

21
2 Jim

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

OBTENCION DE ANTICUERPOS
ESPECIFICOS A C3 HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

DIANA LEZCANO MEZA

DIRECTOR: DR. LUIS ANGEL TERAN ORTIZ



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.

INDICE

1	INTRODUCCION	1
	COMPLEMENTO	2
	TERCER COMPONENTE DEL COMPLEMENTO. . .	11
	OBJETIVOS.	21
2	TRABAJO EXPERIMENTAL	22
	PURIFICACION DE C3	24
	CARACTERIZACION DE C3.	35
	PRODUCCION DE ANTICUERPOS.	40
	CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS	40
	APLICACION DE LOS ANTICUERPOS.	40
3	RESULTADOS	43
4	CONCLUSIONES	53
5	BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUCCION

El sistema del complemento constituye junto con el aparato inmune el mecanismo de defensa de los animales vertebrados, está formado cuando menos por 20 proteínas en su mayoría termolábiles que se encuentran normalmente en circulación y se activan unas a otras en dos secuencias determinadas, una iniciada por la formación de complejos antígeno-anticuerpo y la otra sin necesidad de éstos.

Los efectos biológicos generados en este sistema pueden ser clasificados en tres grupos: 1) enzimáticos, 2) quimiotácticos y 3) modificadores de la permeabilidad vascular; cuya finalidad es la lisis celular, promover la fagocitosis y el proceso inflamatorio, viéndose así razón para suponer que severas deficiencias en uno o más componentes del complemento pueden estar asociados con susceptibilidad a la infección (1).

COMPLEMENTO

El complemento tiene dos vías de activación, la vía --- clásica y la vía alterna.

Los componentes de ambas vías de activación han sido -- caracterizados fisicoquímica y funcionalmente en el hombre.

En las especies menores el conocimiento de este sistema es menos completo pero con los datos que se tienen es sufi-- ciente para permitir un análisis filogénico de éste.

En las clases Arthropoda y Equinodermata pertenecientes al grupo de los invertebrados, se ha demostrado únicamente -- la presencia de la vía alterna y de los componentes termina-- les del sistema, lo que indica que la llamada vía alterna es la primera en desarrollarse, aun antes que la respuesta in-- mune con la cual se conectará posteriormente. Dentro de los vertebrados, los Ostracodermos (Agnatha) son la especie me-- nor que presenta desarrollo de la respuesta por medio de an-- ticuerpos, sin embargo, no ha sido posible demostrar la pre-- sencia de los componentes de la vía clásica. En la clase --- Condrictia se ha demostrado la presencia de la vía alterna y se logró aislar al componente C9. Con los estudios realizados hasta el momento, los únicos animales en los que se ha de--- mostrado la presencia de la vía clásica son los mamíferos(2).

Cada vía es iniciada por diferentes agentes activadores, siguiendo una secuencia determinada hasta que ambas conver-- gen en una ruta común cuya finalidad es la destrucción de -- partículas extrañas.

VIA CLASICA

Los componentes de esta vía podemos clasificarlos según su función en dos grupos:

- 1) Proteínas activas: C1, C2, C3 y C4.
- 2) Inhibidores: C1 inhibidor (C1 INH), Proteína enlazante a C4 (C4bp), C3b inactivador (C3b INA) y β 1H.

Esta vía es activada por complejos antígeno-anticuerpo, agregados de Ig G, DNA, proteína C reactiva y algunas membranas celulares (3,4).

La molécula encargada de iniciar la activación es C1, la cual está formada por tres subunidades denominadas C1q, C1r y C1s. C1q se une a la región FC de las inmunoglobulinas o bien por unión directa con la molécula activadora cuyos cambios conformacionales activan a C1r el cual a su vez activa a C1s que es la subunidad que posee actividad proteasa sobre las moléculas C2 y C4, rompiendo a cada una de ellas en dos fragmentos: C2a, C2b, C4a, C4b, generándose la formación del complejo C4b,2a (C4,2) también denominado "C3 convertasa", complejo enzimático encargado de actuar sobre el componente C3 rompiéndolo en dos fragmentos, C3a y C3b, y formar el complejo C4,2,3b con actividad "C5 convertasa" (4,5).

La regulación de esta vía (4,5) es realizada de la siguiente forma:

- 1.- El C1 INH actúa inhibiendo la actividad enzimática de C1s por formación de un complejo firme e irreversible con él.
- 2.- La molécula C3b INA rompe a C3b, dando como resultado la formación de C3bi que es una molécula inactiva.
- 3.- El β 1H es un regulador que se une a C3b favoreciendo así la acción de C3b INA, es por ello que β 1H es denominado C3b INA acelerador.
- 4.- La proteína C4bp se une a C4b y facilita así su destrucción por C3b INA.

VIA ALTERNA

Esta vía también es conocida con el nombre de ¹vía de la properdina. Está constituida por seis proteínas: Factor B, Factor D, C3 y properdina, denominadas moléculas activas; y β 1H y C3b INA son los inhibidores de esta ruta.

Su activación inmunológica puede ser por IgA y por IgG pero lo más importante de esta vía es que puede ser activada por complejos de polisacáridos, lipopolisacáridos, bacterias, virus, células infectadas por virus y parásitos en ausencia de anticuerpos específicos, por lo cual constituye el componente molecular importante de defensa natural, donde no es necesaria la formación del complejo antígeno-anticuerpo para su activación (3,6).

El proceso de activación de la vía alterna se puede dividir en dos etapas: Iniciación y Amplificación.

La etapa de iniciación consiste en el depósito de C3b sobre las partículas biológicas, esto requiere del rompimiento enzimático de C3 en la fase fluida y generación de C3b capaz de unirse a dichas partículas. Aparentemente hay generación constante de C3b, por rompimiento espontáneo de C3, el cual al interactuar con el factor B en presencia de iones Mg^{++} y factor D, el factor B es dividido en dos fragmentos, Ba y Bb, formándose el complejo C3b,Bb capaz de romper más C3. Una vez que C3b se ha unido a la superficie celular está sujeto a dos procesos competitivos: Amplificación y Control.

Durante la amplificación se depositan más moléculas de C3b alrededor de la molécula original de C3b. Este proceso se inicia con la formación del complejo C3b,Bb, el cual tiene una vida media de 1.5 min. a 37°C debido a la disociación espontánea de la subunidad Bb en forma inactiva, el sitio activo de esta enzima se encuentra precisamente en el fragmento Bb, es por ello que requiere de la properdina pues actúa como estabilizador, de tal manera que su vida media a 37°C se incrementa a 10 min. (3,4).

El complejo formado es C3b,Bb(P) capaz de actuar sobre las moléculas C3 y C5.

El proceso necesita de un control eficiente, pues de lo contrario se depositarían moléculas de C3b en forma indiscriminada sobre células del huésped y partículas extrañas.

El mecanismo de regulación se debe inicialmente a la -

proteína sérica $\beta 1H$ que se une a C3b, evitando así que éste interactúe con el factor B, formando el complejo C3b, $\beta 1H$ que es rápidamente inactivado por C3b INA.

El proceso por medio del cual se activa el mecanismo de control o de amplificación no se ha determinado todavía pero se han propuesto algunas explicaciones para esto.

- 1.- Se sugiere que los carbohidratos cargados negativamente tales como membranas celulares unidas a ácido siálico y heparina, incrementan la afinidad de C3b unido a la membrana por $\beta 1H$, pero no para Bf.
- 2.- Propone que el sitio de reconocimiento de C3b, es capaz de interactuar con ciertas estructuras comunes para los activadores de la vía alterna y estas interacciones debilitan el sitio de unión entre $\beta 1H$ y C3b (3,4).

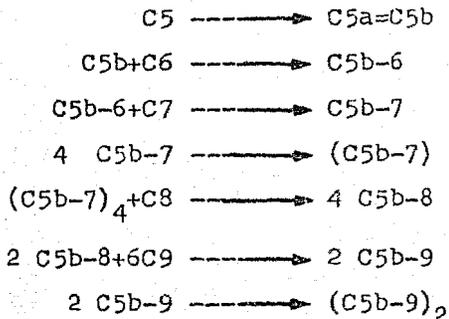
VIA COMUN

Fase de ataque a la membrana

Está constituido por las reacciones de C5 a C9. El complejo originado aquí es el responsable de la actividad membranolítica del complemento.

Esta fase se inicia con la activación de C5, lo cual puede suceder por cualquiera de las dos vías, es decir, por C4,2,3b o bien por C3b,Bb(P), rompiéndolo en dos fracciones, C5a que es un péptido biológicamente activo y C5b el cual se une a C6 y C7 de manera estable y se enlaza a la membrana, este complejo tiene una estructura tetramérica. A este com-

plejo se le une C8 y forma un complejo C5b-8, dos de estos complejos se unen debido a la molécula C9 dando lugar al complejo $(C5-9)_2$ que es el responsable de la lisis celular (3).

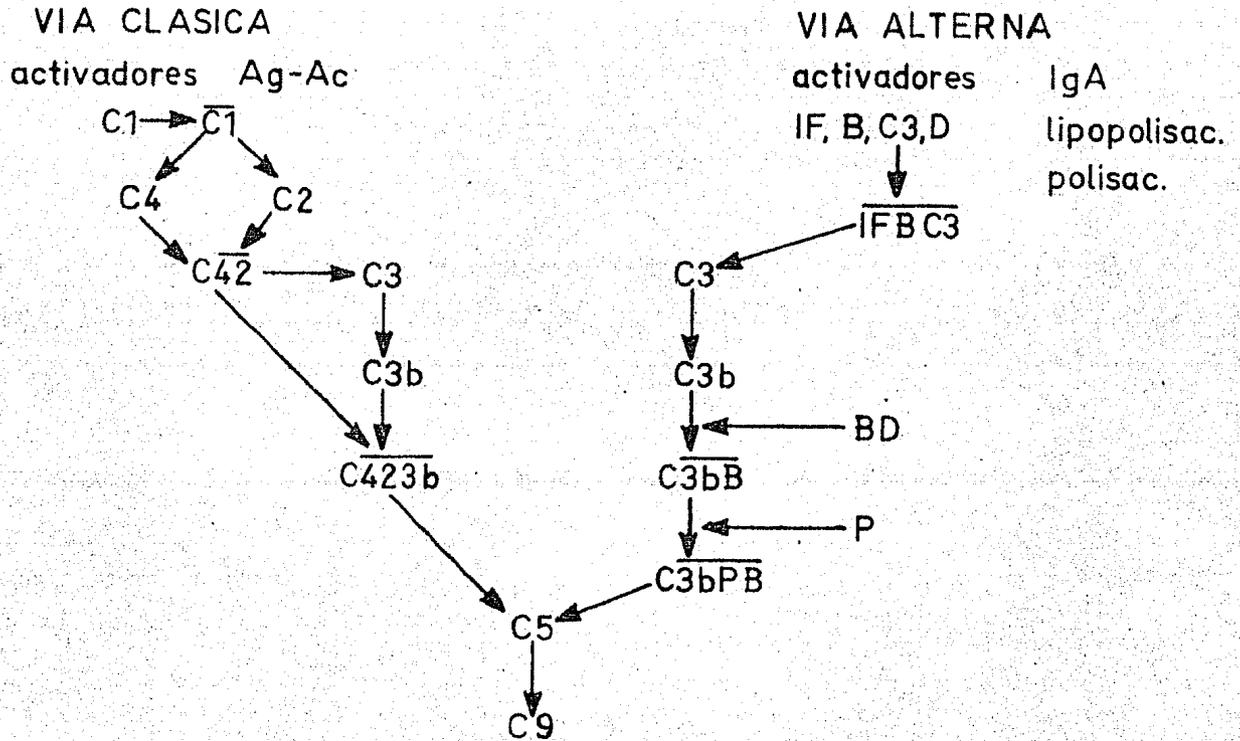


El mecanismo de regulación lo ejerce la proteína S, la cual se enlaza al complejo C5b-7 modulando de esta forma su capacidad citolítica.

Durante el desarrollo de las reacciones del complemento se generan una serie de actividades biológicas que indudablemente juegan un papel muy importante en numerosos fenómenos inflamatorios de origen inmunológico y no inmunológico.

Estas actividades son causadas por algunos fragmentos de los componentes liberados durante la activación, complejos multimoleculares y por ciertos componentes sin sufrir modificación alguna (1,4). En la tabla #1 se muestran algunas de estas funciones.

FIG 1 VIAS DE ACTIVACION DEL COMPLEMENTO



ref 5

TABLA # 1

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL COMPLEMENTO

ACTIVIDAD	COMPONENTES
Sobre células	
Quimiotaxis sobre polimorfonucleares y macrófagos	C3a, C5a
Incrementa movilidad de polimorfonucleares.	Ba
Inhibición de la migración de macrófagos y difusión de macrófagos.	Bb
Movilización de linfocitos medulares	C3c
Agregación y marginación de polimorfonucleares en circulación y neutropenia (in vivo)	C5a
Agregación de polimorfonucleares (in vitro)	C5a
Secreción de proteasas por macrófagos	C3b
Liberación de enzimas lisosomales de polimorfonucleares.	C5a
Inmunoaderencia	C4b, C3b
Opsonización	C3b
Estimulación de linfocitos B	C3b
Liberación de histamina por plaquetas	C3, C1-6, C1-9.

(ref.4)

TABLA # 1
(CONTINUACION)

Citólisis	C8, C9
Modulación de la respuesta inmune	C3b, C4b, C3d
Sobre complejos inmunes	
Agregación	C1q
Solubilización	C3b
Sobre vasos y fibras de músculo liso	
Incrementa permeabilidad vascular y contracción del músculo liso	C3a, C5a
Sobre formación de inmuncongultininas	C3b
Sobre coagulación	
Mecanismo dependiente de plaquetas (solo conejo)	C6
Sobre virus	
Neutralización de herpes virus	C1, C4
Lisis de células infectadas con virus oncogénicos	C1q, C1-9

(ref.4)

TERCER COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C3)

La molécula de C3 fue el primer constituyente del complemento reconocido, aislado y descrito por Müller-Eberhard en 1960.

TABLA # 2

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL C3

Peso molecular	180 000 Daltons (D)
Movilidad electroforética	beta
Constante de sedimentación	9.5 S
Coefficiente de extinción (E_{280})	10
Contenido de carbohidratos	2.7%
Cantidad en plasma	80-130 mg%

ESTRUCTURA QUIMICA

La molécula está formada por dos cadenas polipeptídicas, una de ellas con movilidad electroforética de alfa globulina, constituida por 906 aminoácidos y peso molecular de --- 110 000 Daltons y la otra de movilidad electroforética beta, consta de 660 aminoácidos y un peso molecular de 70 000 Daltons unidas por puentes disulfuro (3).

La serina es el aminoácido del N-terminal en ambas cadenas y C-terminal de la cadena alfa. El C terminal de la cadena beta es una alanina (7).

La activación de C3 se debe a la hidrólisis del enlace peptídico número 77 (entre arginina y serina) de la cadena alfa, por la "C3 convertasa". Este rompimiento origina la --

Formación del fragmento C3a con un peso molecular de 9 000 Daltons y un fragmento mayor C3b de 171 000 Daltons (7,8) .

C3a es inactivado por la enzima sérica carboxipeptidasa B, la cual remueve del C-terminal el residuo de arginina (4).

C3b es inactivado por C3b INA, el cual rompe la cadena alfa en dos fragmentos, uno de 67 000 Daltons y otro de 43 000 Daltons. Ambos fragmentos están unidos por puentes disulfuro a la cadena beta. La molécula de C3b rota, C3bi, tiene el mismo peso molecular que la molécula C3b intacta. C3bi es muy susceptible a ataque con tripsina la cual rompe la cadena alfa en la región cercana al N-terminal y produce dos fragmentos C3c y C3d.

La porción C3d contiene el sitio de unión a las partículas de C3b y permanece enlazado cuando C3c es separado (7,8).

En la figura # 2, se encuentran representados en forma esquemática los estados sucesivos de activación y rompimiento de C3.

C3 sólo existe en el suero fresco, a medida que el suero envejece esta globulina se degrada, el proceso de conversión puede ser inducido por calentamiento, presencia de complejos antígeno-anticuerpo, C1 esterasa y enzimas proteolíticas, entre las que destaca la plasmina (9).

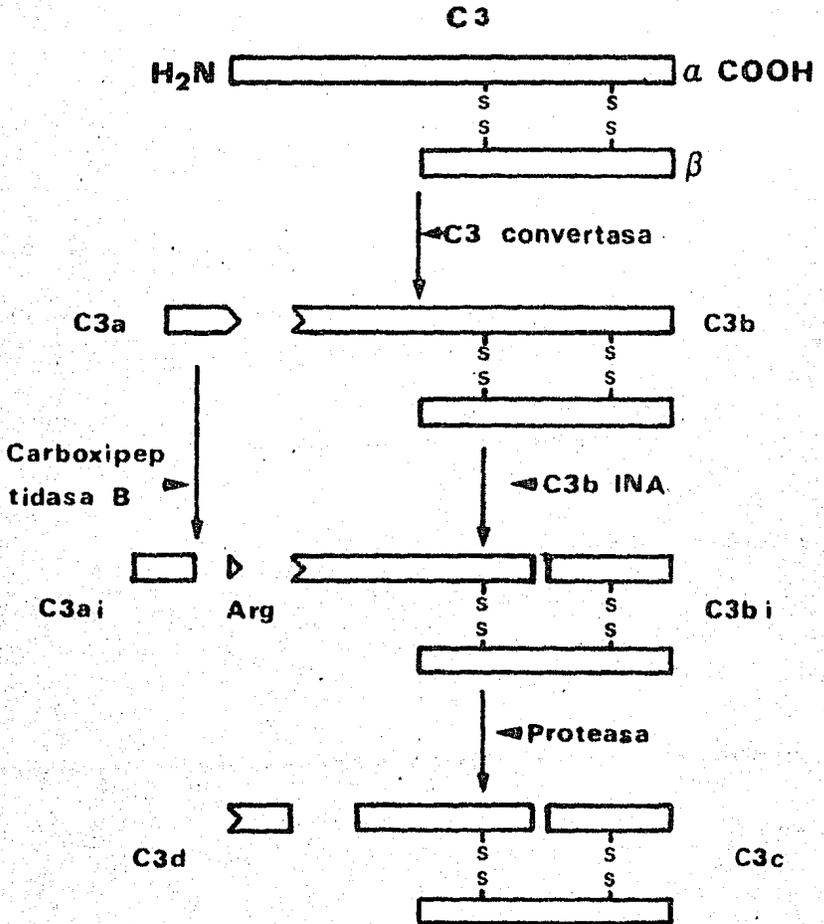
Se ha demostrado que C3 es sintetizado en el hígado como una cadena polipeptídica simple (SPC) denominada también pro-C3, tiene un peso molecular de 197000 Daltons.

Esta proteína ha sido aislada de plasma humano fresco tratado con inhibidores de proteasas.

Pro-C3 reacciona con suero anti C3 alfa y anti C3 --- beta. Adicionalmente suero anti SPC reacciona con C3 beta revelando una reacción de identidad entre SPC y C3 e identidad parcial entre SPC y C3 alfa así como entre SPC y C3 beta. La composición de aminoácidos es muy similar entre - pro-C3 y C3. En la tabla # 3 se puede apreciar la semejanza entre estas dos proteínas (8).

La conversión de pro-C3 en C3 ocurre posteriormente a su síntesis, antes de la secreción o bien, en la sangre -- por medio de las proteasas del suero (8).

FIG 2 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA MOLECULA DE C3 Y SUS PRODUCTOS



(ref.4)

TABLA # 3

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DEL C3

	Mol de aminoácidos / Mol de proteína		
	Pro C3	C3	C3
Lisina	113.9	115.2	111.6
Histidina	28.0	25.4	27.7
Arginina	79.1	76.9	81.2
Ac. aspártico	145.4	148.7	144.9
Treonina	102.5	102.6	100.3
Serina	107.1	106.4	107.5
Ac. Glutámico	202.0	219.0	217.2
Prolina	83.3	81.5	77.0
Glicina	95.7	98.0	97.0
Alanina	98.8	100.2	94.2
1/2 Cistina	ND	ND	ND
Valina	140.9	142.3	141.8
Metionina	42.4	40.9	44.3
Isoleucina	78.3	77.1	77.6
Leucina	156.0	154.3	155.4
Tirosina	58.6	58.2	56.2
Fenilalanina	61.9	60.5	60.1
Triptofano	ND	ND	14.4

ND.: No Determinado

(ref. 8,11)

METABOLISMO

Como cualquier proteína del organismo, C3 está sujeta a un equilibrio dinámico, su concentración en suero refleja un balance entre síntesis y degradación (2).

Por medio de análisis radioactivo se ha estudiado su vida media en humanos normales, en diferentes trabajos, las proporciones de recambio de C3 son de 1.3 a 3.4; de 1.6 a 2.7 y de 0.9 a 2.2 mg/100 mL. de plasma/hr. (2,10).

La proporción de síntesis de C3 fue calculada suponiendo un estado constante de catálisis y concentración en suero, obteniéndose un rango de 0.5 a 1.5 mg./Kg./hr. (10).

SITIOS DE SINTESIS

Por medio de cultivo de tejidos se ha demostrado que C3 es sintetizado por médula ósea, ganglios linfáticos, mononucleares, bazo e hígado, siendo este último el sitio principal de síntesis, esto fue probado porque al realizar transplantes de hígado de un paciente a otro con diferente tipo alélico se observó que el receptor, después de la operación, poseía la variante alélica de C3 del donador (2,12).

No existe paso transplacentar pues la evidencia de diferentes tipos de C3 en plasma fetal y materno así lo demuestran. Esta proteína es sintetizada a las nueve semanas de vida intrauterina (2).

CARACTERÍSTICAS INMUNOELECTROFORÉTICAS

En el suero fresco el C3 se ve como un arco de precipitina simétrico que va desde la transferrina hasta la IgG.

En el suero almacenado tenemos C3bi el cual posee mayor movilidad electroforética y su arco de precipitina está un poco más hacia el ánodo que el de la transferrina.

A veces aparecen trazados bifásicos intermedios en el suero almacenado según las proporciones presentes de estas globulinas (9).

GENETICA

Hasta el momento no se ha determinado en que cromosoma se encuentra localizada su codificación genética, pero se sabe que se heredan como un caracter autosómico codominante -- (13).

C3 es una molécula polimórfica (13, 14)

Existen 20 variedades alélicas determinadas electroforéticamente siendo las más comunes C3 S (de corrimiento lento) y C3 F (de corrimiento rápido); el resto de las variantes se han designado de acuerdo a su movilidad relativa (ver tabla # 4). La distancia entre C3 S y una variante rara designada C3 F1.0 es tomada como unidad y todas las otras movilidades son expresadas como un decimal con respecto a su distancia. Las diferencias alélicas se encuentran localizadas en la porción C3c de la molécula (13,15)

En la tabla # 5 se encuentran las frecuencias alélicas de C3 en la población mundial.

Existe también un alelo nulo denominado C3 . En homocigotos a este alelo, C3 está ausente y las funciones del suero mediadas por complemento están disminuidas y presenta un

marcado incremento de susceptibilidad a infecciones por bacterias piógenas (13,14) .

En heterocigotos a esta deficiencia, la cantidad de C3 en plasma esta reducida a la mitad de la concentración normal (14).

TABLA # 4
VARIANTES ALELICAS DE C3

Corrimiento lento

C3 S
C3 S 0.25
C3 S 0.4
C3 S 0.5
C3 S 0.6
C3 S 0.65
C3 S 1.3
C3 S 1.55

Corrimiento rápido

C3 F
C3 f
C3 F 0.5
C3 F 0.6
C3 F 0.7
C3 F 0.8
C3 F 0.85
C3 F 0.9
C3 F 1.0
C3 F 1.1
C3 F 1.15
C3 F 1.2

(ref. 12, 13, 14)

TABLA # 5

FRECUENCIAS ALELICAS EN LA POBLACION MUNDIAL

POBLACION	NUMERO	S	F	ALELOS RAROS
Caucásicos (USA)	472	0.773	0.219	0.008
Noruegos	2590	0.789	0.205	0.006
Suecos	1196	0.797	0.194	0.008
Daneses	1164	0.823	0.177	0.001
Finlandeses	1034	0.830	0.170	--
Alemanes	3675	0.792	0.200	0.003
Australianos	600	0.788	0.207	0.005
Bulgaros	127	0.815	0.185	--
Georgianos (URSS)	232	0.768	0.228	0.010
Espanoles	961	0.783	0.211	0.006
Iraníes	101	0.792	0.208	--
Islandeses	246	0.810	0.190	--
Finlandés mestizo	589	0.940	0.060	--
Suecos mestizos	148	0.973	0.027	--
Noruegos mestizos	198	0.937	0.063	--
Cheremisses (URSS)	271	0.887	0.111	--
Esquimales (Groelandia)	63	0.936	0.064	--
Orientales (USA)	68	0.993	--	0.007
Negros (USA)	154	0.948	0.049	0.003
Angolese	707	0.952	0.044	0.004
Etiopes	218	0.888	0.112	--

(ref.13)

OBJETIVOS

- 1.- Purificación del tercer componente del complemento (C3) mediante la obtención de la fracción euglobulina por -- diálisis del suero humano contra agua, cromatografía en DEAE-celulosa y electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 2.- Caracterización del C3
- 3.- Producción de anticuerpos específicos anti-C3.
- 4.- Aplicación de estos anticuerpos para:

Determinar la concentración sérica de C3 por inmunodifusión radial, ya que la concentración de C3 es un excelente indicador de consumo de complemento, pues esta proteína es activada tanto por la vía clásica como -- por la vía alterna. La determinación de C3 tiene además otras ventajas que son:

- a) es el componente más abundante de este sistema, lo -- cual facilita su determinación ; y
- b) es termoestable.

2

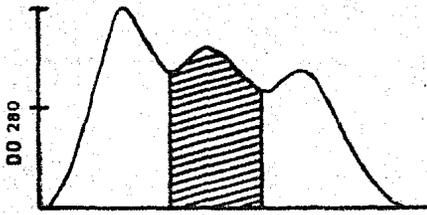
TRABAJO
EXPERIMENTAL

OBTENCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA C3

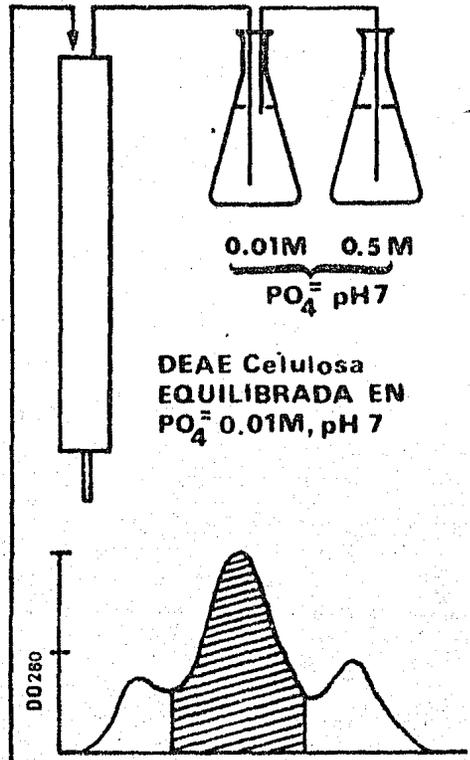
PRECIPITADO DE 500ml DE
SUERO DIALIZADO CONTRA
AGUA DE LA LLAVE

REDISOLVER EN 75 ml DE PBS

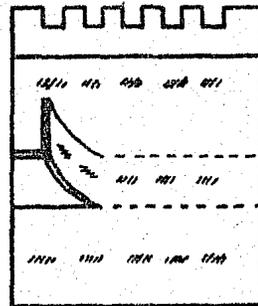
CROMATOGRAFIA EN
Sephadex G200



DIALIZAR vs $\text{PO}_4^{=}$ 0.01, pH7



ANTI-C3



PURIFICACION DE C3

PRECIPITACION DE PROTEINAS PLASMATICAS POR INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA

Fundamento

Cuando la fuerza ionica es baja no existen suficientes iones para formar la atmósfera necesaria alrededor de los - grupos cargados de la molécula, es decir, se pierde el e--- quilibrio entre fuerzas soluto-disolvente, ocasionando así que las proteínas precipiten, siendo las primeras en hacerlo las moléculas más grandes (9,30).

MATERIAL:

Membrana de diálisis (3.5 cm. de diámetro)

Centrífuga

Tubos de centrífuga

REACTIVOS:

Plasma humano

Agua de la llave

Sol. amortiguada salina-fosfatos

METODO:

- 1.- El plasma humano se introduce en las membranas de diálisis.
- 2.- Se dializa contra agua de la llave toda la noche.
- 3.- Se centrifuga a 3 000 rpm. durante 10 min.
- 4.- El precipitado se resuspende en sol. amortiguada salina-fosfatos.

CROMATOGRAFIA POR PESO MOLECULAR

EN SEPHADEX G 200

Fundamento

Usando geles porosos de dextrán, como lo es el sephadex, las partículas pueden ser separadas basándose en sus dimensiones moleculares.

Las proteínas que se encuentran sobre el límite de exclusión del gel no entran a las partículas de sephadex, mientras que las moléculas pequeñas sí, por tanto, las moléculas saldrán de la columna en orden decreciente (31,32).

MATERIAL:

Baño maría a 37°C

Bomba de vacío

Columna de vidrio de 90 x 1.5 cm.

Colector de fracciones

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas de 5 ml.

Pipetas Pasteur

Colorímetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb)

REACTIVOS:

Precipitado de la diálisis

Sol. amortiguada salina fosfatos

Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals)

Agua destilada

Polietilenglicol 20 000 (Sigma Chemical Company)
Sol. de azul coomasie: azul coomasie brillante G-250
(Sigma Chemical Company) 0.01%, 4.75% y
ác. fosfórico al 8.5%.

MONTAJE DE LA COLUMNA

- 1.- Pesar 4.0 g. de sephadex G-200, hidratarlo en agua destilada e incubar toda la noche a 37°C.
- 2.- Deaerear el sephadex y la sol. amortiguadora.
- 3.- Adicionar a la columna la sol. amortiguadora y vertir el sephadex cuidadosamente sin que se formen burbujas.
- 4.- Una vez ampacada la columna se equilibra con la sol. amortiguadora salina fosfatos.

CORRIMIENTO DE LA MUESTRA

- 1.- Eliminar la sol. amortiguadora de la parte superior del sephadex e inmediatamente aplicar la muestra dejándola caer suavemente por las paredes de la columna.
- 2.- Dejar que penetre completamente la muestra.
- 3.- Eluir con la sol. amortiguadora colectando fracciones de 2 ml.
- 4.- Determinar concentración de proteínas a las fracciones por el método de Azul Coomasie (33) y trazar una curva de Densidad óptica contra número de fracción.

Para determinar en que parte de la cromatografía fué eluido el C3 se realizó IDR (18) para esta proteína en placas comerciales (Helena). Una vez identificadas las fracciones positivas a C3 se juntaron y se concentraron en Polietilenglicol 20 000 y se realizó una electroforesis en gel de poli--acrilamida.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Es un método ampliamente usado en la separación de --- proteínas y ácidos nucleicos ya que el medio de soporte, es decir, la acrilamida, es un material inerte y variando su - concentración es posible separar unas proteínas de otras -- (34,35).

MATERIAL:

Cámara de electroforesis

Fuente de poder

Bomba de vacío

Agitador magnético

2 placas de vidrio de 19 x 15.5 cm.

2 separadores de 19.5 x 0.2 cm.

1 peine para nueve aplicaciones de 2mm. de espesor.

Pipetas serológicas de 10.0, 5.0 y 1.0 ml.

1 jeringa Hamilton de 50 microlitros (Hamilton Company).

REACTIVOS:

Agar noble (Laboratorios Difco) al 2%

TEMED (N,N,N',N' tetrametilendiamino) (Sigma Chemical Company).

Persulfato de amonio (Sigma Chemical Company) al 10%.

Sol. amortiguadora para el gel concentrador: TRIS/HCL 0.5 M
pH 6.7 TRIS (hidroximetil) aminometano (Merck)

Sol. amortiguadora para el gel resolvidor: TRIS-HCL 1.5 M
pH 8.9

Sol. amortiguadora para corrimiento: TRIS 0.025 - GLICINA
(Merck) 0.192 pH 8.3

Azul de bromofenol (Sigma de México) al 2%

Sol. de tinción: Isopropanol 25%, ác. acético 10%, azul
coomasie brillante R (Sigma Chemical Company) 0.05%

Sol. de acrilamida-bisacrilamida al 30 - 0.8% Acrilamida
(Sigma Chemical Company)

N, N-metilenbisacrilamida (Sigma Chemical Company)

Sol. para desteñir: ác. acético al 5%

METODO:

Montaje de las placas de vidrio

En una de las placas de vidrio marcar una línea a 12.0 cm. de distancia y una segunda línea a 1.0 cm. de la anterior. Acoplar las dos placas de vidrio en la cámara de electroforésis y entre ellas colocar los separadores verticalmente, sellar los tres lados de la placa con agar, dejar secar.

Preparación del gel resolvedor al 10%

Agua destilada	12.4 ml.
Sol. acrilamida-bisacrilamida	10.0
Sol. amortiguadora del gel resolvedor	7.5
Persulfato de amonio	0.15

Deaerear 5 min. con agitación, adicionar 15 microlitros de TEMED, agitar y aplicar a la placa hasta la primera marca cuidando que no se formen burbujas. Adicionar agua destilada con una pipeta Pasteur dejándola caer suavemente para no romper la interfase.

El tiempo de polimerización es de 30 min., después de los cuales se lava con agua destilada y se seca con papel filtro.

Colocar el peine en la segunda línea.

Preparación del gel concentrador al 4.5%

Agua destilada	4.0 ml.
Sol. de acrilamida-bisacrilamida	1.0
Sol. amortiguadora del gel concentrador	1.6
Persulfato de amonio	0.07

Deaerear 5 min. con agitación. Adicionar 0.003 ml. de TEMED, con agitación y aplicar a la placa con pipeta evitando la formación de burbujas. El gel polimeriza en 30 min., después de los cuales se retira el peine, se lava con agua destilada y se seca.

Preparación de las muestras

- 1.- Las muestras se dializan contra la sol. amortiguadora - del gel concentrador (diluido 1:5) para evitar interferencias debidas a la concentración de sales.
- 2.- Ajustar la concentración de proteína a 350 microgramos.
- 3.- El vol. máximo por celda es de 50 microlitros .

Aplicación y corrimiento de la muestra

- 1.- Aplicar las muestras en las celdas correspondientes, agregar a cada celda 5 microlitros de azul de bromofenol, llenarlas con sol. amortiguadora de corrimiento con una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no rebotar las ---- muestras .
- 2.- Llenar con sol. amortiguadora de corrimiento ambas cá-- maras.
- 3.- Colocar el electrodo positivo (ánodo) en la cámara in-- ferior y el electrodo negativo (cátodo) en la superior.
- 4.- Aplicar al gel concentrador 10 miliamperios (mA) totales, hasta que el frente del colorante entre al gel resolvedor, entonces incrementar el amperaje a 25 mA. totales.
- 5.- El corrimiento finaliza cuando el colorante sale por el extremo inferior del gel resolvedor.

Revelado

- 1.- Sumergir la placa en la sol. de tinción durante dos horas*.
- 2.- Lavar la placa con sol. para desteñir, haciendo varios cambios hasta lograr visualización de las bandas.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA

Fundamento

La DEAE-celulosa es empleada como una matriz de intercambio aniónico, capaz de enlazar electrostáticamente a proteínas que poseen cargas opuestas a ella. El grado de unión depende de la intensidad de carga de ambas.

Las proteínas pueden ser eluidas diferencialmente por:

a) Incremento de la fuerza iónica del medio

Al aumentar la concentración de iones, éstos compiten con las proteínas por los grupos cargados del intercambiador.

b) Alteración del pH

Cuando el pH de la sol. amortiguadora está cercano al punto isoeléctrico de cada proteína, la carga neta llega a ser cero, es entonces cuando la proteína se separa del intercambiador (32,36).

MATERIAL:

Bomba de vacío

Pipetas serológicas de 5.0 ml.

Bomba peristáltica

Colector de fracciones

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

Colorímetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb).

Tubos de diálisis de 3.5 cm. de diámetro

REACTIVOS:

DEAE-celulosa (dietilaminoetil celulosa) (Sigma Chemical Company)

Columna de 4.0 x 20 cm.

Sol. amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.0

Sol. amortiguadora de fosfatos 0.01M, NaCl 0.05M pH 7.0

Sol. de azul coomasie: azul coomasie brillante G-250 (Sigma Chemical Company) 0.01%, etanol 4.75 y ác. fosfórico - al 8.5% .

Polietilenglicol 20 000 (Sigma Chemical Company)

Segunda fracción de la cromatografía es sephadex G-200

MONTAJE DE LA COLUMNA

La columna se empacó de acuerdo a las siguientes condiciones :

100 mg. de proteína por gramo de DEAE-celulosa

1.0g de DEAE-celulosa por 10 ml. de sol. amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.0 .

- 1.- Empacar la columna con DEAE-celulosa previamente activada y deaerada (37).
- 2.- Equilibrar la DEAE-celulosa con sol. amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.0 (deaerado) por lo menos con 5 veces el volumen de la columna.

CORRIMIENTO DE LA MUESTRA

- 1.- Eliminar la sol. amortiguadora de la parte superior de la DEAE-celulosa e inmediatamente adicionar la muestra (2a. fracción de la cromatografía en sephadex que fue -

previamente dializada contra la sol. amortiguadora con la que se equilibró la columna) dejándola caer suavemente por las paredes de la columna.

- 2.- Dejar que penetre completamente la muestra a la DEAE-celulosa.
- 3.- Adicionar sol. amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.0 y lavar con ella hasta que en el eluado no salga proteína.
- 4.- Eluir entonces con gradiente salino formado por:
Sol. amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.0
Sol. amortiguadora de fosfatos 0.01M, NaCl 0.5M, 7.0
- 5.- Colectar fracciones de 7 ml. aproximadamente y determinar la concentración de proteínas por el método de Azul Coomasie y trazar una gráfica de densidad óptica contra número de fracción.

Para determinar en que tubos fue eluido el C3 se realizó IDR en placas comerciales (Helena) y una vez determinada se procedió a juntar las fracciones positivas a C3 y a concentrar con polietilenglicol 20 000.

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con lo que se reveló la presencia de contaminantes en la fracción que contiene al C3 por lo que se procedió a realizar una electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida.

ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

El material y método de esta técnica fue descrito anteriormente.

La cantidad de muestra por celda es de 50 microlitros, también se aplica un suero normal humano como marcador de -- referencia.

En esta técnica se emplea un método de visualización -- inmediata y desnaturalización mínima para las proteínas, (38) lo que nos permite recortar únicamente la banda de C3.

Método de Visualización

MATERIAL:

Lámpara de luz ultravioleta UVL-22

Licuadaora

Centrífuga

Navaja

Tubos de centrifuga

REACTIVOS:

Sol. salina fisiológica: Cloruro de sodio al 0.9%

Sol. patrón de sulfonato de anilino naftaleno 1mg/ml (Sigma Chemical Company). Para su uso se hace una dilución al 0.003% con sol. amortiguadora de fosfato monobásico de sodio 0.1 M pH 6.8

METODO:

- 1.- Una vez terminada la electroforesis colocar el gel en -- la caja de Petri y cubrirlo con la sol. de sulfonato de anilino naftaleno.
- 2.- Esperar 10 min.
- 3.- Revelar con la lámpara de luz ultravioleta, sobre un --

fondo obscuro.

- 4.- Identificar la banda de C3 y recortarla.
- 5.- Colocar la banda de C3 en los vasos de la licuadora y -
agregarle sol. salina fisiológica.
- 6.- Moler en la licuadora por 10 min.
- 7.- Centrifugar esta mezcla.
- 8.- Separar el sobrenadante y determinar proteínas.
Se ajusta a una concentración de 1mg/ml y se procede a
su caracterización.

CARACTERIZACION DE C3

La caracterización de C3 se efectuó por:

- 1.- Movilidad electroforética en gel de poliacrilamida.
- 2.- Inmunoelectroforesis.
- 3.- Doble difusión.

INMUNOELECTROFORESIS

Fundamento

Es un método cualitativo que combina los principios de la electroforesis de zona con reacciones antígeno-anticuerpo en gel. El proceso se lleva a cabo en dos etapas: en la primera, la mezcla de proteínas es separada por electroforesis de zona, y en el segundo paso los grupos de proteínas son analizados con antisueros específicos permitiendo la --
formación de arcos de precipitación (18,28).

MATERIAL:

Placas de vidrio

Separadores de 2 mm. de espesor

Pinzas metálicas

Fuente de poder

Cámara de electroforesis

Electrodos

Perforador para inmunolectroforesis LKB

Cortador para inmunolectroforesis LKB

Capilares

Cámara húmeda

REACTIVOS:

Sol. amortiguadora de barbituratos pH 8.6, fuerza iónica --
0.075 barbiturato de sodio (Merck) 15.4 g/lt y ác. ---
barbitúrico (Merck) 2.76 g/lt.

Agar noble (Laboratorios Difco) al 1.0% en sol. amortigua--
dora de barbituratos.

Rojo de Ponceau: rojo de Ponceau S (Sigma de México) 0.5g,
ác. sulfosalicílico 7.5g, ác. tricloroacético 7.5g, --
disolver en 250 ml. de agua destilada.

Sol. de ác. acético al 5.0%

Suero normal humano

C3 purificado

Suero de conejo anti-proteínas totales de humano

METODO:

- 1.- Un lado de una placa se barniza con agar y se deja secar, esto se hace con la finalidad de que no se desprege el - agar.
- 2.- Colocar el separador que cubre tres lados de la placa y cubrir con la otra placa de vidrio.
- 3.- Sujetar con pinzas para que no se muevan las placas.
- 4.- Adicionar el agar caliente, dejar gelificar.
- 5.- Quitar las pinzas y retirar la placa de vidrio y el se-- parador.
- 6.- Hacer las perforaciones en el gel.
- 7.- Retirar el gel de los pocitos y aplicar la muestra.
- 8.- Colocar en la cámara la placa y la sol. amortiguadora de barbituratos.
- 9.- Aplicar 100 volts hasta que el colorante migre 2.5 cm. - aproximadamente.
- 10.- Sacar de la cámara, retirar el gel del canal y adicio-- nar el antisuero.
- 11.- Incubar en cámara húmeda, toda la noche permitiendo así la difusión del antisuero.
- 12.- Lavar la placa con varios cambios de sol. salina fisio-- lógica.
- 13.- Lavar con agua destilada.
- 14.- Secar la placa.
- 15.- Teñir con rojo de Ponceau durante 10 min.
- 16.- Destefir con ácido acético al 5%.

DOBLE INMUNODIFUSION

Fundamento

Es una técnica en la cual el antígeno y el anticuerpo difunden uno hacia el otro a través de un gel, formándose una banda de precipitación donde alcanzan su punto de equivalencia (18,28).

MATERIAL:

Portaobjetos

Separadores de 2 mm de espesor

Jeringa Hamilton de 50 microlitros (Hamilton Company)

Cámara húmeda

Molde para doble difusión

REACTIVOS:

Agarosa 0.8%

Sol. salina fisiológica: Cloruro de sodio al 0.9%

Sol. de rojo de Ponceau: rojo de Ponceau S (Sigma de México)
0.5%, ác. sulfosalicílico 7.5g, disolver en 250 ml.
de agua destilada.

Sol. de ác. acético al 5%

Suero anti-C3 comercial (Sigma Chemical Company)

Suero anti-C3 de conejo

C3 puro

METODO:

- 1.- Colocar entre el portaobjetos y el molde los separadores
- 2.- Dejar difundir la agarosa caliente por uno de los lados
- 3.- Dejar gelificar

- 4.- Depositar en cada pozo 50 microlitros de la muestra que corresponda.
- 5.- Permitir su difusión en cámara húmeda.
- 6.- Retirar el molde y lavar con sol. salina fisiológica.
- 7.- Lavar con agua destilada
- 8.- Secar
- 9.- Teñir 10 min. con rojo de Ponceau
- 10.- Decolorar con sol. de ác. acético al 5%.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Se inculó a dos conejos por vía intramuscular con C3 a una concentración de 1.0 mg/ml cada semana, las dos primeras dosis se aplicaron con un vol. igual de aceite mineral como adyuvante.

Se realizaron sangrías cada semana a partir de la tercera inoculación, observándose el título de anticuerpos por inmunoprecipitación en capilar contra C3 puro.

CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS

Para determinar la especificidad del anticuerpo anti-C3 obtenido se utilizaron las técnicas de inmunoelectroforesis y doble difusión (materiales y métodos previamente descritos).

APLICACION DE LOS ANTICUERPOS

DETERMINACION SERICA DE C3 POR INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE

Fundamento

Es un método cuantitativo de difusión en gel, en el cual un antisuero específico se encuentra uniformemente distribuido en el agar y el antígeno se adiciona posteriormente en pozos circulares del gel, permitiendo que difunda y forme halos de precipitación, los cuales son proporcionales a la concentración de antígeno. (18,28)

MATERIAL:

Placas de vidrio

Separadores de 2 mm. de espesor

Pinzas metálicas

Perforador LKB

Pipeta Pasteur

Bomba de vacío

Jeringa Hamilton de 50 microlitros (Hamilton Company)

Estufa a 56°C

Cámara húmeda

Regla

REACTIVOS:

Agar noble (Laboratorios Difco) al 2.0% en sol. amortiguada salina fosfatos.

Suero de conejo anti-C3

Estándares de C3

Muestras problema

METODO:

- 1.- Colocar los separadores entre las placas de vidrio perfectamente limpias.
- 2.- Presionar con las pinzas.
- 3.- Mezclar en un tubo la cantidad de agar y antisuero que corresponda a la dilución deseada (dil.1:5).
- 4.- Vaciar la mezcla a la placa y dejar gelificar.

- 5.- Remover un vidrio y los separadores.
- 6.- Hacer las perforaciones necesarias y retirar el gel de los pocitos.
- 7.- Aplicar las muestras en el pozo que corresponda.
- 8.- Incubar en cámara húmeda 24 horas.
- 9.- Medir los halos de precipitación en cada pozo.
- 10.- Trazar una gráfica de Diámetro al cuadrado (D^2) VS. --- concentración de los estándares y extrapolar en ella la concentración de los problemas.

RESULTADOS

PURIFICACION DEL C3.

CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200

Al realizar la cromatografía en sephadex G-200 del --- precipitado obtenido por diálisis del suero contra agua de la llave, se obtuvo la gráfica que se muestra en la fig.# 4.

Mediante esta cromatografía eliminamos una gran cantidad de proteínas contaminantes de alto peso molecular, tales como Ig M, α_2 macroglobulina, β -lipoproteína e Ig G que son eluidas casi totalmente en la primera fracción. En la segunda fracción tenemos al C3 contaminado Ig G, albúmina, transferrina y α_2 macroglobulina (fig.# 6 C). La tercera fracción contiene albúmina principalmente.

FIG 4 CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX
G 200

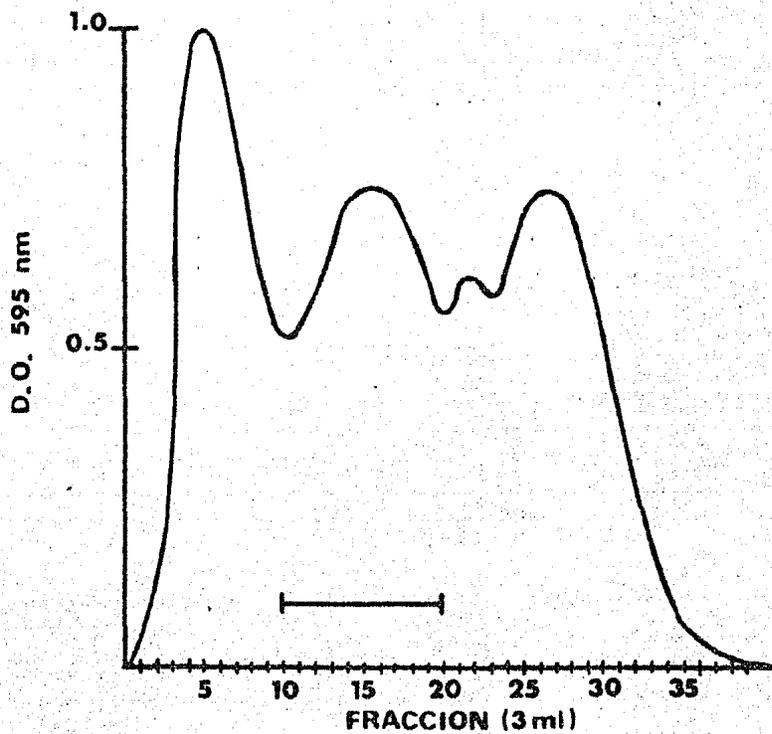
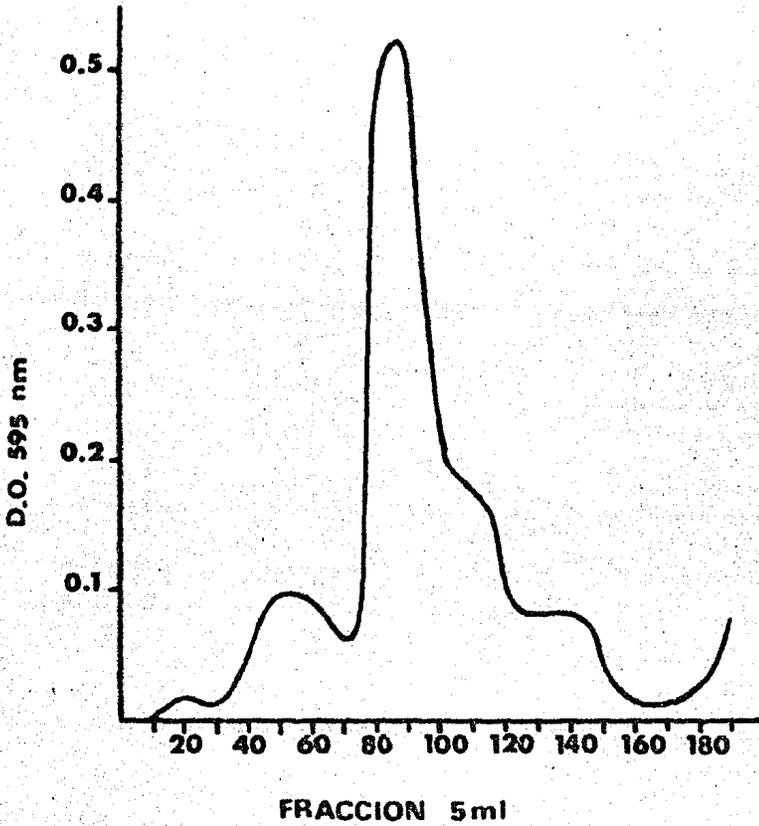


FIG 5 CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA



CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

La gráfica de la figura # 5, muestra la cromatografía en DEAE-celulosa en la segunda fracción de la cromatografía en sephadex G-200.

Como se puede apreciar en la fig. # 6 D, mediante esta cromatografía se eliminaron algunas de las proteínas contaminantes de C3, sin embargo, debido a la contaminación existente en esta fracción, se procedió a realizar la electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida.

En la fig. # 6 se muestra la secuencia completa de la purificación de C3.

CARACTERIZACION DEL C3

- 1.- La movilidad electroforética en gel de poliacrilamida - (fig. # 6) corresponde a la descrita por Putnam (39).
- 2.- Por inmunoelectroforesis contra suero anti-proteínas -- totales (fig.# 7) forma un solo arco de precipitina en la región beta que corresponde al reportado por Kawai (9).
- 3.- En doble difusión se observó reacción de precipitación de C3 con anti-C3 comercial (fig.# 8).

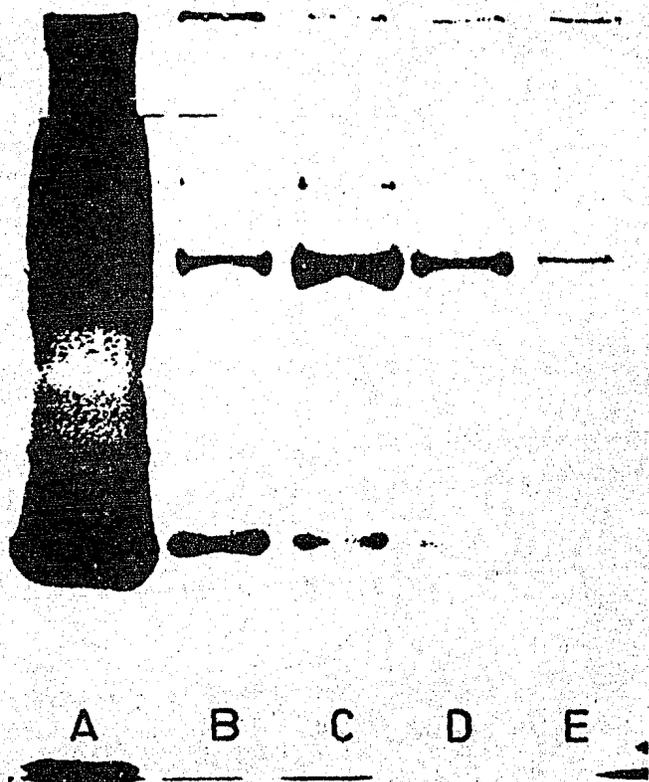


FIG. 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida que muestra la secuencia de la purificación de C3. A) Suero normal humano, B) Precipitado de la dialisis con agua de la llave, C) segunda fracción de la cromatografía en sephadex G-200, D) segunda fracción de la cromatografía en DEAE-celulosa, E) C3 puro.

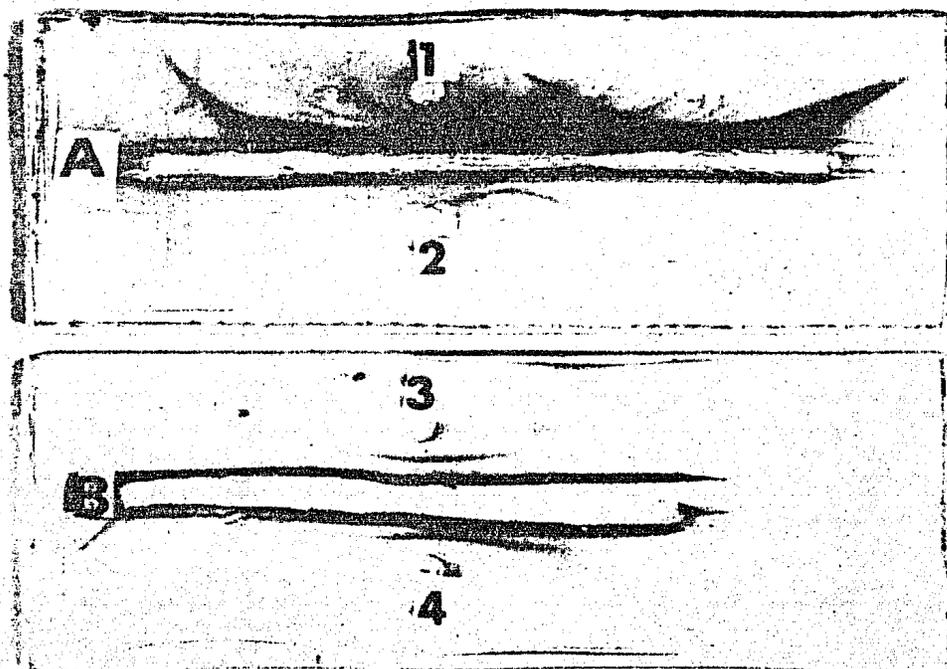


FIG.7. Inmunoelectroforesis de suero normal humano (1,3) y C3 (2,4) ante suero de conejo anti-proteinas totales (A) y suero de conejo anti-C3 (B).

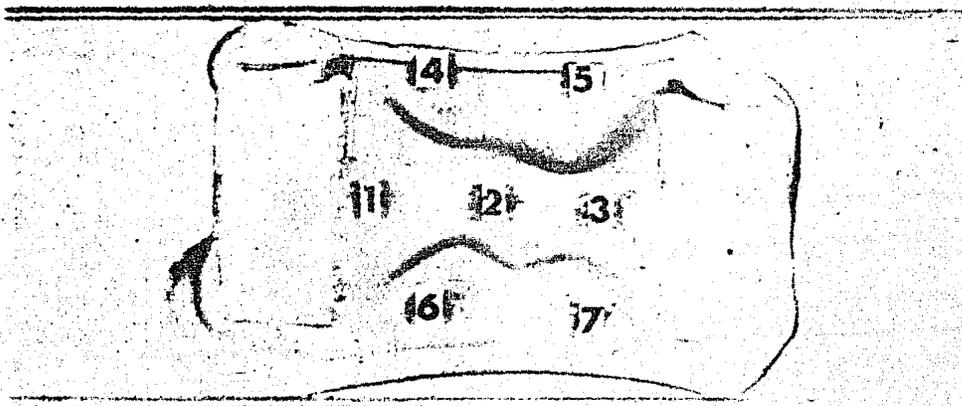


FIG.8. Doble inmunodifusión. C3 puro (1,2,3), suero anti--
C3 de conejo (4,7) y suero anti-C3 comercial (5,6).

CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS

- 1.- Por inmunolectroforesis (fig.# 7) se observa que con suero humano normal se forma un solo arco de precipitina en la región beta que corresponde a la reportada por Kawai (9).
- 2.- Por doble difusión (fig.# 8) se observa banda de identidad con el suero de conejo anti-C3 comercial.

APLICACION DE LOS ANTICUERPOS

Fueron probados 45 sueros humanos en las placas de inmunodifusión elaboradas con el suero de conejo anti-C3 y en las placas comerciales (Helena), obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla # 6 los cuales fueron analizados estadísticamente con una regresión lineal, obteniendo un coeficiente de correlación (r) de 0.94 .

TABLA # 6

DETERMINACION SERICA DE C3 POR IDR

C3 sérico en mg.%

Muestra	Obtenido por este trabajo	Placa comercial (Helena)
1	76.0	105.0
2	62.0	60.0
3	72.0	75.0
4	150.0	115.0
5	5.0	30.0
6	0.0	0.0
7	80.0	83.0
8	63.0	60.0
9	75.0	73.0
10	68.0	70.0
11	71.0	70.0
12	53.0	55.0
13	61.0	65.0
14	74.0	70.0
15	72.0	74.0
16	90.0	90.0
17	83.0	80.0
18	85.0	87.0
19	81.0	76.0
20	90.0	91.0

continúa -

TABLA # 6

continuación...

21	55.0	58.0
22	100.0	110.0
23	111.0	120.0
24	20.0	40.0
25	30.0	38.0
26	102.0	100.0
27	115.0	130.0
28	120.0	130.0
29	122.0	135.0
30	96.0	100.0
31	87.0	81.0
32	83.0	77.0
33	50.0	55.0
34	20.0	38.0
35	57.0	55.0
36	63.0	70.0
37	68.0	65.0
38	55.0	50.0
39	80.0	78.0
40	93.0	87.0
41	99.0	100.0
42	73.0	70.0
43	105.0	110.0
44	92.0	86.0
45	66.0	70.0

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos observamos que la proteína se logró purificar por el método propuesto, en el cual se realiza una precipitación de las proteínas del suero humano al disminuir la fuerza iónica y por medio de las cromatografías en sephadex G-200 y DEAE-celulosa se logra eliminar contaminantes de manera que al realizar la electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida es posible recortar la banda de C3 sin contaminante alguno.

En la tabla # 7 se comparan varios métodos para purificar C3 y observamos que el propuesto en este trabajo consta de menos pasos, con lo cual se reduce el tiempo, y además se obtiene un rendimiento igual al de los métodos previamente descritos; lo cual hace de éste un buen método de elección en la purificación de C3 en un laboratorio de esca-

TABLA # 7

COMPARACION DE METODOS DE PURIFICACION

Método	A	B	C	D	E
Muller-Eberhard H.J et al (40)	0.1-0.2%	2	2	1	-
Muller-Eberhard H.J. et al (40)	0.2%	2	1	2	1
Lachmann P.J.and Hobart M.J. (41)	N.R.	4	3	-	-
Lachmann P.J.and Hobard M.J. (41)	N.R.	2	2	-	-
Método propuesto en este trabajo	0.1%	1	2	-	1

A = Rendimiento

B = Precipitaciones

C = Cromatografías

D = Ultracentrifugación

E = Electroforesis preparativa

NR = No reportado

sos recursos.

La proteína purificada fue caracterizada como C3, pues:

- a) Su movilidad electroforética en gel de poliacrilamida así lo confirma.
- b) Reacciona de manera específica con el suero anti-C3 comercial.
- c) Al probarlo por inmunolectroforesis contra suero anti--proteínas totales de humano se observó una sola banda -- que correspondió a C3.

Una vez caracterizada la proteína se procedió a la ---producción de anticuerpos por inoculación de éste al conejo. La especificidad de los anticuerpos anti-C3 humano fue confirmada por:

- a) Doble difusión, en la que observamos banda de identidad entre el suero anti-C3 de conejo y el suero anti-C3 co--mercial, lo cual indica que realmente obtuvimos anti-C3 humano.
- b) Por inmunolectroforesis, este suero de conejo fue pro--bado contra suero humano y contra C3 purificado en este trabajo, observándose en ambos una sola línea de preci--pitación.

Cuando se estableció la especificidad del suero anti--C3, fue empleado en la elaboración de placas de IDR, para -cuantificación sérica de C3, las cuales tuvieron buena ----correlación de resultados con respecto a los obtenidos en -

la placa comercial (Helena) con que se estableció la comparación.

Los anticuerpos aquí obtenidos podrán tener otras aplicaciones, tales como:

- a) Determinar la presencia de C3 como contaminante en la purificación de otras proteínas.
- b) Determinación de polimorfismos.
 - i) para establecer la frecuencia de cada alelo en la población mexicana.
 - ii) establecer si se encuentra asociada a alguna enfermedad para emplearse como un marcador genético.
- c) Probar la presencia de C3b sobre los eritrocitos de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna, ya que estos pacientes enlazan mayor cantidad de C3b que los eritrocitos normales durante la activación del complemento por cualquiera de sus dos vías.
- d) Determinación del factor nefrítico en el suero de pacientes con glomerulonefritis membranoproliferativa.
- e) Conjugando anticuerpos anti-C3 con fluoresceína es posible detectar la presencia de C3b depositado sobre el glomérulo, en biopsias de pacientes con glomerulonefritis membranoproliferativa; llegando a constituir una prueba diagnóstica para esta patología.

5

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alper, C.A., and Rosen, F.S.
Laboratory Diagnosis of Immunologic Disorders
Cap. 4. pags: 47 - 68
Grune and Stratton, Inc, 1975.
- 2.- Ruddy, S., Gigli, I., and Austen, K.F.
The Complement System of Man
N. Engl. J. Med. 287 (11) : 545 - 549, septiembre 1972.
- 3.- Muller-Eberhard, H.J.
Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80
Tema 15, pags: 1001 - 1021
Academic Press, 1980.

4.- Peltier, A.P.

Immunology

Cap. 8, pags: 252 - 284

A wiley medical publication, 2a. edición, 1982.

5.- Cooper, N.R.

Basic and Clinical Immunology

Cap. 8, pags: 83 - 95

Lange Medical Publications, 3a. edición, 1980.

6.- Fearon, D.T. and Austen, K.F.

The alternative pathway of complement - A system for
host resistance to microbial infection

N.Engl. J. Med. 303 (5) : 259 - 262, julio 1982.

7.- Tack, B.F. and Prahl, J.W.

Third component of complement: Structural analysis of
the polipeptide chains of C3 and C3b

Biochem 18 (8) : 1497 - 1503, Abril 1979.

8.- Minta, J.C.

Purification and characterization of single chain pre--
cursor C3-protein (pro-C3) from normal human plasma

J. Immunol. 123 (5) : 2415 - 2420, noviembre 1979.

9.- Kawai, Tadashi

Proteínas plasmáticas. Aplicación Clínica

Cap. 6, pags: 68 - 70

Editorial Panamericana, 1977.

10.- Alper, C.A. and Rosen, F.S.

Studies of the in vivo behavior of human C3 in normal subjects and patientes.

J. Clin. invest. 46 (12) : 2021 - 2034, 1967.

11.- Tack, B.F. and Prahl, J.W.

Third component of human complement. Isolation from plasma and characterization

Biochem 15 : 4513 - 4519, 1976.

12.- Alper C.A., Johnson A.M. et al.

Human C3 : Evidence for the liver as the primary site of synthesis

Science 163 : 286 - 288, enero 1969.

13.- Alper, C.A. and Rosen, F.S.

Genetics of the complement system

Adv. HUM. Genet. 7 : 141 - 188, 1976.

14.- Harris, Harry

The principles of human biochemical genetics

Cap. 8, pags: 358 - 359

Elsevier/North-Holland Biomedical Press

3a. edición, 1980.

15.- Rittner, C.

Firts International symposium and workshop on the polymorphism of the human complement system

Vox. Sang. 25 : 9 - 27, 1973.

- 16.- Parish, C.R., Hayward, J.A.
The Lymphocyte surface.I. Relation between Fc recepto--
res, C3 receptores and surface immunoglobulin
Pro, R. Soc. Lond B. 187: 47 - 55, 1974.
- 17.- Scott Diane M., Amos N, Sissons J.P.G. et al.
The immunoglobulin nature of nephritic factor (NeF)
Clin exp. immunol. 32 : 12 - 24, 1978.
- 18.- Crowle Alfred J.
Manual of Clinical Immunology
Cap. 2, pags: 3 - 14
American Society for microbiology. 2a. edición, 1980.
- 19.- Turner D.R., Wilson D.M., Lake A., et al.
An evaluation of the immunoperoxidasa technique in
renal biopsy diagnosis
Clin Nephrol 11 : 13 - 20, 1979.
- 20.- Miller F., Elias J.M.
An comparasion of the unlabeled enzyme method with ----
immunofluorescence for the evaluation of human immuno--
logic renal disease
Am. J. Clin. Pathol. 64 : 464 - 470, 1975.
- 21.- Peters J.H., Coons A.H.
A fluorescent antibody as specific cytochemical reagents
Methods Immunochem 5 : 424 - 428, 1976.

- 22.- Peters D.K.
Medical Immunology
Cap. 9, pags : 208 - 232
Mc Graw-Hill Book Company U.S.A., 1980.
- 23.- Stoffersen E.
C3 polymorphism in patients with chronic uremia
Hum. Hered 30 (1) : 46 - 49, 1980.
- 24.- Pepper B.
Polymorphic variants of the third component of complement in Graves'disease
Hum, Hered 29 (5) : 279 - 283, 1979.
- 25.- Sorensen H., Dissing J.
Association between C3 F gene and Atherosclerotic vascular diseases
Hum, Hered 25 : 279 - 283, 1975 a.
- 26.- Brönneham R.
Studies of the polymorphism. Relationship between C3 phenotypes and rheumatoid arthritis
Hum, Hered 23 : 206 - 213, 1973 b
- 27.- Mancini G, Carbonara A.O. Heremans J.F.
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion
Immunochemistry 2: 235 - 242, 1965.

- 28.- Van Oss Carel J. and Bartolome William B.
Methods in immunodiagnosis
Cap. 6, pags: 65 - 90
A wiley medical publication, 2a. edición, 1980.
- 29.- Alper Chester A.
Automated nephelometric determination of serum haptoglobin, C3 and alfa 1 antitripsina
Advances in automated analysis
Presented at the technician international congress,
nov. 2 - 4, 1970.
- 30.- Pennell Robert B.
The plasma proteins. (Isolation, Characterization and function)
Cap. 2, pags: 9 - 50
Academic Press Vol. 1, 1960.
- 31.- Sephadex gel filtration in theory and practice
Pharmacia Fine Chemicals
Uppsala-Sweden, 1970.
- 32.- Hudson L. and Hay F.C.
Practical immunology
Cap. 7, pags: 158 - 175
Blackwell Scientific Publications, 2a. edición, 1980.

33.- Bradford M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding

Analytical Biochemistry 72 : 248 - 254, 1976.

34.- Béla Takacs

Immunological Methods

Cap. 4, pags: 81 - 105

Academic Press Inc, 1979.

35.- Jonh's P.P.

Selected methods in celular immunology

Cap. 19, pags: 424 - 440.

W.H. Freeman and Company, 1980.

36.- Fahey J.L., Terry E.W.

Handbook of experimental immunology

Cap. 8, pags: 8.1 - 8.10

Blackwell Scientific Publication, 3a. edición, Vol. 1, 1973.

37.- Sutherland W.

Handbook of experimental immunology

Cap. 2, pags: 2.3 - 2.4

Blackwell Scientific Publication. 3a. edición, Vol. 1, 1978.

38.- Hartam B.K., Udenfriend S.

A method for immediate visualization of proteins in acrilamid gel and its use for preparation of antibodies to enzymes.

Analytical Biochemistry 30 : 391 - 394, 1969.

39.- Heide K., Haupt H., and Schwick H.G.

The plasma proteins. (Structure, function and genetic control)

Cap. 8, pags: 545 - 587

Academic Press. 2a. edición, Vol. 3, 1977.

40.- Müller-Eberhard H.J., Nilsson U. and Aronsson T.

Isolation and characterization of two B₁-glycoproteins of human serum

J. Exp. Med. 111 : 210 - 215, 1960.

41.- Lachmann P.J. and Hobart M.J.

Handbook of Experimental Immunology

Capítulo 5A, pags: 5A.1 - 5A.23

Blackwell Scientific Publications

2a. edición, 1973.