

69 2 ejempl.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



---

**CUANTIFICACION DE IgG HUMANA POR EL  
METODO DE INMUNODIFUSION RADIAL  
UTILIZANDO ANTICUERPOS DE CERDO**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A**

**PEDRO FRAGOSO CABELLO**

**ASESORES: M.C. HECTOR BARBOSA NAJERA  
M.V.Z. JUAN GARZA RAMOS**

**1 9 8 1**



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.

## ABREVIATURAS

ACE.- Adyuvante Completo de Freund.

Ac.- Anticuerpo.

Ag.- Antígeno.

cm.- Centímetros.

DID.- Doble Inmunodifusión.

IDR.- Inmunodifusión Radial.

IEF.- Inmunolectroforesis.

M.- Molar.

map.- Miliamperios.

mg.- Miligramos.

ml.- Mililitros.

mm.- Milímetros.

N.- Normal.

nm.- Nanometros.

rpm.- Revoluciones por minuto.

SDS.- Dodesil sulfato de sodio.

2 ME.- 2 Mercaptoetanol.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVO.....	4
MATERIAL Y METODOS.....	5
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47

## RESUMEN

En el presente trabajo se utiliza un subproducto de la Producción Animal en cerdos (sangre) con el fin de obtener anticuerpos monoespecíficos contra IgG humana.

El protocolo de inmunización permite incrementar el título de anticuerpos en animales inmunizados poco antes de su sacrificio con lo cual no se lesiona la industria de la carne y con los antisueros así obtenidos fué factible montar la técnica de Inmunodifusión radial (IDR) para la cuantificación de IgG humana con la misma sensibilidad y reproducibilidad del producto que se encuentra en el mercado nacional.

Este sistema modifica la enseñanza de la Zootecnia en el sentido del mejor aprovechamiento de los subproductos y se hace además posible la implantación de una tecnología no existente en el país.

Por otra parte por los resultados de la inmunización de los cerdos con IgG humana, se montaron pruebas inmunológicas donde se encontró que hay similitud entre cadenas gamma humanas y las de cerdo.

## INTRODUCCION

Uno de los intereses de los inmunólogos en la actualidad, es la producción de anticuerpos. Ello se debe a la diversidad de usos a que se destinan: En el área médica es frecuente la administración de anticuerpos específicos en las enfermedades tales como tétanos, difteria o bien causadas por picaduras de alacranes. y mordeduras de serpientes, en deficiencias inmunológicas y algunos casos específicos para prevenir sensibilizaciones (9,8,7.); como reactivos biológicos han sido utilizados para montar un gran número de pruebas inmunodiagnósticas, (20); o bien dada su capacidad de combinarse específicamente con su ligando en la purificación de numerosas moléculas (4).

En los países en desarrollo la producción de anticuerpos se realiza en animales destinados exclusivamente a este fin, puesto que los acs. de origen humano son muy caros o bien no existen en todas las especificidades diferentes (antitétanos, antidifteria, antialacrán, etc. (2).

Cuando la finalidad es producir acs. en pequeña escala, se emplean pequeñas especies como el conejo; pero cuando se persigue obtener grandes volúmenes de antisueros es el caballo el animal clásicamente utilizado, quizá debido a antecedentes históricos que se iniciaron en circunstancias peculiares cuando no existía la Ganadería como un instrumento sistemá

tico y existia la producción sistemática del caballo como medio de transporte utilizado a gran escala por los ejércitos, además reúne las características de ser grande, docil y de -- sintetizar cantidades apreciables de anticuerpos(2).

El uso de esta especie con el único fin de producir antisueros específicos, trae como consecuencia que los costos de los mismos se incrementa notablemente, dado que se necesita mantener aislados a estos animales con alimentación y cuidados especiales.

Por otro lado la Ganadería moderna maneja grandes cantidades de animales que se destinan al consumo humano y su sangre es por lo general eliminada sin ninguna utilidad o cuando mucho se utiliza en la fabricación de harinas y rellenas.

El acoplar la producción de grandes volúmenes de anticuerpos en especies destinadas al consumo humano, podría -- significar una gran reducción en el costo de producción de antisueros.

Esto ha sido explorado con anterioridad utilizando al cerdo como animal productor de antitoxina tetánica el cual es uno de los antisueros que más se emplean en el caso de la seroterapia para humanos, (1).

Además el volumen que se puede obtener permitiría la implantación de la seroterapia en forma masiva en la Industria Pecuaria persiguiendo disminuir la mortalidad que se observa en los recién nacidos. (19).

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es la producción en el - cerdo de anticuerpos monoespecíficos contra inmunoglobulina G- (IgG) humana y la estandarización de la técnica de Inmunodifusión radial (IDR) como método de cuantificación de la misma.

Este objetivo se inserta en el uso de antisueros en la producción de reactivos biológicos para el montaje de técnicas de diagnóstico y específicamente en la introducción de la técnica de IDR, la cual es muy usada en clínica y por lo tanto existe un mercado nacional que satisfacer. Si se logra instaurar este propósito a nivel industrial se obtendrá un beneficio enorme ya que el fin que se persigue es disminuir los costos - de producción y mercado en varios cientos de veces.

Implícito a esto, se encuentra un cambio en la enseñanza de la Zootecnia, ya que el método introduce una variante en cuanto a la utilización de un producto de deshecho.



## MATERIAL Y METODOS

Diseño Experimental.

Para lograr el objetivo de este trabajo, era necesario tener anticuerpos monoespecíficos, por lo tanto el diseño experimental comprendió la purificación del antígeno y el protocolo de inmunización de los cerdos.

Obtención del antígeno.

Las cadenas pesadas de IgG, humana se obtuvieron a partir de suero completo. La sangre de humano fué donada por el Banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología.

A partir de la sangre se obtuvo el plasma que posteriormente se desfibrinó por agitación con perlas de vidrio a 4°C, durante 6 horas.

Se obtuvieron aproximadamente 600 ml. de suero a partir del cual se procedió a la separación de inmunoglobulinas por precipitación con sulfato de amonio al 33% (3) método que consiste en añadir lentamente al suero una solución saturada de sulfato de amonio pH 8.0 en un volumen que sea la mitad del suero obtenido, en este caso se agregaron 300 ml de la solución una vez hecha la mezcla se depositó en botellas de centrifugadora de 250 ml. centrifugando a 10,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.

Se elimina el sobrenadante y se resuspende el preci-

pitado en agua destilada, llevándolo a un volumen de 300 ml. y agregando 150 ml. de la solución saturada de sulfato de amonio volviéndose a centrifugar con las mismas constantes, repitiéndose la precipitación cuantas veces sea necesario, hasta que el sobrenadante sea transparente.

Al final el sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en una solución de fosfatos más cloruro de sodio (PBS) y se colocó en bolsás de diálisis, poniéndose a dializar contra una solución amortiguadora de fosfatos .01 M pH 8.0, efectuándose cambios de esta solución cada 24 horas en 4 ocasiones.

Se prosiguió con la purificación de la IgG humana, empleándose la Cromatografía en columna de intercambio iónico (18), la cual consiste en la utilización de una substancia insoluble de iones con carga opuesta utilizando como adsorbente una matriz de DEAE- celulosa (Wathman) en una columna de vidrio de 57 cm. de longitud, 2.6 cm. de diámetro y un volumen total de 536.393 ml.

La resina se hidrató colocándola en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N, al sedimentarse la DEAE se decantó el sobrenadante para lavar luego con cloruro de sodio (NaCl) .15 N al sedimentar la resina se decantó el sobrenadante y finalmente esta pastilla se deshizo en ácido clorhídrico (HCl) .1 N filtrado inmediatamente en el sistema buchner con papel -

filtro (Wathman) del No. 4 con vacío a través del cual se pasan volúmenes de agua destilada suficiente para elevar el pH del sistema y logrado esto se equilibra con el amortiguador de corrida.

La columna se montó empacando la DEAE-célulosa con el cuidado necesario para impedir que se formaran burbujas o quedaran fracturas en la misma.

El empacado se hizo dejando pasar dos o tres veces, volúmenes de amortiguador igual a la capacidad de la columna, hecho esto se colocó la muestra de inmunoglobulinas en la superficie de la columna con un volumen de 5 ml. y una concentración de 5.7 mg/ml.

Utilizando como amortiguador de corrida fosfatos de sodio con molaridad creciente: .01, .03, .05, .07 y .15 M con pH 8.0.

Se colectaron fracciones de 5 ml. en un colector automático Golden Retriever modelo 1200 PUP y se determinó su absorbancia de cada una de las fracciones en un espectrofotómetro Carl Zeiss modelo A-II usando una longitud de onda de 280 nm. graficándose los resultados y las fracciones con altas concentraciones de proteína fueron concentradas en un equipo AMICON modelo 202 utilizando una membrana porosa que permite el paso de moléculas menores de 100,000.

Para estudiar la pureza de estas fracciones se utilizaron las técnicas de inmunolectroforesis (IEF), do ble inmunodifusión (DID) y electroforesis (22,14,21).

La IEF es una prueba que se basa en la separación electroforética de los antígenos y posteriormente en el proceso de inmunodifusión con los anticuerpos.

La preparación de las placas fué de la siguiente manera:

Se preparó agarosa (Sigma) al 1% en solución de barbital .05 M pH 8.6 calentándose en baño maría hasta que la agarosa se disolvió completamente, posteriormente se depositó en inmunomarcos con portaobjetos en una mesa nivelada, dejando gelificar a 4°C en cámara húmeda.

Se depositaron aproximadamente 20 microlitros de la muestra de IgG y de suero humano como control con capilares de vidrio.

Las placas se colocaron en la cámara de electroforesis, previamente se depositaron 800 ml. de la solución amortiguadora de barbital .05 M pH 8.6 como lo muestra la figura No. 1.

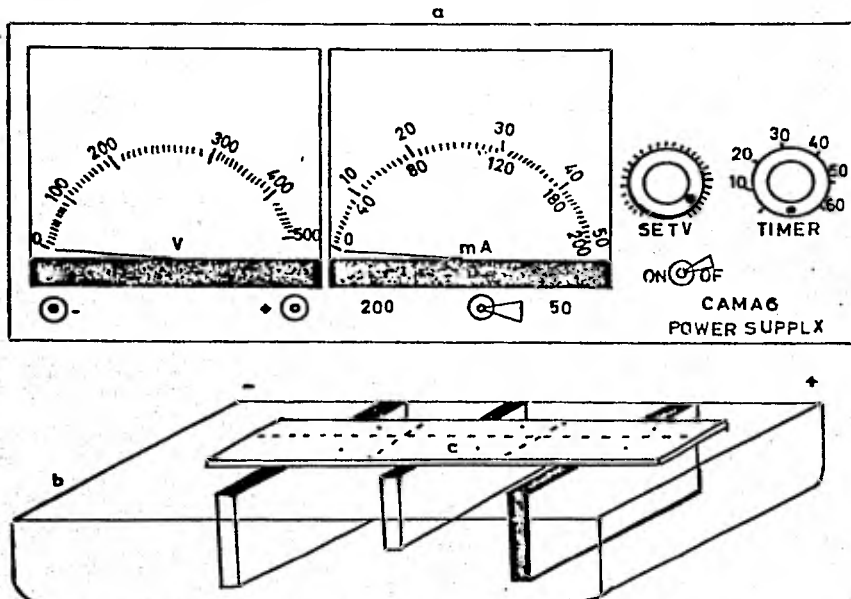


Figura No. 1.- Equipo utilizado en la IEF.

- a.- Fuente de poder.  
 b.- Cámara de electroforesis.  
 c.- Placa colocada dentro de la cámara para su electroforesis.

Aplicando una corriente de 9 mamp. por placa. El tiempo puede variar de una a otra placa, para evitar variaciones -- siempre se utilizó un control de albúmina visualizada con azul de bromofenol el cual se dejaba migrar 2.5 cm. hacia el ánodo.

Al terminar de migrar la proteína, en el canal se depositaron 200 microlitros del antisuero (inmunoglobulinas de -- cerdo contra suero humano total).

Incubándose a temperatura ambiente durante 48 horas-

en cámara húmeda haciendo observaciones periódicas para establecer la formación de bandas de precipitación así como su diagrama.

Para eliminar el exceso de reactantes que no participaron en la reacción Ag-Ac, las placas se colocaron en solución salina .85% pH 7.4 realizándose 3 cambios de la solución cada 24 horas. Luego se colocaron en agua destilada por 2 horas.

Para su tinción (6), primero se colocó un papel filtro sobre el gel, dejándose a temperatura ambiente, después se humedeció ligeramente el papel, se retiró y se efectuó su tinción utilizando una solución de amido negro al 1% durante 15 minutos, se retiró el exceso de colorante con agua destilada y después con ácido acético al 10%, finalmente se tomaron grafías utilizando un negoscopio.

En la prueba de DID el antígeno y el anticuerpo depositados en los pocillos cortados en un gel de agarosa difunden el uno hacia el otro y precipitan formando una línea opaca en la región donde se encuentran en proporciones óptimas, las placas se prepararon de acuerdo a la técnica de Ouchterlony (14).

Se depositarán 20 microlitros de la muestra de IgG humana en el pocillo del centro y 20 microlitros de antiinmunoglobulinas monoespecíficas comerciales (Behring) en los pocillos periféricos al igual que una muestra de antisuero humano total.

Las placas se lavaron, se secaron y se tifieron de -- igual manera que las placas de IEF.

Una vez comprobada la pureza de la IgG humana se -- procedió a la reducción de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas y las cadenas ligeras, de acuerdo a la técnica -- descrita por Edelman (5).

Para la separación de cadenas pesadas de cadenas ligeras se emplearon las técnicas de cromatografía en Sephadex -- G-100 (12), y electroforesis en gel de acrilamida (21).

La cromatografía en Sephadex G-100, se llevó a cabo -- montando una columna con las siguientes dimensiones: 98 cm. de longitud, 1.6 cm. de diámetro y un volumen total de 198 ml.

El gel se hidrató con agua destilada durante 6 horas y se colocó en una solución de urea 6 M y ácido propiónico 1 -- N, se empacó la columna con las mismas precauciones tomadas en el montaje de la columna de DEAE-celulosa. Las muestras de 3 ml. se corrieron en la columna colectándose fracciones del -- mismo volumen en el colector automático descrito con anteriori -- dad.

En la electroforesis el gel que se prepara es un gel transparente, flexible y elástico que se hace a partir de una mezcla de monómeros altamente solubles la cual puede modificar -- se químicamente para incorporar grupos cargados positiva o ne -- gativamente en la estructura del gel para el efecto de cambio -- de iones.

El gel se preparó en forma de placa en una celda de electroforesis especialmente diseñada de tal manera que se pueden aplicar y correr al mismo tiempo un cierto número de muestras.

Se depositaron muestras de 25-50 microlitros, aplicando una corriente de 10 mamp. por muestra, utilizando como indicador azul de bromofenol, efectuándose su tinte y destintado de acuerdo a la técnica descrita con anterioridad (6).

#### ADYUVANTE.

Se utilizó adyuvante completo de Freud (ACF), el cual se preparó mezclando 85 partes de aceite mineral con 15 partes de lanolina y 5 mg/ml. de Mycobacterium tuberculosis H37 Rv esterilizado en autoclave y liofilizado.

Se mezclaron volúmenes iguales de antígeno y ACF formando una emulsión, conteniendo 500 microgramos de cadenas pesadas de IgG humana y 2.5 mg. de Mycobacterium tuberculosis por ml.

#### INMUNIZACION DE LOS CERDOS.

El proyecto se llevó a cabo utilizando 10 cerdos como lote control y 10 cerdos como lote experimental.

Estos animales fueron proporcionados por la Granja Experimental Porcina "Zapotitlán" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnica de la U.N.A.M.



Se efectuaron 2 inmunizaciones administrando 1 ml. - de la mezcla de Ag y el ACF por vía subcutánea en la base de - las orejas y 3 inmunizaciones aplicando únicamente el Ag en la misma región.

El último estímulo antigénico se realizó 8 días an-- tes de su salida al rastro logrando con esto, coincidir el mo-- mento óptimo de producción de anticuerpos en un período de hi-- perinmunización con el momento de su muerte. Colectándose la-- mayor cantidad de sangre.

Los cerdos del lote control vivieron junto con los - cerdos del lote experimental.

Para la obtención del suero, la sangre se dejó coagu-- lar a temperatura ambiente, manteniéndose posteriormente a 4°C para intensificar la retracción del coágulo y de esta manera - obtener mayor cantidad de suero, el cual fué separado por de-- cantación y centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C - para eliminar restos celulares.

La separación de inmunoglobulinas se efectuó por pre-- cipitación con sulfato de amonio al 33% técnica ya descrita (3).

El análisis de la reactividad y especificidad de los anticuerpos obtenidos, se realizó por la técnica de IEF.

Determinándose después la concentración de Nitrógeno de ambos reactantes, es decir, la IgG humana purificada y - el antisuero contra cadenas pesadas de la misma, por el méto--

do de Kjeldahl (10).

Una vez obtenidos el antígeno y el antisuero necesarios se procedió al montaje de las placas de IDR de acuerdo a la técnica descrita por Mancini (13).

Este método inmunoquímico de precipitación por difusión simple es adecuado para determinaciones cuantitativas -- muy precisas y se lleva a cabo incorporando uno de los reactivos, en este caso el anticuerpo en el gel de agarosa a una -- concentración uniforme mientras que el otro reactivo, IgG humana purificada se introduce en una perforación desde la que se difunde hasta encontrar su punto de equivalencia con los -- anticuerpos monoespecíficos y de esa manera precipitan formando un anillo concéntrico al pozo donde se aplica.

#### PREPARACION DEL AGAR.

Se añadió 2 gr. de agarosa a 100 ml. de solución de fosfatos .01 M pH 8.0. Esta suspensión se colocó en baño maría hasta que la agarosa se disolvió, manteniéndose después a una temperatura de 50°C.

#### PREPARACION DE LA MEZCLA CON EL ANTISUERO.

Se mezclaron volúmenes iguales de la agarosa y del antisuero previa dilución en solución amortiguadora de fosfatos. .01 M pH 8.0 y previo calentamiento a 50°C, tan bien como sea posible sin formar burbujas de aire.

La mezcla se vació en cajas de Petri sobre una mesa nivelada tratando de formar una capa con un espesor uniforme de 1 mm. y sin formar burbujas, después de la gelificación se conservaron a 4°C.

Después se efectuaron cortes circulares en el gel - utilizando una aguja de 2 mm. de diámetro, retirandopor succión los pequeños cilindros que cortó la aguja.

Cada uno de los pocillos recibió 5 microlitros del Ag depositados con una micropipeta Gilson dejándose a temperatura ambiente.

Se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpos 2,4,6,8,10,12., mg/ml. para localizar la concentración necesaria que proporcionara la mayor nitidez y diámetro del anillo de precipitación.

De igual manera se utilizaron concentraciones diferentes del antígeno: .07, .077, .087, .1, .116, .14, .175, -- .23, .35, 1.4 y 2.8 mg/ml. de IgG, para localizar el rango de concentración que graficados contra el diámetro al cuadrado - del anillo de precipitación proporcionará una línea recta.

## PURIFICACION DE CADENAS GAMMA

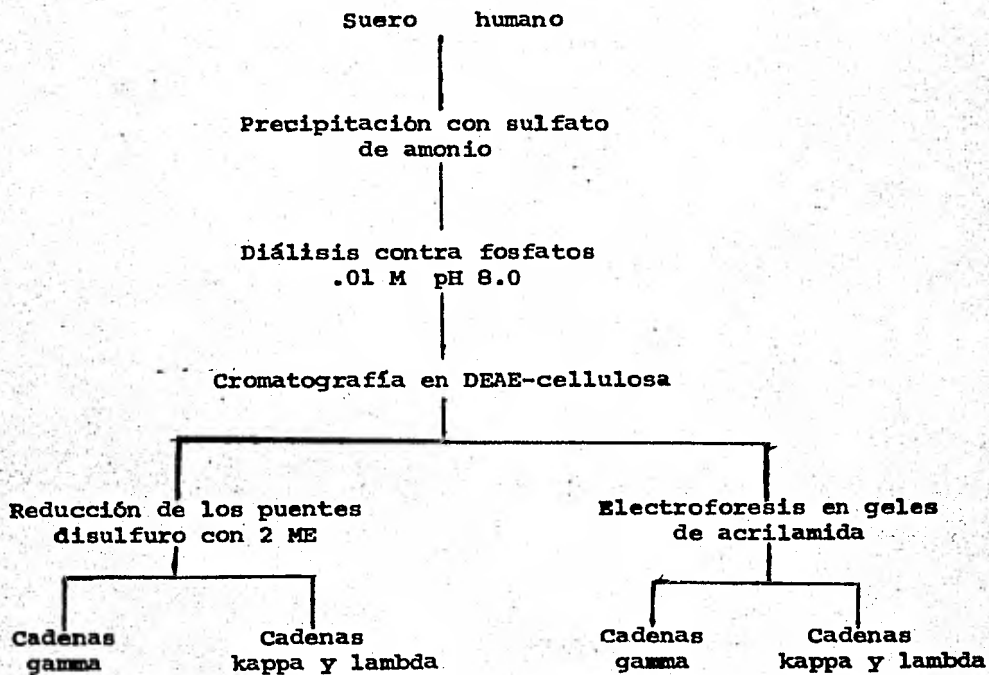


Figura No. 2.- Esquema del método utilizado para la purificación de IgG humana y la separación en sus cadenas pesadas y ligeras.

## RESULTADOS

OBTENCION DEL ANTIGENO.

En la figura No. 3 se puede observar el perfil de elusión que resulta al graficar las lecturas de densidad óptica contra el número de fracciones de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-cellulosa con solución amortiguadora de fosfatos como eluyente, la cual muestra que es posible fraccionar los diferentes componentes de una mezcla ya que cada pico teóricamente representa una molécula diferente. Se puede observar que hay un componente principal el cual eluye en las fracciones 30-50.

Al aumentar la molaridad del amortiguador se observa la elusión de otros componentes.

Al determinar la composición de cada una de estas -- fracciones se observó que la fracción No.1 estaba constituida principalmente por IgG por lo cual, siendo el objetivo a perseguir, en las siguientes cromatografías se utilizó únicamente el amortiguador a una concentración (.01 M pH 8.0) y el patrón obtenido se observa en la figura No. 4.

Dado que los estudios de pureza realizados por IEF y DLD, demostraron que la fracción No.1 estaba contaminada con otras inmunoglobulinas, estas fracciones se reunieron, se concentraron y se utilizaron en una nueva corrida en la columna de

DEAE-cellulosa y los resultados de esta cromatografía se muestran en la figura No. 5.

En las figuras Nos. 3 y 4 se encuentran otras fracciones importantes en cuyo caso se demostró que contenían IgG por lo cual se decidió reunir las, concentrarlas y utilizarlas en una cromatografía cuyos resultados se muestran en la figura No. 6 cuyo análisis cualitativo demostró que la primera fracción estaba constituida por IgG y la segunda por otras inmunoglobulinas.

La figura No. 7 muestra una IEF en donde se tiene la IgG purificada en el pozo superior, en el pozo inferior suero humano total y en el canal un suero de conejo contra suero humano, como puede observar en la muestra de IgG se revela una sola banda de precipitación.

En la figura No. 8 se puede observar que cuando se coloca al centro una muestra de IgG purificada y en los pozos periféricos antinmunoglobulinas humanas monoespecíficas (Behring) y suero de conejo contra suero humano, se detecta una sola banda de precipitación entre la anti-IgG y el antisuero contra la IgG que se encuentra en el pozo central, además estas bandas dan identidad.

El resultado de la cromatografía en Sephadex G-100 para separar cadenas pesadas de cadenas ligeras se muestra en la figura No. 9, en la cual se puede observar dos fracciones en --

las que teóricamente la primera corresponde a cadenas pesadas y la segunda a cadenas ligeras; sin embargo al analizar la pureza de estas fracciones en geles de acrilamida, la fracción de cadenas pesadas mostró contaminación con cadenas ligeras, por lo tanto el camino final utilizado para obtener cadenas pesadas fué la electroforesis en geles de acrilamida con SDS y 2 ME, e como se observa en la figura No. 10 se puede separar perfectamente dichas cadenas y por lo tanto estas fueron las fracciones utilizadas para inmunizar.

El proceso de inmunización resulta en la producción de anticuerpos contra cadenas pesadas en 2 de los 10 cerdos inmunizados.

Los pesos de los animales aparecen en los cuadros -- Nos. 1 y 2 donde se observa que el proceso de inmunización no perjudica la ganancia de peso ya que los datos entre el lote experimental cuadro No. 1 y el lote control cuadro No. 2 son muy similares. Esto mismo se puede observar en la figura No. 11 donde se grafican los datos individuales haciendo una relación entre el peso inicial y el peso final y se encuentra que todos los puntos caen cerca de una línea de regresión lineal.

Al momento de la muerte de los animales en el rastro, se colectó la sangre para proceder a la separación del suero y a la precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio al 33%.

Estas inmunoglobulinas al probarse en IEF en contra de suero humano total reaccionan con una sola banda de precipitación la cual se puede observar en la figura No. 12.

Para el montaje de las placas de IDR se procedió a estudiar primero la concentración de antisuero que permitiera el diámetro de precipitación máximo y que aun se conservara nítida la línea de precipitación. Esto se estudió con 4 concentraciones diferentes de antígeno, los resultados se observan en la figura No. 13, en base a estos datos se decidió tomar como concentración a utilizar 2.5 mg/ml. de anti-IgG.

Para ver la influencia de la concentración del Ag y poder tomar de ellas tres concentraciones que sirvieran como estándares, al montar las placas se utilizó una concentración de anti-IgG de 2.5 mg/ml. de agar y las concentraciones del Ag fueron de: .07, .077, .087, .1, .116, .14, .175, .23, .35, .7, 1.4 y 2.8 mg/ml. y entonces los resultados por cuadruplicado se observan en la figura No. 14 donde haciendo una regresión lineal se obtiene una  $R=.989$ .

Para estudiar la reproducibilidad de esta técnica se hizo un ensayo utilizando la concentración de antisuero ya establecida y efectuando 12 repeticiones de cada concentración del Ag, las concentraciones fueron: .1, .116, .14, .175, .23, .35, .7, 1.4 mg/ml.

Los resultados se observan en las figuras Nos. 15 y-



16 cuya regresión lineal muestra una  $R=.981$ .

La comparación entre los valores obtenidos utilizando los reactivos obtenidos en el presente trabajo y los reactivos que se venden comercialmente en México (Behring) se muestran en la figura No. 17 donde se puede observar que cuando se utilizan las placas y los estándares comerciales se obtienen resultados similares a los obtenidos cuando se utilizan las placas preparadas con el antisuero de cerdo.

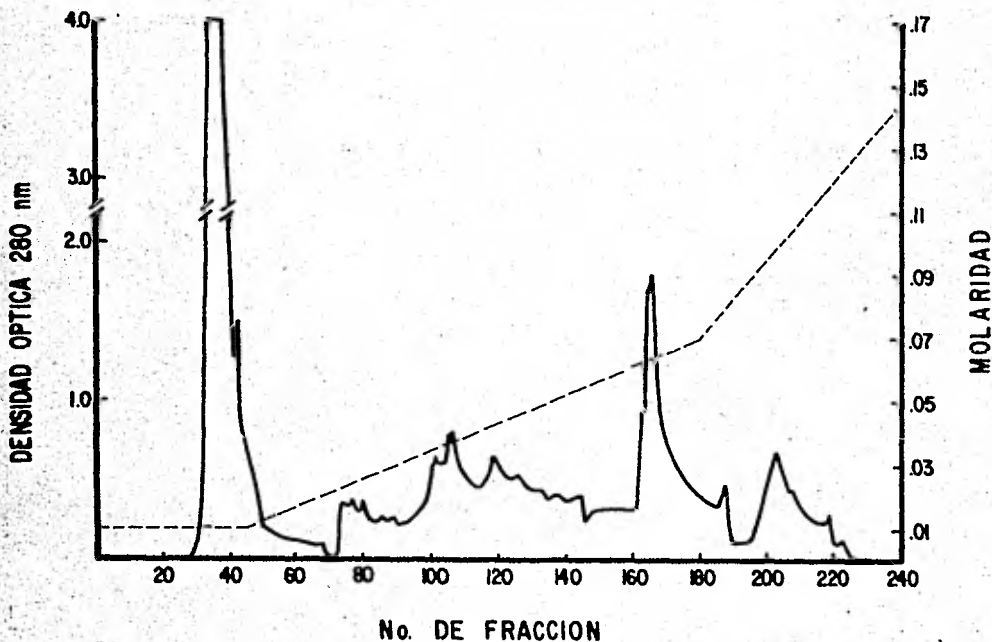


Figura No. 3.- Elusión de una muestra de inmunoglobulinas a través de una columna de DEAE-cellulosa con un -- gradiente de molaridad, graficando la densidad óptica -- contra el No. de fracciones y molaridad. Se observa la presencia de diferentes fracciones las cuales se separan para su análisis cualitativo el cual demostró que la ma yor concentración de IgG estaba en la fracción No. 1.

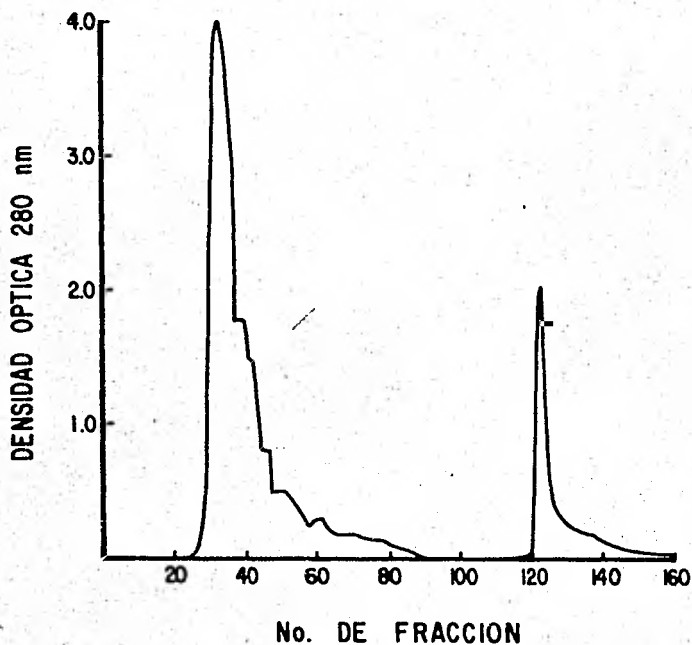


Figura No. 4.- Cromatografía de intercambio iónico utilizada una sola molaridad (.01M) de fosfatos la cual permite la separación del componente principal (IgG) en la primera fracción proteica.

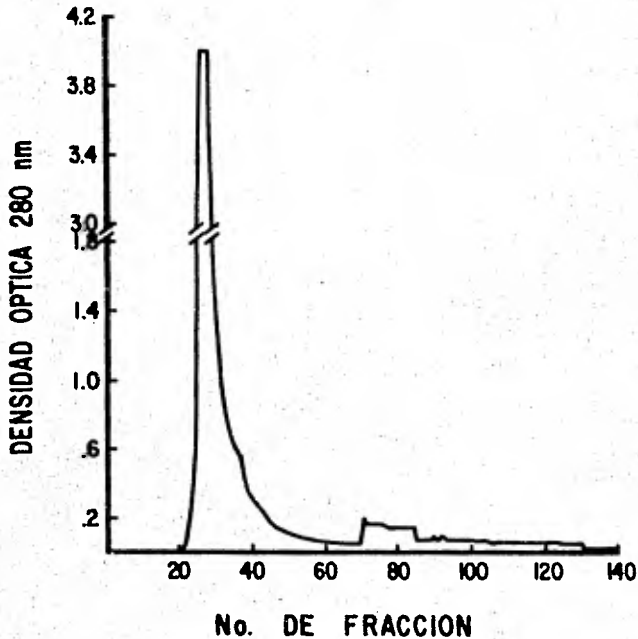


Figura No. 5.- Cromatografía del conjunto de fracciones No.1 en DEAE-Cellulosa con amortiguador de fosfatos. -- .01M pH 8.0. Se observa la salida de un componente principal (IgG) en la fracción inicial seguida de componentes minoritarios. El análisis de esta fracción demostró estar constituida exclusivamente por IgG.

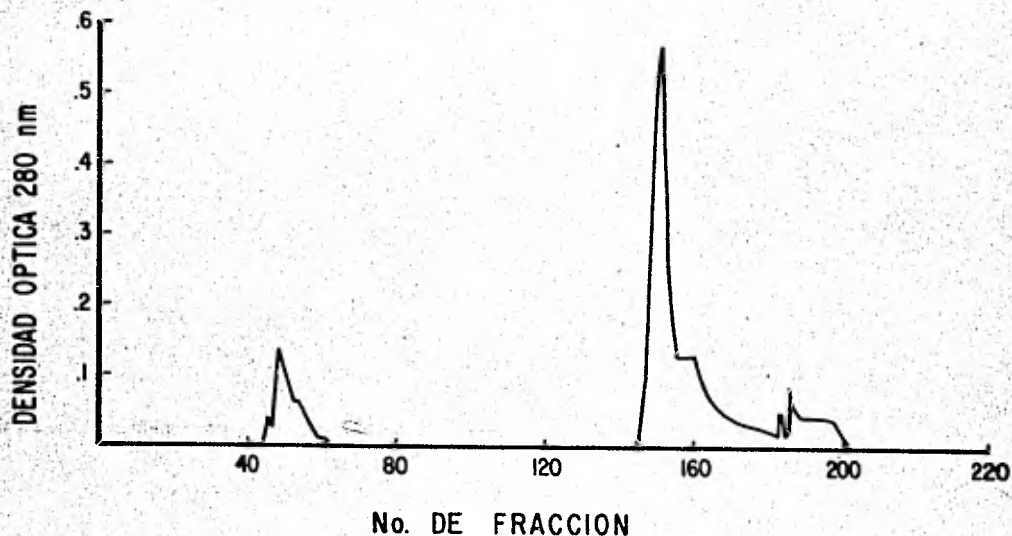


Figura No.6.- Cromatografía de las fracciones eluidas - después de la fracción de IgG cuando se utilizó amortiguador de fosfatos con molaridad creciente. Demostrando por análisis inmunoeléctroforético que, el primer pico estaba constituido por IgG y el segundo por otras inmunoglobulinas.



Figura No.7.- IDF donde se colocó suero humano en el pozo superior y una muestra de la fracción No.1 de la cromatografía observada en la Fig. No. 5 en el pozo inferior en el canal se colocó un suero de conejo contra suero humano total. A las 48 horas se observa que la muestra del pozo inferior consiste en una sola proteína que se comporta electroforéticamente como la IgG.

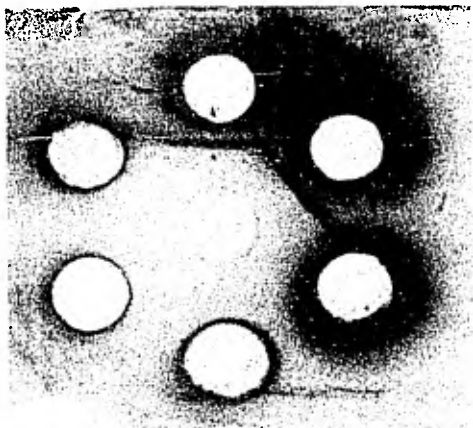


Figura No. 8.- DID en los pozos periféricos se colocaron inmunoglobulinas monoespecíficas y suero de conejo contra suero humano total y en el centro una muestra de la fracción No.1. Se observa una línea de precipitación en tre la muestra de IgG y el suero anti-IgG al igual que entre el suero de conejo y dicha muestra. Estas bandas muestran identidad total por lo cual se supone que la fracción No.1 está compuesta exclusivamente por IgG.

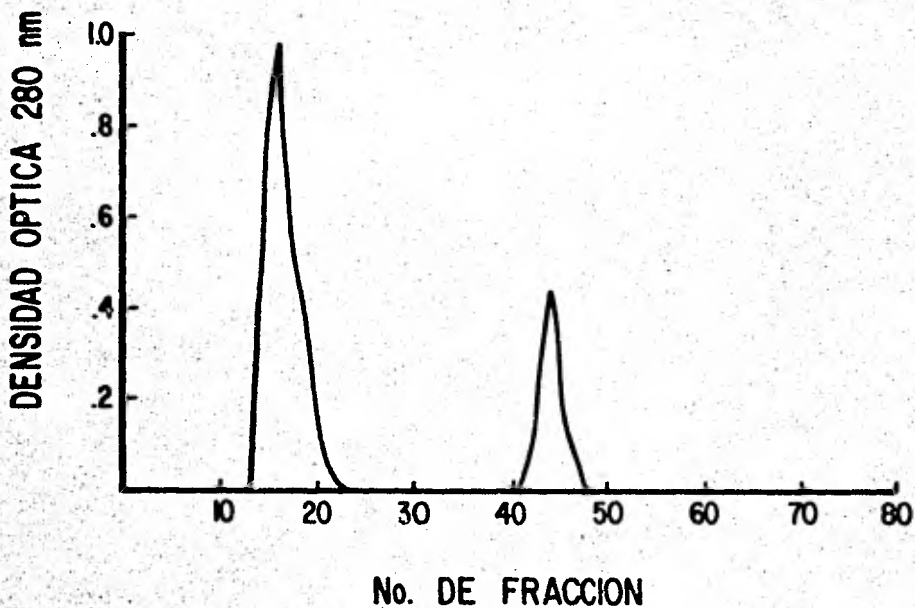


Figura No.9.- Cromatografía en Sephadex G-100 de la IgG sometida a reducción con 2 ME. Aparentemente se logra romper los puentes disulfuro entre las cadenas y la separación de las mismas en Sephadex, sin embargo, el análisis electroforético de la IgG demostró contaminación con cadenas ligeras, correspondiendo el primer pico a cadenas pesadas y el segundo a cadenas ligeras.



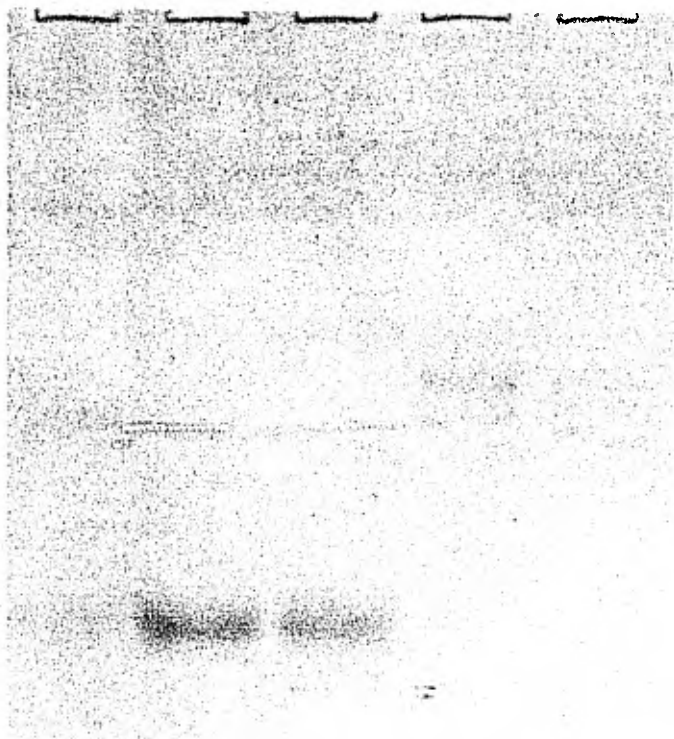


Figura No.10.- Electroforesis en placa donde se muestra este método, es posible separar cadenas pesadas de cadenas ligeras. En el carril No.1 aparece una muestra de - IgG completa, en los carriles Nos.2 y 3 cadenas ligeras y en los carriles Nos.4 y 5 cadenas pesadas las cuales habían sido separadas previamente en un gel de acrilimida usando 2 ME.

## GRUPO EXPERIMENTAL

	PESO INICIAL				PESO FINAL
1	71	79	85	90	100
2	71	71	77	82	88
3	76	81	86	90	97
4	63	66	72	77	85
5	65	66	70	76	83
6	53	63	82	87	89
7	57	66	84	91	96
8	65	74	89	98	103
9	56	64	X		
10	63	76	86	95	96
TOTAL	640				837
PESO X / ANIMAL	64.0				93.7

Cuadro No.1.- Relación de los pesos de los cerdos del lote experimental, mostrado que el proceso de inmunización no perjudica la ganancia de peso puesto que el promedio por animal es adecuado para su salida al mercado. Estos pesos fueron registrados cada 2 semanas.

X-Una semana después del segundo estímulo antigénico, este cerdo murió a causa de una neumonía bacteriana.

## GRUPO CONTROL

	PESO INICIAL				PESO FINAL
1	70	81	84	97	101.5
2	52	60	66	74	77
3	62	70	79	90	94
4	67	78	86	102	106
5	50	55	62	70	75
6	45	53	60	67	75
7	43	49	56	64	73
8	43	56	64	73	81
9	60	69	78	91	102
10	48	61	68	81	91
<b>TOTAL</b>	<b>540</b>				<b>875.5</b>
<b>PESO X / ANIMAL</b>	<b>54.0</b>				<b>87.55</b>

Figura. No.2.- Relación de los pesos de los cerdos del lote control. Se puede observar que estos son similares a los pesos del lote experimental y su registro se llevó a cabo en el mismo período que el lote experimental.

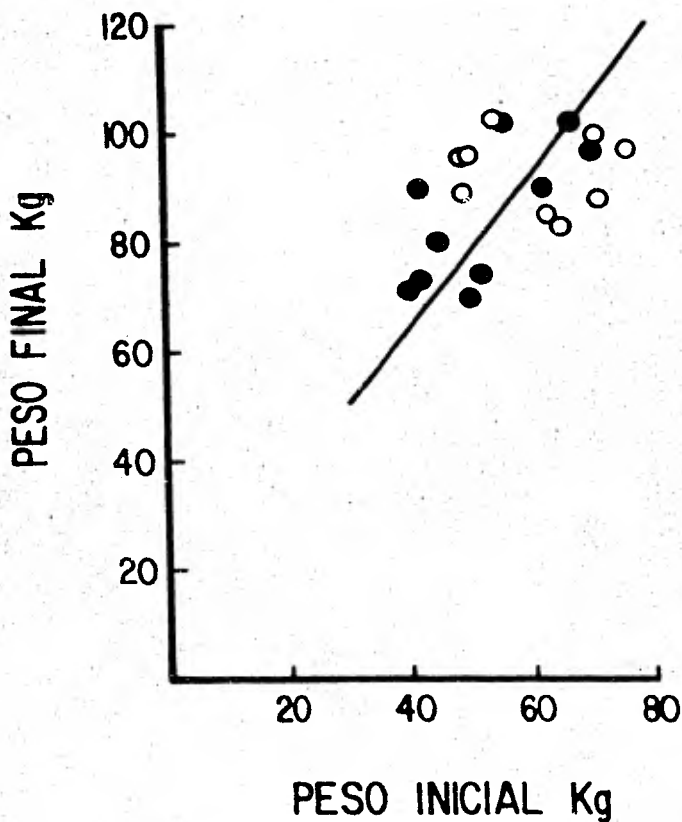


Figura No.11. Gráfica que demuestra que el peso final - de los cerdos experimentales al igual que el de los controles está en relación directa con el peso inicial, ya que la relación de las 2 mediciones originan puntos que caen muy cerca de una línea de regresión lineal. Los -- círculos vacíos (○) corresponden a los animales experi- mentales y los círculos completos (●) corresponden a -- los animales del grupo de control.

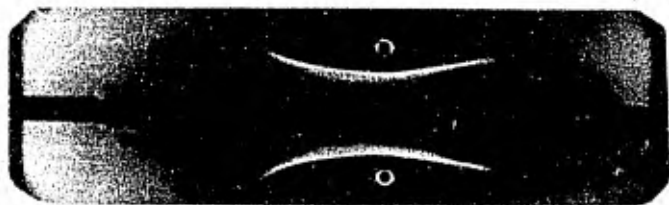


Figura No.12.- IEF donde se coloca suero humano total en los pozos y en el canal el suero de los cerdos inmunizados con cadenas gamma, se encuentra una sola línea de precipitación lo cual demuestra que la inmunización fué realizada con un solo Ag.

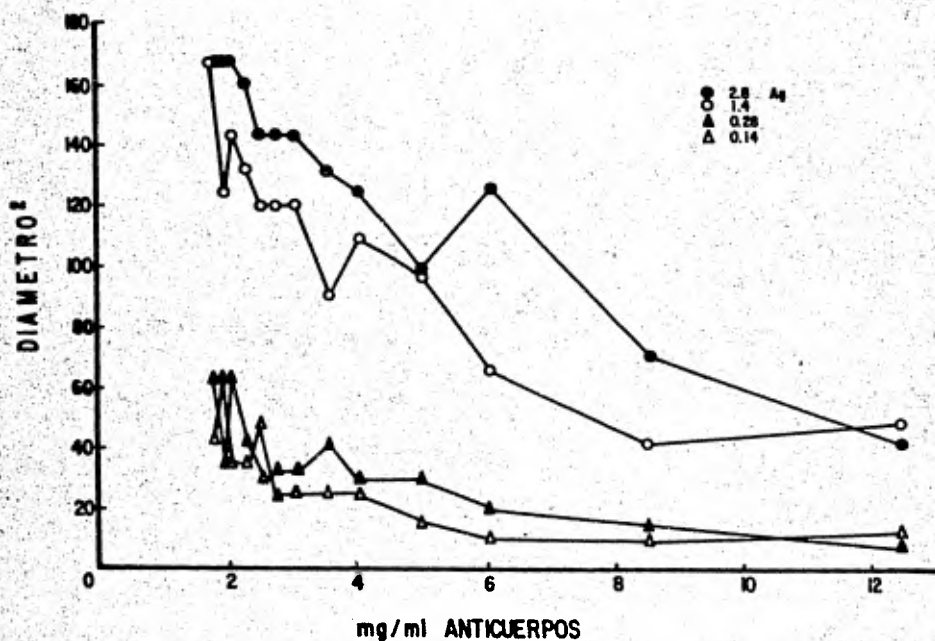


Figura No.13.- Esta gráfica muestra el diámetro observado a las 48 horas en la IDR utilizando 4 concentraciones del Ag y una serie de concentraciones de Acs. La máxima dimensión alcanzada aún con perfecta nitidez del halo de precipitación fué al utilizar 2.5 mg de Acs. con las distintas concentraciones del Ag.

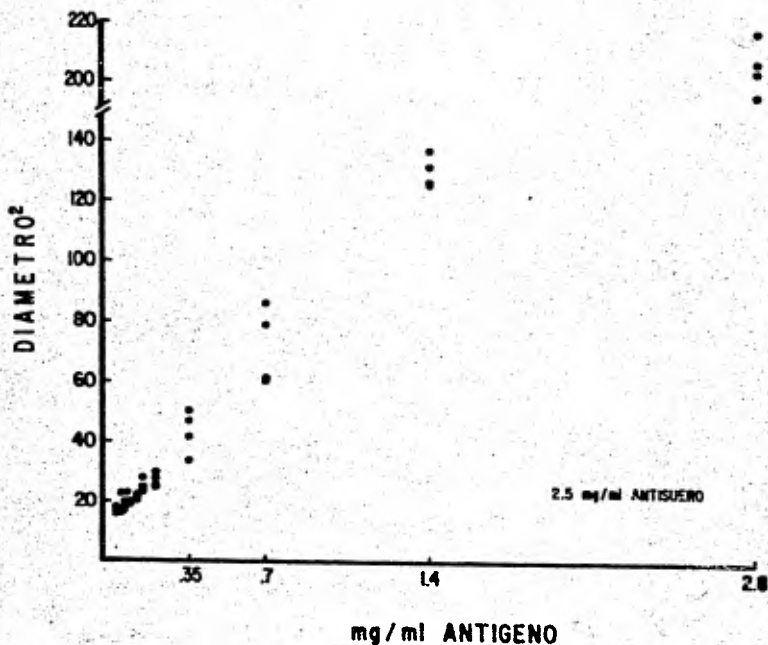


Figura No.14.- Gráfica dada al estudiar la dimensión del diámetro del halo de precipitación contra diferentes concentraciones del Ag, se observa que existe una línea recta clara hasta la concentración de 1.4 mg/ml de IgG humana purificada y la pendiente cae cuando se aumenta la concentración a 2.8 mg/ml.

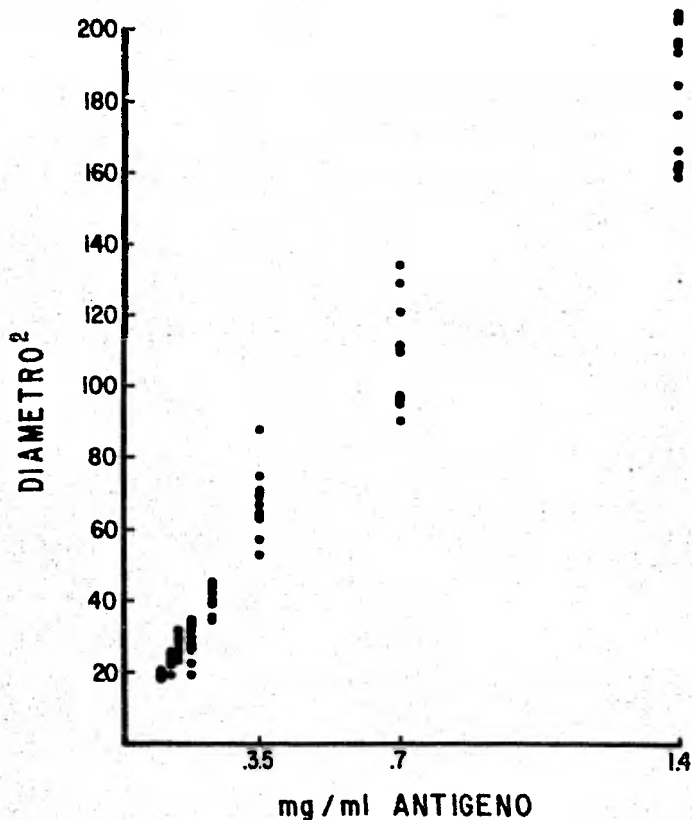


Figura No.15.- Al utilizar diferentes concentraciones de Ag: .1, .116, .14, .175, .23, .35, .7, 1.4 mg/ml a una concentración constante de Acs (2.5mg/ml), se observa que las replicaciones de las diferentes concentraciones de Ag muestran un buen grado de similitud por lo que se establece la confiabilidad del sistema.



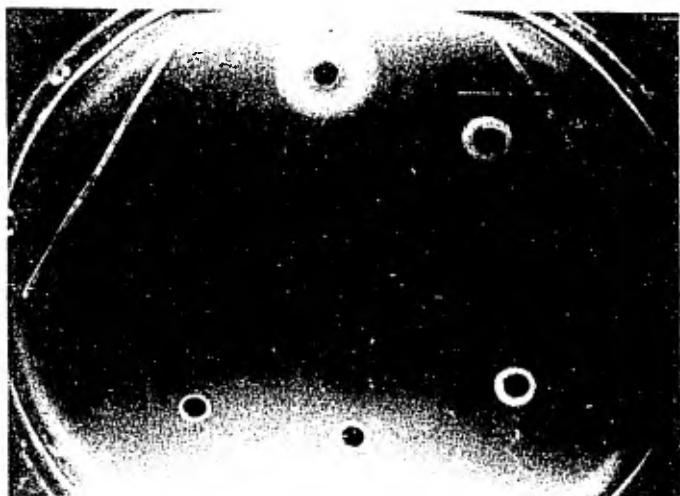


Figura No.10.- Placa de IDR en la que se muestra objetivamente los resultados obtenidos al preparar placas con una concentración de Aca de 2.5 mg/ml. Se hicieron 12 - réplicas de cada una de las concentraciones utilizadas - que son: .10, .16, .17, .25, .25, .3 y 1.4 mg/ml.

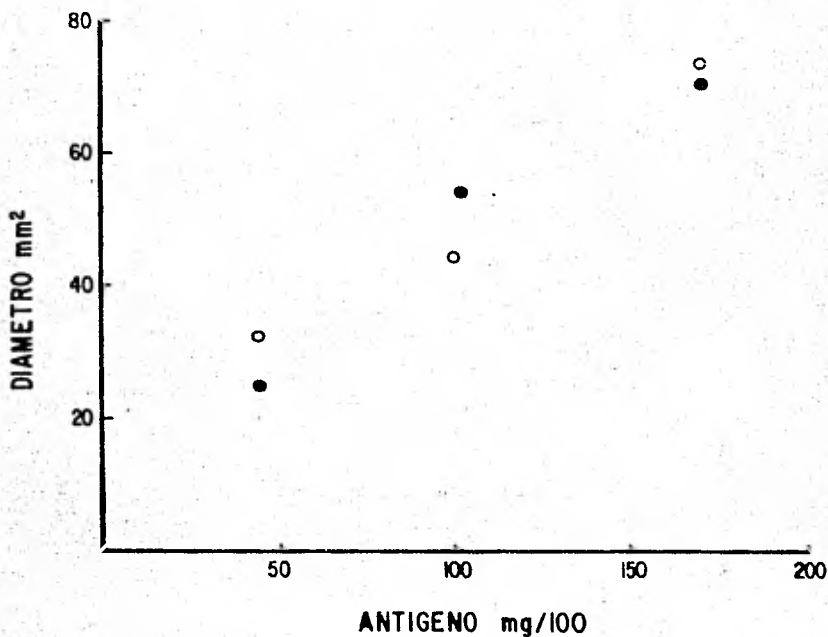


Figura No.17.- Gráfica dada al comparar los valores obtenidos utilizando los reactivos obtenidos en el presente trabajo representados por los círculos vacíos (O) y los reactivos que se venden comercialmente cuyos valores están representados por los círculos completos (●). Se observa que se logra la misma sensibilidad en los dos sistemas dado que la pendiente de la curva es similar. Las concentraciones del antígeno en el sistema Behring son: .102, .44, .1.7 mg/ml, en el sistema montado en el laboratorio son: .175, .35, 1.4 mg/ml.

## DISCUSION.

La purificación de moléculas plantea problemas metodológicos cuyo grado de dificultad varía dependiendo de múltiples factores: físicos, químicos y en el caso de moléculas biológicamente activas, habitualmente se persigue su separación con la conservación de sus propiedades biológicas, en el presente trabajo se mostraron algunas técnicas ya descritas para la separación de cadenas gamma humanas.

En el proceso de purificación de IgG humana, se encontró que la precipitación con sulfato de amonio permite la concentración de inmunoglobulinas, pero no la separación de otros componentes del suero de los que solamente se logra disminuir su concentración.

La cromatografía de intercambio iónico utilizando DEAE-cellulosa permitió, cuando se empleó repetidamente la purificación de IgG aprovechando la carga eléctrica neta de la molécula cuando está en solución con pH 8.0, Es necesario aclarar, sin embargo que la capacidad de resolución de la resina es mucho menor de la especificada por el fabricante por lo cual es necesario utilizar concentraciones menores de las muestras a separar.

Por otro lado no fué posible separar cadenas pesadas de cadenas ligeras utilizando el método descrito por Edelman --

(5) y fué necesario hacerlo por medio de electroforesis en gel de acuerdo a la técnica de Osborn y cols. (20), método que fué eficiente para lograr este objetivo.

Por otra parte el proceso de inmunización resultó en la producción de anticuerpos solo por 2 de los 10 cerdos inmunizados, lo cual hizo necesario investigar el porqué de este fenómeno, fué lógico pensar que pudieran existir determinantes antigénicos comunes a ambas moléculas, a pesar de que la relación filogénica entre el cerdo y el hombre no parezca cercana.

Por IEF se logró demostrar que un antisuero en contra de cadenas gamma humanas reconoce una protefina del suero de cerdo que migra electroforéticamente muy similar a la IgG; inversamente un antisuero contra IgG de cerdo precipita a una porción del suero humano que migra similarmente a la IgG. Estos resultados se muestran en la figura No.18.

Cuando se investigó la similitud entre cadenas Kappa y lambda, no se logró detectar reacciones cruzadas como se muestra en la figura No.19, a pesar que solo se utilizaron antisueros contra cadenas kappa y lambda humanas.

Este hallazgo sugería fuertemente ser el causante de lo nó respuesta de los cerdos al proceso de inmunización, lo cual fué reforzado por el hecho de que cuando estos animales se inmunizaron al mismo tiempo con la IgG humana e IgG de caballo, solamente respondieron con la producción de anticuerpos-

contra IgG de caballo.

Esto abre un campo de grán interés desde el punto de vista biológico y médico ya que esta similitud puede servir para tratar de resolver problemas de Filogénia, Ontogénia y Genética de las inmunoglobulinas (16); así mismo la incapacidad -- del cerdo de responder inmunológicamente a la administración -- de IgG humana hace necesario estudiar más a fondo este parecido entre la IgG humana y porcina, pues si el humano se comporta de igual manera a la administración de IgG porcina, esto -- significaría una gran oportunidad de seroterapia en humanos con sueros heterólogos sin problemas de hipersensibilidad por complejos que se observan con la administración de suero de caballo y con grandes ventajas dada la forma de producción de antisueros en cerdos.

Dado el parecido entre la IgG de cerdo y la humana, -- es posible que se pueda implementar esta seroterapia en el humano con poco riesgo de sensibilización y tratar así de interferir con la patología que causa el mayor número de muertes, en los recién nacidos, la gastroenteritis (16).

El objetivo fijado inicialmente montaje de la técnica de IDR para la cuantificación de IgG de humano -- fué alcanzado totalmente, ya que se logró implementar la técnica con resultados comparables a los del producto comercial vendido en México en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad.

Es necesario aclarar que si se produjera sistemáticamente este método de cuantificación de IgG humana, el costo se reduciría en más de 100 veces comparativamente al valor con -- que se venden comercialmente las placas.

Este sistema de producción de antisueros en animales destinados al consumo humano, introduce un cambio en la Zootecnia, ya que aprovecha un recurso de desecho en la elaboración de un producto valioso de gran importancia como método de diagnóstico en clínica humana.

Además este método como se demuestra en el cuadro -- No. 1, no modifica el incremento de peso registrado en los animales experimentales el cual es similar al registrado en los cerdos del lote control, esto significa que el aclopar la industria de producción de biológicos no perjudica la de producción de carne, ya sea registrado en forma de peso o calidad de la canal, puesto que en el momento de la inspección sanitaria estas fueron clasificadas aptas para consumo humano.

La producción masiva de anticuerpos explorada en este estudio abre otra área de trabajo, la seroterapia por vía oral en animales destinados a la producción de carne para consumo humano.

Se conoce que muchos animales nacen sin anticuerpos y que los adquieren durante los primeros días de vida con el calostro que ingieren de la madre, y de esta manera les permi-

te adquirir cierta resistencia a diversos gérmenes patógenos (15).

Los recién nacidos, sin embargo dada esta deficiencia inmunológica son más susceptibles de sufrir enfermedades infecciosas que ocasionan un gran número de muertes (10).

Dado que se puede adquirir resistencias a dichas enfermedades por el traspaso de anticuerpos de la madre al recién nacido por medio del calostro, es probable o al menos parece ser factible el que se pudiera proteger a estos animales contra los agentes patógenos más frecuentes en una comunidad, administrándoles anticuerpos por vía oral (15); de dar resultado se disminuiría la mortalidad postnatal tan alta que se registra en México (19), y eso a su vez incrementaría la producción de carne para consumo humano.

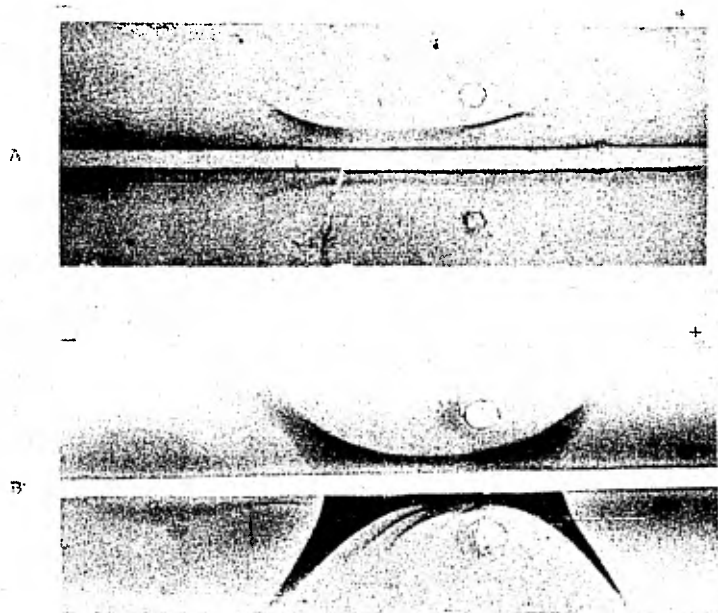


Figura No.10.- IEF donde se coloca en los pozos superiores suero humano y en los pozos inferiores suero de cerdo. En el canal A se colocó suero monoespecífico anti-IgG humana, en el canal B se colocó suero anti-inmunoglobulinas de cerdo. Se observa que en ambos sistemas existe el reconocimiento en común de una proteína del suero que migra electroforéticamente en forma similar a la IgG.



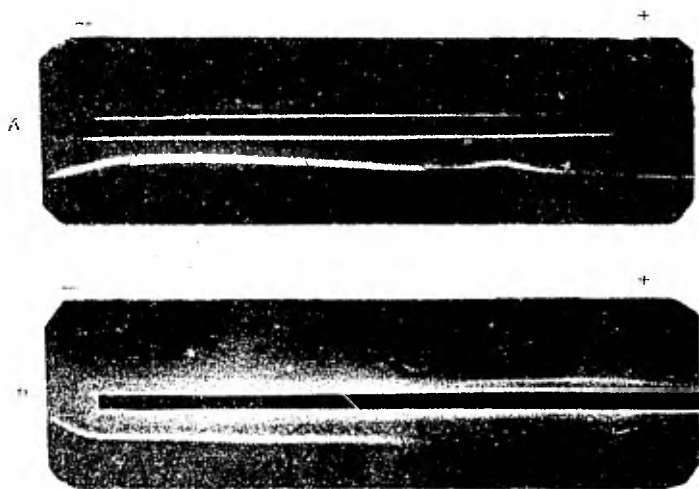


Figura No.19.- IEF donde se coloca suero humano en los pozos inferiores y suero de cerdo en los pozos superiores. En el canal A se colocó suero anticadenas Kappa humanas y en canal B suero anticadenas lambda humanas. Se observa la formación de una línea de precipitación en los sueros humanos pero no se demuestra la precipitación en el suero de cerdo.

## CONCLUSIONES

- 1.- Se logra el objetivo principal de cuantificar -- IgG humana por medio de la técnica de IDR utilizando la sangre de cerdos destinados al consumo humano.
- 2.- El método desarrollado logra implementarse con la sensibilidad, precisión y reproducibilidad que el producto que se vende comercialmente en el mercado nacional.
- 3.- El protocolo de inmunización diseñado, permite administrar los estímulos antigénicos al final del período de desarrollo con lo cual no se lesiona el incremento de peso registrado en esta etapa del crecimiento.
- 4.- Se modifica la enseñanza de la Zootecnia al introducir un método que permite utilizar un subproducto como reactivo en pruebas biológicas de alta sensibilidad cuya tecnología no ha sido implementada en el país.
- 5.- Se establece que la electroforesis en geles de acrilamida resulta en el mejor método para obtener cadenas pesadas de inmunoglobulinas.
- 6.- El parecido inmunológico encontrado entre la IgG humana e IgG de cerdo, a parte de su interés biológico, elimina al cerdo como productor industrial de anti-cadenas gamma humanas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barbosa, H.; Ravines, J.; Garza, J. y Larralde, C. Producción masiva de Antitoxina tetánica en cerdos. Técnica Pecuaria, en prensa, 1981.
- 2.- <sup>b</sup>Barbosa, H.; Larralde, C.; Molinari J.L.; Del Arco, R. Aspectos Inmunológicos en la producción Industrial de Antitoxinas. Ciencia Veterinaria Volumen I, U.N.A.M. pp. 42-54, 1976.
- 3.- Campbell, D.H.; Garvey, J.S.; Cremer, N.E.; Sussdorf, D.H. Methods in Immunology. second Ed. W.A. Benjamin Inc. pp. - 235-278, 1970.
- 4.- Cuatrecasas, Pedro. Protein Purification by affinity Chromatography. Journal of Biological Chemistry. Vol. 245, - No. 12, pp. 3059-3065, 1970.
- 5.- Edelman, G.M. and Fougereau, M. Corroboration of recent - Models of the G Immunoglobulin Molecule. Journal Exp. -- Med. Vol. 121, pp. 373-393, 1965.
- 6.- Flisher, Ana. Inmunología de la Cisticercosis Humana tesis doctoral. Escuela de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. p. 20, 1978.
- 7.- Preda, V.J. et al: Prevention of Rh hemolytic Disease: -- tenyer's clinical experience with Rh immune globulin. N Engl Journal Med. Vol. 292, pp. 1014-1038, 1975.
- 8.- Fudenber, H.H. & others. Primary immunodeficiencies Re-- port of a World Health Organization Committee Pediatrics. - cap. 47. pp. 927, 1971.
- 9.- Fundenber, H.H.; Sitites, Daniel P.; Caldwell, Joeseph L. and Wells J. Vivian. Basic & Clinical Immunology, second -

Ed. cap. 43, 1978.

- 10.- Kirk, P.L. Kjeldahl Metho for total Nitrogen. An. Al. Chemical. vol. 22, 354-358, 1959.
- 11.- Kurczyn Ruiz, G.; Garza, J.; Olguin, F.; Quintana, F. -- Efecto de la adición al calostro del suero sanguíneo, albúmina y gamma globulinas en lechones. Vet. Méx. vol 7 pp. 124-131, 1976.
- 12.- Laurente, T.C. and Killander, J. A theory of filtration - and its experimental verification. Journal of Chromatography. vol. 14, pp. 317-330. 1964.
- 13.- Mancini, G.; Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. Immuno--chemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immuno diffusion. Immunochemistry. Pergamon Press. vol. 2, pp. - 235-254, 1965.
- 14.- Ouchterlony, O. Antigen-Antibody reactions in gels. Acta - Pathol. Microbiol. Scand; vol. 26 pp. 507-515 1949.
- 15.- Quiróz Pérez, J.; Olguin, F.; Garza, J. Anticuerpos adquiridos pasivamente en relación con mortalidad e incremento de peso en lechones. Vet. Méx. vol. 6, pp. 84-91, 1975.
- 16.- Sánchez Rebolledo, J.M. y Gutiérrez, G. Manual de Infectología. Gastroenteritis. 5a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. cap.I, 1977.
- 17.- Sela, M. The Antigen. Philygeny of Immunoglobulins Academic Press Incor. vol. I cap. 6 pp. 417-477, 1974.
- 18.- Sober, H.A. and Peterson, E.A. Protein Chromatography en ion exchange cellulosa. Federal Proceedings vol. 17, pp. 1116-1126, 1958.

- 19.- Uruchurtu, A. y col. Un estudio sobre la mortalidad de lechones en México. Vet. Méx. vol. 7 pp. 111-123, 1976.
- 20.- Vyas, G.N.; Stites, D.p.; Brechner, G. Laboratory Diagnosis of Immunologic Disorders. Grune & Stratton ed. 1975.
- 21.- Weber, K. and Osborn, M. The Reability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis. Journal Biol. Chem. vol 244, pp. 4406-4412, 1969.
- 22.- Williams, C.A.; & Chase, M.W. Methods in immunology and immunochemistry. Preparation of antigens and antibodies. - vol I Academic Press. pp. 318-330. 1967.