



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**PURIFICACION DE BETA-2
MICROGLOBULINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ESTELA BLANCO CASTRO

Director de Tesis : Dr. Luis A. Terán Ortiz



CVAVTITLAN

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1 9 8 5



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO.

	pag.
1) Resumen	1
2) Introducción	2
3) Generalidades	3
- β_2 -m y su homología con las inmunoglobulinas.	5
-Distribución de β_2 -m en líquidos corporales y células.	7
-Asociación de β_2 -m y HLA.	9
-Otros estudios.	13
- β_2 -m en medicina clínica.	15
4) Material y Métodos	18
-Purificación.	23
-Characterización.	28
-Obtención de anticuerpos.	36
5) Resultados y Discusión	40
6) Conclusiones	46
7) Glosario	47
8) Bibliografía	50

R E S U M E N

Se propone una técnica de purificación para β_2 -m; la cual consiste en coleccionar orinas de pacientes post-transplante renal de 1-9 días. Las proteínas urinarias son adsorbidas por cromatografía en DEAE-Celulosa y eluidas por gradiente discontinuo con solución reguladora de fosfatos 0.05 0.1, 0.17, 0.2 M, pH 6.8. Se dializa la fracción 0.1 M para luego liofilizarla. Se resuspende el liofilizado y se pasa en una columna de sephadex G-75. La fracción de exclusión se dializa y filtra en amicon M 50 ; se liofiliza. La proteína obtenida se ajusta a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$, y se caracteriza por doble difusión en microtécnica con antisuero comercial anti β_2 -m ; su peso molecular se determina mediante electroforesis en acrilamida-SDS en donde además se ve el grado de pureza de la proteína; la inmunoelectroforesis con anti proteínas totales descarta la presencia de proteínas séricas humanas. La proteína se conjuga con --carbodiimida a albúmina sérica bovina y se inocula a conejos obteniendose anticuerpos específicos.

INTRODUCCION

La Beta-2-Microglobulina (β_2 -m) fué aislada por primera vez por Berggård y Pearn en 1969 a partir de la orina de pacientes con alteraciones renales tubulares. Su función es aún desconocida, sin embargo parece tener relación con el aparato inmune por las siguientes razones:

a) La secuencia de aminoácidos tiene una gran homología con el dominio 3 de la IgG.

b) Se encuentra formando parte de receptores como el HLA loci A, B y C; así como otros que tienen que ver con la reactividad de linfocitos.

c) Recientemente se ha demostrado la correlación entre incrementos plasmáticos o urinarios de esta proteína con algunos estados de enfermedad, como en el rechazo inmunológico de trasplante renal, en estados de inmunodeficiencia -- como en el cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

GENERALIDADES

La β_2 -m es una proteína pequeña constituida por 100 aminoácidos que pertenece por su movilidad electroforética al grupo de las γ -globulinas, en la posición 25 y 81 se une por un puente disulfuro por lo que es una proteína globular; se ha visto que carece de polimorfismo así como de carbohidratos y que a un pH inferior de 5.5 se desnaturaliza. (2,12,39)

En la tabla 1 se muestran algunas de sus propiedades.

TABLA 1

Propiedades de la β_2 -m. (4)

Peso molecular	11,815
Punto isoelectrico a 5°C	5.4-5.7
Coefficiente de sedimentación, S°_{20w}	1.6 S
Velocidad de fricción f/f_0	1.16

Se han estudiado β_2 -m de diferentes especies y se encontró que tienen propiedades muy similares. Las especies que están totalmente caracterizadas son: humana, conejo, cobayo y rata; parcialmente las de pollo, bovino, perro y algunos primates. (26)

En las especies estudiadas no se ha visto polimorfismo aunque en cobayo se encontraron dos tipos. Tanto sus pesos moleculares, movilidad electroforética y secuencia de aminoácidos son parecidos, pero a pesar de esto no se ha visto que los anticuerpos obtenidos en contra de unas reacciones cruzadamente contra otras. (26)

El catabolismo de la β_2 -m es en riñón, en las células epiteliales del túbulo proximal. (5,6,11). En circuns-tancias normales la β_2 -m de suero es filtrada por el glomérulo renal y catabolizada en los túbulos proximales y en pequeñas cantidades reabsorbida. En pacientes con daño renal la actividad catabólica de las células tubulares está perdida lo que provoca un incremento de la concentración de β_2 -m tanto en suero como en orina. (21,47)

β_2 -M Y SU HOMOLOGIA CON LAS INMUNOGLOBULINAS

Smith y Poulik fueron los primeros en estudiar la estructura primaria de la β_2 -m humana y aunque incompleta - su investigación encontraron que 24 aminoácidos son homólogos con la secuencia de la cadena pesada de la IgG principalmente el dominio 3. Posteriormente Peterson y colaboradores establecen la secuencia completa de la proteína y encuentran que la homología entre β_2 -m y la IgG (dominio 3) es de 28 aminoácidos. Sin embargo, se ha observado que a pesar de su parecido no hay reacción cruzada de anti β_2 -m con las diferentes inmunoglobulinas ni con las cadenas ligeras κ , λ y la cadena J ni con anti inmunoglobulinas y β_2 -m, la síntesis y expresión de los anticuerpos y la β_2 -m son independientes. (4, 25, 26, 30, 33)

Igualmente se encontró homología en β_2 -m de ratón y conejo y sus respectivas IgG y de igual modo se ha visto que no hay reacción cruzada entre estas. (3)

Debido a su extraordinaria similitud entre la porción CH_3 de la IgG y la β_2 -m se ha propuesto un origen evolutivo, a partir de un gen ancestral común y que el gen --

para β_2 -m surgió antes de la duplicación del gen para IgG ; o que posteriormente ocurre una deleción importante en el gen correspondiente a la β_2 -m que ahora la presenta como -- una unidad pequeña. Otra teoría es que la unidad como la -- β_2 -m se haya duplicado genicamente dentro del DNA formando un cistrón que incluye la información de 3 monómeros consecutivos. (3,26)

Debido a este parentesco entre genes de inmunoglobulinas y la β_2 -m, así como su presencia en receptores que participan en interacciones celulares dentro de la respuesta inmunológica se ha propuesto que la β_2 -m juega un papel modulador.

DISTRIBUCION DE β_2 -M EN LIQUIDOS CORPORALES Y CELULAS

La β_2 -m se ha encontrado en orina, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido sinovial, líquido seminal y calostro. En la tabla 2 se muestran concentraciones de β_2 -m en algunos líquidos corporales humanos.

TABLA 2

Concentración de β_2 -m en líquidos corporales humanos. (2,26)

Calostro	19,700 ng/ml
L. amniótico	1150 ng/ml
LCR	1.7 mg/lt
L. seminal	500 ng/ml
Orina	370 μ g al día
Saliva	1100 ng/ml
Suero	2-4 μ g/ml

LCR= Líquido cefalorraquídeo

La síntesis de β_2 -m es exclusiva de células nucleadas y se ha visto que se encuentra en la superficie de los linfocitos, macrófagos, células endoteliales y algunas epiteliales, trombocitos, mononucleares y polimorfonucleares. Se encontró en el epitelio celular citoplasmático del túbulo renal y ocasionalmente en la membrana basal tubular. También se ha observado en células tumorales de origen mesenquimatoso y hematopoyético. (5,14,15) Se ha sugerido que la β_2 -m está asociada a antígenos tumorales específicos (TSA) y que los TSA son una modificación de los antígenos HLA. (13,31)

Bernier y Fanger reportaron que en cultivo de linfocitos normales hay síntesis de β_2 -m, la que no solo se expresa en la superficie celular, sino también se secreta al medio, pudiendo ser incrementada por estimulación con fitohemaglutinina (PHA). (4,26)

En el ratón β_2 -m es reportada asociada con los antígenos de histocompatibilidad H-2, también estructuralmente y genéticamente con otros marcadores como el TL, antígeno S, Qa-2, H-Y y con un factor interaccional célula-célula. (8)

ASOCIACION DE β_2 -M Y HLA.

Las células en su superficie expresan un gran número de diferentes moléculas que cuando se realiza un transplante de tejido son extrañas para organismos diferentes, - (aún de la misma especie) provocando el rechazo. El pequeño grupo de glucoproteínas capaz de desencadenar este fenómeno se denomina antígeno mayor de histocompatibilidad (HLA) formado por dos cadenas: una ligera y constante y la otra pesada y variable. (*figura 1*) (44)

Poulik y Motwani demostraron que la β_2 -m está presente en la membrana de linfocitos y que está íntimamente asociada a los antígenos HLA de los loci A, B y C es decir, se trata de la región constante de estas proteínas y a pesar de su interacción estructural son producidas por dos -- cromosomas diferentes. El gen de β_2 -m está en el cromosoma 15 y el gen del HLA está en el cromosoma 6. (18)

Se muestra un modelo de la asociación de la β_2 -m y los antígenos HLA del loci A, B y C así como con otros receptores; por ejemplo para la fitohemaglutinina (PHA) y receptores de unidad de reconocimiento para cultivo mixto de

linfocitos (MCL). Vemos la forma monómera de los antígenos HLA y la forma dímera de los mismos con β_2 -m. Se observa -- que la β_2 -m es una proteína extrínseca, ya que es netamente hidrofílica por lo que no puede interaccionar con los fosfolípidos de la membrana plasmática. La β_2 -m se une a la cadena pesada del HLA por fuerzas no covalentes en el dominio -- dos; una porción de la cadena pesada penetra la membrana te niendo esta un peso molecular de 10,000 daltons y contenien do un puente disulfuro. La papaína nos puede fragmentar a -- la proteína en dos fracciones de 34,000 y 11,000 daltons -- mientras que tratamientos con detergentes no iónicos se obtienen dos fracciones de 43,000 y 11,000 daltons. (*figu - ra 2*) (12,20)

La cadena pesada del HLA es extremadamente sensible a proteólisis cuando β_2 -m es removida. Como la β_2 -m es un tercio del tamaño de los antígenos HLA expuestos nos -- hace pensar que ésta probablemente influye en la conforma -- ción de la cadena pesada estabilizándola. (44)

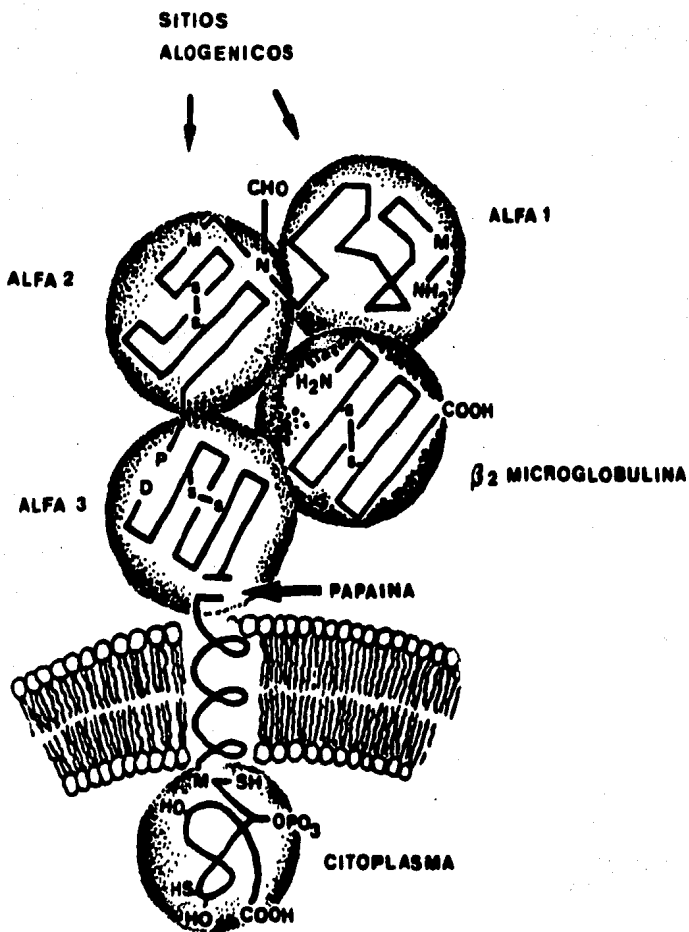


Figura 1 Antigenos HLA loci A,B y C (41)

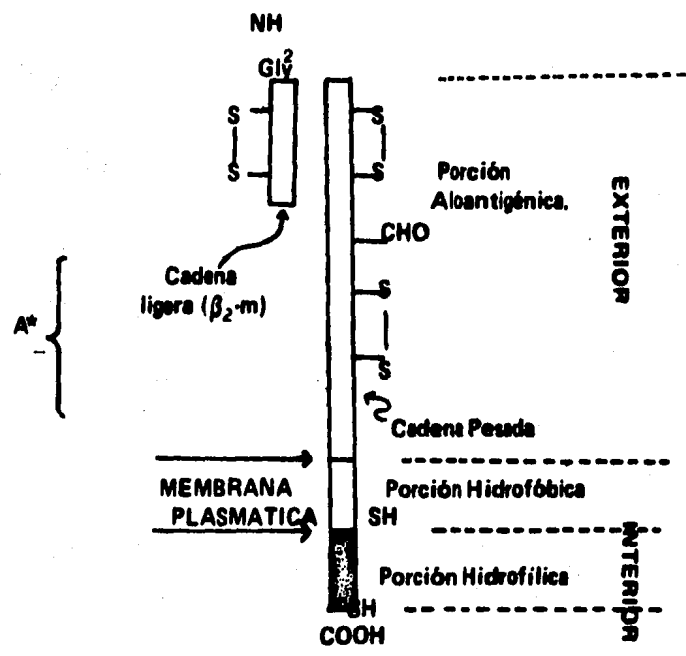
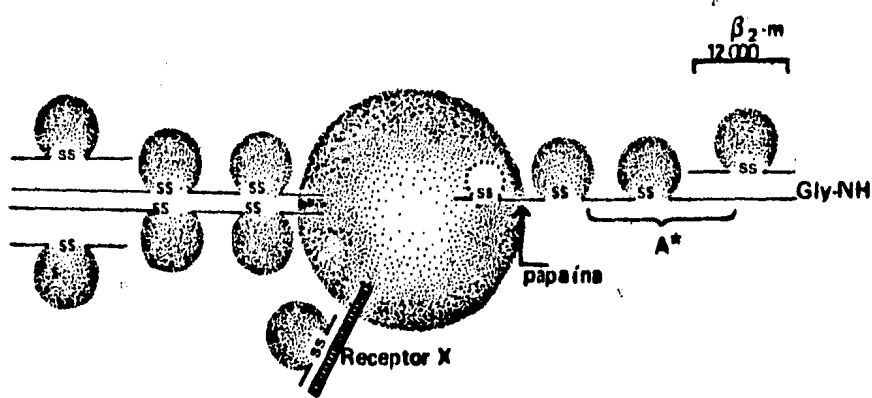


Figura 2 Asociación de β_2 -m con el HLA (12.26)

OTROS ESTUDIOS

Incubando linfocitos en cultivo se ha visto que hay síntesis y secreción en el medio de β_2 -m. Esta síntesis puede ser incrementada cuando los linfocitos son estimulados con fitohemaglutinina (PHA) o concanavalina A (Con A) pero no son estimulados con el mitógeno de fitolaca (PWM) lo que sugiere que es secretada por linfocitos timo dependientes. Tratamiento de linfocitos normales en cultivo con anti β_2 -m y complemento mata el 20% de las células e impide la producción de β_2 -m. (4,20)

Si se marcan células con fluoresceína anti β_2 -m se observa brillo en todas ellas a la luz ultravioleta, -- siendo más intenso en un 15 a 20% de las mismas. Utilizando anticuerpos anti cadenas ligeras marcadas con rodamina y anti β_2 -m marcada con fluoresceína ambos antisueros marcan la misma proporción de células pero distinguiendo subpoblaciones diferentes, lo que sugiere que las células poseedoras de grandes cantidades de β_2 -m pertenecen a la población timodependientes. (16)

Un tercio de linfocitos normales expresan receptores para IgG y si son tratados con β_2 -m exógena se ve que el número de linfocitos normales que expresan receptores Fc aumentan al doble. Si se ponen anticuerpos anti β_2 -m a los linfocitos tratados con β_2 -m el incremento de la expresión de receptores es suprimida.(4)

También se ha visto que promueve la formación de rosetas entre macrófagos y glóbulos rojos de borrego, fija complemento y además tiene propiedades citoflicicas, actividad quimiotáctica, no se une a receptores Fc y se ha observado que β_2 -m puede impedir la polimerización de la fibrina cuando está presente en una gran cantidad. La proteína fue capaz de prolongar el tiempo de trombina pero no dañó la actividad de trombina esterasa. Incubación con anti β_2 -m inhibió marcadamente esta actividad anticoagulante. Por otro lado se ha demostrado que anticuerpos anti β_2 -m son capaces de agregar plaquetas.(3,4,22)

β_2 -M EN MEDICINA CLINICA

La β_2 -m se puede encontrar elevada en orina y suero. Este incremento puede estar gobernado por dos procesos:

- 1) La velocidad de desaparición-degradación de la proteína.
- 2) La velocidad de síntesis liberada de las células.

Una reducción en la velocidad de filtración es asociada con un aumento en suero de β_2 -m por lo tanto puede ser usado en la evaluación clínica de la función renal post trasplante, incluyendo la predicción de rechazo agudo y crónico o la viabilidad del injerto. (1, 8, 35, 37, 38)

Por lo tanto mediciones de β_2 -m son de valor diagnóstico en daño renal y además se puede diferenciar entre infección del tracto preglomerular y postglomerular. (27, 35, 45)

Cuando la concentración sérica es elevada y la función renal es normal, aparentemente es debido a un incremento en la síntesis.

A las enfermedades que caen en este tipo se les puede dividir en dos categorías:

a) Enfermedades inflamatorias crónicas.

En pacientes con lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren's, sarcoidosis, algunas enfermedades hepáticas como cirrosis y hepatitis viral aguda; así también en el 80-100% de los pacientes con síndrome inmuno deficiente adquirido. (17, 27, 28, 34, 46)

b) Enfermedades Neoplásicas.

Valores séricos incrementados de β_2 -m han sido encontrados en pacientes con leucemia linfocítica crónica, -- mieloma múltiple, carcinoma, linfoma y linfadenopatías por lo que es un candidato como marcador tumoral. (10, 14, 32, 40)

Anti β_2 -m es capaz de suprimir la reactividad de los antígenos HLA locus A, B y C, mientras la expresividad de otros antígenos como DR es incrementada. (9, 24, 25)

Como ya se vió la β_2 -m es de gran importancia por lo que el estudio de dicha proteína va en aumento ya que en un gran número de enfermedades se observan incrementos considerables de gran utilidad tanto para el diagnóstico de estas enfermedades así como para valoración pronóstica. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo, es la purificación de β_2 -m con un método sencillo y económico. La purificación de esta proteína también es importante porque abre camino para nuevos estudios.

MATERIAL Y METODOS

I.- Material.

1) MATERIAL BIOLÓGICO.

30 litros de orina de pacientes post-transplante renal de 1 a 9 días. (Unidad de transplante del C.H. " 20 de noviembre " ISSSTE).

Anticuerpos anti β_2 -m (Tilburg Berchem Antwerpen - London).

Suero normal humano concentración 7g/100 ml.

Suero de conejo anti proteínas totales humanas.

2) EQUIPO.

Agitador magnético

Cámara de electroforésis

Cámara húmeda

Cámara de inmunoelectroforésis

Centrífuga J-21 C Beckman

Colector de fracciones LKB Ultrarrao 2000

Conductímetro Travenol

Cortador de gel LKB

Espectrofotómetro Spectronic 20, Bausch & Lomb

Filtro Amicón Diaflo

Fuente de poder Gelman

Jeringa de 20 ml y aguja no. 18

Jeringa Hamilton (Hamilton Co.)

Liofilizadora Labconco

Medidor de pH

Molde para doble difusión en microtécnica

Membrana ultrafiltración 10 x M 50 43 mm

Parrilla

Perforador para inmunolectroforésis LKB

Pipeta automática de 100 μ l

Rotor Beckman JA-14

3) REACTIVOS.

Azida de sodio (Sigma)

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio (KP) 1 M, 0.2 M, 0.15 M, 0.1 M, 0.05 M, 0.02M
pH 6.8

Solución de azul de coomassie G-250 para cuantifi -

car proteínas (Sigma Ch. Co.): 50 ml de etanol, ac. fosfórico 100 ml, azul de coomassie 0.1 g, aforar a 1 lt con agua destilada; filtrar 2 veces la solución.

DEAE-Celulosa: Dietil aminoetil celulosa (Sigma Ch. Co).

Sephadex G-75 (Pharmacia)

Solución reguladora de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.2

Agarosa 0.8% en PBS 0.1 M, pH 7.2

Agar noble al 1% en agua destilada

Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0.8%

Acrilamida (Sigma Ch. Co.)

N,N,-metilenbisacrilamida (Sigma Ch. Co)

Solución amortiguadora para el gel concentrador:

Tris -HCl 0.2 M, pH 7.0

Tris: Hidroximetil aminometano (merck)

Solución reguladora para gel resolvedor: Tris - HCl

1.75 M, pH 8.4

Persulfato de amonio al 10% (Sigma Ch. Co.)

SDS al 10%: Dodecil sulfato de sodio (Sigma Ch. Co)

TEMED: N,N,N'N' tetrametilendiamino (Sigma Ch. Co).

Solución reguladora para corrimiento: 6 g Tris, 28g

glicina, SDS 0.1%, aforar a 1 lt con agua destilada y ajustar pH 8.3

Solución fijadora: Metanol 50%, ác. acético 10%, agua destilada 40%.

Solución teñidora: Metanol 50%, ác. acético 10%, colorante 0.1%, agua destilada 40% (Colorante azul de coomassie brillante R, Sigma).

Solución desteñidora: Metanol 10%, ác. acético 10%, agua destilada 80%.

Azul de bromofenol 2% (Sigma de México).

Agar noble al 1% en solución amortiguadora de barbituratos (Lab. Difco).

Solución amortiguadora de barbituratos pH 8.6 - 9.0 fuerza iónica 0.075 (Lab. Helena).

Solución salina fisiológica (SSF); Cloruro de sodio 0.9%.

Acido acético al 5%

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

Acetato de sodio-acético 0.2 M, pH 5

Glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8 y 2.2

Glutaraldehído 2.5%

K_2HPO_4 0.1 M, pH 7.4

Solución reguladora de fosfatos (PBS) que contenga

NaCl 0.15 M, $KHPO_4$ 0.01 M, pH 7.4

II.- Métodos.

PURIFICACION.

1) TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

La orina es colocada en garrafones que contengan azida de sodio en una concentración del 1% y 40 ml de solución reguladora KP 1 M, pH 6.8 para 4 litros de muestra. Se centrifuga a 5,000 rpm 15 min; determinar proteínas por el método de azul de coomassie y es refrigerada a 4°C.

2) METODO DE AZUL DE COOMASSIE PARA CUANTIFICAR PROTEINAS.

FUNDAMENTO.

El método para cuantificar proteínas involucra la unión del azul de coomassie brillante G-250 a la proteína. La unión del colorante a la proteína causa un cambio en la absorción máxima del colorante de 465 a 595 nm. La prueba es reproducible y rápida. La reacción total se lleva a cabo en 2 minutos con una estabilidad de 1 hr. La sensibilidad del método es de 10 a 100 µg de proteína. (?)

METODO.

1.- Adicionar 5 ml de la solución de coomassie a 0.1 ml de la muestra.

- 2.- Agitar y reposar 15 min. a temperatura ambiente.
- 3.- Leer a 595 nm usando como blanco solución de coomassie.
- 4.- Determinar la concentración de la muestra comparando la densidad óptica obtenida con una curva estandar de albúmina humana en concentraciones de 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$

3) CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA.

FUNDAMENTO.

La cromatografía de intercambio iónico involucra la unión electrostática de una proteína con una matriz insoluble que contiene grupos químicos con carga opuesta a la de la proteína. El grado en el que la proteína se une depende de su densidad de carga. La DEAE-Celulosa es una resina con carga positiva (intercambio aniónico).

Las proteínas pueden ser eluidas por:

a) Incrementos de la fuerza iónica: al incrementar la concentración de iones estos compiten con las proteínas por los grupos cargados.

b) Alterando el pH: como el pH se acerca a el punto isoeléctrico, la carga neta llega a ser cero y así la proteína se desprende. (23,29)

METODO.

- 1.- Diluir las orinas hasta una conductividad de 5-7 mmhos/cm²
- 2.- Pasar las orinas a través de la columna de DEAE montada
- 3.- Determinar el volumen de orina a usar en la cromatografía de acuerdo a la concentración de proteína que contenga, así como a la capacidad de la columna para adsorber (100 mg de proteína por gramo de DEAE-Celulosa).
- 4.- Lavar la columna con la solución reguladora KP 0.02 M.
- 5.- Eluir las proteínas con las siguientes soluciones reguladoras; KP 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 M, pH 6.8
- 6.- Determinar el volumen de las soluciones reguladoras midiendo la cantidad de proteína y cuando la densidad óptica sea menor a 0.05, cambiar la solución reguladora.
- 7.- Cuantificar proteínas de las diferentes fracciones.
- 8.- Conservar la fracción correspondiente a KP 0.1 M.
- 9.- Dializar la fracción anterior contra agua de la llave - por 24 hrs. Posteriormente liofilizar y resuspender en la menor cantidad de agua destilada.

4) CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-75.

FUNDAMENTO.

Usando geles porosos dextran (sephadex), agarosa, poliacrilamida o mezclas de agarosa y acrilamida las proteínas pueden ser separadas en base a su dimensión molecular. Estos funcionan como tamices moleculares de diferentes tipos de micelas, que al humedecerse se convierten en partículas esféricas con trama de diferentes grados lo cual hace que los solutos se seleccionen según su tamaño molecular. Cuando una solución acuosa atraviesa un gel filtrante, las moléculas pequeñas de diámetro inferior al de la trama de las partículas que originan el gel, penetran en las mismas y deben correr al ser eluidas un trayecto mayor que las que no penetran por lo que partículas de gran tamaño saldrán antes que las de tamaño pequeño. (29)

METODO.

- 1.- Equilibrar la columna con PBS (200 ml como mínimo).
- 2.- Colocar la muestra obtenida de la columna de DEAE.
- 3.- Eluir con PBS y coleccionar volúmenes de 3 ml.
- 4.- Leer proteínas a 280 nm.
- 5.- Coleccionar la fracción 2.

- 6.- Dializar contra agua y por último contra PBS.
- 7.- Filtrar por Amicón.
- 8.- Liofilizar.
- 9.- Resuspender la proteína en agua obteniendo una concentración final de 150 µg/ml.

CARACTERIZACION DE β_2 -M.

1.- Identificación.

a) DOBLE DIFUSION EN MICROTECNICA.

FUNDAMENTO.

Técnica cualitativa o semicuantitativa basada en el principio de que el antígeno (Ag) y el anticuerpo (Ac) se difunden a través de un medio semisólido (agar) y forman complejos Ag-Ac estables que pueden ser identificados visualmente. La técnica consiste en colocar agar en platos de vidrio o plástico y hacer perforaciones, en donde son colocados por separado el Ag y el Ac y se dejan difundir de 18 a 24 hrs. Líneas de precipitación visibles se forman en el agar en el punto de equivalencia. (29, 43)

METODO.

- 1.- Hacer un frotis en un porta objeto con la agarosa.
- 2.- Dejar secar.
- 3.- Poner los soportes y encima el molde.
- 4.- Poner por capilaridad la agarosa.
- 5.- Poner en cada pozo 0.05 ml de muestra y en el centro -- los anticuerpos.

Poner en medio humedo y esperar de 24 a 48 hrs. a temperatura ambiente.

NOTA: El espesor del agar queda de 1.5 mm, el diámetro de los pozos es de 4 mm, la distancia entre cada pozo es de 4 mm y la capacidad es de 50 μ l.

b) ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA-SDS.

FUNDAMENTO.

En la electroforésis la migración de las proteínas es dependiente de la carga, tamaño y forma de la molécula. Sin embargo, en la presencia de SDS todas las proteínas se vuelven cargadas negativamente y tienen carga similar a proporción de peso, debido a su unión a moléculas de detergentes cargadas negativamente. Cuando estas proteínas cubiertas con SDS son puestas en un campo eléctrico, la separación de las proteínas ahora dependerá solo de su tamaño y forma. Variando la concentración del gel de poliacrilamida, diferentes rangos de peso molecular pueden ser puestos. (23)

METODO.

Todo el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente. Preparar el gel resolvidor de la siguiente manera:

GEL RESOLVEDOR AL 10% (56 ml).

Acrilamida-Bisacrilamida	16.5	ml
Solución reguladora del resolvidor	10.0	ml
SDS 10%	0.5	ml
TEMED	0.03	ml
Agua destilada	22.5	ml
Persulfato de amonio (fresco)	0.5	ml

Agregar la mezcla a la placa evitando que se formen burbujas hasta la primera línea y ponerle agua destilada lentamente para evitar el menisco, dejar en reposo 1 hr lavar el exceso de persulfato de amonio con agua destilada y secar con papel filtro.

Colocar el peine en la segunda línea y agregar - el gel concentrador.

GEL CONCENTRADOR AL 4.5% (10 ml).

Acrilamida-Bisacrilamida	1.5 ml
Solución reguladora del concentrador	5.0 ml
SDS 10%	0.1 ml
TEMED	0.01 ml
Agua destilada	3.3 ml
Persulfato de amonio (fresco)	0.1 ml

Agregar la mezcla evitando la formación de burbujas. Se deja polimerizar 1 hr., quitar el peine y lavar con agua destilada, secar con papel filtro. Dejar reposar la placa de 2 a 24 hrs. con solución reguladora de corrimiento.

PREPARACION DE LA MUESTRA.

- 1.- Dializar todas las muestras a analizar contra la solución reguladora de corrimiento 24 hrs. a 4°C, diluida 1:40 y 1% de SDS para evitar interferencias debido a la concentración de sales.
- 2.- Ajustar a una concentración de 25 µg.
- 3.- Preparar la siguiente mezcla:

Glicina (50%)	2.5 ml
SDS 10%	1.0 ml
Tris 0.2 M, pH 7.0	0.5 ml
Agua destilada	1.0 ml
Azul de bromofenol	0.1 %

Poner cantidades iguales de la mezcla anterior y de la muestra.

4.- Hervir en baño maría 5 min. la mezcla anterior.

MONTAJE DEL APARATO Y APLICACION DE LA MUESTRA.

- 1.- Poner la solución reguladora en la parte inferior de la cámara de electroforesis, sin olvidar que tiene que estar equilibrada antes de colocarlo.
- 2.- En la parte superior se encuentra la solución reguladora y con ayuda de la jeringa hamilton, poner en cada celda la muestra microlitro por microlitro, esto se hace con la finalidad de que la muestra no rebote y contamine otros pozos.

CORRIMIENTO DE LA ELECTROFORESIS.

- 1.- Colocar el electrodo positivo en la cámara inferior y el negativo en la cámara superior.
- 2.- Aplicar 10 miliamperes (mA).

- 3.- El procedimiento finaliza cuando el colorante recorre - aproximadamente 10 cm del gel resolvidor.
- 4.- Poner en la solución fijadora el gel 4 hrs.
- 5.- Teñir la placa de 6-12 hrs.
- 6.- Desteñir la placa haciendo varios cambios hasta que la placa quede clara y se vean las bandas.

2.- Determinación de la pureza.

La determinación de la pureza es realizada por inmunolectroforé^{sis} y por electroforé^{sis} en gel de poliacrilamida-SDS.

a) INMUNOELECTROFORESIS.

FUNDAMENTO.

Es una técnica por la que las proteínas primera - mente son separadas en un gel de agar de acuerdo a su carga superficial, por exposición a un campo eléctrico. Después de la separación electroforética, las proteínas son puestas para reaccionar, por doble difusión, con un antisuero depositado en un canal paralelo. El resultado es una serie de líneas de precipitación. (36)

METODO.

- 1.- Llenar las placas con agar al 1% y dejar gelificar.
- 2.- Colocar sobre la placa de agar el perforador para la inmunolectroforé^{sis} y extraer el agar de los pozos por succión con pipeta pasteur y vacío.
- 3.- Poner las muestras en los pozos y agregar una gota de azul de bromofenol al suero.

- 4.- Llenar la cámara de electroforésis con la solución amortiguadora de barbituratos.
- 5.- Se conecta a la fuente de poder ajustando a 100 volts - y se deja hasta que el colorante se desplace 2.5 cm del lugar de donde se depositó.
- 6.- Sacar la placa y con el cortador para el gel, abrir los canales y poner en ellos los anticuerpos antiproteínas totales.
- 7.- Dejar difundir de 12-24 hrs. y ver resultados.

OBTENCION DE ANTICUERPOS

Para la obtención de anticuerpos inocular la proteína acoplada a albúmina bovina 1 ml más 1 ml de adyuvante de Freund a un conejo de raza New Zealand de 4 meses.

(19)

TABLA 3
Protocolo de inoculación

β_2 -m µg	Albúmina bovina mg	Carbodiimida mg	inoculación	adyuvante Freund
375	0.02	15	primera	completo
300	0.017	12	segunda	incompleto
		<i>s a n g r e</i>		
300	0.017	12	tercera	incompleto
		<i>s a n g r e</i>		
277	0.015	11	cuarta	incompleta
<i>s a n g r e c a d a o c h o d í a s</i>				

Para acoplar, mezclar la β_2 -m con albúmina a la carbodiimida, agitar 1 hr. a temperatura ambiente. Posteriormente dializar contra agua destilada 24 hrs.

Detectar la producción de anticuerpos por precipitación en capilar directa; con inmunoelectroforé^sis y doble difusión en microtécnica.

1.- Obtención de antisuero monoespecífico.

a) CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

FUNDAMENTO.

Es ésta una cromatografía de adsorción en la que se aprovecha la especificidad de interacciones biológicas - entre proteínas aisladas, como lo es la reacción antígeno - anticuerpo. Mediante la insolubilización de uno de los reactivos se consigue una substancia fijadora insoluble con afinidad biológica para la substancia a ser captada o purificada.

El glutaraldehído es un agente que ayuda a la preparación de adsorbentes efectivos estables y específicos. - Reacciona con grupos epsilon amino de lisina. La adición de este agente a la solución de baja concentración de proteína produce polímeros de bajo peso molecular las cuales son solubles en agua. Su adición posterior a una solución de alta concentración de proteína produce polímeros de proteína de alto peso molecular las cuales son insolubles en agua.(42)

METODO.

- 1.- Agregar a 40 ml de suero 4.8 ml de la solución reguladora de acetato pH 5 y ajustar el pH a 5 si es necesario.
- 2.- Agregar 11.2 ml de glutaraldehído, dejar 3 hrs. a temperatura ambiente con agitación lenta.
- 3.- Homogenizar el gel formado por jeringa con aguja del número 18.
- 4.- Lavar con PBS (250 ml aproximadamente)
- 5.- Lavar con glicina-HCl, pH 2.2 0.2 M (100 ml)
- 6.- Dispersar en 50 ml de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 hasta que la concentración de proteínas que salga sea menor de 0.05 de densidad óptica a 280 nm.

- 7.- Rehomogenizar y dispersar en 50 ml de HCl-Glicina 0.2 M pH 2.8, agitar 15 min. a temperatura ambiente.
- 8.- Neutralizar con 10 ml de K_2HPO_4 1 M, adicionar 40 ml de agua destilada y centrifugar.
- 9.- Dispersar el gel en 100 ml de glicina 1 M.
- 10.- Incubar toda la noche a 4°C.
- 11.- Lavar con PBS
- 12.- Incubar con el antisuero de conejo obtenido (anti β_2 -m) a temperatura ambiente y agitar durante 24 hrs.
- 13.- Centrifugar y guardar el sobrenadante.

NOTA: El inmunoadsorbente puede ser guardado a 4°C en PBS con 0.01% de azida de sodio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación

- 1) Se colectaron 30 lt. de orina, seleccionando las orinas con mayor concentración de proteína.
- 2) En la cromatografía de intercambio iónico se eluyeron las proteínas por gradiente discontinuo con las siguientes soluciones reguladoras: 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M y 0.2M pH 6.8, obteniéndose en cada una litro y medio. Se cuantificó proteínas por azul de coomassie, en cada fracción (*gráfica 1*).

Como se observa la mayor concentración de proteína se obtiene con la solución reguladora 0.1 M; ésta fracción es dializada contra agua de la llave por 12 hrs.

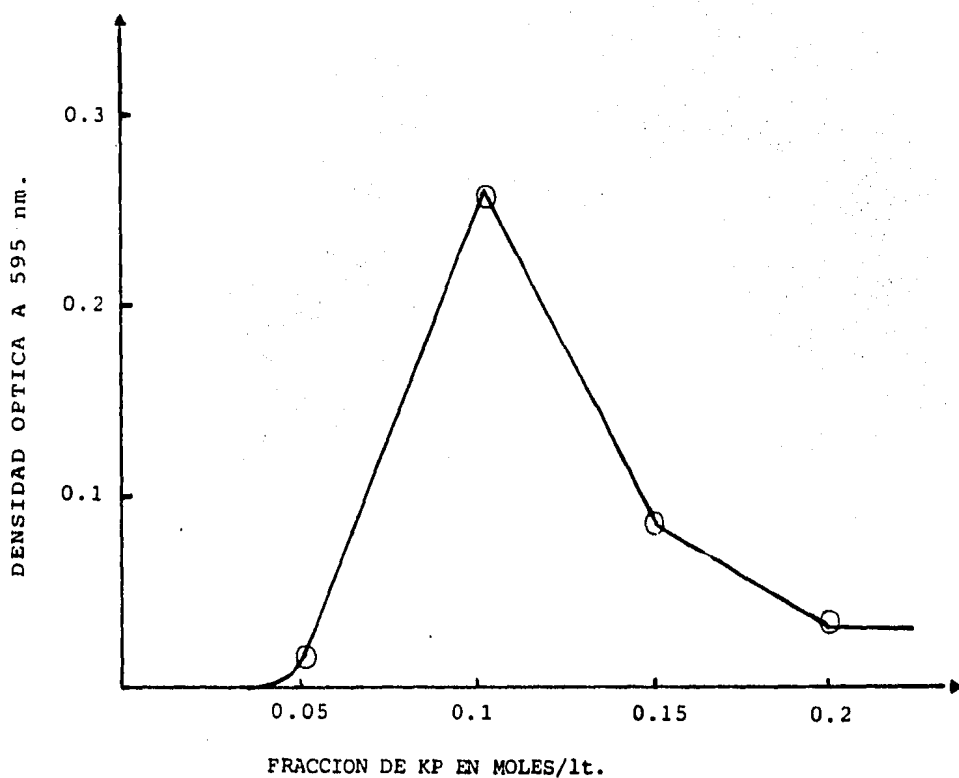
La muestra antes de dializar es amarilla y posteriormente el color disminuye, además se forma un precipitado blanco que se elimina por centrifugación.

El sobrenadante se liofiliza quedando un polvo abundante y con apariencia salina poco soluble en agua; el precipitado se elimina por centrifugación.

3) El sobrenadante se pasa por Sephadex G-75 y se cuantifica proteína midiendo la densidad óptica a 280 nm. (Gráfica 2)

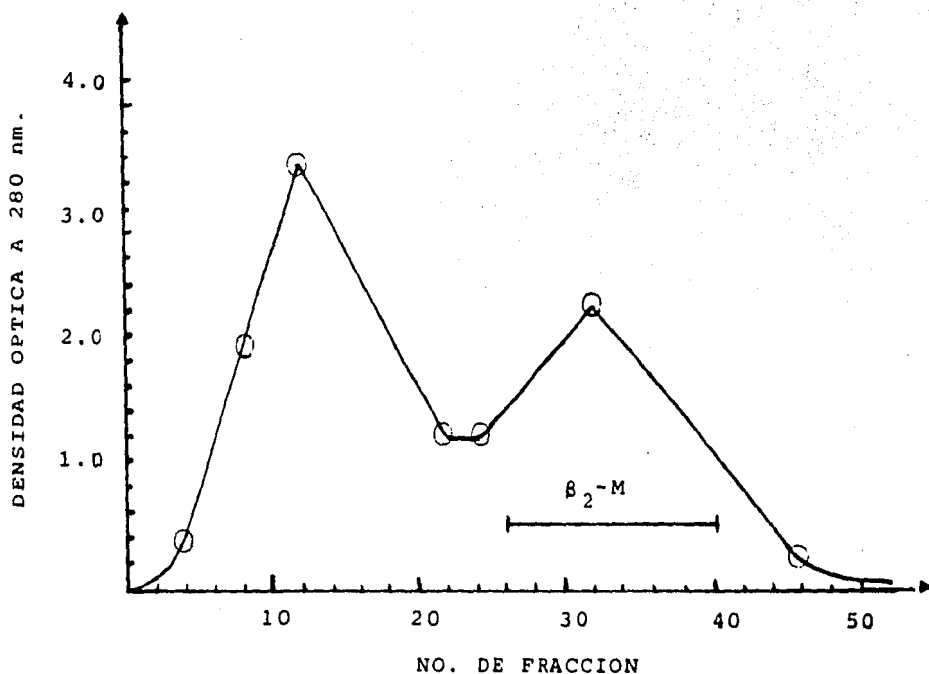
En la columna se observa que se separan dos fracciones amarillas. La fracción de exclusión es dializada contra agua y posteriormente contra PBS. Se filtra por Amicón M-50 para quitar rastros de albúmina y se liofiliza. El liofilizado se resuspende en el menor volúmen de agua posible quedando en promedio a 150 $\mu\text{g/ml}$.

GRAFICA 1



Cromatografía en DEAE-Celulosa con gradiente discontinuo. Se colectó la fracción correspondiente a 0.1 moles/lit que contienen la máxima concentración de β_2 -m en un volumen de 1500 ml.

GRAFICA 2



CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-75.

Se usó una columna de 90 x 1.5 cm y se colectaron fracciones de 3 ml juntando de la 26-40 que corresponden a la β_2 -m.

CARACTERIZACION DE β_2 -M.

1.- Identificación.

a) Se hizo una doble difusión en microtécnica con un anti - suero comercial específico anti β_2 -m donde se obtuvo -- reacción positiva.

En la electroforé^sis en acrilamida-SDS se identificó la β_2 -m de acuerdo a su peso molecular.

2.- Determinación de la pureza.

Ya caracterizada la protefna se determina la pureza por medio de inmunolectroforé^sis con anticuerpos anti protefnas séricas, en la cual no se observa reacción positiva. Como complemento de la determinación de la pureza está la electroforé^sis en poliacrilamida-SDS, que además de determinar el peso molecular se aprecia pureza, ya que no hubo otras bandas contaminantes de protefⁿas.

OBTENCION DE ANTICUERPOS.

Debido al peso molecular pequeño de la β_2 -m se acopló químicamente a albúmina sérica bovina (BSA) con el fin de aumentar su tamaño y por tanto su inmunogenicidad.

Se obtuvo producción de anticuerpos contra β_2 -m hasta la cuarta semana de inoculación. Se determinó la presencia de anti β_2 -m por prueba cualitativa en capilar. -- Cuando se realizó la inmunolectroforésis con β_2 -m, se obtuvieron varias bandas de precipitación por lo que se decidió adsorber el antisuero por cromatografía de afinidad con proteínas plasmáticas inmovilizadas; finalmente se observa una sola banda de precipitación correspondiente a la β_2 -m.

CONCLUSIONES

- La orina de pacientes recién transplantados de riñón es una buena fuente de β_2 -m.
- Es una buena técnica para la obtención de β_2 -m.
- Es un método sencillo en comparación con otros realizados hasta la fecha, que además de complicados requieren de reactivos y aparatos de difícil adquisición en nuestro medio.
- Es una técnica que resulta económica lo que es importante para todo laboratorio.

La técnica aunque no tiene un buen rendimiento se obtiene en pureza suficiente para obtener anticuerpos específicos en contra de ella.

G L O S A R I O

- Cadena J Cadena polipeptídica que normalmente se encuentra en las inmunoglobulinas poliméricas, en particular IgA e IgM.
- Cadena κ Una de los 2 tipos principales de cadena L.
- Cadena λ Uno de 2 tipos mayores de cadena L.
- Cadena L Cadena de polipéptidos presente en todas las moléculas de inmunoglobulinas.
- CH₃ Cadena pesada dominio 3 de las inmunoglobulinas.
- Fc Receptor presente sobre diversas subclases de linfocitos para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.
- H-2 Complejo mayor de histocompatibilidad en el ratón

- HLA (Antígenos leucocitarios humanos). La mayor región de histocompatibilidad en el hombre.
- H-Y Antígeno de histocompatibilidad del ratón en el macho (localizado en el cromosoma Y)
- IgG Inmunoglobulina que de acuerdo a su cadena pesada es de la clase gama.
- KP Solución reguladora de fosfato monobásico de potasio.
- PBS Solución reguladora de fosfato.
- Qa Marcadores de subpoblación de linfocitos T periféricos.
- Qa₂ Subregión de Qa.

S Región del complejo H-2, que controla la expresión cuantitativa y cualitativa de una β -globulina del suero; que corresponde al C-4 del complemento.

TL Antígeno de membrana timo-leucemia en el ratón.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Barnes, R.R., Lynne, C.A. Beta-2-Microglobulin. Transplantation --
35:6 552-555, 1983
- 2.- Berggård, IL, Bearn, A.G. Isolation and Properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids. J. of biological Chemistry. 243:15 4095-4103, 1968.
- 3.- Berggård, B., Björck, L., Cigén, R & Lögdberg, L. β_2 -microglobulin Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40 suppl. 154 13-25, 1980.
- 4.- Bernier, G.M. β_2 -Microglobulin: Structure, Function and Significance. Vox. Sang. 38 323-327, 1980.
- 5.- Bernier, G.M., Post, R.S. β_2 -Microglobulin. Transplantation 15 : 1 176-179, 1973.
- 6.- Bernier, G.M., Cornad, M.E. Catabolism of human β_2 -microglobulin by the rat kidney. American J. of Physiology 217:5 1359-1362, 1969.
- 7.- 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.
- 8.- Carrier, Y., Colle, A., Tchou, P., Bout, D., Capro, A. Quantification of β_2 -microglobulin by inhibition enzyme immunoassay. J. of Immunological Methods 40 321-238, 1981.

- 9.- Ceppellini, R., Garotta, G., Malavasi, F., Trucco, M. Modulation of Expression of HLA components at the Cell Surface Induced by Anti- β_2 -m Reagents. *Tissue Antigens* 17 28-38, 1981.
- 10.- Child, J.A., Crawford, S.M., Norfolk, D.R., O'Quigley, J. Evaluation of serum β_2 -microglobulin as a prognostic indicator in myelomatosis. *J. Cancer* 47 111-114, 1983.
- 11.- Chung, Parl M., Paz, Villamil Enojo, Hall, P.W. Demonstration of β_2 -microglobulin in the kidney by direct immunofluorescent staining. *Vox. Sang.* 38 348-352, 1980.
- 12.- Cooper, E.H., Plesner, T. Beta-2-Microglobulin Review: Its Relevance in Clinical Oncology. *Med. Pediatric Oncology* 8 323-334, 1980.
- 13.- Curry, R., Thoen, J., Messner, R.P. Rapid Semi-Quantitative isolation of beta-2-microglobulin from urine. *J. of Immunological Methods* 47 365-373, 1981.
- 14.- Evrin, P.E., Nilsson, K. β_2 -Microglobulin production in vitro by human hematopoietic, mesenchymal and epithelial cells. *J. of Immunology* 112:1 137-143, 1974.
- 15.- Evrin, P.E., Pertoft, Hakan. β_2 -microglobulin in human Blood Cell. *J. of immunology* 111:4 1147-1153, 1973.
- 16.- Fanger, M.W., Bernier, G.M. Subpopulations of Human Lymphocytes defined by β_2 -microglobulin. *J. Immunology* 11:2 609-617, 1973.

- 17.- Francioli, P., CLément, F. Beta₂-microglobulin and Immunodeficiency in a Homosexual Man. *New England J. of Medicine* 307:22, 1982.
- 18.- Goodfellowe, P.N., Jones. E.A., Van Heyningen, V., Solomon, E., Bobrow, M. The β_2 -microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 254 267-268, 1975.
- 19.- Goodfriend, T.L., Levine, L., Faman, G.D. Antibodies to Bradykinin and Angiotensin: A use of Carbodiimides in Immunology. *Science* 144 1344-1346, 1964.
- 20.- Grey, H.M., Kubo, R.T. y col. The Small subunit of HL-A antigens is β_2 -microglobulin. *J. Exp. Med.* 138, 1608-1612, 1973.
- 21.- Hall, P.W., Ricanati, E.S., Vacca, Ch. V., Chung-Park, M. Renal Metabolism of β_2 -microglobulin, *Vox. Sang* 38 343-347 1980.
- 22.- Hammerschmidt, D.E., Moldow, Ch. F Impaired fibrin polymerization in viral hepatitis. Report of a case: probable identity of the inhibitor with β_2 -microglobulin *J.A. Clin. Med.* 92:6 1002-1008, 1978
- 23.- Hudson, L., Hay, P.C. Practical Immunology. Ed. Blackwell. London 1980.
- 24.- Hunter, S.V., Poulik, M.D. Tukey Anti-Human β_2 -microglobulin Reveals False Positive Reactions observed with DR antisera. *Transplantation* 11:4 1966-1969, 1979.
- 25.- Hütteroth, T.H., Litwin, S.D., Cleve, H., Poulik, M.D. The relationship between β_2 -microglobulin and immunoglobulin in cultured human lymphoid cell lines *J. Exp. Med.* 137 838-843, 1973.

- 26.- Jamieson, G.A., Ph. D., Progress in Clinical and Biological Research vol. 5 ed. E. Scientific, New York, 1976.
- 27.- Karlsson, F.A., Wibell, L., Evrin, P.E. β_2 -microglobulin in Clinical Medicine. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40, suppl. 154 27-37, 1980.
- 28.- Manicourt, D., Brauman, H., Orloff, S., Plasma and Urinary levels of β_2 -microglobulin in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 37:4 328-332, 1978.
- 29.- Margni, R.A. y col. Immunología e Inmunología. Fundamentos. Editorial Panamericana, Argentina 1977.
- 30.- Marx, J.L. Immunology: Role of β_2 -microglobulin. Science 428-429, 1974.
- 31.- Michael, J.G., Dingle, S., Dipersio, L. Pesce, A.J. Beta₂-microglobulin in human tumors heterografted into Athymic Mice. Vox. Sang 38 334-338, 1980.
- 32.- Norfolk, D., Child, J.A. Cooper, E.H., Kerruish, S., Ward, A.M. Serum β_2 -microglobulin in myelomatosis: Potential Value in Stratification and Monitoring J. Cancer 42 510-515, 1980.
- 33.- Poulik, M.D., Bloom, A.D. β_2 -microglobulin Production and Secretion by Lymphocytes in culture. J. Immunology 110:5 1973, 1430 -- 1433.
- 34.- Revillard, J.P. Significance of β_2 -microglobulin in Liver Diseases Vox. Sang. 38 339-342, 1980.

- 35.- Roberts. J.L. Lewis E.J. Serum and Urine beta-2-microglobulin and lysozyme concentrations in transplant rejection. Proc. Dialysis-transplant Forum 145-148, 1979.
- 36.- Rose, N.R., Bigazzi, P.E. Methods in Immunodiagnosis. Ed. Wiley & Sons, New York, 1980.
- 37.- Rosenbaum, R.W., Kately, J., Sánchez, T.V., Hirota, T.F., Mayro, G.H. Beta-2-microglobulin: An early indicator of renal transplant survival and function. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 26 77-81, 1980.
- 38.- Roxe, D.M., Siddiqui, F., Santhanam, S., Greco, F., Wolf, J. Rationales and Application of Beta-2-microglobulin Measurements to Detect acute transplant Rejection. Nephron 27 260-264, 1981.
- 39.- Schardijn, G., Stadius, L.W., Swaak, A.J.G. Urinary β_2 -microglobulin in upper and lower urinary-tract infections. The Lancet 14 805-807, 1979.
- 40.- Spāti, B., Child, J.A. Kerruisch, S.M., Cooper, E.H. Behaviour of serum β_2 -microglobulin and Acute Phase Reactant Proteins in chronic Lymphocytic Leukaemia. Acta Haematologica 64 79-86, 1980.
- 41.- Suvejgaard, A., Morling, M., Płatz, P., Ryder, L.P., Thomsen, M. Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. Ed. Academic Press, Paris, 1980.

- 42.- Ternynck, T., Avrameas, S. Polymerization and Immobilization of Proteins using Ethylchloroformate and Glutaraldehyde. Scand. J. O immunology supp no. 3 29-35, 1975.
- 43.- Thompson, R.A. Techniques in Clinical Immunology ed. Blackwell, Oxford, 1977.
- 44.- Trågårdh, L., Kämpe, O., Hammerling, U., Böhme, J., Claesson, L., Peterons, P.A. β_2 -microglobulin and transplantation antigens. - Scand. J. C. Lab. Invest. 40, suppl 154, 39-44, 1980.
- 45.- Viberti, G.C., Keen, H., Marckinishing renal function in diabetics. British medical J. 282 95-98, 1981.
- 46.- Vladutiu, A.), Richard, M.D., Adler, H., Wells Brason, F. Diagnostic value of Biochemical Analysis of Pleural Effusions. American Society of Clin. Pathologist. 71:2 210-214, 1979.
- 47.- Wibell, L. Evrin, P.E., Berggård, I. Serum β_2 -microglobulin in renal diseases. Nephron 10 320-331, 1973.