



Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**PURIFICACION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA
HEPATITIS TIPO B (ANTIGENO AUSTRALIA).**

T E S I S

PRESENTADA POR:

MARIA DE LOURDES SACAGUCHI IDE

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**



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.- INTRODUCCION

- a) Objetivo
- b) Terminología y patogenia
- c) Epidemiología de la hepatitis por virus tipo B
- d) Estructura antigénica del virus de la hepatitis B
- e) Respuesta inmune en la hepatitis por virus tipo B
- f) Antecedentes metodológicos

II.- MATERIAL Y METODOS

III.- RESULTADOS

IV.- CONCLUSIONES

V.- BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION:

De importancia primordial para el mantenimiento de la salud pública, tanto en México como en muchos países, es el conocimiento de la historia natural de las diversas variedades de hepatitis, de las cuales se desconocen aún aspectos esenciales para su curación y prevención. En lo que se refiere a curación, no existe un tratamiento específico puesto que el curso de la enfermedad presenta variación entre cada paciente; se ha hecho mayor énfasis en la profilaxis pre y post exposición de la cual se ha publicado el uso de inmunoglobulinas, suero hiperinmune y ahora de una vacuna comercial; antes de usar alguno de estos productos se recomienda hacer un cuidadoso estudio epidemiológico ya que el costo del suero hiperinmune y de la vacuna es muy elevado (1, 2).

Si bien la epidemiología de la hepatitis infecciosa y de la hepatitis sérica, en la actualidad denominadas hepatitis por virus tipo A y hepatitis por virus tipo B respectivamente, ha sido bastante estudiada desde hace 40 años, fue hasta el descubrimiento de Blumberg en 1964 (3) del " Antígeno Australia " cuando se hizo posible investigar la naturaleza y las características del agente causal de la hepatitis B, así como avanzar significativamente en el conocimiento de diversos aspectos epide-

miológicos cuyas implicaciones ahora están bien definidas, como las que se refieren a su transmisión por vía transfusional y oral, y a las posibilidades de prevención por medio de vacunas.

A partir del trabajo inicial de Blumberg, quien utilizó el método clásico de doble difusión en agar, han surgido variantes y nuevos métodos que permiten identificar cantidades muy pequeñas de este antígeno y de sus anticuerpos específicos. La necesidad de utilizar un antígeno de elevada pureza y especificidad se hizo patente desde que aparecieron los métodos llamados de "tercera generación" cuya gran sensibilidad ha sido posible conseguir gracias al desarrollo de métodos efectivos de concentración y purificación del virus tipo B, como el de Harris y colaboradores (4). El objetivo principal de este trabajo ha sido obtener antígeno de superficie de hepatitis B altamente purificado, para ser utilizado en la detección del anticuerpo homólogo por métodos de alta sensibilidad y especificidad o bien, con una previa purificación en la inmunización de animales de laboratorio para obtener el suero anti-antígeno, debido a que de todos los métodos y en particular los de tercera generación requieren anticuerpos de mayor especificidad.

TERMINOLOGIA Y PATOGENIA:

Como ya se mencionó, se han - - identificado dos virus denominados tipo A y tipo B y recientemente un tercero aún no bien conocido, por lo que se le describe como agente noA - noB, de características epidemiológicas diferentes.

La hepatitis tipo A, conocida antes como hepatitis infecciosa o ictérica catarral, es un padecimiento epidémico que por lo general se adquiere a través de la ingestión de cantidades ínfimas del virus. También puede adquirirse por vía parenteral, pero esta vía de transmisión es poco frecuente.

La hepatitis tipo B, previamente conocida como hepatis sérica o ictérica por suero homólogo, por lo común se relaciona con las transfusiones de sangre o la aplicación de productos hemáticos. El virus de la hepatitis tipo B puede penetrar al organismo por vía parenteral uo oral (5).

La importancia de la transmisión parenteral o no parenteral del virus no ha sido bien establecida. Sin embargo, parecen estar implicados en la transmisión de la infección varios flúidos del cuerpo como saliva, descargas menstruales y vaginales, líquido seminal, exudados -serosos y leche materna. Lo que más nos interesa es la asociación que existe con padecimientos crónicos, incluuo

yendo hepatitis crónica activa, cirrosis y cáncer hepático; además, la infección por virus de hepatitis B puede convertir a la persona en un portador con antigenemia -- persistente. Se considera que existen en Norteamérica y en el norte de Europa 0.1% o menos de portadores; en Europa central y Europa del este alrededor de un 5%, la -- frecuencia aumenta en el sur de Europa y en los países - que se encuentran en el Mediterráneo, mientras que en al -- gunas partes de Africa y Asia se calcula que puede ser - hasta del 20% (6).

La infección por virus de hepatitis B está asociada con la aparición de un antígeno específico en el suero y su anticuerpo homólogo; se trata del originalmente llama do antígeno Australia, al que ahora se le conoce con el nombre de antígeno de superficie de hepatitis B (Ag_sHB), y se encuentra en el material de recubrimiento de las -- partículas Dane y en otras formas tubulares y esféricas encontradas en sueros antígeno-de-superficie-positivos. Otro antígeno que también se encuentra presente es el an -- tígeno nucleoide que está íntimamente relacionado a la - infección, y un tercer antígeno presente es el antígeno e, el cual parece estar relacionado con el número de par -- tículas virales y el grado de infectividad en sueros - - Ag_sHB positivos. Su presencia se relaciona comunmente -- con un pronóstico desfavorable y con el desarrollo de -

un padecimiento hepático crónico. De estos dos últimos - antígenos nombrados también se han encontrado sus respectivos anticuerpos (7).

A finales de 1978, se tiene el primer reporte de la llamada hepatitis noA - noB en el cual se notifica de un caso de hepatitis en una enfermera, posiblemente adquirida por inoculación accidental del virus por un piquete - de aguja. El diagnóstico de hepatitis noA - noB en la enfermera se hizo por exclusión, ya que el AgsHB y su Ac - homólogo habían sido negativos; y aunque el anticuerpo anti - A estaba presente éste era mediado por IgG lo - - cual es indicativo de una infección anterior (8). Se - ha sospechado la existencia de éste agente infeccioso -- noA - noB a partir de las siguientes observaciones:

- 1.- Tiene un período variable pero definido de incuba---ción, intermedio entre hepatitis tipo A y hepatitis tipo B (generalmente de 6 a 12 semanas).
- 2.- En preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina, las alteraciones son virtualmente indis--tinguibles de la hepatitis viral tipo A y de la tipo B.
- 3.- Existe una relación directa entre el desarrollo de - la hepatitis noA - noB y el origen de la sangre donada como sucede con la hepatitis B y es cerca de diez

veces más común después de recibirla de donadores co
merciales que de donadores voluntarios (9).

DIFERENCIAS EPIDEMIOLOGICAS ENTRE LAS HEPATITIS VIRALES

	Hepatitis A	Hepatitis B	no A - no B
Transmisión	Vía oral, a veces parenteral	Vía parenteral, a veces oral	Parenteral (hasta ahora)
Período de incubación (días)	15 a 50	40 a 180	42 a 84
Distribución por edades	Todas, pero principalmente en niños menores de 14 años	Todas, especialmente en adultos jóvenes (15 a 30 años) no frecuente en niños	Adultos (hasta ahora)
Variación estacional de la incidencia	Más frecuente en invierno y primavera	Ninguna	Se desconoce
Modelo animal para infectividad	Hapale jacchus (mono titi) y otros	Chimpancé	Probado en Chimpancé
Marcadores Serológicos	Desconocidos o ninguno	AgstB* AcstE AgstB AcstB AgeHB AceHB	Desconocidos o ninguno

* Ver cuadro de nomenclatura.

- Bryan J.A., Pattison Ch. P. Hepatitis Viral, un compendio. Medicina de Posgrado Vol. 7 No. 8, 1979.

- Alter H.J., Hollan P.V., Purcell R.H., Popper H. Transmissible agent in Non-A, Non-B hepatitis. Lancet. Saturday 4 March 1978.

DIFERENCIAS CLINICAS ENTRE LAS HEPATITIS VIRALES

	Hepatitis A	Hepatitis B	no A - no B
Sintomatología	Síndrome gripal de iniciación abrupta y con fiebre. Malestar general Anorexia Náuseas Vómito Fatiga	Parecidos a los de hepatitis A, pero de evolución mas prolongada; en ocasiones Urticaria Artralgias Linfadenopatía cervical	Fatiga Náuseas Vómito Malestar general
Curso clínico	Breve	Prolongado	Variable hasta donde no ha experimentado
Severidad	Habitualmente leve	Variable, a menudo grave	Leve
Complicaciones	Poco habituales	Presentes en un 5 a 10% de los casos	Poco habituales hasta ahora
Indice de mortalidad	0.1%	1 a 10%	No se sabe por ahora

NOMENCLATURA.

Cuadro No. 2

Terminología utilizada para los antígenos y anticuerpos del virus de la hepatitis tipo B.

VHB	Virus de hepatitis B. Un virus de 42 nm (partícula Dane).
AgsHB	Antígeno de superficie de la hepatitis B, originalmente conocido como antígeno Australia (AgAu). Este antígeno se encuentra en la superficie del virus y en las partículas libres de forma esférica y tubular.
AgcHB	Antígeno nucleoide de la hepatitis B. Este antígeno se encuentra en el nucleoide de la partícula Dane.
AgeHB	Antígeno e asociado con infecciones de hepatitis tipo B.
AcshB	Anticuerpo anti-antígeno de superficie.
AccHB	Anticuerpo anti-nucleoide.
AceHB	Anticuerpo anti-e.

Zuckerman A.J. The three types of human viral hepatitis.
Bulletin of the World Health Organization. 56(1);1-20, 1978.

EPIDEMIOLOGIA DE LA HEPATITIS POR VIRUS TIPO B.

En la actualidad, con la existencia de pruebas de laboratorio de alta especificidad para la identificación de la hepatitis B, los conceptos epidemiológicos sobre la infección han cambiado significativamente. Por ejemplo, se ha desechado el dogma epidemiológico de que la hepatitis B se contagia exclusivamente por productos hemáticos a través de la ruta parenteral; este cambio se debe a ciertas observaciones como son el hallazgo de que la infección es endémica en instituciones cerradas, de que hay prevalencia de la infección en comunidades urbanas de adultos, en el porcentaje y edad de distribución del AgsHB en diferentes regiones geográficas y la relativa alta incidencia en condiciones socioeconómicas pobres; además, existen evidencias circunstanciales según las cuales la transmisión es posible por contacto personal íntimo y por la ruta sexual.

Ahora bien, en áreas donde la prevalencia es baja, la inoculación de sangre y algunos productos derivados de ésta continúan siendo el mejor modo de transmisión de la infección, como sucede en las transfusiones, en la inoculación accidental de pequeñas cantidades de sangre como puede ocurrir en los manejos médicos, quirúrgicos y dentales, en los adictos a drogas intravenosas o subcutáneas, en inmunización masiva, tatuajes, acupuntura, --

accidentes de laboratorio e inoculación accidental con -
objetos que por alguna razón hayan sido contaminados con
sangre.

Por otro lado, en zonas donde la incidencia de in-
fección por virus de hepatitis B es más alta, como suce-
de en los trópicos, los modos de transmisión son simila-
res a los otros lugares del mundo; se tienen en estudio
otros factores adicionales que pueden ser importantes -
como la repetida picadura de artrópodos que se alimentan
de sangre, aunque los primeros resultados obtenidos has-
ta ahora no son muy claros.

Otro factor importante que determina la prevalencia
del virus en algunas regiones es la transmisión de la en-
fermedad de madre portadora a sus hijos, la cual puede -
ocurrir durante el período perinatal.

El mecanismo de infección pre-natal no es muy claro,
y aunque se cree que el virus puede infectar al feto en
el útero, éste parece ser un caso muy raro; es más proba-
ble que la infección ocurra poco antes del nacimiento -
como resultado de un escape de sangre de la madre a la -
circulación del niño (6).

ESTRUCTURA ANTIGENICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

Está bien establecido que la partícula Dane es el virus tipo B de la hepatitis, y que esta partícula - vista bajo el microscópio electrónico tiene una complejidad morfológica que ha sido superada por la heterogeneidad antigénica del AgsHB, ya que mediante cuidadosas - pruebas de laboratorio se ha demostrado que todas las -- muestras de AgsHB poseen un antígeno común específico - " a " y que las partículas generalmente tienen como mínimo dos subdeterminantes mutuamente excluyentes "d" o - "y" y "w" o "r".

Los subtipos son la expresión fenotípica de distintas variantes genotípicas del virus, y se han reconocido cuatro principales fenotipos: adw, adr, ayw y ayr, pero han sido descritas otras variantes de estas subdeterminantes, todas aparentemente en la superficie de la partícula Dane. Estos subtipos son valiosos marcadores epidemiológicos y ofrecen un método para distinguir el origen de la infección. Aunque algunos autores consideran que los subtipos no parecen estar asociados con una forma -- clínica particular de padecimiento hepático cabe la posibilidad de que en el futuro esta idea cambie ya que en la actualidad existen algunos estudios preliminares que parecen indicar lo contrario. (6,10).

RESPUESTA INMUNE EN LA HEPATITIS POR VIRUS TIPO B.

Después de la infección por virus de hepatitis B, - la respuesta inmune se manifiesta por un mínimo de tres sistemas antigénicos: el antígeno de superficie, el antígeno nucleoide y el antígeno e, como resultado de la replicación del virus en el hepatocito.

El antígeno de superficie aparece en el suero de muchos pacientes durante el período de incubación, como 4 a 6 semanas después de la infección y 2 a 8 semanas antes de que las pruebas bioquímicas descubran el daño hepático o el ataque de ictericia. El Ags persiste durante la fase aguda de la enfermedad y habitualmente desaparece de la circulación durante la convalecencia. El antígeno nucleoide no ha sido identificado en el suero o plasma. El siguiente evento identificable en la circulación, es la actividad asociada a DNA polimerasa (11), - inmediatamente antes o al tiempo en que suben las transaminasas séricas. El anticuerpo antinucleoide se encuentra en el suero 2 a 10 semanas después de la aparición del Ags, y frecuentemente es identificable durante la infección aguda y por algún tiempo después de la recuperación aunque con títulos que tienden a bajar; en general los títulos altos de este anticuerpo son encontrados en portadores persistentes del Ags. El anticuerpo antinucleoide parece estar correlacionado con la cantidad y du

ración de la replicación del virus. Finalmente aparece - el anticuerpo de superficie. (6)

Estudios previos han mostrado que el antígeno e está presente al principio, en el curso de la infección aguda, cuando inicialmente aparece el Ags y antes del ascenso de las transaminasas séricas. El antígeno e desaparece de la circulación en individuos que se recuperan de la enfermedad aguda, pero en muchos pacientes que evolucionan a una infección crónica tienen antígeno e persistente (12)

ANTECEDENTES METODOLOGICOS.

Desde que Blumberg descubrió el antígeno Australia, utilizando el método de doble difusión en placa de agar de Ouchterlony, la metodología para este propósito ha -- evolucionado con bastante rapidez; en la actualidad pueden reconocerse tres generaciones de pruebas, que se describen a continuación:

PRIMERA GENERACION (baja sensibilidad) (4)

- a) Doble difusión en placa de agar(Ouchterlony); sus inconvenientes son su baja sensibilidad y el tiempo requerido para su interpretación (1 a 7 días), y -- sus ventajas son sencillez, economía y especificidad. Esta última característica es de la mayor importancia cuando se trata de establecer la identidad de las variantes antigénicas del virus.
- b) Micro-Ouchterlony: es la variante micro del método anterior, con inconvenientes similares, la ventaja ya mencionada y, además, la de requerir cantidades muy pequeñas de suero o reactivos biológicos. (13)

SEGUNDA GENERACION (sensibilidad intermedia).

- a) Aglutinación de látex; es un método con ventajas prácticas notables, en particular sencillez y rapidez, y su inconveniente fundamental consiste en menor especi

- ficidad que se traduce en una proporción de reacciones falsas positivas mayor que en otras pruebas (14).
- b) **Contrainmunolectroforesis:** método sencillo, rápido y de bajo costo que permite detectar la mayoría de los casos positivos al antígeno. Por estas características es probablemente el método más utilizado, a pesar de que se sabe que produce una pequeña proporción de resultados falsos negativos si se compara con los métodos de tercera generación. (13).
- c) **Fijación de complemento;** tiene los inconvenientes de lo complicado del método en sí, a lo que se suma la necesidad de utilizar un suero inmune que no posea actividad anticomplementaria (generalmente de origen humano); sin embargo, su especificidad es muy buena y su sensibilidad está entre intermedia y alta (13)

TERCERA GENERACION (sensibilidad alta).

- a) **Inmunofluorescencia;** no es un método apropiado para trabajo rutinario de detección del antígeno Australia. Es particularmente útil para la localización del antígeno en células o en tejidos. El método se utiliza principalmente para estudios de biopsias hepáticas en el caso de enfermos crónicos, en especial cuando hay producción de antígeno y en el suero se encuentran solo los complejos antígeno-anticuerpo. (15)

- b) Hemaglutinación inversa, reversa o pasiva; relativamente rápido y sencillo, este método funciona bastante bien con reactivos biológicos perfectamente estandarizados pero pequeñas alteraciones en las condiciones de los eritrocitos sensibilizados pueden dar lugar a reacciones falsas negativas y positivas. (13)
- c) Análisis radioinmunológico (RIA); su principal ventaja es la elevada sensibilidad, siendo también muy buena su especificidad. Sus inconvenientes reconocidos son el alto costo de los reactivos y del equipo para la lectura de los resultados, además de requerirse instalaciones especiales, personal capacitado en forma especial para el manejo de materiales radioisotópicos y licencia para manejo de sustancias radioactivas. (16)
- d) Análisis enzimoimmunológico (EIA); esta metodología comprende diferentes técnicas aplicables a la identificación y cuantificación de antígenos y anticuerpos en flúidos biológicos. Su sensibilidad es comparable a la de RIA y tiene ventajas evidentes sobre éste último: no requiere el uso de isótopos, el equipo para su manejo, ni personal altamente adiestrado en técnicas especiales, ya que se pueden utilizar espectrofotómetros ordinarios o especiales para los aspectos --cuantitativos de la técnica. Existe inclusive la posi

bilidad de practicar esta metodología en forma cualitativa o semi-cuantitativa haciendo lecturas a simple vista, como un paso previo a la determinación cuantitativa. (17)

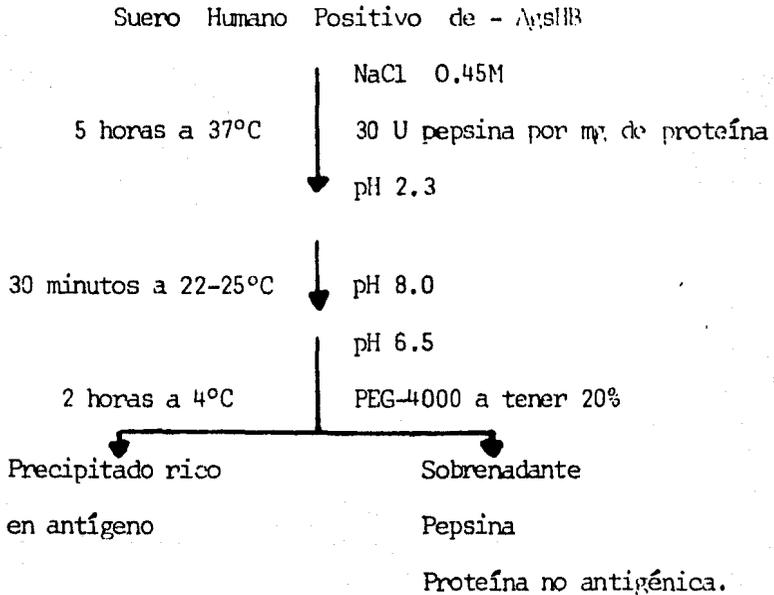
MATERIAL Y METODOS.

Antes de seleccionar la técnica empleada en la purificación del AgsHB, se consultó bibliografía y de ésta se seleccionaron varios métodos que fuesen sencillos y accesibles a nuestras posibilidades, además de que cumplieran con nuestros objetivos de obtener un buen grado de pureza y también una buena cantidad de antígeno. En la literatura se encuentran publicadas una gran variedad de metodologías empleadas para la purificación del AgsHB; entre ellas están las que se basan en gradientes de centrifugación en sucrosa o en cloruro de cesio, en ocasiones combinadas con ultracentrifugación o electroforesis; nosotros no empleamos ésta metodología porque se hubiese requerido de mucho material y tiempo para obtener una buena cantidad del antígeno. También se encontraron combinaciones de precipitación con cloruro de amonio o polietilenglicol, cromatografía por filtración en gel de DEAE-Sephadex, extracciones con freon y adsorción y elución de Aerosil. Consideramos que las dos primeras precipitaciones no darían un buen grado de pureza, y para llevar a cabo las otras técnicas no se contaba con el material necesario. Por último se encontró el uso de enzimas como la pepsina para llevar a cabo la purificación del antígeno (18). Dentro de éstos últimos se encontró una técnica que podía cubrir los objetivos principales; que

es la que a continuación se describe.

(Método descrito por Harris y colaboradores) (4,19).

DIAGRAMA DEL METODO DE LA PURIFICACION DEL Λ_{195} SHB.

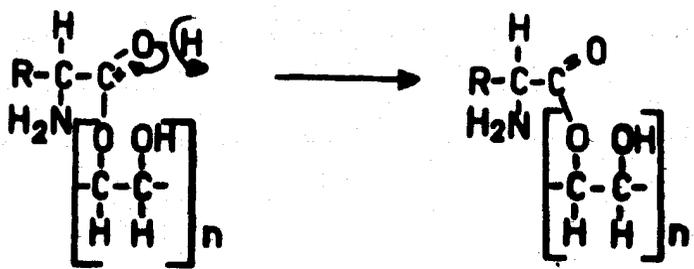
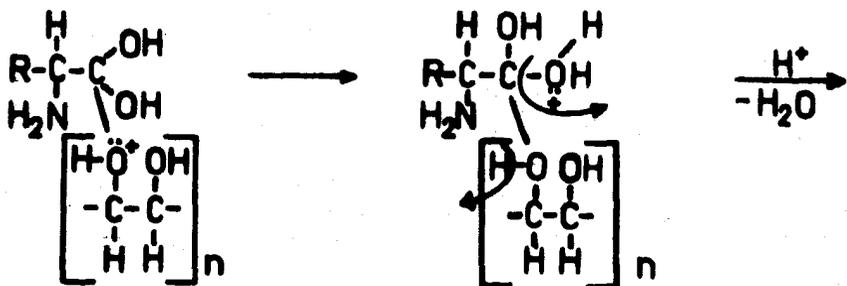
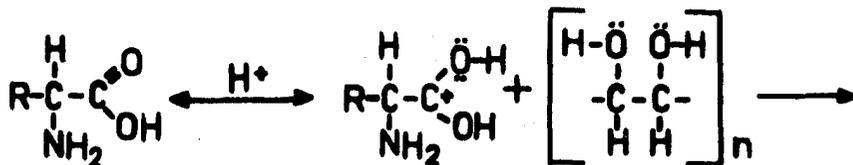


El método se basa en la degradación de las proteínas séricas - por la acción enzimática de la pepsina, la cual tiene como particularidad el romper enlaces peptídicos entre fenilalanina, triptofano, tirosina, leucina, ácido aspártico y ácido glutámico.

El pH es el óptimo para la actividad de la pepsina y el cloruro de sodio se agrega con el fin de aumentar la solubilidad de las proteínas.

En el segundo paso, con el aumento del pH se persigue únicamente para parar la acción de la enzima. Por último, al agregar el PEG en un medio ligeramente ácido se precipita el antígeno porque se supone que en éstas condiciones hay formación de iones carbonilo en las proteínas, los cuales sufren un ataque nucleofílico por los oxidri-

los del PEG formándose un complejo proteínas- PEG (20) (21)



Antes de poner en práctica el método de purificación del AgsHB se hicieron dos ensayos previos con un suero humano normal; en ambos se hizo la cuantificación de proteínas totales por el método de biuret, ya que según la técnica de Harris se debe tomar en cuenta la actividad de la pepsina y la concentración de las proteínas séricas para calcular el tiempo de digestión; la comprobación de la degradación se hizo por método electroforético debido a que con el biuret hay reacción positiva en presencia de polipéptidos (22).

Estos ensayos previos fueron de gran utilidad para familiarizarnos con toda la metodología a seguir y en un momento dado para poder controlar las distintas situaciones que se presentan al montar una nueva técnica.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PEPSINA.

Este método fue empleado para saber la cantidad de pepsina necesaria para degradar 1 miligramo de proteína. Una vez obtenido el dato de la actividad fue posible calcular la cantidad de pepsina necesaria para hidrolizar las proteínas de los distintos plasmas utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

REACTIVOS.

SUSTRATO

Se disuelven 0.16 mM/l (9.94 mg de N-acetil L-fenilalanildiyodotirosina) en 1.0 ml de hidróxido de sodio 0.1 N.

Se agregan 80 ml de agua destilada ajustando el pH a 2 con ácido clorhídrico 0.1 N y se afora a 100 ml con ácido clorhídrico 0.01 N.

(estable 2 semanas).

SOLUCION AMORTIGUADORA

DE ACETATO 4 N a pH 5.5

Se disuelven 272 g de acetato de sodio trihidratado en 200 ml de agua destilada más 50 ml de ácido acético glacial, y se completa a 500 ml con agua destilada; se ajusta el pH a 5.5 (estable - un año).

NINHIDRINA

Se disuelven 20 g de ninhidrina y 3 g de hidri--

dantina en 750 ml de éter monometílico del etilenglicol y se adicionan 250 ml de amortiguador de acetato, pasándose a un frasco ámbar.
(estable 4 semanas).

TECNICA

Preincubar el sustrato y los tubos a 37°C, y poner en los tubos

	PROBLEMA	BLANCO	CONCENTRACION EN LA PRUEBA
Sustrato	1.0 ml	1.0 ml	
Pepsina	0.1 ml	-	Entre 10 y 100 μ g/ml HCl 0.01 N.
Mezclar e incubar exactamente 10 minutos			
Ninhidrina	0.5 ml	0.5 ml	
Pepsina	-	0.1 ml	
Mezclar, tapar con una canica de vidrio y calentar a ebullición durante 15 minutos y enfriar en agua fría.			
Etanol al 50%	1.0 ml	1.0 ml	
Mezclar y leer contra blanco de agua las extinciones a 578 nm dentro de los siguientes 60 minutos			

CALCULO

Después de restar el valor del blanco correspondiente al problema aplicar el ΔE obtenido por minuto en la siguiente fórmula.

$$\text{Actividad / volumen} = \Delta E \times 194 \text{ (U / ml) .}$$

Hinsberg K., K. Lang. *Medizinsche Chemie*, Urban-Schwarzenberg-Verlag, 3rd edition, pp 799, 1975. Tomado de *Prepartions for Biochemistry*. Merck 1977.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Este método se empleó para conocer la concentración de proteínas de los plasmas que tenían que ser degradados por la pepsina.

METODO DE BIURET.

Como se sabe, todas las proteínas tienen un gran número de enlaces peptídicos, por lo que si se trata una solución de proteínas con iones de Cu^{++} en un medio moderadamente alcalino, se forma un complejo quelato de composición desconocida, entre el ion Cu^{++} y los grupos carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$) y ($=\text{N}-\text{H}$) de los enlaces peptídicos. En ello se basa la prueba de biuret para cuantificar proteínas.

REACTIVOS.

- a) Solución de cloruro de sodio 0.15 M. Pesar 8.5 g de cloruro de sodio, disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada.
- b) Biuret. Deben utilizarse reactivos de grado analítico. Pesar 1.5 g de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; P.M. 249.7) y 6.0g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; P.M.282.2), transferir a un matraz volumétrico de un litro y disolver en aproximadamente 500 ml de agua destilada. Agitando constantemente, agregar 300 ml de hidróxi-

do de sodio 2.5 N (preparado a partir de una solución saturada de NaOH libre de carbonatos). Completar el volumen con agua destilada, mezclar y conservar en un frasco Pyrex, de polietileno o bien de vidrio común pero recubierto de parafina en su interior.

METODO

- a) Preparar una dilución 1:20 del patrón de proteínas con una solución 0.15 M de cloruro de sodio; así mismo preparar una dilución del problema, a manera de contener entre 3 y 4 mg/ml. El patrón de proteína utilizado fue un patrón secundario B* con una concentración media de $4.43\text{g} \pm 0.047\text{g}/100\text{ ml}$; esta concentración fue obtenida haciendo 30 determinaciones de proteínas totales por el método de biuret.
- b) En tubos separados medir 2ml de cada una de las diluciones y 8 ml del reactivo de biuret; mezclar bien. Preparar también un blanco de reactivo usando 2 ml de la solución de cloruro de sodio y 8 ml de biuret.
Dejar reposar durante 30 minutos a 20 - 25°C y leer la absorción a 540 nm, ajustando a cero con el blanco de reactivos.

CALCULO

$$\frac{\text{Absorción del desconocido}}{\text{Absorción del patrón}} \times \frac{\text{Concentración del patrón (g/l)}}{\text{Concentración del desconocido}}$$

20

* Chanes Adame E.J. Preparación de un patrón primario de proteínas.

Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM (1978).

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SERICAS EN ACETATO DE CELULOSA.

Este método se empleó para verificar si la hidrólisis de las proteínas séricas se había llevado a cabo por la acción de la pepsina en forma completa.

METODO DE MICROZONA.

La electroforesis se basa en la migración de partículas cargadas eléctricamente, en un campo eléctrico; - la prueba requiere de tres elementos:

- a) Campo eléctrico.
- b) Partícula cargada.
- c) Medio de desplazamiento

El campo eléctrico se establece con la corriente directa de una fuente de poder con voltaje-amperaje regulables. La partícula cargada es la muestra a estudiarse y el medio de desplazamiento es en donde se coloca la muestra para su estudio.

EQUIPO Y MATERIAL:

Fuente de poder.
Cámara de electroforesis.
Aplicador de muestras
Tiras de acetato de celulosa.

REACTIVOS:

Amortiguador veronal pH 8.6; fuerza iónica 0.0025.
Rojo Ponceau S al 0.5% en ácido tricloroacético al 5%.

Suero humano normal.

Suero tratado con pepsina.

METODO:

- 1.- Embeber la tira de acetato de celulosa en el amortiguador, hasta que estén llenos todos los poros.
- 2.- Llenar la cámara de electroforesis con el amortiguador hasta el nivel marcado.
- 3.- Sacar la tira de acetato del amortiguador y quitar el exceso con papel absorbente.
- 4.- Poner la muestra con el aplicador de microzona a 1.5 cm del cátodo.
- 5.- Colocar la tira de acetato en la cámara con las muestras hacia abajo de tal forma que sea el acetato de celulosa el que haga contacto y cierre el circuito; tapar la cámara.
- 6.- Colocar los electrodos verificando su posición
- 7.- Conectar la fuente de poder y ajustar a 250 volts (5.5 V por cm^2) durante 30 minutos
- 8.- Desconectar la fuente de poder, retirar los electrodos, destapar la cámara y entonces sacar la tira, manteniéndola en posición horizontal.
- 9.- Teñir la tira dentro de una cubeta apropiada con rojo de Ponceau S durante 5 minutos.
- 10.- Lavar la tira en tres cubetas sucesivas conteniendo ácido acético al 5% dejándola algunos minu

tos en cada baño.

11.- Retirarla del último baño hasta que el fondo de la tira esté nuevamente blanco y solo se observen las bandas obtenidas, teñidas de color rojo.

12.- Leer directamente. En este caso se observaron las -
bandas clásicas de las proteínas en el suero normal
y ninguna banda en el suero tratado con pepsina.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Este método se llevó a cabo en un medio de agar y se usó para comprobar si el antígeno de superficie se encontraba en el precipitado obtenido.

FUNDAMENTO

La contraimmunoelectroforesis también se conoce con el nombre de electroforesis cruzada la cual hace uso del flujo endosmótico, que se lleva a cabo porque el agar tiene una carga neta negativa, que fija los iones positivos del amortiguador provocando un flujo de dicho amortiguador hacia el cátodo esto hace que algunas proteínas como las gamma globulinas emigren hacia el cátodo al practicarse la electroforesis. En esta forma el anticuerpo se mueve como un frente concentrado hacia el cátodo, y el antígeno se mueve en la dirección opuesta hacia el ánodo - - (13,23).

EQUIPO Y MATERIAL

- * Fuente de poder
- * Cámara de electroforesis
- Placas de plástico

REACTIVOS

Amortiguador Veronal:

Barbital sódico

(Na 5,5 dietilbarbiturato) 6.69g

Acetato de sodio anhidro 2.66g

Merthiolate(Thimerosal) 0.1g

Agar 750 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.6 con HCl 0.12N y ajustar a un litro con agua destilada.

Preparación de las placas:

Agarosa 1.4g

Amortiguador veronal 200 ml.

Fundir en autoclave y agregar 25 ml a cada placa, dejar solidificar y guardar en refrigeración

METODO

a) En la placa que contiene la agarosa se hacen los pozos necesarios para las pruebas que se desean realizar.

(Cuando se hace la prueba con suero problema se emplean 3 pozos porque de esta forma se puede observar si se encuentra presente el antígeno o el anticuerpo).

b) En el pozo central depositar la muestra problema.

c) Del lado anódico depositar el suero que contiene el anticuerpo.

d) Del lado catódico depositar el suero que contiene el antígeno

e) Llenar la cámara con el amortiguador hasta la marca indicada.

- f) Empapar las esponjas con el amortiguador (son las que hacen contacto con la placa).
- g) Invertir la placa para que sea el agar el que cierre el puente.
- h) Correr la muestra durante 60 minutos a 30 mA.
- i) Observar con una fuente de luz y una lupa.

* En este caso se usaron de la marca Hyland

Resultados:

La primera técnica desarrollada en este trabajo fue la determinación de la actividad de la pepsina, de la cual se obtuvo el siguiente resultado:

A una concentración de $100 \mu\text{g/ml}$ de pepsina se obtuvieron 33 U de actividad de la enzima; como el método empleado requería 30 U de pepsina /mg de proteína se hizo el siguiente cálculo:

$$\frac{100 \mu\text{g} \times 30\text{U}}{33\text{U}} = 91 \mu\text{g}$$

o sea $91 \mu\text{g}$ de enzima es necesaria para hidrolizar 1 mg de proteína.

Cuantificación de proteínas.

En la cuantificación de proteína plasmática se empleó el método de biuret por medio del cual se obtuvieron las cantidades de 5.26 y 5.65 g/100 ml en 2 plasmas normales.

Tomando como referencia estos resultados se consideró que la técnica en estas condiciones hidrolizaría al menos esas cantidades de proteínas en un plasma positivo para el AgsHB, además se agregó un exceso de 45.5 mg de enzima capaz de hidrolizar 0.5 g más de proteína, y de esta forma se aseguró la hidrólisis total.

En la electroforesis hecha a los plasmas normales en los cuales se pretendía hidrolizar todas las proteínas - presentes y que habían estado en incubación durante 4 horas observamos que quedaban restos proteícos presentes; por lo cual en el segundo ensayo se incubó una nueva mezcla de digestión exactamente 5 horas, después de lo cual se hizo la electroforesis dando como resultado una hidrólisis total.

Contrainmunolectroforesis

Por este método se determinó el título de AgsHB del plasma utilizado, y también el título del precipitado obtenido en el plasma positivo; después de hacer diluciones - del 1:2 hasta 1:128 se obtuvo un título de 1:8. En el precipitado rico en AgsHB primero se hizo una dilución 1:10 tomando 0.2 g de precipitado y llevando a 2.0 ml con solución salina. De esta solución se hicieron también diluciones de 1:2 hasta 1:128 obteniéndose un título de 1:32, y tomando en cuenta la primera dilución hecha al precipitado el título final fue 1:320.

CONCLUSIONES

- a) El método de Harris y colaboradores para purificar al AgsHB es efectivamente un procedimiento muy satisfactorio y relativamente sencillo, que no requiere equipo o material sofisticado o costoso.
- b) La digestión de las proteínas séricas por medio de pepsina fue completa en las condiciones experimentales - utilizadas en éste trabajo.
- c) Las pruebas de contrainmunolectroforesis indicaron - que la estructura antigénica del AgsHB no fue alterada por el tratamiento enzimático.
- d) Se demostró que hubo un incremento substancial del título del AgsHB, de 40 veces, pasando de 1:8 en el material original a 1:320 en el producto final.

- 1.- Centers for disease Control MMWR. Immune Globulins - for Protection against Viral Hepatitis. Vol. 30 No.- 34,1981.
- 2.- Centers for Disease Control MMWR Inactivated Hepatitis B virus Vaccine. Vol. 31 No. 24,1982.
- 3.- Blumberg B.S.,Alter H.J. and Visnich S.: A new antigen in leukemia sera. JAMA, 191:1965.
- 4.- Harris R.B., Semar M., Johnson A.J. Detection of hepatitis B surface antigen in potentially contaminated human plasma fraction. J. Lab. Cli. Med. 90:1977.
- 5.- Bryan J.A. Pattison Ch. P. Hepatitis Viral, un compendio. Medicina de posgrado Vol. 7 No. 8,1979.
- 6.- Zuckerman A.J. The three types of human viral hepatitis. Bulletin of the World Health Organization 56 (1) 1978.
- 7.- Vyas G.N., Schmid. "Hepatitis and Blood Transfusion" Proceedings of a Symposium Health University of California, San Francisco, March, 25-26,1972.
- 8.- Centers for Disease Control MMWR. Non-A, Non-B hepatitis infection transmitted via needle. Vol. 20 No. 14, 1979.
- 9.- Alter H.J., Holland P.V., Purcell R.H., Popper H. - - Transmissible agent in Non-A, Non-B hepatitis. Lancet. Saturday 4 March 1978.

- 10.- N.G.P.L., Powell L.W., Halliday J.W., Gera K.L., Mc Keering L., Campbell C.B. Hepatitis B-antigen subtypes in Australia as detected by radio immunoassay. The American Journal of Gastroenterology
- 11.- Robinson W.S. DNA and DNAPolymerase in the core of the Dane particle of hepatitis B. Am. J. Med. Sci. 270;1975.
- 12.- J. Tong M., Stevenson D., Gordon Irving. Correlation of e antigen, DNAPolymerase activity, and Dane particles in chronic benign and chronic active type B hepatitis infections. The Journal of Infectious Diseases. Vol.135 No.6,1977.
- 13.- Rose N.R. and Bigazz P.E. Methods in Immunodiagnosis. A Wilye-interscience Publication John Wiley & sons. 4.19,37,58.
- 14.- Martin Sosa S., Berron R. Involvement of complement and RA factor in non-specific agglutination of latex for HAA. International Symposium on viral hepatitis, Milan. Dec.1974.
- 15.- Nairn R.C. Fluorescent Protein Tracing. Livingstone LTD Edimburgh and London. Secon edittion 88-89,1964.
- 16.- Wolters L., Kuijpers L., Kacaki J., Schuurs A. Solid phase enzyme.Immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen. J. Clin.Path.,29,1976.

- 17.- Brian G.W. Enzime-immunoassay. Clin.Chem 22/8,1976.
- 18.- Schuur A., Wolters G. Hepatitis B surface antigen - and human serum proteins. The Am. J. of the Sci.Vol. 270, No.1, 1975.
- 19.- Yong Kim Ch., Spano H., E. Clark G. Use of pepsin-treated Hepatitis Associated Antigen in the production of Precipitating Antibody. J. of Infectious - - Diseases. Vol.124, No.a, 1971.
- 20.- Martin A.N., Swarbrick J., Cammarata A., Chun A.H.C. Physical Pharmacy. Secon edition Lea & Febiger Philadelphia. 334, 1969.
- 21.- Lehninger A. Traducido del inglés por el Dr. Calvet Prats F. y Dr. Bozal Fes J. Ediciones Omega. Quinta reedición. 140-141, 1972.
- 22.- Lynch M.J. Métodos de Laboratorio. 2a. ed. Nueva - Editorial Interamericana. 244. 1976.
- 23.- Gordon. B.L., Lo esencial de la Inmunología. Editorial El Manual Moderno. 2a. edición 57, 1975.