última preparación no se utilizó para el montaje de la técnica de ELISA. Con lo anterior se observó que aunque el método de Avrameas no es muy nuevo, es efectivo, más simple, menos drástico, más rápido, se utilizan menos reactivos y las condiciones del proceso son más fáciles de controlar ya que en el método de Nakane es importante cerciorarse de los virajes de color por que de no visualisarse la preparación debe ser desechada

e iniciar el proceso nuevamente, es probable que éste método no sea conveniente para marcar Ac de cabra.

La prueba de ELISA en gel fue muy importante ya que ayudo a evaluar la actividad de los conjugados Ac-E, además con ella se pudo observar que existía reacción detectable entre la cantidad de AFP que está presente en el suero humano y el Ac-E por lo tanto con éste sistema fue posible detectar concentraciones muy bajas de Ag y además ratificó la monoespecificidad de la fracción GG anti-AFP. Algo que sorprendió durante éste análisis fue -- que:

a) Con el sistema AFP~Ac-E: Se hizo evidente la reacción Ag-Ac al desarrollarse color porque se llevó a cabo la reacción enzimática efectuada por el Ac-E que se unió al Ag.

b) Con el sistema Ac~AFP~Ac-E: No se desarrollo el color de la reacción enzimática, probablemente esto se debió a que el conjugado no se unió a la AFP y que por lo tanto se eliminó durante la diálisis.

No obstante que para el montaje de la técnica de ELISA se probaron multiples sistemas y condiciones de trabajo (fases sólidas, soluciones reguladoras, origen de antisueros, tratamientos previos de los Ac, tiempos, temperaturas y condiciones de incubación, diluciones de los reactivos, etc.) consideramos que los mejores resultados obtenidos pueden servir como información preliminar que pudiera aplicarse para seleccionar las condiciones más apropiadas para el montaje de un sistema en el que se probará una fracción enriquecida de Ac adherido a la fase sólida. Con las condiciones que se manejaron en todos los sistemas ELISA nunca se pudo observar que a mayor concentración de AFP correspondiera un mayor desarrollo de co--

lor por la reacción enzimática, inicialmente se pensó - que éstos resultados se debían a que la fase sólida no era capaz de fijar al Ac y para favorecer la adsorción - se probaron diferentes fases sólidas y soluciones regula- doras que cubrían un rango de pH 5.0 hasta 9.5, incluso el Ac también se mod ficó tratándolo con glutaraldehído o bien uniéndolo covalentemente a la fase sólida (discos activados con BrCN) pero en todos éstos casos no se ob- servó una diferencia muy clara entre concentraciones al- tas, bajas y nulas de AFP.

Cuando se fijó el Ac y en especial la fracción GG - anti-AFP por medio de secuedad a 37^oC a los pozos de las placas Dynatech para ELISA, se observó una ligera diferen- cia de desarrollo de color entre las muestras de color, - negativas y positivas, pudiendo indicar ésto dos cosas: - que a pesar de la alta reactividad de los sueros anti-AFP su avidéz por el Ag no era buena por lo que era necesario incrementar su concentración y/o que éste plástico era un buen soporte para el Ac pero debían mejorarse las condi- ciones del sistema. Posteriormente se penso que los conju- gados Ac-E no reaccionaban de manera adecuada o que su - concentración era muy baja, por ello fue que se prepara- ron 2 lotes por dos métodos diferentes, ambos se evalua- ron y el más reactivo se probó por los criterios ya men- cionados.

Debido a que cuando se utilizaron bloqueadores pro- teicos (ASB y gelatina) se obtuvieron valores de fondo - muy elevados, se decidió no utilizarlos para tener un - sistema más limpio. Los valores de fondo elevados proba- blemente se debían a absorción inespecífica.

Para el montaje de la técnica de ELISA directa se -

recomienda que las fuentes de los anticuerpos involucrados sean de animales de especie zoológicamente lejanas - con el propósito de manejar inmunoglobulinas inmunológicamente distintas, en el laboratorio se utilizaron como primer Ac uno obtenido de conejo el que se unió a la fase sólida y como segundo Ac uno de cabra empleado en la preparación del conjugado Ac-E, sin embargo los resultados no fueron diferentes a los que se obtuvieron al usar Ac de cabra anti-AFP unido a la fase sólida.

La última alternativa que se probó para el montaje de éste ELISA fue un sistema indirecto en el que se utilizó un Ac de conejo anti-inmunoglobulina de cabra-peroxidasa, de acuerdo al sistema Ac cabra~AFP~Ac cabra~SC anti-Ig cabra-PO que nuevamente dió resultados muy poco satisfactorios.

Es necesario hacer notar que al probar los siguientes sistemas:

A) Ac de conejo o cabra anti-AFP~AFP.- Hubo reacción aparente observable en IEF-B.

B) AFP~Ac-E.- Hubo reacción aparente observable en el ELISA en gel.

C) Ac de conejo o cabra anti-AFP~AFP~Ac-E.- No hubo reacción observable ni en el ELISA en gel ni en pozos de placas Dynatech para ELISA.

Es difícil entender la razón del porque las 3 proteínas juntas (inciso "C") no efectúan aparentemente una reacción Ag-Ac típica en la que se basa la técnica de ELISA, sin embargo se podría pensar lo siguiente:

1.- Falta de concentración de Ac anti-AFP específico - contra la AFP.

2.- Interacciones muy débiles entre la fase sólida y el

Ac el que por consiguiente es eliminado fácilmente en cada proceso de lavado. Si consideramos que una de las limitantes de la técnica de ELISA es que su sensibilidad - está sujeta, entre otros factores, a la cantidad de Ac - absorbido gracias a las propiedades fisicoquímicas de la fase sólida, es evidente la importancia que tiene la naturaleza de ésta.

3.- El Ac anti-AFP obtenido en el laboratorio fue muy - reactivo contra un limitado número de determinantes anti - génicos estéricamente cercanos. Existe un gran número de publicaciones referentes al montaje de la técnica de ELISA directa en las que inicialmente se obtienen Ac anti-AFP de baja afinidad por inoculación de conejos con AFP purificada principalmente por métodos inmunoquímicos y - absorbiendo al Ac en fases sólidas como placas comerciales para ELISA o incluso en microparticulas hidrofílicas de derivados de N-hidroxisuccinimida. En nuestro caso se inoculó un precipitado formado por un complejo AFP-GG de conejo o cabra anti-AFP y aunque teóricamente éste tipo de complejos se metabolizan in vivo, probablemente en - nuestros animales el metabolismo modificó algunos de los determinantes antigénicos de la AFP o bien el metabolismo se efectuó parcialmente dejando solo expuesta una parte de la molécula y el resto quedó neutralizado por anticuerpos, por lo tanto el suero producido contenía anticuerpos que solo reaccionaban o reconocían cierta zona - limitada de la molécula pudiendo haber en ella algún determinante antigénico inmunodominante causante de la alta reactividad del suero en el que predomina el Ac dirigido contra éste Ag, obviamente al efectuarse la primera reacción sobre la fase sólida Ac~AFP se bloquea el de--

terminante antigénico más importante por el Ac dominante y el segundo Ac del conjugado Ac-E ya no tiene a su disposición la zona antigénica contra la que ésta dirigida ya que éste conjugado se preparó con el mismo SMC anti-AFP que estaba absorbido en la fase sólida. Probablemente el acomodo espacial de los determinantes no permiten la accesibilidad al Ac por un simple impedimento estérico a pesar de que el Ac es policlonal. Esta última aseveración quizá no sea la más acertada pero pudiera explicar un poco mejor el fenómeno suscitado en ésta parte del proyecto (inciso "C").

Al parecer las posibles alternativas que podrían solucionar el problema serían:

- a) Purificar AFP humana e inocularla a animales sin importar que los anticuerpos utilizados en ambas fases del sistema ELISA sean obtenidos de la misma especie.
- b) Obtener una concentración elevada de Ac anti-AFP altamente purificada y específica (teóricamente es suficiente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el forramiento de un pozo de las placas de Dynatech).
- c) Utilizar un soporte, por ejemplo de algún plástico (como el poliestireno) cuya absorción hidrofílica sea elevada hacia el Ac.

C O N C L U S I O N E S

1.- Es más difícil trabajar con sueros de cabra que con sueros de conejo por su alto contenido en lípidos.

2.- La modificación de Lebecq para la IEF-B ofrece una sensibilidad semejante a la del método tradicional y es más sencilla de realizar.

3.- La aparición de polímeros de AFP se debe al congelamiento y descongelamiento sucesivo de las muestras biológicas que la contienen.

4.- Los métodos inmunoquímicos, en combinación con otros, permiten obtener preparaciones altamente purificadas de AFP.

5.- El método de Avrameas para la preparación de conjugados Ac-E sigue siendo bastante eficiente.

6.- La IEF-C es ligeramente más sensible que la ID-R.

7.- Es posible detectar embarazos con alto riesgo de DTN mediante la cuantificación de la AFP en el líquido amniótico empleando la técnica de IEF-C e ID-R.

8.- En virtud de que no fue posible detectar la concentración de AFP en el suero materno mediante la técnica de IEF-C e ID-R que se montaron en el laboratorio (debido a su baja sensibilidad) consideramos que es necesario afinar las condiciones de la técnica de ELISA que fue probada en éste trabajo.

9.- Para el montaje de la técnica de ELISA es más adecuado utilizar el sistema más "limpio" posible.

RESUMEN

La finalidad del trabajo fue el diseño de técnicas sensibles, confiables y de bajo costo que permitieran - cuantificar la concentración de AFP en diferentes líquidos biológicos para ayudar a la detección de un tipo de enfermedades perinatológicas, principalmente las relacionadas a defectos del cierre del tubo neural (DTN), que son muy frecuentes en nuestro país.

Para ello, mediante inmunoadsorciones con suero normal humano se obtuvo un suero monoespecífico anti-AFP el cual fue utilizado para la purificación de AFP, la preparación de conjugados anticuerpo-enzima, montaje y estandarización de las técnicas de inmunodifusión radial (ID-R) e inmunoelectroforesis de cohete (IEF-C) y se intentó el montaje de una técnica de ELISA.

Mediante las técnicas de ID-R e IEF-C se cuantificó la concentración de AFP en líquidos amnióticos de madres con complicaciones durante el embarazo y en sueros de cordón umbilical de productos normales a término y afectados con DTN. Ambas técnicas seleccionaron adecuadamente aquellos líquidos amnióticos de mujeres embarazadas con alto riesgo de tener fetos afectados con DTN.

Para la cuantificación de la AFP en el suero de mujeres embarazadas se intentó montar y estandarizar un sistema para la técnica de ELISA debido a que con ella se pueden cuantificar concentraciones por debajo de 1 $\mu\text{g/ml}$. No obstante que se realizaron un gran número de modificaciones en las condiciones para dicho montaje, fue imposible, hasta el momento, establecer las condiciones óptimas para un sistema adecuado y funcional.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Abelev, G. I., Assecritóva, I. V., Kraevsky, N. A., Parova, S. D. & Perevodchikova, N. I.: Embryonal serum alpha globulin in cancer patients. Diagnostic value. - *Int. J. Cancer* 2: 551 (1967).
- 2.- Abelev, G. I., Parova, S. D., Khrakova, N. I., - Postnikova, Z. A. & Irlin, I. S.: Production of embryonal alpha globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplant. Bull.* 1: 174 (1963).
- 3.- Arnon, E., Teicher, M., Bustin, M. & Sela, M.: - Preparation of antisera to alpha-fetoprotein making use - of stradiol affinity column. *F.E.B.S. Lett.* 32/2: 335 - (1973).
- 4.- Avrameas, S. & Ternyck, T.: The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochem.* 6: 53 (1969).
- 5.- Bélanger, L., Hamel, D., Dufour, D. & Pouliot, - M.: Double-antibody enzyme immunoassay applied to human - α_1 -fetoprotein. *Clin. Chem.* 22/2: 198 (1976).
- 6.- Bélanger, L., Sylvestre, C. & Dofour, D.: Enzyme linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive - and sandwich procedures. *Clin. Chim. Acta* 48: 15 (1973 b).
- 7.- Bergstrand, G. G. & Czar, B.: Demonstration of a new protein fraction in serum from human fetus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 8: 174 (1956).
- 8.- Brock, D. J. H., Bolton, A. E. & Monaghan, J. H.: Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein measurement. *Lancet* 2: 923 (1973).
- 9.- Brock, D. J. H. & Nelson, M. M.: Amniotic fluid protein in pregnancies complicated by anencephaly. *J. - Obstet. Gynaecol. Brit. Commun.* 81/22: 177 (1974).

10.- Brock, D. J. H., Scrimgeour, J. B., Bolton, A. E., Wald, N., Peto, R. & Barker, S.: Effect of gestational age on screening for neural defects by maternal plasma-AFP-measurement. *Lancet* 2: 195 (1975 a).

11.- Brock, D. J. H. & Sutcliffe, R. G.: Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* 2: 197 (1972).

12.- Brock, J. E., Norgaard-Pedersen, M. & Trolle, D.: Alpha-fetoprotein in amniotic fluid and serum from pregnant women with severe rhesus isoimmunization. *Acta Obstet. - Gynec. Scand.* 55: Suppl. 53: 7 (1976).

13.- Burton, K. B., Sowers, S. G. & Nelson, H. L.: Maternal serum α -fetoprotein screening in North Carolina: - Experience with more than twelve thousand pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146: 439 (1983).

14.- Caballero, C., Vakemans, M., López del Campo, J. G.: Serum α -fetoprotein in adults, in women during pregnancy, in children at birth and during the first months of life: A sex difference. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 127: 384 (1977).

15.- Cahil, J., Cohen, H. & Starkovsky, N.: A rapid screening test for detection of alpha-fetoprotein as an indicator of fetal distress. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 119: 1095 (1974).

16.- Campbell, D. H., Garvey, J. S., Cremer, N. E. & Sussdorf, D. H.: *Methods in immunology*. 2th ed. Ed. W.A. - Benjamin Inc. New York, U.S.A. 1970: 86-89, 104, 191-193, 252.

17.- Cuatrecasas, P., Wilchek, M. & Anfinsen, Ch. B.: Selective enzyme purification by affinity chromatography: *Biochemistry* 61: 636 (1968).

18.- Chandra, R. K., Madhavankutty, K. & Way, R. C.: Serum α -fetoprotein levels in patients with cystic fibrosis and their parents and siblings. *Brit. Med. J.* 1: 714 (1975).

19.- Chayvialle, J. A. P. & Ganguli, P. C.: Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in human plasma. *Lancet.* 1: - 1355 (1973).

20.- Ching-Han, L. & Ming, C.: A complement fixation test for the detection of alpha-fetoprotein in the diagnosis of primary liver cancer. *Sci. Sin.* 16: 612 (1973).

21.- Foy, H., Kondi, A., Parker, A. M., Stanley, R. & Venning, C. D.: Alpha-fetoprotein test in pregnant women, women on oral contraceptives, newborn babies and piridoxine-deprived baboons. *Lancet* 760: 1336 (1970).

22.- Gitlin, D. & Boesman, M.: Serum α -fetoprotein, albumin and γ -globulin in the human conceptus. *J. Clin. Invest.* 45: 1826 (1966).

23.- Gitlin, D. & Boesman, M.: Sites of serum α -fetoprotein synthesis in human and in the rat. *J. Clin. Invest.* 46: 1010 (1967).

24.- Gitlin, D., Perricelli, A.: Synthesis of serum albumin, prealbumin, α -fetoprotein, α_1 -antitrypsin and transferrin by human yolk sac. *Nature (Lond.)* 228: 995 - (1970).

25.- Gitlin, D., Perricelli, A. & Gitlin, G. M.: Synthesis of α -fetoprotein by liver, yolk sac and gastrointestinal tract of human conceptus. *Cancer Res.* 32: 979 - (1972).

26.- Higa, Y., Sasazyki, T., Nakajima, H., Yakayama, M., Tada, M. & Soma, H.: Amniotic fluid protein in the antenatal diagnosis of some fetal abnormalities. *Amer. J.* -

Obstet. Gynec. 119: 932 (1974).

27.- Ishiguro, T.: α -fetoprotein in twing pregnan--
cies. *Lancet* 2: 1214 (1973).

28.- Javadvpur, N., McIntire, K. R. & Waldmann. T.
A.: Immunochemical determination of human chorionic gonado
tropin and alpha-fetoprotein in sera and tumors of patients
with testicular cancer. Workshop on genitourinary cancer.
Immunology 49: 209 (1979).

29.- Johnson, A. M. , Umansky, I., Alper, C. A., Eve
rett, C. & Greenspan, G.: Amniotic fluid proteins: mater-
nal and fetal contributions. *J. Pediat.* 84: 588 (1974).

30.- Langone, J. J. & Vunakis, V. H.: Methods in en-
zymology "Immunochemical Techniques", 1th ed. Academic -
Press, U.S.A. 1981: Vol. 3 part B: 120-121, 152-157, 646-
651.

31.- Laurel, C. B.: Antigen-antibody crossed electro-
phoresis. *Analyt. Biochem.* 10: 358 (1965).

32.- Lebecq, S. L., Sahi, J. & Bastide, M.: A novel
antibody overlay technique for two-dimensional immunoelec
trophoresis. *J. Immunol. Methods* 66/2: 219 (1984).

33.- Leek. A. E., Rouss, C. F., Kitau, M. J. & Chard,
T.: Raised alpha-fetoprotein in maternal serum with anen-
cephalic pregnancy. *Lancet* 2: 385 (1973).

34.- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C. &
Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol
reagent. *J. Biochem. Chem.* 193: 265 (1951).

35.- Maiolini, R., Ferrua, B. & Masseyeff, R.: Enzy-
moimmunoassay of human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. -
Methods* 6: 355 (1975).

36.- Maiolini, R. & Masseyeff, R.: A sandwich method
of enzymoimmunoassay. I.: Application to rat and human -
alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods.* 8: 223 (1975).

37.- Mancini, G., Carbonara, A. O. & Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial - immunodifusion. *Immunochemistry* 2: 235 (1965).

38.- Mansoor, M. B.: Purification of alpha-fetopro-- tein. *Anal. Biochem.* 101: 200 (1980).

39.- Masopust, J., Kithier, K., Radl, J., Koutechy, - J. & Kótal, L.: Occurence of fetoprotein in patients with neoplastic and non-neoplastic diseases. *Int. J. Cancer* 3: 364 (1968).

40.- Masopust, J., Tomášová, H. & Kótal, L.: Some phy sicochemical characteristics of human α_1 -fetoprotein. - *Protides biol. fluids* 18: 239 (1971 b).

41.- Masseyeff, R., Bonet, C., Drouet, J., Sudaka, P. & Lalanne, C.: Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein. I.- Technique and serum levels in normal adults. *Digestion* 10: 17 (1974).

42.- McIntire, K. R., Vogel, C. L., Princler, G. L. & Patel, I. R.: Serum α -fetoprotein as a biochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 32: 1941 (1972).

43.- Nayak, N. C., Chawla, V., Malaviya, A. N. & - Chandra, R. K.: α -fetoprotein in indian childhood cirrho- sis. *Lancet* 1: 68 (1972).

44.- Nevin, N. C. & Armstrong, M. J.: Raised alpha-fe- toprotein levels in amniotic fluid and maternal serum in a triplet pregnancy in which one fetus had an omphalocele. - *Brit. J. Obstet. Gynaec.* 82: 826 (1975).

45.- Nevin, N. C., Nesbitt, S. & Thompson, W.: Myelo- cele and alpha-fetoprotein in amniotic fluid. *Lancet* 1: - 1383 (1973).

46.- Nishi, S.: Isolation and characterization of a human fetal α -globulin from sera of fetuses and a hepato- ma patient. *Cancer Res.* 30: 2507 (1970).

47.- Nishi, S., Watabe, H. & Hirai, H.: Production - of antibody to homologous α -fetoprotein in rabbits, rats and horses by immunization with human α -fetoprotein. *J. Immunol.* 109: 957 (1972).

48.- Nørgaard-Pedersen, B.: Purification and sensitive immunoelectrophoresis detection and quantitation of human α_1 -fetoprotein. *Clin. Chim. Acta* 38: 163 (1972).

49.- Nørgaard-Pedersen, B.: α_1 -fetoprotein concentration in cord serum as a parameter for gestational age. *Acta Paediat. Scand.* 62: 167 (1973 a).

50.- Nørgaard-Pedersen, B.: A highly sensitive radio immunoelectrophoresis quantitation of human α -fetoprotein. *Clin. Chim. Acta* 48: 345 (1973 b).

51.- Nørgaard-Pedersen, B.: Human alpha-fetoprotein: A review of recent methodological and clinical studies. - *Scand. J. Immunol.* 4: 7 (1976).

52.- Nørgaard-Pedersen, B. & Axelsen, N. H.: Alpha-fetoprotein like activity in sera from patients with malignant and non-malignant disease and from healthy individuals. *Clin. Chim. Acta* 6: 203 (1976).

53.- Nørgaard-Pedersen, B. & Klebe, J. G.: Alpha-fetoprotein and carbonic anhydrase B and C concentration in cord blood from newborn infants of diabetes mothers. *Acta Endocr. (Kbb)* 182: Suppl. 81.

54.- O'Connor, G. T., Tatarinov, Y. S., Abelev, G. I. & Uriel, J.: A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. *Cancer* 25: 1091 (1970).

55.- Pagé, M.: Alpha-fetoprotein: Purification on -- Sepharose linked concanavalin A. *Canad. J. Biochem.* 51: - 1213 (1973).

56.- Pritchard, J. A.: Deglutition by normal and anen cephalic fetuses. *Obstet. Gynaec.* 42: 613 (1973).

57.- Rouslahti, E., Pihko, H. & Seppälä, M.: Alpha-fetoprotein: immunochemical purification and chemical properties. Expression in normal state and in malignant and non-malignant liver disease. *Transplant. Rev.* 20: 38 (1974 a).

58.- Rouslahti, E. & Seppälä, M.: Studies of carcino-fetal protein: Physical and chemical properties of human alpha-fetoprotein. *Int. J. Cancer* 7: 218 (1971 a).

59.- Rouslahti, E. & Seppälä, M.: Studies of carcino-fetal proteins. III.- Development of a radioimmunoassay - for α -fetoprotein. Demonstration of α -fetoprotein in serum of healthy human adults. *Int. J. Cancer* 8: 374 (1971 - b).

60.- Rouslahti, E. & Terry, W. D.: α -fetoprotein and serum albumin show sequence homology. *Nature* 260: 804 - (1976).

61.- Rouslahti, E. & Wigzell, H.: Breakage of tolerance to alpha-fetoprotein in monkeys. *Nature* 255: 716 (1975).

62.- Seller, M., Singer, J. D., Coltart, T. M. & Campbell, S.: Maternal serum alpha-fetoprotein levels and prenatal diagnosis of neural tube defects. *Lancet* 1: 428 (1974).

63.- Seppälä, M., Aula, P., Rapola, J., Karjalaine, O., Huttunen, N. P. & Rouslahti, E.: Congenital nephrosis syndrome: prenatal diagnosis and genetic counselling by - estimation of amniotic fluid and maternal serum alpha-fetoprotein. *Lancet* 2: 123 (1976 a).

64.- Seppälä, M., Bagshewe, K. D. & Rouslahti, E.: Ra dioimmunoassay of alpha-fetoprotein: a contribution to the

diagnosis of choriocarcinoma and hydatidiform mole. *Int. - J. Cancer* 10: 478 (1972).

65.- Seppälä, M., Laes, E. & Harvo-Nojonen, M.: Elevated amniotic fluid alpha-fetoprotein in congenital oesophageal atresia. *J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw.* 81/10: 827 (1975).

66.- Seppälä, M. & Rouslahti, E.: α -fetoprotein in normal and pregnancy sera. *Lancet* 1: 375 (1972 b).

67.- Seppälä, M. & Rouslahti, E.: Alpha-fetoprotein in maternal serum: a new marker for detection of fetal distress and intrauterine death. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 115: 48 (1973 b).

68.- Sikorowa, L., Morawski, A. & Piatkowski, Z.: Endodermal sinus tumor of ovary. Clinic pathologic study of 6 cases. *Oncology* 36/4: 187 (1979).

69.- Simpson, N. E., Dallaire, L., Miller, J. R., Siminovich, L., Miller, J. & Hamerton, J. L.: Antenatal diagnosis of neural tube defects in Canada: Extension of a collaborative study. *Can. Med. Assoc. J.* 120/6: 653 (1979).

70.- Smith, C. J. & Kelleher, P. C.: α -fetoprotein: separation of two-molecular variants by affinity chromatography with concanavalin-A agarose. *Biochem. biophys. Acta (Amst)* 317: 231 (1973).

71.- Stewart, C. R., Ward, A. M. & Lorber, J.: Amniotic fluid alpha-fetoprotein in the diagnosis of neural tract malformations. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* 82: 257 - (1975).

72.- Tatarinov, Y. S.: Detection of embryospecific alpha-globulin in the blood sera of patients with primary liver tumour. *Vop. Med. Khim.* 10: 90 (1964).

73.- Tatarinov, Y. S.: Content of embryo-specific alpha-globulin in fetal and neonatal sera and sera from a--

dult human with primary carcinoma of the liver. *Fed. Proc.* (Transl.) Suppl. 25: 344 (1966).

74.- Thom, H., Johnstone, F. D., Gibson, J. J., Scott, G. B. & Noble, D. W.: Fetal proteinuria in diagnosis of - congenital nephrosis detected raised alpha-fetoprotein in maternal serum. *Br. Med. J.* 1/6052: 16 (1977).

75.- Tsug, S. H. & Cotes, E.: Coexistence of bronchogenic carcinoma and Gaucher disease. *Arch. Pathol. Lab. - Med.* 101: 56 (1977).

76.- U. K. Colaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube-defects. Maternal serum alpha-feto protein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. *Lancet* 1: 1323 - (1977)..

77.- U. K. Colaborative study of alpha-fetoprotein in relation to neural-tube-defects. *Lancet* 2: 651 (1979).

78.- Wahren, B., Harmenberg, J., Edsmyr, P., Jakobsson, P. & Ingimarsson, S.: Possible tumour markers in patients with oesophagus cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 14/3: - 361 (1979).

79.- Wald, N. J., Barker, S., Cuckle, H., Brock, D. - J. H. & Stirrat, G. M.: Maternal alpha-fetoprotein and spontaneous abortion. *Br. J. Obstet. Gynaec.* 84: 357 (1977).

80.- Wald, N. J. & Cucle, H. S.: Relation between maternal serum and amniotic fluid alpha-fetoprotein. *Lancet* 2: 257 (1980).

81.- Waldman, T. A. & McIntire, K. R.: Serum alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia-telangiectasia. *Lancet* 2: 1112 (1972).

82.- Weinberg, A. G., Milunsky, A. & Horrad, M. J.:

Elevated amniotic-fluid alpha-fetoprotein and duodenal atresia. *Lancet* 2: 496 (1975).

83.- Zeltser, P. M., Neerhout, R. C., Fonkolsrud, E. W. & Stiehm, E. R.: Differentiation between neonatal hepatitis and biliar atresia by measuring serum-alpha-fetoprotein. *Lancet* 1: 373 (1974).