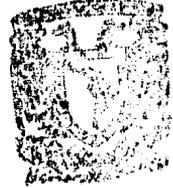


2 Ep. No 107



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**"TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS EN PATOLOGIA"
I.-PREPARACION DEL COMPLEJO
PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
HOMERO SEPULVEDA AMED**

MEXICO, D. F.

1984



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

	Pág.
CAPTULO I	
INTRODUCCION	1
CAPTULO II	
ANTECEDENTES Y GENERALIDADES	5
2.1 Historia de los métodos inmunohistoquímicos.	6
2.2 Métodos de Inmunoperoxidasa.	8
2.3 Factores que afectan la interpretación de los resultados.	11
2.4 Tinción de contraste y controles en la técnica de inmunoperoxidasa.	14
2.5 Fijación del tejido para la técnica de inmunoperoxidasa.	16
2.6 Métodos para la conjugación del anticuerpo a la enzima.	17
2.7 Métodos para la preparación del complejo peroxidasa-anti-peroxidasa.	21
2.8 Aplicación de los métodos inmunohistoquímicos.	24

CAPITULO III	MATERIAL Y METODO	25
3.1	Obtención de suero anti-peroxidasa	29
3.2	Precipitación por fraccionamiento salino.	29
3.3	Cromatografía de intercambio iónico.	30
3.4	Microinmunodifusión doble de Ouchterlony.	31
3.5	Cuantificación de proteína.	31
3.6	Preparación del complejo peroxidasa-anti-peroxidasa.	32
3.7	Filtración en gel.	32
3.8	Demostración del complejo PAP por inmunodifusión.	33
CAPITULO IV	RESULTADOS	34
CAPITULO V	CONCLUSIONES	45
APENDICE		47
BIBLIOGRAFIA		55

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

Los histopatólogos han reconocido que a veces emplean criterios de naturaleza muy subjetiva que dan fallas en el diagnóstico, y esto ha proporcionado un incentivo para el desarrollo de técnicas histoquímicas y tinciones especiales para validar el criterio morfológico. Aunque usadas frecuentemente, muchas de las técnicas histoquímicas tienen sus propias limitaciones ya que solo pueden ser aplicadas a tejido fresco o especialmente procesado para que puedan ser utilizadas las tinciones histoquímicas.

Con la introducción de los métodos de inmunofluorescencia por Coons y Col. (11) en 1941, los patólogos reconocieron el potencial del método que permite la identificación específica de una célula de acuerdo a su constitución antigénica o sus productos.

Los métodos de inmunofluorescencia han tenido enorme éxito en algunas áreas de la patología, como por ejemplo, aclarando la patogenia de la glomerulonefritis. La falta de utilización general puede ser atribuida principalmente a las siguientes desventajas del método de inmunofluorescencia, considerando su uso en patología :

1. El tejido a emplear no puede ser procesado convencionalmente

(fijado en formalina - incluido en parafina) a diferencia de las otras técnicas histoquímicas.

2. El método de inmunofluorescencia aplicado a tejido fijado por congelación deja empobrecidos detalles morfológicos, y el patólogo ya no puede apreciar la morfología fina del tejido.
3. La inmunofluorescencia posee algunas desventajas como la inestabilidad de la reacción, dificultad en la cuantificación, equipo especial para su observación (microscopio de luz U.V.), no se puede usar para microscopía electrónica y esta reacción sólo dura un determinado tiempo en el cual puede ser leída.

No obstante, el éxito de métodos de inmunofluorescencia en algunas áreas de la patología estimularon al desarrollo de un método alternativo que no tuviera las desventajas antes mencionadas. El marcar un anticuerpo específico con la enzima peroxidasa en lugar de isotiocianato de fluoresceína representaba el primer paso en la resolución de estas dificultades. La marca de la enzima peroxidasa puede ser localizada en el tejido añadiendo un substrato cromogénico que produce una reacción colorida y el producto de esta reacción es visible al microscopio de luz. Inicialmente este método de inmunoperoxidasa fue aplicado a tejido fijado por congelación en analogía con la inmunofluorescencia, pero el detalle morfológico se perdía; después se demostró que el método de inmunoperoxidasa puede ser usado para la localización de algunos antígenos en tejidos preparados convencionalmente fijados en formalina - e incluidos en parafina. Esto fue demostrado primero en referencia a inmunoglobulinas, posteriormente se demostró su utilidad en una gran variedad

de antígenos que resisten la fijación e inclusión en grado suficiente para ser demostrados por el método de inmunoperoxidasa.

Existen variantes de esta metodología: el método directo o del anticuerpo marcado, método indirecto o del anticuerpo no marcado, método del puente enzimático y por último el método peroxidasa-anti-peroxidasa(PAP); este último se considera el más sensible y efectivo, razón por la cual se escogió como tema principal en este trabajo de investigación, cuyo objetivo ha sido la preparación del complejo peroxidasa-antiperoxidasa en el laboratorio, de acuerdo a nuestras posibilidades en cuanto a equipo y reactivos.

Tomando en cuenta las condiciones económicas actuales será poco factible la utilización de técnicas que requieren reactivos muy caros y difíciles de preparar, como las que se basan en el marcaje con isótopos radioactivos; por tanto se tendrán que utilizar con mas frecuencia métodos como los descritos en este trabajo, y el reactivo preparado en el laboratorio es un ejemplo de lo que se puede hacer y debemos hacer para llegar a alcanzar autosuficiencia en la producción de reactivos inmunológicos para laboratorios de investigación y para exámenes de rutina.

C A P I T U L O I I

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

2.1 HISTORIA DE LOS METODOS INMUNOHISTOQUIMICOS.

En 1941 Coons (11) introdujo el uso de anticuerpos marcados con un fluorocromo para demostrar componentes tisulares. Esta técnica ganó gran popularidad a mediados de la década de los 50's y se aplica a secciones de tejido fresco congelado y no fijado, porque el material fijado en formalina e incluido en parafina (form-paraf.) es inadecuado para esta técnica . Hay varias limitaciones importantes de la técnica clásica de inmunofluorescencia, como la ocurrencia natural de la autofluorescencia que tiende a obscurecer la fluorescencia de reacciones específicas, la falta de estabilidad de la preparación, que tiende a perder la fluorescencia, y el costo del equipo necesario; la adaptación del método a la microscopía electrónica ha tenido poco éxito, además de la necesidad de usar tejido manejado en una forma especial.

Para salvar algunas de esas limitaciones se propuso el uso de enzimas conjugadas al anticuerpo, y en los experimentos iniciales el anticuerpo se conjugó a la fosfatasa ácida; los experimentos preliminares demostraron que era posible esta técnica y se probaron diversas enzimas hasta encontrar la

enzima mas indicada. A mediados de los 70's algunos antígenos de importancia histológica, como inmunoglobulinas intracelulares, antígeno de Hepatitis B, podían ya ser demostrados por las técnicas de inmunofluorescencia y de inmunoperoxidasa.

El marcar anticuerpos con la enzima peroxidasa de rábano fuerte (HRP) fue introducido independientemente por Avrameas y Uriel, Nakane y Pierce en 1966. El complejo anticuerpo - HRP se revela no por microscopio de luz ultravioleta, sino por microscopio de luz visible, por medio de una reacción con 3,3'-diaminobenzidina · 4HCl (DAB) y peróxido de hidrogeno. El producto de la reacción, de color café, es estable y la preparación puede ser utilizada para microscopía electrónica aplicando un tratamiento con tetróxido de Osmio (OsO_4).

En el presente trabajo fue empleada la peroxidasa de rábano fuerte porque esta enzima es accesible comercialmente en forma relativamente pura, y porque los métodos citoquímicos e histoquímicos para su uso están bien establecidos y satisfactoriamente adaptados para microscopía electrónica. El peso molecular teórico del anticuerpo marcado con peroxidasa es aproximadamente de 200,000 y esto permite que penetre con facilidad al tejido como si fuera un anticuerpo nativo (160,000), en contraste con la utilización del anticuerpo marcado con ferritina cuya difusibilidad en el tejido está limitada por su peso molecular elevado (850,000). Además, su capacidad de amplificar la reacción enzimática y la opacidad electrónica del producto de reacción hace que se marquen los sitios antigénicos, observables con el microscopio de luz. Finalmente, el conjugado anticuerpo-peroxidasa es estable por varios meses a 4°C o indefinidamente en congelación.

2.2 METODOS DE INMUNOPEROXIDASA.

Hay 2 métodos generales para realizar estudios inmunohistológicos:

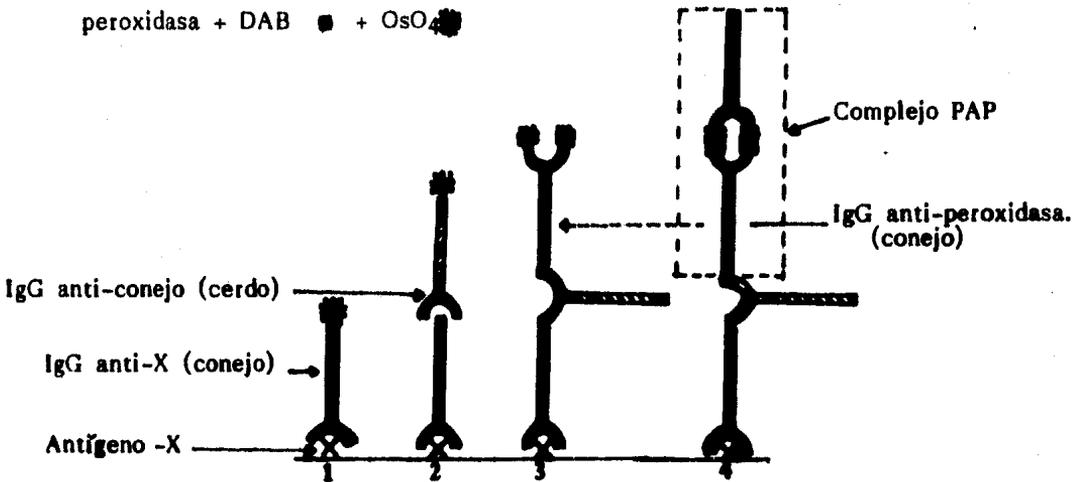
En el **método directo** (Fig. No. 1) el antígeno X es atacado por el anticuerpo IgG-anti X producido en conejo y marcado con HRP; la reacción con el substrato DAB (Fig. No. 2) dan un producto final de color café en el sitio donde se encuentre el antígeno X.

En el **método indirecto** el antígeno X se hace reaccionar primero con un suero IgG-anti X producido en conejo y posteriormente es tratado con un anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cerdo y marcado con HRP; todo el complejo es tratado con DAB dando el producto final de color café en el sitio del antígeno X. La sensibilidad de ambos métodos depende principalmente del procedimiento usado para conjugar la HRP al anticuerpo, porque la eficiencia de la reacción en la preparación de conjugados utilizando glutaraldehído es baja. Este problema pudo ser solucionado perfeccionando las técnicas de conjugación o utilizando el método del anticuerpo no marcado. El primero de estos métodos es llamado **método del puente enzimático** (28) el antígeno X es primero marcado con IgG anti-X de conejo, este complejo se une indirectamente al anticuerpo IgG-anti HRP usando como puente un suero anti-IgG de conejo producido en cerdo el cual se añade en exceso. La región variable del anticuerpo anti-HRP se enlaza con peroxidasa libre y todo el complejo es demostrado con la reacción de DAB.

A fin de optimizar las condiciones inmunológicas Sterberger introduce una modificación al método llamandolo **método del anticuerpo peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP)**. Combinan los últimos dos pasos del método anterior,

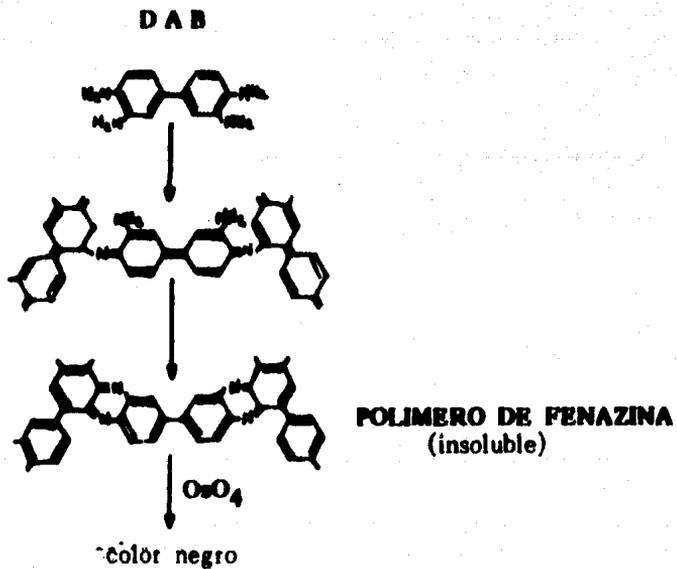
el anticuerpo anti-HRP y la peroxidasa libre se hacen reaccionar formando un complejo soluble peroxidasa-anti-peroxidasa, este complejo actua como el último sistema antigénico el cual se enlaza a la IgG-anti X de conejo por medio de IgG de cerdo anti-IgG de conejo.

FIGURA N° 1



Esquema de los metodos inmunoperoxidasa directo(1) indirecto(2) metodo del puente enzimático(3) metodo PAP (4).

FIGURA N° 2



2.3 FACTORES QUE AFECTAN LA INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Los dos factores que interfieren en la interpretación de los resultados en las técnicas de inmunoperoxidasa, particularmente en cortes histológicos (form.-paraf.), son la peroxidasa endógena y la tinción de fondo.

La **peroxidasa endógena** se encuentra activa en glóbulos rojos y en granulocitos, especialmente eosinófilos. Hay varias formas de inhibir la actividad de la peroxidasa endógena para que esta no interfiera en la interpretación:

1. El tejido se tiñe previamente con un colorate de diferente tono al obtenido por el complejo inmunológico. (35)
2. Es inhibida antes de la tinción inmunoperoxidasa utilizando una solución al 0.5% de H_2O_2 en metanol por 30 minutos(8), ó solución al 0.3% de H_2O_2 en agua por 3 a 10 minutos (10) también se puede usar un tratamiento con ácido periodico seguido de borohidruro de sodio para bloquear la peroxidasa endógena en secciones fijadas por congelación (32).
3. Una solución al 0.001% de H_2O_2 en la solución de DAB reduce la tinción de células rojas(24); algunos substratos de peroxidasa, como el reactivo de carbazol, tienden a no teñir la peroxidasa endógena tan intensamente como la DAB (36), desafortunadamente el producto final de la reacción con carbazol, es soluble en alcohol.

Después de alguno de estos tratamientos será necesario incrementar el tiempo de exposición del antígeno al antisuero o incrementar la

concentración de éste; además, se debe tener mucho cuidado al seleccionar el tratamiento a usar, teniendo en cuenta que algunos antígenos son mucho más sensibles que otros y puede afectarlos el tratamiento.

La tinción de fondo se presenta claramente en el tejido conectivo, pero los factores que afectan esta tinción inespecífica no han sido claramente definidos. Se incrementa en material incluido en parafina (45), y en secciones fijadas por congelación aumenta por lavados excesivos con solución amortiguadora de fosfatos (19), y es más notable en tejido fijado con aldehído y polímeros conjugados.

La tinción de fondo del tejido conectivo puede deberse a la porción Fc de la inmunoglobulina que es atraída por los grupos básicos presentes en la fibra colágena; se puede reducir esta dificultad eliminando el grupo carboxilo de la fracción Fc en la inmunoglobulina, según ha sido reportado por Weston y Poole (45). También sugieren que podría ser debido a la IgG predominante en el fluido intersticial, enlazándose a la colágena durante el tratamiento del tejido con formalina-parafina y participando en la reacción de inmunoperoxidasa. Mucha de la tinción de fondo puede ser reducida usando algunos de los siguientes métodos:

1. Usando una dilución óptima de antisueros a los cuales se les ha añadido ovoalbúmina, suero bovino, albúmina humana o sangre humana grupo "A" adsorbida con suero de cerdo.
2. 24 a 48 horas de exposición a 4°C con una dilución alta de suero IgG anti-X.
3. Usando el conjugado mejorado por Avrameas y Ternynck. (3)

4. Usando el conjugado Fab. (45)
5. Digestión enzimática de secciones parafinadas. (23)
6. Biopsias lavadas con solución salina fría. (5)

2.4 TINCION DE CONTRASTE Y CONTROLES EN LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA.

Para tener muestras control en la técnica se substituye el suero contra el antígeno X por : a) suero normal de conejo ; b) solución amortiguadora; c) DAB antes y después del tratamiento con metanol / H_2O_2 .

La preparación de inmunoperoxidasa puede ser contrastada con hematoxilina eosina y con otros métodos histológicos de tinción. Se debe tener cuidado al efectuar la tinción de contraste porque el producto final de la reacción con DAB, que es un polímero de fenazina (Fig. 2) de color café, puede actuar como mordente para colorantes básicos; este fenómeno explica en parte porqué todas las tinciones histológicas, excepto el método PAS usado en el tratamiento inmunoperoxidasa dan los mismos resultados que los cortes que no han sido tratados con inmunoperoxidasa (24).

El polímero de fenazina resiste el tratamiento con alcohol ácido, alcohol, xileno, medio de montaje; es relativamente estable a temperatura ambiente por varios años, pero el mayor inconveniente es que el DAB es una sustancia altamente carcinogénica por lo que se debe manejar con mucho cuidado. Por esta razón se ha tratado de encontrar un substituto para el DAB, y el 3-amino-9etilcarbozol es recomendado para usarse en cortes histológicos (form-paraf.); el producto final es de color café-rojizo, se contrasta con hematoxilina ligera y la preparación es montada en gelatina-glicerol. Otros posibles substitutos para el DAB son el N,N' -bis(4-aminofenil) piperazina (PIP) y el N,N' -bis(4-aminofenil)-1,3-xilendiamino (BAXD) , ambos se consideran no carcinogénicos (3R) y el producto final es muy estable, con la

posible excepción de la estabilidad en alcohol ácido. Resultados preliminares sugieren que si estos agentes son disueltos inicialmente en una pequeña alícuota de dimetil-formamida pueden substituir al DAB en el procedimiento de inmunoperoxidasa; los productos finales de estos reactivos son de color café-violeta y contrastan bien con las tinciones metil-verde y hematoxilina nuclear, y se puede usar para microscopía electrónica con un tratamiento de tetróxido de Osmio.

2.5 FIJACION DEL TEJIDO PARA LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA.

El tejido es fijado en formalina e incluido en parafina de acuerdo con el siguiente protocolo: Una solución stock de formaldehído al 40% a la cual se ha añadido 9% de NaCl se utilizará para la fijación.

La solución de trabajo formalina que consiste en una parte de la solución stock y nueve partes de agua, el tejido es fijado en esta solución por 24 a 48 horas; para muchos antígenos se usa en la solución de formalina amortiguador de carbonato de calcio.

La solución amortiguadora de Acetato en la solución glutaraldehído-formalina o formalina se ha encontrado ser el procedimiento óptimo para fijar inmunoglobulinas intracelulares (18), secciones incluidas en parafina son cortadas con un espesor de cinco micrómetros y montadas en un portaobjetos ; secadas a 37°C por no más de 24 horas.

Cuando se utilizan secciones fijadas por congelación estas son montadas en portaobjetos y adheridas con "Tissue-Tek" , secadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de la fijación es recomendable lavar la preparación en solución de glicina 0.05 M en PBS^{*} para inhibir o remover fijador que no haya reaccionado, como aldehído el cual podría incrementar las reacciones inespecíficas del sistema inmunoperoxidasa o reducir la reacción con DAB (38).

* Solución amortiguadora de fosfatos-salina.

2.6 METODOS PARA LA CONJUGACION DEL ANTICUERPO A LA ENZIMA (HRP).

Los métodos de conjugación no deben alterar la actividad del anticuerpo ni de la enzima, en la conjugación de la IgG y HRP se utilizaron agentes bifuncionales como la p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenil sulfona (32), carbodimidas (14), o glutaraldehído (2). Todos estos métodos se realizan por **procedimiento de un solo paso**; IgG, HRP y el agente conjugante se mezclan y resulta usualmente en un conjugado HRP-IgG polimerizado junto con polímeros de IgG. La razón para la formación de polímeros consiste en que la molécula de IgG tiene una actividad más alta que el agente bifuncional con la HRP; por otra parte la actividad del anticuerpo y de la enzima se reduce por este procedimiento, por lo que la HRP debe ser añadida en gran exceso para obtener por lo menos 5% de conjugado en la muestra.

Para superar estas desventajas se desarrolló el **procedimiento en dos pasos**, usando glutaraldehído (3) o diisocianato (14). En este método la HRP es conjugada con un agente bifuncional (activador) en el primer paso y, después de eliminado el exceso, la HRP activada se hace reaccionar con IgG. El método de dos pasos usando glutaraldehído como agente conjugante ha ganado gran popularidad; en este método, la actividad del anticuerpo y de la enzima se retiene mucho mejor que en los métodos de un solo paso, pero tanto en el método que utiliza glutaraldehído como en el que utiliza diisocianato se obtienen complejos monoméricos HRP-IgG con cantidades considerables de polímeros conjugados; de cualquier modo, ninguno de los dos métodos satisfacen los requerimientos de una buena conjugación, un buen rendimiento y que la muestra no esté contaminada con IgG y HRP inactivo.

Método de oxidación del carbohidrato * (31)

La HRP es una glicoproteína (18% es carbohidrato); la porción de carbohidrato puede ser utilizada para la formación de grupos aldehído por oxidación con periodato de sodio (NaIO_4). " El carbohidrato no es requerido para la actividad enzimática" ; más aún, si se bloquean los grupos α - ϵ - amino y los grupos hidroxilo de la HRP con fluorodinitrobenzoceno antes de la oxidación, se previene una autoconjugación y permite la formación de una base de Schiff con HRP-aldehído o cualquier proteína que contenga grupos α ó ϵ ; un máximo de 5 a 6 HRP-aldehído se enlazan a una molécula de IgG.

Método de conjugación usando p-benzoquinona (43) .

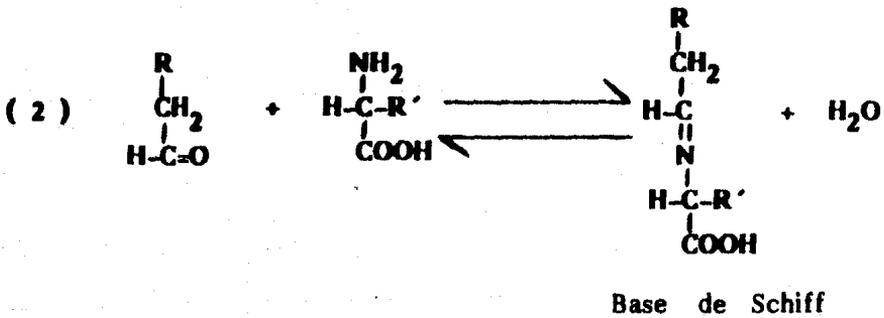
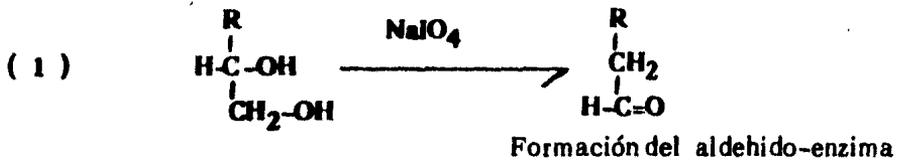
La IgG o el fragmento Fab son activados con este reactivo y la proteína activa puede hacerse reaccionar con la enzima. En la conjugación parece ser que la HRP reacciona por completo, por lo que se recomienda poner ésta en exceso; el producto final de la reacción consiste en una fracción monomérica de HRP-IgG o HRP-Fab y un conjugado polimerizado. Para el estudio inmunohistológico de la ultraestructura intracelular del tejido, las dimensiones del conjugado deben ser pequeñas para reducir la dificultad de penetración, lo cual favorece escoger el fragmento Fab conjugado a la HRP por el método de dos pasos con glutaraldehído : periodato o p-benzoquinona.

Cuando se observa el tejido al microscopio de luz se debe tener una baja tinción de fondo; la HRP que no reaccionó y los conjugados polimerizados causan un incremento en la tinción de fondo, el anticuerpo

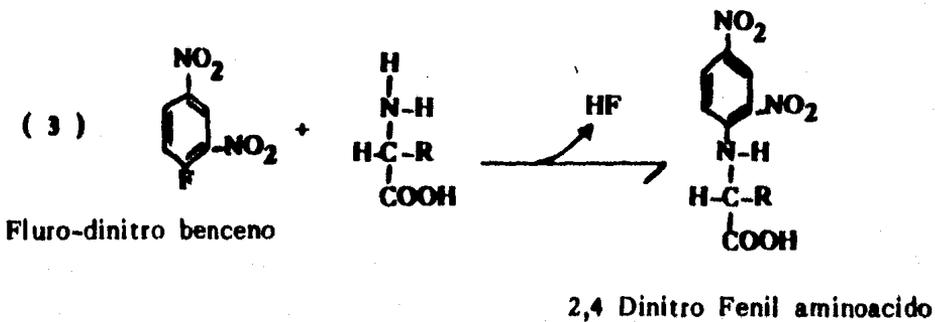
libre compite con el conjugado disminuyendo así la sensibilidad, con estas consideraciones un conjugado monomérico de alta pureza (purificado) dará el mejor resultado.

FIGURA Nº 3

Reacciones de conjugación utilizando el metodo de oxidación con periodato de sodio.



Reacción de Sanger (45)



2.7 METODOS PARA LA PREPARACION DEL COMPLEJO PEROXIDASA-ANTI- PEROXIDASA (PAP).

El uso del PAP para tinción inmunohistoquímica no sólo ofrece gran sensibilidad, como las técnicas convencionales de inmunoperoxidasa, sino que además es tan simple como el método indirecto. La evaluación práctica del PAP se demuestra en numerosos reportes en los últimos años y puede ser utilizada para detectar una gran variedad de antígenos(42).

La preparación del PAP es un proceso que requiere tiempo y un mínimo de experiencia para obtener buenos resultados, existen dos métodos para ello. Originalmente Mason y Sammons utilizaron la siguiente técnica, que sirvió de base para la utilizada en este trabajo. El método que se basa en la separación por cromatografía de la mezcla anti-HRP y HRP* (27) y el método descrito por Sternberger. En el primer método el antisuero anti-HRP se prepara en conejos por un método convencional de inmunización; la fracción IgG de este suero se obtiene por cromatografía en DEAE celulosa. Para preparar el complejo PAP se toma una alícuota del suero anti-HRP y se incuba por 1 hora a temperatura ambiente con un exceso de HRP (de 3 a 10 veces de exceso); la mezcla se centrifuga 3 minutos y el sobrenadante se aplica a una columna de Sephacryl S-200 previamente equilibrada a 4°C con amortiguador eluyente de fosfatos salina a pH=7.2. La densidad óptica de las fracciones es medida a 280nm (para proteína) y a 400nm (para HRP). La fracción que contiene el complejo PAP es recolectada, concentrada y guardada a 4°C.

* tabla No. 1

El método descrito por Sternberger y col. en 1970 (27) consiste en la precipitación del anticuerpo específico contra HRP con HRP en equivalencia, la solubilización del precipitado con un exceso de HRP a pH=2.3 a 1°C seguido por una inmediata neutralización y separación del PAP por medio de precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación.

El método para la preparación del PAP por medio de cromatografía tiene varias ventajas sobre el método descrito por Sternberger, en el cual es necesario tener mucho cuidado cuando se acidifica y se neutraliza el complejo. Además de las consideraciones prácticas, la cromatografía ofrece otras ventajas: se evita la acidificación y no se arriesga la desnaturalización de la proteína o de la enzima, y el complejo obtenido por cromatografía es más estable porque contiene sólo el anticuerpo suficiente, el cual mantiene su actividad aún en diluciones altas. Sternberger sugiere que el complejo PAP tiende a disociarse cuando se encuentra en diluciones muy altas; esto se observa cuando se prueba el complejo por inmunodifusión en agar, la cual revela la presencia de enzima libre cuando se hacen diluciones altas del complejo. Por el método de cromatografía no se observa la presencia de enzima libre, la cual podría interferir en la técnica disminuyendo la sensibilidad.

Se ha comparado el método PAP con el método indirecto encontrando que el PAP es por lo menos 20 veces más sensible. Si la dilución óptima de trabajo del primer suero inmune del método indirecto (anti-IgG humana preparada en conejo) es de 1:100, el correspondiente al método PAP es de 1:2000 con una franca y fuerte reacción.

TABLA N° 1

comparación de las dos técnicas para la obtención del PAP.

STERNBERGER.

- 1.- Incubación de HRP y anti-HRP en proporciones equivalentes.
- 2.- Centrifugación para separar el complejo PAP insoluble.
- 3.- Lavar el complejo.
- 4.- Suspensión en solución de HRP.
- 5.- Ajustar pH de la solución a pH=2.3 .
- 6.- Neutralización a pH= 7.4 .
- 7.- Precipitación del PAP con sulfato de amonio saturado.
- 8.- Lavar con solución de sulfato de amonio al 50% de saturación.
- 9.- Solución del complejo insoluble en agua destilada.
- 10.- Dializar en contra de buffer de acetato.
- 11.- Centrifugar para remover material insoluble.

TECNICA CROMATOGRAFICA.

- 1.- Incubación de HRP y anti-HRP en exceso de antígeno.
- 2.- Centrifugación para remover el PAP insoluble.
- 3.- Aplicar sobrenadante a una columna de Sephacryl.
- 4.- Identificación del primer pico de proteínas.
- 5.- Concentración del pico.

2.8 APLICACION DE LOS METODOS INMUNOHISTOQUIMICOS.

Las técnicas de inmunoperoxidasa (42) o sus variantes han sido aplicadas a una gran variedad de antígenos tisulares, no sólo en tejidos formalinizados e incluidos en parafina, sino también en alcohol ácido, ácido picrico, solución de Zenker, etc...

Esta es una lista de los antígenos que más comunmente se destacan por medio de estas técnicas :

- Hormonas (17)
- Enzimas (10)
- Inmunoglobulinas intracelulares y extracelulares (7)
- Alfa-1-antitripsina (33)
- Antígenos asociados a tumores (39)
- Antígeno de superficie de la Hepatitis B (9)
- Antígeno amibiano (13)
- Antígeno carcinoembrionario (34)

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO

MATERIAL Y METODO

Material Biológico : 4 conejos de la raza Nueva Zelandia de 2.5 Kg.

Reactivos y Sustancias :

Adyuvante completo de Freund

Adyuvante incompleto de Freund

Agarosa

Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS)

DEAE-celulosa

Peroxidasa (HRP) tipo VI SIGMA Chemical Company

Peroxidasa (HRP) tipo I SIGMA Chemical Company

Sephadex G-200

Sulfato de Amonio

Reactivos para determinación de proteína por el método de Lowry:

Albúmina sérica Bovina (ASB)

Na_2CO_3 al 2% en NaOH al 0.1N

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Tartrato de sodio al 2%

Sulfato de cobre al 1%

Los métodos de preparación se encuentran descritos en el apéndice.

Material de vidrio :

Agitadores
Cajas Petri
Portaobjetos
Probetas
Matraces Erlenmeyer
Matraces aforados
Tubos de ensaye
Vasos de precipitado

**Equipo para operación de
Nodulos Linfáticos :**

Anestesia
Bisturí
Tijeras
Pinzas
Jeringas de Insulina

Aparatos de Laboratorio :

Balanza Analítica
Agitadores Magnéticos
Colector de Fracciones
Espectrofotómetro
Columnas de cromatografía para filtración en gel

M E T O D O L O G I A

Para la obtención del complejo peroxidasa-anti-peroxidasa se desarrolló la metodología que a continuación se describe, que consta de los pasos siguientes, cada uno de ellos descrito en detalle más adelante :

- 1. Obtener IgG-antiperoxidasa por medio de un esquema de inmunización en conejos.**
- 2. Separar las gamaglobulinas del suero inmune por fraccionamiento salino con sulfato de amonio.**
- 3. Obtener las Inmunoglobulinas por medio de una cromatografía de intercambio iónico.**
- 4. Demostrar especificidad y actividad del anticuerpo frente a la peroxidasa por medio de la técnica de difusión doble de Ouchterlony.**
- 5. Determinar la concentración total de proteína.**
- 6. Formar el complejo soluble peroxidasa-anti-peroxidasa.**
- 7. Realizar cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-200 para obtener el complejo inmunológico purificado.**
- 8. Demostrar el complejo inmunológico (PAP) por inmunodifusión y compararlo con el complejo PAP que se vende comercialmente.**

3.1 OBTENCION DE SUERO ANTI-PEROXIDASA.

Se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelandia de 2.5 kilogramos de peso, y antes de proceder a la inmunización se hizo un sangrado preinmune para tener un suero control negativo. Cada conejo fue inmunizado por vía subcutánea y vía ganglios poplíteos. Para inoculación en los ganglios linfáticos fue necesario hacer incisiones en la parte posterior de los muslos de los conejos, para poder inyectar directamente en los ganglios. Las primeras inmunizaciones se realizaron inyectando a cada animal 2 mg/ml de HRP tipo VI en PBS, emulsificados con 1 ml de adyuvante completo de Freund en 2 ganglios linfáticos y en 4 sitios subcutáneos; a las 3 semanas se repitió la inmunización en 4 sitios subcutáneos y 2 sitios intramusculares. A las 3 semanas se hizo una sangría de prueba, y en seguida se aplicó un refuerzo en 4 sitios subcutáneos, pero ahora utilizando adyuvante incompleto de Freund; si la prueba de inmunodifusión es positiva a las 3 semanas se hace sangrado de corazón para obtener la mayor cantidad posible de suero.

3.2 PRECIPITACION POR FRACCIONAMIENTO SALINO (SAS).

La precipitación con sulfato de amonio saturado (SAS) se basa en que moléculas de agua presentes en la solución proteica son capturadas por el sulfato de amonio hasta llegar un momento en el cual la cantidad de agua presente no es suficiente para que las moléculas proteicas se encuentren en solución y sobreviene la precipitación.

Se realizaron dos precipitaciones al 40% de saturación para de esta manera obtener la mayor cantidad de gamaglobulina más pura posible.

3.3 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

La cromatografía de intercambio iónico se basa en el principio de la atracción electrostática de iones con carga opuesta en una superficie polielectrolítica. El principio básico implica una interacción electrostática entre los iones que se intercambian y la carga eléctrica normal en la superficie de la resina. La velocidad de movimiento de un compuesto ionizable hacia abajo de la columna está en función de su grado de ionización, de la concentración de los otros iones y de las afinidades relativas de los diferentes iones presentes en la solución, en relación con los sitios cargados de la resina. Para obtener la separación deseada, los iones retenidos electrostáticamente se eluyen diferencialmente mediante un ajuste de pH del solvente eluyente, así como de su fuerza iónica.

La fracción de gamaglobulinas obtenida por precipitación con sulfato de amonio se aplica a una columna de cromatografía con DEAE-celulosa para fraccionar las gamaglobulinas y obtener la fracción IgG, que es la que interesa en nuestro caso.

Se utilizó una columna de 55 cm de altura, 2.0 cm de diámetro y con un volumen de 150 ml; el eluyente fue amortiguador de fosfatos 0.01M pH=8.0 con una velocidad de flujo de 0.30 ml/min y el volumen de las fracciones colectadas de 43 gotas (3.0 ml). Se eluyó la columna 2 veces vol/vol y después se inició la elución con una mezcla 9:1 de amortiguador de fosfatos 0.1M + NaCl 3M para cambiar la fuerza iónica de la columna e iniciar la elución de las demás fracciones de gamaglobulinas.

3.4 MICROINMUNODIFUSION DOBLE DE OUCHTERLONY.

Esta prueba de difusión doble en agar se basa que el antígeno y el anticuerpo difunden a través de un medio semisolido, las bandas de precipitación que se observan, aparecen en la zona de equivalencia donde la concentración del antígeno y el anticuerpo son optimas para la precipitación del sistema.

Se realizó esta prueba para demostrar la actividad del anticuerpo y además demostrar que el anticuerpo es IgG anti-peroxidasa. Para esto se realizaron varias diluciones del anticuerpo en PBS , las cuales se colocaron en los pozos periféricos, y en el pozo del centro se colocó una solución de peroxidasa (1 mg /ml); de esta manera se observaron las bandas de inmunoprecipitación y se obtuvo el título del anticuerpo anti-peroxidasa según la dilución más alta en la cual se observó precipitación.

3.5 CUANTIFICACION DE PROTEINAS (METODO DE LOWRY).

Aunque la microinmunodifusión nos dió una idea de la concentración proteica, debemos conocerla con mayor exactitud. Este paso es importante para la formación del complejo PAP el cual se debe hacer teniendo en cuenta la concentración tanto de la enzima como del anticuerpo; para formar el complejo soluble se debe tener una relación 3:2 (tres moléculas de enzima por cada dos moléculas de anticuerpo). Por tanto, es muy importante conocer la concentración de inmunoglobulina (IgG) presente en el suero inmune obtenido.

3.6 PREPARACION DEL COMPLEJO PEROXIDASA ANTI-PEROXIDASA.

La preparación del PAP es un proceso que requiere tiempo y un grado de experiencia para obtener buenos resultados; en este trabajo se utilizó una técnica rápida y sencilla que se basa en la separación por cromatografía de la mezcla de anti-peroxidasa y peroxidasa.

Para preparar el complejo PAP se tomó una alícuota del suero anti-peroxidasa y se incubó 15 minutos a 37°C con un exceso de peroxidasa (3 a 10 veces de exceso). La mezcla se centrifugó por 30 minutos a 3000rpm a 4°C y el sobrenadante se aplicó a una columna de Sephadex G-200 previamente equilibrada para continuar con la fase de filtración en gel.

3.7 FILTRACION EN GEL.

Se denomina así a la técnica de separación de moléculas de diferente tamaño mediante su paso a través de una columna de gel.

Los polisacáridos conocidos con el nombre de dextranses se unen cuidadosamente por enlaces cruzados, de manera que constituyan pequeños glóbulos hidrofílicos de naturaleza insoluble que cuando se coloca en agua se hinchan de manera considerable para formar un gel insoluble. El fundamento de este método de separación es la propiedad que tiene el Sephadex de excluir los solutos de peso molecular grande, mientras que es accesible para la difusión de moléculas de pequeña dimensión.

Se usó como gel Sephadex G-200, que tiene una exclusión molecular mayor de 40,000, y una columna de las siguientes dimensiones:

100 cm de altura, 2.5 cm de diámetro y volumen 550 ml ; el amortiguador usado fue PBS pH=7.2 ; la velocidad de flujo empleada fue de 0.3 ml/min , y el volumen de cada fracción colectada fue de 86 gotas (6 ml).

3.8 DEMOSTRACION DEL COMPLEJO PAP POR INMUNODIFUSION.

El primer pico obtenido en la columna de Sephadex G-200 se concentró por ultrafiltración y se probó por inmunodifusión doble de -- Ouchterlony dando líneas de precipitación en contra de anti-IgG y anti-peroxidasa.

Al comparar las líneas de inmunoprecipitación obtenidas por el complejo PAP que se vende comercialmente y las líneas obtenidas por el complejo PAP producido por nosotros en el laboratorio, fue posible tener idea de las características del complejo obtenido.

C A P I T U L O I V

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1 OBTENCION DE SUERO ANTI-PEROXIDASA .

El esquema de inmunización realizado en los conejos dió buenos resultados aunque en un tiempo mucho mayor al que se esperaba; las primeras inmunizaciones, en las cuales se utilizó adyuvante completo de Freund, dieron como resultado una respuesta primaria elevada en contra de la peroxidasa, pero esta respuesta es de IgM y como sabemos la inmunoglobulina que nos interesa es IgG. Se siguió inmunizando a los conejos hasta obtener la respuesta secundaria de IgG anti-peroxidasa, pero como era de esperarse, los conejos no respondieron con la misma intensidad a las inmunizaciones; mientras que un conejo respondió intensamente dando un buen título de anticuerpos anti-peroxidasa, otro conejo dió un título muy bajo cuando se realizó la misma prueba (inmunodifusión doble de Ouchterlony) . Se trató de ir siguiendo la respuesta de cada conejo frente a la peroxidasa hasta obtener el mayor título posible de anticuerpos IgG anti-peroxidasa, pero se corría el riesgo de hiperinmunizar al animal y diera como resultado la disminución en el título de anticuerpos.

Para evitar esto se decidió respetar el esquema de inmunización

descrito previamente hasta obtener el mayor título posible y en ese momento realizar una punción cardíaca para obtener la mayor cantidad de suero con un título de anticuerpos anti-peroxidasa alto, lo cual se logró en forma satisfactoria. El material utilizado finalmente consistió en la mezcla de los sueros obtenidos.

4.2 PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO SATURADO.

Se obtuvieron aproximadamente 225 ml de suero inmune de 4 conejos inmunizados, de los cuales se apartaron 25 ml y se conservaron a -20°C . En 200 ml se realizaron dos precipitaciones con sulfato de amonio al 40% de saturación, para obtener la fracción de gamaglobulinas lo más pura posible. En el apéndice se indica la forma de calcular la cantidad necesaria de sulfato de amonio saturado para realizar la precipitación al 40% y las condiciones para obtener el mejor resultado. Después de las precipitaciones sucesivas se dializó la muestra con amortiguador de fosfatos 0.01 M hasta obtener prueba de cloruro de bario (BaCl_2) negativa, y el material dializado fue aplicado a una columna de DEAE-celulosa, como se describe a continuación.

4.3 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico de la muestra obtenida por precipitación con sulfato de amonio saturado bajo las condiciones ya citadas en la sección de material y método.

Se determinó la absorbancia en el filtrado a 280 nm obteniéndose el cromatograma de la Fig.No.4 .En dicho cromatograma se observa la presencia de dos picos principales ; se concentraron las fracciones correspondientes a cada pico y se demostró la actividad de anticuerpos IgG anti-peroxidasa en la fracción correspondiente al primer pico, por medio de inmunodifusión doble de Ouchterlony.

4.4. MICROINMUNODIFUSION DOBLE DE OUCHTERLONY.

Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-peroxidasa en el pico obtenido por cromatografía de intercambio iónico se realizó una microinmunodifusión de Ouchterlony. La muestra concentrada correspondiente al pico I que es la fracción en la cual se eluyeron las inmunoglobulinas de la clase IgG fue utilizada para realizar esta técnica de la siguiente manera: Se prepararon diluciones en PBS hasta 1:64, y de cada dilución se colocaron aproximadamente 5-7 microlitros en las cavidades periféricas según puede verse en la Fig. No. 5 , en el pozo del centro se coloca una solución de peroxidasa conteniendo 1 mg/ml.

En la misma figura se observa que las líneas de inmunoprecipitación demuestran la presencia de anticuerpos IgG-anti-peroxidasa hasta una dilución de 1:32, al cabo de 72 horas.

4.5 CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Se siguió el método descrito por Lowry y col. (26) empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método está basado en dos reacciones:

1. La formación de un complejo colorido entre los enlaces peptídicos y el ión cúprico en solución alcalina.
2. La reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por el complejo cobre proteína.

Por interpolación con la curva patrón realizada se tuvo como resultado la concentración de **10.2 mg de proteína por mililitro.**

4.6 PREPARACION DEL COMPLEJO SOLUBLE PAP.

Para la preparación del complejo PAP se siguieron las condiciones indicadas en la sección de material y método (3.6) las cuales se basaron en las investigaciones bibliográficas realizadas.

Se utilizaron: 2 ml de suero anti-peroxidasa (10 mg/ml)
1 ml de solución de HRP tipo I Sigma (50 mg/ml),
se incubaron 15 minutos a 37°C y posteriormente
se centrifugó la mezcla a 3000 rpm a 4°C y el
sobrenadante se aplicó a una columna de
Sephadex G-200.

4.7 FILTRACION EN GEL.

Se llevó a cabo la cromatografía por filtración en gel con Sephadex G-200 bajo las condiciones ya citadas en la sección de material y método (3.7). Se determinó la absorbancia del filtrado a 280 nm (para proteína) y a 400 nm (para HRP) obteniéndose el cromatograma de la

Fig. No. 6 en el que se observa la presencia de tres picos bien definidos, cuyas fracciones correspondientes se separaron y concentraron.

En el cromatograma se observa que el primer pico contiene proteína y HRP, por lo que se puede suponer que en esa fracción es donde se encuentra el complejo inmune peroxidasa anti-peroxidasa, teniendo en cuenta que en la cromatografía por filtración en gel el primer eluido será el que tenga mayor peso molecular, y en nuestro caso es el complejo PAP, posteriormente la proteína libre y por último la enzima libre.

La gran ventaja de esta técnica utilizada para la obtención del PAP consiste en obtener el complejo en forma purificada gracias a la filtración por pesos moleculares.

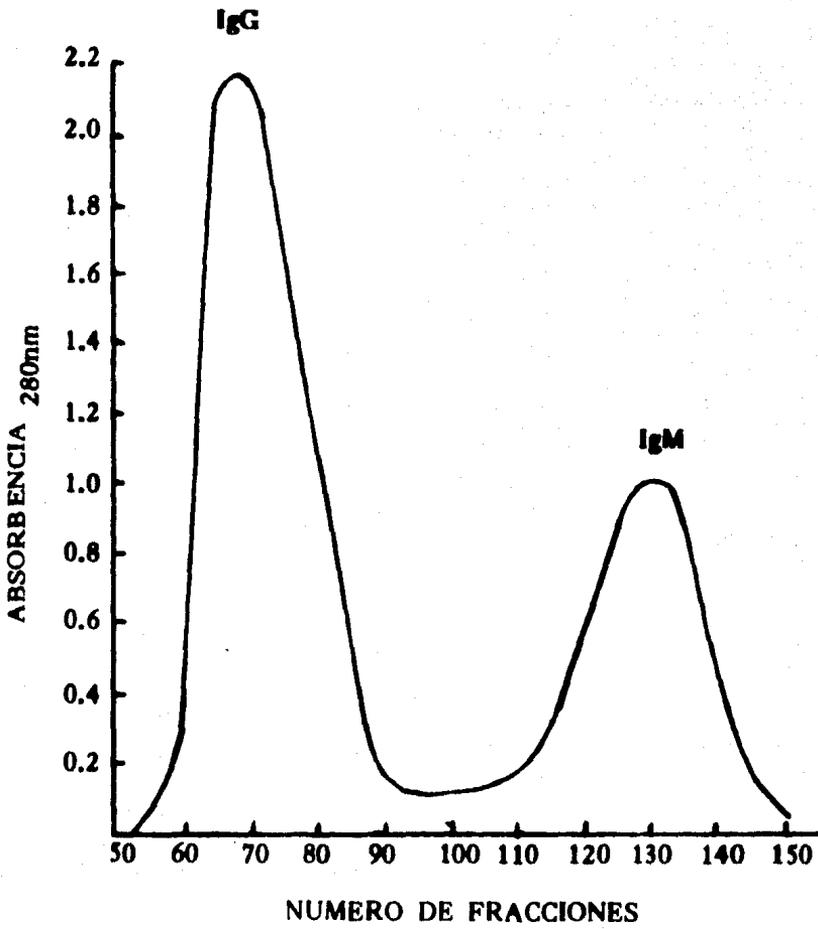
4.3 DEMOSTRACION DEL COMPLEJO PAP POR INMUNODIFUSION.

Los resultados obtenidos por la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony muestran que el complejo peroxidasa anti-peroxidasa obtenido en el laboratorio utilizando el método descrito anteriormente muestra líneas de inmunoprecipitación de identidad (Fig. No. 7) entre el complejo y el antisuero anti-IgG de conejo producido en cabra y frente al antisuero anti-peroxidasa producido en conejo. Se observa que la fracción obtenida por filtración en gel reacciona frente a estos dos antisueros demostrando así la presencia del complejo PAP.

El complejo obtenido en el laboratorio se comparó con un complejo peroxidasa-anti-peroxidasa producido comercialmente por los Laboratorios Dako. En la prueba de inmunodifusión doble de Ouchterlony se observa que este complejo reacciona frente al antisuero anti-IgG de conejo (cabra) y al antisuero anti-peroxidasa (conejo), dando líneas de inmunoprecipitación y observándose también la formación de una línea de identidad parcial, lo que indica la presencia de una cantidad considerable de enzima libre.

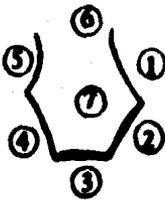
Al hacer esta comparación entre el reactivo obtenido en el laboratorio y el que se vende comercialmente se observa una mejor purificación en el obtenido en el laboratorio, pues este reactivo no contiene enzima libre, mientras que el PAP Dako si contiene una cantidad considerable de enzima libre, misma que disminuirá su sensibilidad al usarse para la investigación de antígenos tisulares.

FIGURA Nº 4



CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

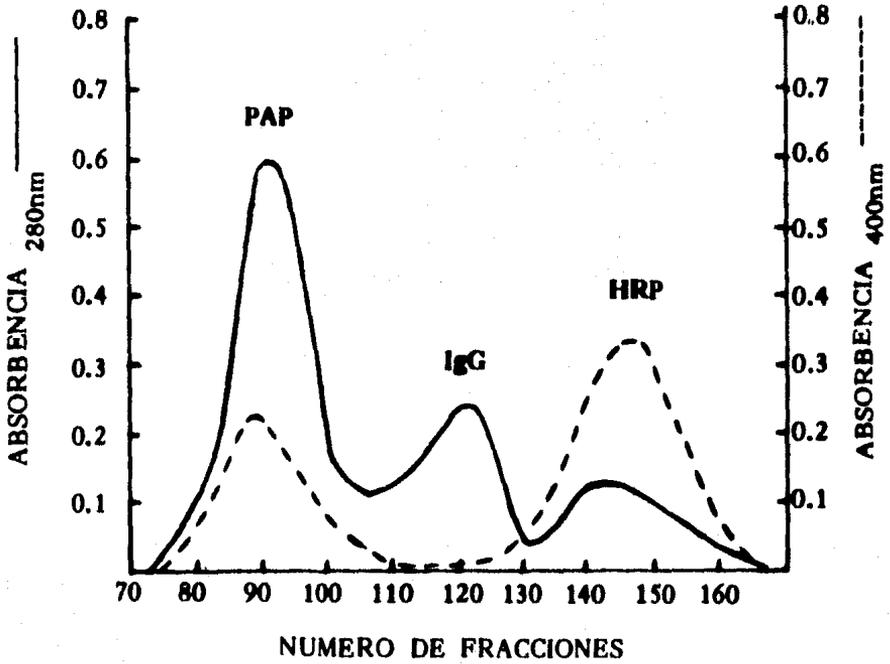
FIGURA Nº 5



- 1.- Suero anti-peroxidasa dil.1:2
- 2.- " " dil.1:4
- 3.- " " dil.1:8
- 4.- " " dil.1:16
- 5.- " " dil.1:32
- 6.- " " dil.1:64
- 7.- Solucion de HRP en PBS 1mg/ml.

Microimmunodifusion doble de Ouchterlony

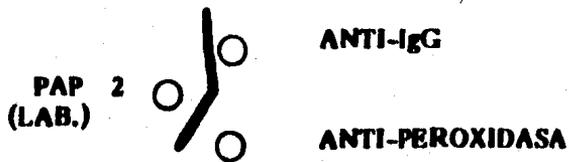
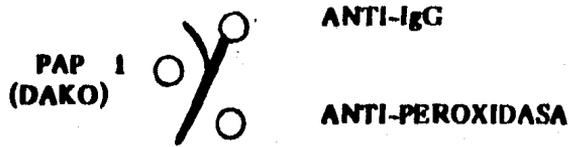
FIGURA Nº 6



CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

SEPHADEX G-200

FIGURA Nº 7



- PAP 1** .- Complejo peroxidasa anti-peroxidasa de Dakopatts.
PAP 2 .- Complejo peroxidasa anti-peroxidasa obtenido en el Laboratorio.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se encontró dificultad para que los conejos respondieran inmunológicamente frente a la enzima peroxidasa, y fue necesario combinar varios esquemas de inmunización para obtener anticuerpos IgG-anti-peroxidasa a títulos satisfactorios.
2. De los resultados obtenidos por el método de cromatografía para la preparación del complejo peroxidasa-anti-peroxidasa se demuestra que se puede obtener el complejo PAP con un excelente grado de purificación para que se utilice como reactivo inmunológico en investigación.
3. Partiendo de la hipótesis de que las reacciones antígeno-anticuerpo tienen una alta sensibilidad y especificidad, podemos concluir que la calidad del complejo es proporcional a la calidad de los anticuerpos anti-peroxidasa obtenidos y al método utilizado para su preparación.
4. Con la obtención del complejo PAP se demuestra que es posible la preparación de reactivos inmunológicos utilizando técnicas accesibles a los laboratorios y con un costo menor, dado que actualmente se importan.

APENDICE

APENDICE

Metodos utilizados para la preparación del complejo PAP.

Precipitación de proteína con sulfato de amonio saturado.

Reactivos:

Solución de sulfato de amonio saturado:

Se prepara una solución de 4.05 M de sulfato de amonio para obtener el 100% de saturación. (SAS)

Solución salina boratos (SSB):

Acido bórico	6.184 g
Tetraborato de sodio	9.536 g
Cloruro de sodio	4.384 g
Agua destilada a 1 litro.	

Se verifica que el pH quede entre 8.4 - 8.5 ; antes de usarse se hace una dilución con 5 volúmenes de solución amortiguadora y 95 volúmenes de solución salina.

Técnica:

1. Se calcula el volumen necesario de SAS para obtener el grado de saturación deseado (44) :

$$V + 100 \cdot V_1 = (V + V_1) \% \text{ saturación}$$

donde:

V = volumen de la muestra

V₁ = volumen de SAS

2. El SAS se agrega gota a gota, con agitación magnética y a 4°C. Al terminar la adición, se deja agitando toda la noche a 4°C.
3. Se centrifuga a 3,000 rpm 4°C durante 30 min y se separa el sobrenadante del precipitado.
4. El precipitado se dializa contra SSB hasta prueba negativa de sulfatos con cloruro de bario.
5. Cuando se requiere una segunda precipitación, se sigue el mismo procedimiento, determinando el volumen necesario de sulfato de amonio con la siguiente fórmula:

$$V_2 = \frac{(\text{saturación 2} - \text{saturación 1})}{1 - \text{saturación 2}}$$

V - volumen de la muestra

V₂ - volumen de SAS

Cuantificación de proteínas.

Método de Lowry.

Reactivos:

Solución A:

Tartrato de sodio 2.0 %	0.1 ml
Sulfato de cobre 1.0 %	0.1 ml
Carbonato de sodio 2.0 % en NaOH 0.1 N	10.0 ml

Solución B:

Reactivo de Folín-Ciocalteu	1 ml
Agua destilada	1 ml

Técnica:

1. Se elabora una curva de calibración haciendo diluciones de una solución que contiene Albúmina sérica bovina para obtener concentraciones que van de 5.0-100 µg de proteína.
2. Se toma una alícuota de 0.1 ml de la muestra.
3. Se agrega a todos los tubos 2.0 ml de solución A, se mezclan y se dejan a temperatura ambiente 10 min
4. Se agregan a todos los tubos 0.2 ml de solución B, mezclando inmediatamente después de la adición. Se dejan a temperatura ambiente 30 min para el desarrollo de color.
5. Se determinó la densidad óptica a 700 nm en un espectrofotómetro.

(Coleman Junior)

6. Llevar a mg/ml segun tabla standar preparada con 5, 10, 25, 100 mg/ml de albúmina sérica bovina.

Microinmunodifusión doble de Ouchterlony.

1. Se prepara agarosa 0.4 % en PBS y azida de sodio 0.01 %.
Se agita y se disuelve completamente por calentamiento en un baño de agua hirviente.
2. Se pipetea rápidamente 3 ml de la agarosa caliente en portaobjetos o cajas petri (5.0 cm de diámetro) y sobre mesa nivelada.
3. Se dejan solidificar a temperatura ambiente.
4. Se dejan en refrigeración a 4°C por 30 min.
5. Se corta el patrón hexagonal con el aparato adecuado.
Se aspira el agar de los pozos (diámetro 5 mm, distancia entre ellos 5 mm) por succión con una pipeta pasteur unida al vacío.
6. Se llenan los pozos con las muestras. Se usan 5 - 7 µl en cada pozo.
7. Se dejan difundir a temperatura ambiente durante 72 hrs. para el desarrollo de las líneas de precipitación.
8. Se leen con luz directa y fondo oscuro a las 24 , 48 y 72 hrs.
9. Se lavan con citrato de sodio 0.17 M y se leen nuevamente.

Cromatografía de intercambio iónico.**Reactivos:**

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH=8.0

Fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4)	14.19 g en 1 lt
Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4)	13.60 g en 1 lt

Proporción para obtener pH= 8.0

 Na_2HPO_4 ----- 48 ml KH_2PO_4 ----- 2 ml

ajustar pH con potenciómetro.

DE52: DEAE celulosa Whatman que presenta la ventaja de estar prehinchada es decir, ya se la ha dado el tratamiento con HCL y NaOH, requerido para una mayor exposición de los grupos cargados de la celulosa.

Técnica:

1. Se prepara un gel con la matriz de celulosa y el amortiguador elegido y se procede a la eliminación del material fino.
2. Se monta la columna verticalmente y se vierte el amortiguador hasta la mitad de ésta.
3. Se vierte el gel y se mantiene cerrado el tubo de salida hasta que el gel ha sedimentado unos dos cm aproximadamente.
4. Se abre el tubo de salida, y cuando se llega al volumen deseado de cama, se equilibra con el amortiguador, usando por lo menos dos veces el volumen de la cama.

5. Se ajusta a cero de absorbancia la unidad registradora, se desecha el amortiguador de la parte superior de la columna y se agrega la muestra previamente equilibrada con el mismo amortiguador.
6. Una vez que la muestra ha penetrado en la matriz celulósica, se conecta la columna a un recipiente con amortiguador y se colectan las fracciones hasta que su absorbancia es de 0.02 ó menor.

Filtración en gel. (Sephadex G-200).

Reactivos:

Sol. A

Solución amortiguadora de Salina Fosfatos 0.15 M	pH=7.2
Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4)	20.69 gr
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 gr
Agua destilada	a 1 lt

Sol. B

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)	21.29 gr
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 gr
Agua destilada	a 1.0 lt

Mezclar 280 ml de Sol. A con 720 ml de Sol. B para obtener pH= 7.2 ;
 checar con potenciómetro.

Técnica:

1. El empaque de la columna es similar al de la columna de intercambio iónico, y se sigue el mismo procedimiento hasta el paso 5.
2. Se determina el volumen vacío y la uniformidad del empaque pasando

una solución de azul de dextrana (2 mg/ml).

3. Se cierra el tubo de salida y se deposita cuidadosamente la muestra, se deja entrar y se conecta la columna a un recipiente con amortiguador.
4. Se colectan las fracciones hasta que su absorbancia es de 0.02 ó menor.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Arends, J. (1979) "Purification of peroxidase-conjugated antibody for enzyme immunoassay by affinity chromatography on concanavalin A." **Journal of Immunological Methods** 25, 171-175.
2. Avrameas, S. (1969) "Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies." **Immunohistochemistry**, 6, 43-52.
3. Avrameas, S. & Ternynck, T. (1971) "Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. " **Immunohistochemistry**, 8, 1175-1179.
4. Barrett, T. J. "Textbook of Immunology."
The C.V. Mosby Company. (1978).
5. Brandtzaeg, P. (1974) "Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components. Immunohistochemistry with a cold ethanol-fixation technique. " **Immunology** , 26, 1101-1114.
6. Brattain, M., Marks, M. & Pretlow, T. (1976) "The purification of horseradish peroxidase by affinity chromatography on sepharose-bound concanavalin A. " **Analytical Biochemistry** , 72, 346-352.

7. Burns, J., Hambridge, M & Taylor, C.R. (1974) "Intracellular immunoglobulins. A comparative study on three standard tissue processing method using horseradish peroxidase and fluorochrome conjugates. " **Journal of Clinical Pathology**, 27, 548-557.
8. Burns, J. (1975) "Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. " **Histochemistry**, 43, 291-294.
9. Burns, J. (1975) "Immunoperoxidase localisation of hepatitis B antigen (HB) in formalin-paraffin processed liver tissue. " **Histochemistry**, 44, 133-135.
10. Burns, J. (1975) "Prostatic acid phosphatase in tissue sections reveled by the unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase method." **Biomedicine**, 27, 315-317.
11. Coons, A.H., Creech, H.J. & Jones, R.N. (1941) "Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. " **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, 47, 200-202.
12. Conroy, J. & Marucci, A. (1976) "Immunochemical studies of horse-radish peroxidase. Factors affecting the inhibition of enzyme activity by specific antibody. " **Immunochemistry** , 13, 599-603.
13. Culbertson, C.G. (1975) " Soil ameba infection. Specific indirect immunoenzymatic (peroxidase) staining of formalin-fixed paraffin sections." **American Journal of Clinical Pathology**, 63, 475-482.

14. Clyne, D.H., Norris, S.H., Modesto, R.R., Pesce, A. & Pollak, V.E. (1973) "Antibody enzyme conjugates. The preparation of intermolecular conjugates of horseradish peroxidase and antibody and their use in immunohistology of renal cortex. "
Journal of histochemistry and Cytochemistry, 21, 233-240.

15. Davis, B.D, Dulbecco, R., et, al. "Tratado de Microbiología"
2a. edicion, Editorial Salvat S.A. 1978.

16. Engvall, E. & Perlmann, P. (1972) "Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes. "
Journal of Immunology , 10, 129-135.

17. Erlandsen, S.L., Parsons, J.A., Burke, J.P., Redick, J.A., Van Orden, D.E. (1975) "A modification of the unlabeled antibody enzyme method using heterologous antisera for the light microscopic and ultrastructural localisation of isulin, glucagon and growth hormone. "
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 23, 666-667.

18. Garvin, A.J., Spicer, S.S. & McKeever, P.E. (1976) "The cytochemical demostration of intracellular immunoglobulin in neoplasms of Lymphoreticular tissue. "
American Journal of Pathology, 82, 457-478.

19. Gervais, A.G. (1972) "Extraction of acid material from tissue sections by the indirect immunofluorescent test procedure. "
Acta Histochemica (Jona), 43, 83-91.

20. Graham, R.C. & Karnovsky, M.J. (1966) "The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; ultrastructural cytochemistry by a new technique."
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 14, 291-302.

21. Hudson, L. & Hay, C.F. "Practical Immunology"
Second edition. Blackwell Scientific Publications (1976).
22. Jourbert, J., Hogg, J. & Moroz, L. (1975). "Rabbit homocytotropic antibody response to horseradish peroxidase: the role of contaminating antigens."
Immunochemistry, 12, 973-974.
23. Kaplan, W. & Kraft, D.E. (1969). "Demonstration of pathogenic fungi in formalin-fixed tissue by immunofluorescence."
American Journal of Clinical Pathology, 52, 420-432.
24. Kruseman, A.C.N., Bots, G. Th. A.M. & Linderman, E. (1975) "The immunohistochemical identification of hormone-producing cells in formalin fixed, paraffin-embedded human pituitary tissue."
Journal of Pathology, 117, 163-168.
25. Lehninger, A.L. Bioquímica "Las bases moleculares de la estructura y función celular." 5a. edición. Ediciones Omega, S.A.
26. Lowry, H.O., Rosebrought, J.N. Farr, L.A. & Randall, J.R. (1951), "Protein mesurment with the Folin-phenol reagent."
Journal of Biological Chemistry , 193, 265.
27. Mason, D. & Sammons, R. (1978) . "Rapid preparation of peroxidase: antiperoxidase complexes for immunocytochemical use. "
Journal of Immunological Methods , 20, 317-324.
28. Mason, T.E., Phifer, R.F., Spicer, S.S., Swallow, R.A. & Dreskin, R.B. (1969), "An immunoglobulin-enzyme bridge method for localising tissue antigens."
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 17, 563-569.

29. Miller, H., Ternynck, T. & Avrameas, S. (1975) , "Synthesis of antibody and immunoglobulins without detectable antibody function in cells responding to horseradish peroxidase."
The Journal of Immunology, 114, 626-629.
30. Moroz, L., Joubert, J. & Hogg, J. (1974), "A potent non-peroxidase glycoprotein immunogen in commercial horseradish peroxidase. "
The Journal of Immunology, 112, 1094-1099.
31. Nakane, P.K. & Kawaoi, A. (1974) , "Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation."
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 22, 1084-1091.
32. Nakane, P.K. & Pierce, G.B. (1966), "Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localisation of antigens. "
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 14, 929-931.
33. Palmer, P.E. & Wolfe, J.H. (1976) , "Alpha₁- antitrypsin deposition in primary hepatic carcinomas."
Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 100, 232-236.
34. Primus, F.J., Wang, R.H., Sharkey, R.M. & Goldenberg, D.M. (1975), "Detection of carcinoembryonic antigen in tissue sections by immunoperoxidase. "
Journal of Immunological Methods, 8, 267-275.
35. Robinson, G. & Dawson, I. (1975), "Immunochemical studies of the endocrine cells of gastrointestinal tract. I. The use and value of peroxidase-conjugated antibody techniques for the localisation of gastrin-containing cells in the human pyloric antrum. "
Histochemical Journal, 7, 321-333.

36. Rojas-Espinosa, O., Dannenberg, A.M., Sternberger, L.A. & Tsuda, T. (1974), "The role of cathepsin D in the pathogenesis of tuberculosis. A histochemical study employing unlabelled antibodies and the peroxidase-anti-peroxidase complex. "
American Journal of Pathology, 74, 1-17.
37. Seematter, R. & Jaquet, H. (1976) , " Dosage de L 'activité des anticorps antiperoxydase de raifort par la méthode au sulfate d' ammonium. "
Annales D'Immunologie, 127, 3-10.
38. Seligman, A.M., Shannon, W.A., Jr, Hoshino, Y. & Plapinger, R.E. (1973), "Some important principles in 3,3' - diaminobenzidine ultrastructural cytochemistry. "
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 21, 756-758.
39. Strauss, R.A. & Pascal, R.R. (1975), "Invasive and metastasing carcinoma in a small adenomatous polyp of the colon: report of a case with demonstration of a tumour-associated antigen. "
Human Pathology, 6, 256-259.
40. Straus, W. (1970), "Location of antibody to horseradish peroxidase in popliteal lymph nodes of rabbits during the primary and early secondary response. "
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 18, 120-130.
41. Straus, W. (1970), "Localization of the antigen in popliteal lymph nodes of rabbits during the formation of antibodies to horseradish peroxidase. "
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 18, 131-142.

42. Taylor, C.R. & Kledzik, G. (1981), "Immunohistologic techniques in surgical pathology. A spectrum of 'new' special stains. " **Human Pathology**, 12, 590-596.
43. Ternynck, T. & Avrameas, S. (1976) , " A new method using p-benzoquinone for coupling antigens and antibodies to marker substances! **Annales de Immunologie**, 127, 197-208.
44. Weir, D.M. "Handbook of Experimental Immunology". (1978) **Volumen 1. Blackwell Scientific Publications.**
45. Weston, P.D. & Poole, A.R. (1973) , "Antibodies to enzymes and their uses, with specific reference to cathepsin D and other lysosomal enzymes." In **lysosomes in Biology and Pathology**, ed. Dingle, J.T., Vol. 3, Ch. 16.