

24. 48

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"**



**OBTENCION DE ANTICUERPOS  
ANTIDIGITALICOS**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
CLARA VALDIVIA FARFAN**

**ASESORES:  
M. en C. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO  
I. B. Q. ELDA BELTRAN P:**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





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 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.

# I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
INMUNIDAD	2
ANTIGENO	2
INMUNIZACION EXPERIMENTAL	3
ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DIGITALICOS	5
HAPTENOS Y ACARREADORES	5
CONJUGADOS	5
METODOS DE INMUNDANALISIS	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
OBJETIVO	10
HIPOTESIS	10
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	11
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS Y DISCUSION	25
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	44
BIBLIOGRAFIA	45
RESUMEN	48

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA No.	Página
1. Estructura química de digoxina y digitoxina.	6
2. Mecanismo de reacción para el acoplamiento de Dt-ASB.	7
3. Preparación de conjugados.	16
4. Detección de anticuerpos antidigitálicos.	21
5. Caracterización de anticuerpos específicos.	23
6. Curva tipo de ovoalbúmina.	28
7. Curva tipo de albúmina sérica bovina.	28
8. Espectros de absorción de proteína, haptenos y conjugados heterólogos.	30
9. Espectros de absorción de proteína, haptenos y conjugados homólogos.	31
10. Titulación de los sueros antidigoxina.	35
11. Titulación de los sueros antidigitoxina.	36
12. Determinación de la concentración del antígeno por ELISA.	37
13. Sistema de Inhibición Z-01.	39
14. Sistema de Inhibición Z-07.	40
15. Sistema de Inhibición Z-11.	41
16. Sistema de Inhibición Z-13.	42

## INDICE DE TABLAS

TABLA No.	Página
1. Rendimiento de conjugados homólogos y heterólogos.	25
2. Saturación teórica de las proteínas.	27
3. Determinación de proteínas.	27
4. Resíduos de haptenos por mol de proteína.	32
5. Precipitación en capilar de los sueros Z-01, Z-02, Z-06, Z-07.	33
6. Precipitación en capilar de los sueros Z-09, Z-10, Z-11, Z-13 y Z-14.	34
7. Inhibición de la precipitación por hapteno.	38
8. Pruebas de solubilidad.	43

## INTRODUCCION

En la industria farmacéutica, los glucósidos digitálicos son de gran importancia para la elaboración de medicamentos usados en el control de padecimientos cardiovasculares, debido a sus propiedades cardiotónicas. Estos compuestos son obtenidos por extracción de plantas del género *Digitalis* (2), siendo los principales los glucósidos primarios de las series A, B y C que por descomposición enzimática dan origen a los glucósidos secundarios digitoxina, gitoxina y digoxina respectivamente, considerados terapéuticamente activos.

Dependiendo de la especie (*D. lanata*, *D. purpurea*, etc.) el contenido de glucósidos totales varía de 0.1 a 1.0 %. No obstante que la digitoxina es el producto más abundante, la digoxina es preferida terapéuticamente debido a que posee una potencia tres veces mayor a la digitoxina, lo cual ha ocasionado que esta última se acumule en grandes cantidades como subproducto durante los procesos de extracción de la digoxina.

Una alternativa para la utilización de digitoxina fue propuesta por Reinhard (25) y consiste en la biotransformación de este sustrato mediante un cultivo de células en suspensión de *Digitalis*; estas células tienen la capacidad de efectuar la hidroxilación específica en el carbono 12 de la molécula para dar como producto digoxina.

El control del proceso de biotransformación requiere de un método de detección de digitoxina y digoxina que sea rápido, sensible y altamente específico, ya que las cantidades que se manejan son del orden de nanogramos y las estructuras de estos compuestos son químicamente muy semejantes. A pesar de la diversidad de métodos conocidos (Colorimétricos, Fluorométricos, Cromatografía de gases y Cromatografía líquida de alta presión) para la cuantificación de este tipo de compuestos, los métodos de inmunanálisis han sido más eficientes por su especificidad; diferencian digoxina de digitoxina, precisión; detectan cantidades del

-13

orden de  $3 \times 10^{-10}$  mol/ml, y rapidez (23). Las técnicas de inmunanálisis han permitido medir concentraciones muy bajas de digitálicos en plasma y fluidos fisiológicos de pacientes con problemas de toxicidad severa por el suministro continuo de digitálicos, en farmacología clínica y en investigación de los mecanismos de acción de los digitálicos.

En el laboratorio de investigación de Biotecnología de la E.N.E.P. Zaragoza se está desarrollando un estudio sobre la Biotransformación de digitoxina mediante cultivos de células de *Digitalis sp.* en suspensión el cual requiere de la cuantificación de dichos compuestos durante el proceso, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo la obtención de anticuerpos con alta sensibilidad y especificidad contra glucósidos cardiotónicos, los cuales serán utilizados en la implementación de un método cuantitativo que garantice la exactitud y especificidad del fármaco valorado.

## FUNDAMENTACION DEL TEMA

### Inmunidad.

La inmunidad, es la reacción de un organismo contra agentes extraños, organismos infectantes o sus productos tóxicos, para su estudio puede clasificarse en inmunidad natural e inmunidad adquirida. La inmunidad natural llamada también inmunidad innata, congénita o hereditaria puede designarse como la resistencia que tiene el individuo por su naturaleza, especie, sexo u otra variante que presente (1).

La inmunidad adquirida (basada en anticuerpos) se clasifica a su vez en inmunidad adquirida activa e inmunidad adquirida pasiva, en la primera el individuo sintetiza sus propios anticuerpos, mientras que en la última el individuo recibe anticuerpos de otro organismo que puede ser humano o animal.

Actualmente se sabe que la respuesta inmune es mediada por una variedad de factores solubles y por células. La respuesta inmune inducida por un primer contacto con un agente extraño es llevada a cabo por proteínas plasmáticas llamadas anticuerpos y se denomina Respuesta inmune Humoral. La respuesta inducida por células especializadas conocidas como linfocitos T sensibilizados se denomina Respuesta inmune celular.

La respuesta inmune presenta cuatro características:

1. Es inducible, porque sólo se manifiesta cuando un antígeno se introduce al organismo.
2. Es específica, pues sólo reconoce y reacciona contra el antígeno que indujo su producción.
3. Tiene memoria, esto se refiere a que un segundo contacto con el mismo antígeno da como resultado una respuesta más rápida y vigorosa (respuesta secundaria) que en la primera ocasión.
4. Es transferible, es decir, por transferencia de suero que con tenga anticuerpos y/o linfocitos, puede transferirse la respuesta inmune de un individuo a otro (26, 28, 30).

### Antígeno.

Son en su mayoría substancias proteicas, aún cuando ciertos polisacáridos, lípidos y hasta ácidos nucleicos pueden tener propiedades antigénicas. Estructuralmente un antígeno contiene grupos químicos ordenados en una arquitectura tridimensional, conocida como determinante antigénico o epitopes, pudiendo existir varios de ellos en cada antígeno (18). Cuando un organismo es expuesto un antígeno y células inmunológicamente competentes lo reconocen como extraño, puede producir anticuerpos contra los determinantes antigénicos. La característica fundamental de estos anticuerpos es reaccionar específicamente con el antígeno o determinante antigénico que causó su producción.

Un antígeno responsable de inducir una respuesta inmune se denomina inmunógeno y puede reaccionar in vivo o in vitro con el anticuerpo específico. In vitro, la reacción antígeno-anticuerpo dependerá de ciertas condiciones, tales como temperatura, pH, fuerza iónica del medio de reacción, etc., y se podrá visualizar como una aglutinación, hemólisis, precipitación e inhibición, de alguna función biológica, por ejemplo inhibición de actividades tóxicas, enzimáticas ó adhesivas del antígeno.

#### Inmunización experimental.

La inmunización es el proceso por el cual se induce una respuesta inmunológica, mediante el contacto de un antígeno con el organismo.

No existe un esquema de inmunización general que sea recomendado para todos los antígenos. Antes de iniciar un programa de inmunización se deben considerar los diversos factores que intervienen en la respuesta inmune, tales como especie, relación filogenética, antígeno, adyuvante, vía de administración y tipo de respuesta.

**Especie:** La cabra, el caballo y el conejo son consideradas las mejores especies para la producción de anticuerpos, sin embargo, el conejo tiene cualidades que lo hacen más apropiado para su empleo, como es su fácil manipulación y ubicación en un espacio pequeño.

**Relación filogenética:** La respuesta que presenta un organismo frente a un antígeno obtenido de otro de diferente especie es buena, y será mejor cuanto mayor sea la diferencia evolutiva entre ellos, es decir los anticuerpos serán específicos y no presentarán reactividad cruzada.

**Antígeno:** Pueden ser particulados o solubles, en el primer caso la inmunización adecuada es por vía intravenosa, mientras que los antígenos solubles administrados por ésta vía dan una respuesta pobre, la cual se incrementa cuando dicho antígeno se administra acompañado de un adyuvante vía subcutánea o intradérmica.

**Adyuvantes:** Son emulsiones de agua en aceite, estabilizadas por un detergente (emulsificador), las cuales estimulan la producción de anticuerpos. El adyuvante más empleado es el de Freund, que consiste de una mezcla de aceite mineral (drakeol, bayol o nugol) con un detergente (arlacel, falba etc.) en proporciones de 9:1, éste denominado como adyuvante incompleto. El adyuvante completo de Freund contiene además una micobacteria que puede ser M. bovis ó M. tuberculosis.

Teóricamente los adyuvantes pueden actuar por alguno de los siguientes mecanismos:

- a) aumentando directamente el número de células involucradas en la formación de anticuerpos.
- b) favoreciendo el procesamiento del antígeno por las células

fagocíticas.

c) prolongando la duración del antígeno en el animal inmunizado.

Vías de administración: Estas pueden ser intradérmica (ID), subcutánea (SC), intramuscular (IM), intravenosa (IV), intralinfática (IL), intra articular (IA) y en el cojinete de las patas (FP).

Intradérmica, el empleo de esta vía causa la formación de anticuerpos cuando el antígeno se administra con adyuvantes, tiene la desventaja que ocasiona la formación de úlceras en el sitio de aplicación.

Subcutánea, es excelente cuando se requiere que el antígeno se absorba lentamente. Este caso necesita una primera inmunización con adyuvante, a fin de minimizar la tendencia a un choque anafiláctico.

Intravenosa, se emplea para antígenos particulados, en este caso es además importante una inmunización subcutánea, ya que la respuesta obtenida por vía IV es rápida pero no se mantiene por sí sola.

Intramuscular, es adecuada en el empleo de adyuvante completo de Freund, ya que dicha vía proporciona un acceso rápido al sistema circulatorio y linfático.

Intralinfática, su eficiencia es semejante a la que se obtiene por la vía ID y SC.

Intra articular, la administración por esta vía da una respuesta semejante a la obtenida por vía SC, con la ventaja que la administración del antígeno se hace en solución salina y no requiere emulsión.

Cojinetes de las patas, ésta vía se emplea con adyuvante completo de Freund en una de las patas traseras, ya que ocasiona ulceraciones y necrosis severas, debe usarse sólo en casos de extrema necesidad.

Tipo de respuesta, con un esquema de inmunización de corta duración se obtienen anticuerpos altamente específicos, mientras que con un esquema de amplia duración los anticuerpos obtenidos son menos específicos, presentando reactividad cruzada a medida que avanza el tiempo de inmunización.

## Estructura química de los digitálicos.

Los glucósidos digitálicos están constituidos por una estructura básica esteroideal (genina o aglicona) unida en el carbono 3 a una tridigitoxosa mediante un enlace glucosídico, y en el carbono 17 a un anillo de lactona (butenólido), dentro de éstos glucósidos se encuentran la digoxina y digitoxina cuyas estructuras son muy semejantes y su diferencia radica en que la primera tiene un grupo hidroxilo (OH) en el carbono 12 (fig. 1) el cual le confiere una mayor actividad farmacológica (2).

## Haptenos y acarreadores.

Las moléculas con peso molecular menor de 1000, no son inmunógenas cuando se introducen al torrente sanguíneo de un animal; Landstainer en 1905 las denominó haptenos y demostró que al unirlos covalentemente a una proteína, se podían obtener anticuerpos contra estas moléculas. El papel de la proteína en este complejo o conjugado es el de llegar a las células "inmunológicamente competentes" e inducir ahí la formación de anticuerpos de tres tipos, unos dirigidos contra la proteína, otros contra el hapteno, y los terceros contra la unión química del hapteno y la proteína. La molécula grande (proteína) que lleva unido el hapteno se denomina acarreador y el uso de éste ha permitido obtener anticuerpos contra digoxina y digitoxina (9).

Los métodos utilizados para el acoplamiento de haptenos a proteínas (7) se presentan a continuación:

- Diazotización y método de las carbodiimidas para haptenos con grupos amino libres.
- Método del hemisuccinato para grupos alcohol secundario (en azúcares, ribonucleosidos o ribonucleotidos).
- Método de las carbodiimidas y del anhídrido mixto para grupos carboxilato.
- Método de la esterificación con ácido paranitrobenzoico para grupos alcohol secundario.
- Formación de conjugados con isotiocianato de fluoresceína.
- Oxidación con peryodato.

## Conjugados.

Butler y Chen en 1967 obtuvieron por vez primera anticuerpos específicos contra digitálicos. La reacción antigénica de estos compuestos se logró mediante el acoplamiento de la digoxina al grupo E-amino de la lisina perteneciente a una proteína acarreadora, en este caso albúmina sérica bovina. La reacción se llevó a efecto de la siguiente manera: El glucósido esteroideal al mezclarse con el metaperyodato oxida y rompe entre las uniones 3 y 4 de la última digitoxosa donde ocurrirá el acoplamiento con el grupo E-amino de la lisina en la proteína acarreadora, en seguida el conjugado se estabiliza por reducción con borohidruro de sodio (fig. 2).

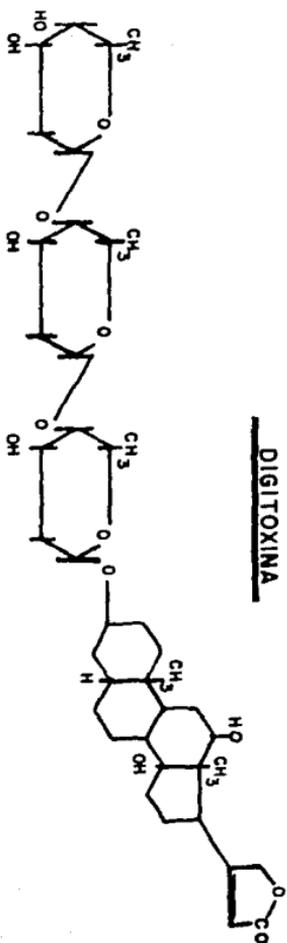
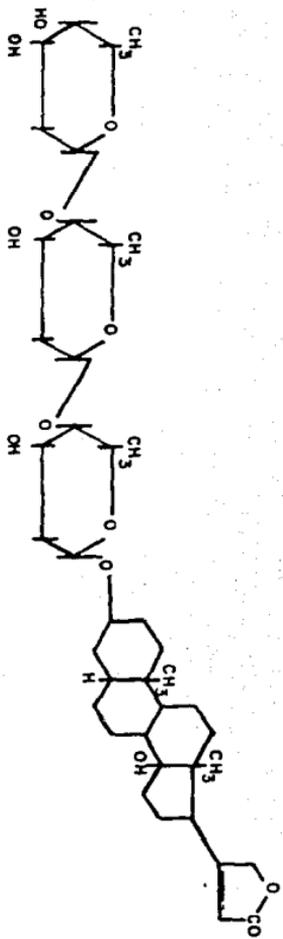


FIG. 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS GLICOSIDOS CARDIACOS.

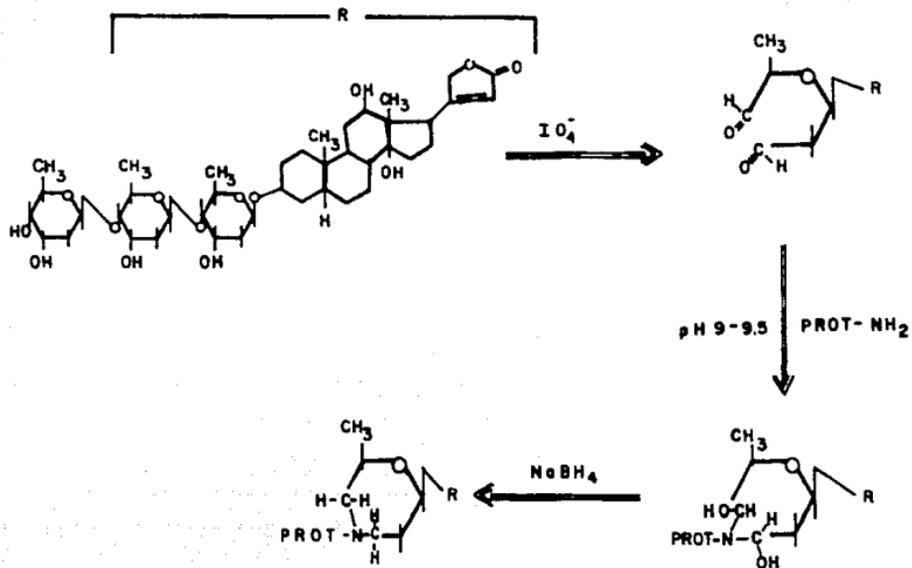


FIG. 2 MECANISMO PARA LA CONJUGACION DEL HAPTENO A UNA PROTEINA ACARREADORA.

La especificidad de los anticuerpos obtenidos por éste autor fué evaluada por diálisis al equilibrio e inhibición de la precipitación por hapteno.

Oliver y col. en 1968 reportaron un método inmunológico para medir niveles terapéuticos de digitoxina en suero humano. Lo relevante de éste procedimiento fue la obtención de anticuerpos más específicos, usando para ello conjugados 3-oxi-succinil digitoxigenina-albúmina sérica humana; la formación del enlace

125

entre digitoxigenina-tirosina I y el anticuerpo de conejo contra digitoxina. La radioactividad de este complejo fue medida en el precipitado obtenido por adición de un segundo anticuerpo (de cabra antigamma globulina de conejo) a la mezcla de reacción. Otra modificación importante en ésta metodología fue la extracción con cloroformo de la digitoxina en la muestra problema

En estudios posteriores Smith y Butler (1970) realizaron la inmunización de conejos con un conjugado de digoxina-albúmina humana, el resultado fue la producción de altos títulos de anticuerpos con una excepcional afinidad y especificidad. Estos anticuerpos han sido empleados para mediciones del orden de nanogramos a picogramos de digoxina.

El método de Smith fue aplicado por Weller y Zenk en 1976 para la obtención de anticuerpos específicos para digoxina y digitoxina respectivamente, a fin de implementar con estos anticuerpos la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) para determinar digoxina y compuestos relacionados, en extractos sin purificar de *Digitalis lanata*. Resultados similares en cuanto exactitud y especificidad han sido reportados por Hagimori (1980) quien determinó el contenido de digoxina y digitoxina en tejido calloso de la especie *Digitalis* durante la primera y segunda etapa de diferenciación del tejido.

#### Métodos de Inmunoanálisis.

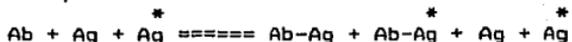
El inmunoanálisis es una herramienta importante en la cuantificación de compuestos que se encuentran en concentraciones muy bajas. En tales análisis los radioisótopos han sido muy empleados como marcadores debido a su sensible detección por técnicas de conteo de centelleo, sin embargo el inconveniente de tener desechos radioactivos ha sugerido el desarrollo de inmunoanálisis basados en tipos de marcaje no isotópico, por ejemplo marcadores fluorescentes (9), electroactivos y enzimáticos (17, 34).

Este último ha sido el más exitoso y presenta dos modalidades, ensayo homogéneo y ensayo heterogéneo.

#### a) Radioinmunoanálisis (RIA).

El principio de éste método se basa en la competencia de una cantidad constante de antígeno marcado radioactivamente (trazador) con una cantidad conocida o desconocida de antígeno no mar

cado, por un número limitado de sitios específicos enlazantes del anticuerpo (9, 20).



b) Inmunoensayo Enzimático Homogéneo (E M I T).

En éste caso, la marca del antígeno es un enzima. Cuando el antígeno marcado está enlazado a un anticuerpo específico, la actividad del enzima se disminuye. El antígeno no marcado (libre) que se encuentra en la muestra a medir, entra en competencia con el antígeno marcado para ocupar los sitios de enlace del anticuerpo, resultando un aumento de la actividad enzimática en el seno del medio. La actividad enzimática está en relación con la concentración del antígeno libre introducido y se determina por la modificación de densidad óptica resultante de la acción catalítica enzimática sobre un sustrato (29).

c) Inmunoanálisis Enzimático Heterogéneo.

Un método de inmunoanálisis enzimático heterogéneo competitivo para digoxina por detección electroquímica fue reportado por Kenneth R. y col. (16), éste consiste en el forramiento de cubetas de poliestireno con el anticuerpo (suero de cabra) específico para digoxina; acción de la enzima fosfatasa alcalina marcada con digoxina y digoxina sin marcar, las cuales compiten por los sitios específicos del anticuerpo; eliminación de la mezcla de reacción en las cubetas y lavados; adición del sustrato fosfato de fenilo, que por acción de la fosfatasa alcalina produce fenol. El fenol producido es inversamente proporcional a la cantidad de digoxina presente y es cuantificado por detección electroquímica por análisis de inyección de flujo o por cromatografía líquida.

d) ELISA. De su siglas en inglés: Enzyme Lynked Immunosorbent Assay.

El principio básico de ésta prueba<sup>2</sup> es que el antígeno o el anticuerpo se adhiere a un soporte sólido sobre el cual se lleva a cabo la reacción antígeno anticuerpo, poniéndose de manifiesto mediante una reacción enzimática posterior.

Existen diferentes ensayos de tipo ELISA que pueden utilizarse para detectar antígeno o anticuerpo, según sea el caso, los más usados son el método indirecto y el método de doble anticuerpo o del Sandwich, los cuales tienen una inmensa gama de variantes. El primero se emplea generalmente para detectar y medir cantidades de anticuerpos específicos contra un antígeno usando una fase sólida forrada con el mismo. Este sistema también puede ser empleado para detectar antígeno en líquidos biológicos.

El segundo método se utiliza para detectar antígenos empleando anticuerpos específicos adsorbidos a la fase sólida (12, 13, 27, 32).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de tejidos vegetales ha sido empleado para varios propósitos durante las últimas décadas. De un interés particular desde un punto de vista biotecnológico es el uso de dichos cultivos para realizar biotransformaciones estereoespecíficas, tal como la hidroxilación de digitoxina en el C - 12 para su conversión a digoxina.

Una fase importante, para el establecimiento de dicho proceso, consiste en la cuantificación del sustrato y producto, la cual requiere de un método con alta sensibilidad y especificidad, debido a que las cantidades que se manejan en el proceso de biotransformación son del orden de nanogramos y las estructuras de los compuestos son químicamente muy semejantes.

La importancia del presente trabajo consiste en la obtención de anticuerpos contra digoxina y digitoxina, para la implementación de un método de cuantificación inmunológico, que tenga como características alta sensibilidad y especificidad.

## HIPOTESIS

La inmunización de conejos con conjugados constituidos por digoxina-ovoalbúmina y digitoxina-ovoalbúmina dará lugar a la formación de anticuerpos con la capacidad de reconocer específicamente la parte esterooidal contra la cual han sido dirigidos.

## OBJETIVO

Este trabajo tiene como finalidad la obtención y caracterización de anticuerpos antidigitoxina y antidigoxina, con los cuales se podrá implementar un método de valoración cuantitativo para digoxina y digitoxina.

## ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

- I. PREPARACION DE CONJUGADOS
- II. CARACTERIZACION DE CONJUGADOS
  - a) Determinación de la cantidad de proteína en el conjugado por el método de Lowry.
  - b) Determinación de los espectros de absorción de los conjugados.
- III. INMUNIZACION
- IV. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIDIGOXINA Y ANTIDIGITOXINA
  - a) Precipitación en capilar.
  - b) Método de ELISA.
- V. CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS ANTIDIGITALICOS POR ELISA  
Pruebas de inhibición por hapteno.
- ANEXO. Solubilización de conjugados y haptenos.

## MATERIAL Y METODOS

## Material.

Vasos de precipitados  
 Matraz Erlenmeyer  
 Matraz aforado  
 Matraz redondo de fondo plano  
 Pipeta graduada  
 Pipeta Pasteur  
 Bulbo de goma  
 Micropipeta  
 Tubos de ensaye  
 Gradilla para tubos de ensaye  
 Homogenizador de tejidos  
 Tubos capilares  
 Jeringas  
 Agujas  
 Torundas  
 Alcohol al 70 %  
 Frascos de Gerber  
 Caja para sujetar animales (conejos)  
 Gradilla para sostener tubos capilares  
 Puntas para micropipeta  
 Microplacas de tiras removibles y fondo plano de 96 pozos,  
 Immunolón II. Dynatech Laboratories  
 Tubos de hule para centrifuga Sorvall

## Material Biológico.

Suero de conejo antidigitoxina y antidigoxina  
 Conjugado de anticuerpos de cabra antiinmunoglobulina de  
 conejo, (Cappel Laboratories).

## Equipo.

Base magnética de agitación Sibron Termolyne Nouva II  
 Balanza analítica Mettler H-20  
 Balanza granataria Harvard Trip 2 kg Ohaus  
 Potenciómetro Conductronic pH 20  
 Vortex Genie K-550 g  
 Refrigerador American  
 Congelador American  
 Centrifuga refrigerada Sorvall RC-5 B Dupon Instruments  
 Centrifuga clínica Solbat  
 Micropipeta multilavadora (S/marca)  
 Micropipeta de 0-20 y 50-200 ul Gilson.  
 Bomba de vacío Koblenz Nom-1  
 Estufa Thelco GCA  
 Espectrofotómetro Bausch & Lomb Espectronic 20  
 Espectrofotómetro Gilford Instrument 250

## Reactivos.

Acido clorhídrico (Baker)  
 Acido bórico (Merck)  
 Acido fórmico (Baker)  
 Acido sulfúrico (Baker)  
 Alcohol etílico absoluto (Baker)  
 Alcohol Isoamílico (Baker)  
 Albúmina sérica bovina (Sigma)  
 Arlazel (Sigma)  
 Bicarbonato de sodio (Baker)  
 Borohidruro de sodio (Merck)  
 Cloruro de potasio (Merck)  
 Cloruro de sodio (Merck)  
 Carbonato de potasio (Merck)  
 Digitoxina (Sigma)  
 Digoxina (Sigma)  
 Dimetilformamida (Sigma)  
 Drakeol (Sigma)  
 Etanol  
 Etilen glicol (Merck)  
 Fosfato dibásico de sodio (Merck)  
 Fosfato monobásico de potasio (Merck)  
 Glicerol (Sigma)  
 Hemocianina (Sigma)  
 Hidróxido de sodio  
 Hielo seco (Liquid Carbonic)  
 Ovoalbúmina (Sigma)  
 Polietilenglicol PM 6 000 (Sigma)  
 Tetraborato de sodio (Merck)  
 Tween 20 (Merck)

## Soluciones.

Regulador de salina - fosfatos (PBS) 0.15 M pH 7.4

NaCl	.....	8.0	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.....	0.2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	.....	2.17	g
KCl	.....	0.2	g
H <sub>2</sub> O aforar a	.....	1000.0	ml

## Regulador de salina-boratos 0.2 M pH 8.4

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	.....	6.184	g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	.....	9.538	g
NaCl	.....	4.384	g
H <sub>2</sub> O aforar a	.....	250.0	ml

## Solución de lavado

- Regulador de salina fosfatos pH 7.3 con tween 20 al 0.05 %

Nota: Todas las soluciones se preparan con agua tridestilada.

## Sustrato.

- Regulador de fosfatos	.....	25	ml
- Ortofenilendiamina	.....	10	mg
H <sub>2</sub> O al 30 %	.....	10	ul

Nota: El sustrato se prepara justo en el momento de usarse y debe mantenerse en un lugar fresco y oscuro.

## I. PREPARACION DE LOS CONJUGADOS.

Los conjugados preparados para la inmunización y comprobación, se denominan homólogos y heterólogos respectivamente, los primeros se emplearon en la inmunización (Digoxina-ovoalbúmina, Digitoxina-ovoalbúmina) y los últimos se usaron en las pruebas de detección que retan la especificidad de los anticuerpos obtenidos (Digoxina-hemocianina, Digitoxina-hemocianina y Digoxina-albúmina sérica bovina, Digitoxina-albúmina sérica bovina). Las proteínas empleadas para la preparación de estos conjugados fueron de animales filogenéticamente diferentes con el fin de evitar la reactividad cruzada. El empleo de conjugados heterólogos tiene como objeto describir la alta afinidad y especificidad de los anticuerpos por la parte esteroideal de la digoxina o digitoxina.

### Método (31).

1. Disolver 436 mg del hapteno en 20 ml de etanol absoluto.
2. Adicionar por goteo 20 ml de una solución de metaperyodato de sodio 0.1 M con agitación magnética (durante 25 minutos).
3. Agregar 0.6 ml de etilen glicol 1 M y dejar reposar durante 25 minutos.
4. Adicionar la mezcla anterior por goteo a una solución de proteína que contiene 560 mg en 20 ml de PBS pH 9.5, el pH se debe mantener entre 9.0-9.5 durante 45 minutos con una solución de carbonato de potasio al 5 %.
5. Adicionar una solución de 0.30 g de borohidruro de sodio en 20 ml de agua y dejar reposar durante 3 horas.
6. Llevar el pH a 6.5 con ácido fórmico 1 M y dejar reposar durante una hora. Elevar el pH a 8.5 con hidróxido de amonio 1M.
7. Dializar toda la noche contra corriente de agua.
8. Al día siguiente llevar el pH a 4.5 por adición de ácido clorhídrico 1 M, dejar reposar una hora a temperatura ambiente y cuatro horas a 4 grados centígrados. La proteína habrá precipitado.
9. Centrifugar la suspensión a 10 000 rpm a 4 C.
10. Desechar el sobrenadante y disolver el precipitado en 5 ml de carbonato de sodio 0.15 M.
11. Dializar contra corriente de agua durante cuatro días.
12. Liofilizar y almacenar. (Fig. 3).

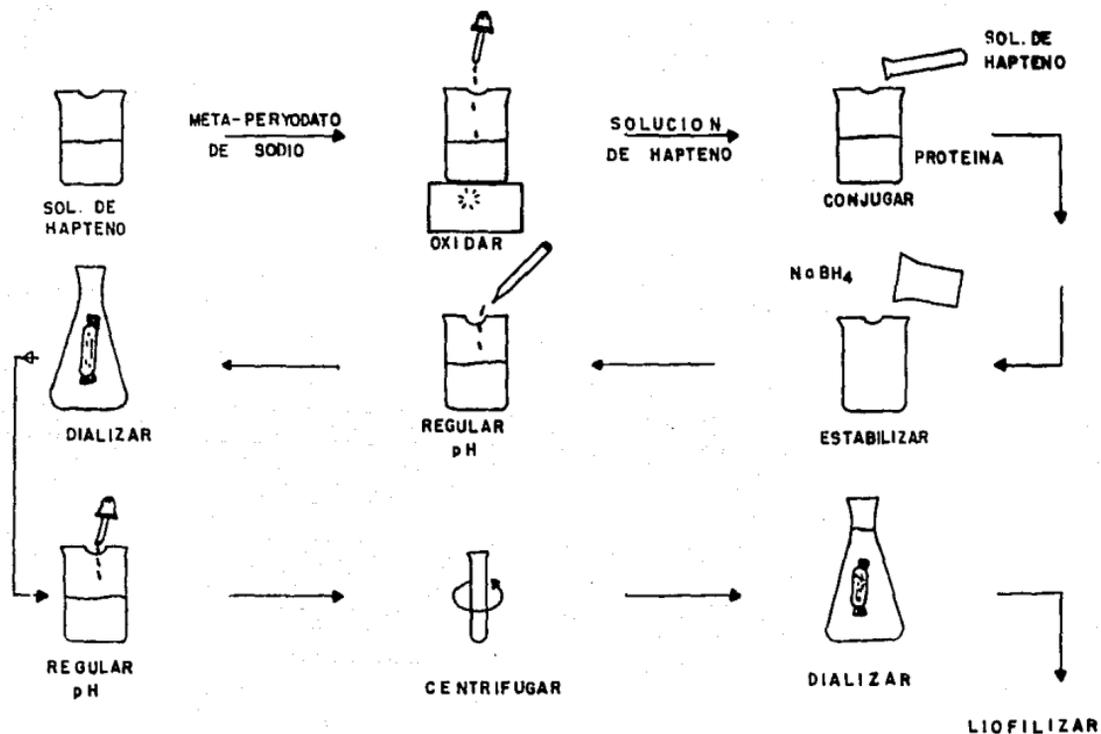


FIG. 3 PREPARACION DEL CONJUGADO

## II. CARACTERIZACION DE LOS CONJUGADOS.

- a) Determinación de la cantidad de proteína en el conjugado por el Método de Lowry.

Esta reacción depende de la cantidad de tirosina y triptofano presentes en la proteína.

### Método.

1. Se mezclan 50 ml de solución A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 % en NaOH 0.1 N) más 1 ml de solución B (CuSO<sub>4</sub> al 5 % en tartrato de Na y K al 1%).
2. A una muestra que contenga de 20 a 200 microgramos de proteína en 0.5 ml se le agregan 2.5 ml de la mezcla A + B y se agita.
3. Se deja reposar 10 minutos
4. A cada tubo se agregan 0.25 ml de reactivo de Folin diluido en agua 1:3 y se agita de inmediato.
5. Se deja reposar 30 minutos.
6. Se lee a 600 nm.

Nota: Se usa como testigo una solución de proteína (ovoalbúmina, albúmina sérica bovina o hemocianina según sea el conjugado) de 250 ug/ml.

- b) Determinación de los espectros de absorción (3).

Con el objeto de determinar si hubo conjugación o no, se realizaron los espectros de absorción de los conjugados, así como los espectros de cada uno de los componentes del conjugado por separado (proteínas y cardiotónicos).

### Método

1. Colocar una muestra de 25 microgramos en un tubo de ensaye en el caso de haptenos.
2. Emplear 250 microgramos en el caso de proteínas y conjugados.
3. Agregar a cada muestra un mililitro de ácido sulfúrico al 98 %
4. Realizar las determinaciones en un espectrofotómetro con celdas de cuarzo de 1 cm.
5. Determinar los espectros de absorción leyendo densidad óptica para cada muestra a intervalos de un nanómetro en un rango de 210 a 600 nanómetros.

## III. INMUNIZACION.

La inmunización se realizó en conejos, con los conjugados homólogos. Las vías de inmunización utilizadas fueron intramuscular, subcutánea e intradérmica debido a que el conjugado va acompañado de adyuvante, el cual tiene la capacidad de aumentar la respuesta inmune y el nivel de anticuerpos circulantes. Los adyuvantes empleados fueron: adyuvante completo de Freund que consiste en una mezcla de aceite mineral (drakeol) con un detergente (arlacel) en proporciones de 1:9 y 5 mg de M. tuberculosis por ml de la mezcla y adyuvante incompleto de Freund que es igual al anterior excepto que no contiene bacterias (35).

Las inmunizaciones son periódicas, 57 días con intervalos de descanso de 15 días (6, 2f).

## ESQUEMA DE INMUNIZACION

Inmunización	Día	Concentración de Antígeno	Vía
1	0	0.5 mg prot/ml de PBS emulsificado con 1 ml de ACF.	IM, ID, SC en SM
2	15	0.5 mg de conjugado emulsificado con 1 ml de ACF.	" "
3	30	0.5 mg de conjugado en 1 ml de PBS con 1 ml de AIF.	" "
4	45	0.5 mg de conjugado en 1 ml de PBS.	" "
5	46	1.0 mg de conjugado en 1 ml de PBS.	" "
6	47	1.5 mg de conjugado en 1 ml de PBS.	" "
7	48	2.0 mg de conjugado en un ml de PBS.	" "
SANGRAR		57	

ACF - Adyuvante completo de Freund	IM - Intramuscular
AIF - Adyuvante incompleto de Freund	ID - Intradérmica
PBS - Regulador de fosfatos	SC - Subcutánea
SM - Sitios múltiples	

#### IV. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIDIGOXINA Y ANTIDIGITOXINA.

##### a) Precipitación en capilar (6, 21).

La precipitación se presenta debido a que los antígenos tienen varios sitios de unión es decir son multivalentes. En estado soluble se unen con su anticuerpo específico y así da lugar a un complejo insoluble. Esta reacción se utiliza ampliamente para mostrar y cuantificar anticuerpos y antígenos, se puede llevar a cabo en medio líquido o semisólido.

La precipitación en medio líquido puede ser semicuantitativa o cuantitativa, en el primer caso sólo se observa la detección de precipitado, para el segundo caso además de la detección de los anticuerpos estos se cuantifican con más exactitud.

##### Método.

1. Se toman 11 capilares y con ayuda de un marcador, se dividen en tres partes iguales.
2. En 8 tubos de ensaye de 13 X 100 debidamente rotulados, se hacen diluciones con PBS al doble del suero.
3. Se colocan 0.5 ml de la solución de suero, se mezclan bien con la misma pipeta (dilución 1:2).
4. Con pipeta diferente se toman 0.5 ml de la solución del tubo 1 y se pasa al tubo 2, se mezclan bien con la misma pipeta (dilución 1:4).
5. El procedimiento se repite para los siguientes tubos (diluciones 1:8 a 1:256).
6. Se toma un tubo capilar y se absorbe un volumen de una solución de conjugado (antígeno) que llegue hasta la primera marca del tubo. La parte externa del tubo se limpia con papel adsorbente.
7. El tubo capilar se gira 180 grados y se hace descender el volumen hasta el borde correspondiente.
8. Se absorbe en forma similar a la descrita en el inciso 6 un volumen tal de antisuero sin diluir, que llegue hasta la segunda marca del tubo. Se limpia la parte externa con papel adsorbente.
9. Se mezcla por inversión repetida.
10. Con el dedo índice se tapa uno de los extremos del capilar y se deja que el contenido quede centrado en el capilar.
11. Un extremo del capilar se introduce en una gradilla con plastilina.
12. Se repite el procedimiento señalado en los incisos 6 al 11 usando cada una de las diluciones del antisuero (de 1:2 a 1:256).

13. Un capilar se llena hasta la segunda marca con antígeno sin diluir y otro en la misma forma con antisuero.
14. Se coloca otro capilar el cual se prepara con proteína y antisuero. El primer tubo capilar es el testigo del antígeno, el segundo del antisuero, y finalmente el último es para observar la reacción cruzada con la parte proteica, por lo que también se considera como testigo.
15. Se deja unos minutos a temperatura ambiente y se guarda en refrigeración de 24 a 48 horas.
16. Se mide la cantidad de precipitado en milímetros.

b) Método de ELISA indirecto (13).

1. Se sensibiliza la placa colocando 100 microlitros de la dilución del antígeno en cada pozo y se incuba a 37 grados centígrados durante cuatro horas y toda la noche en refrigeración. (El antígeno empleado es el conjugado heterólogo diluido en regulador de boratos pH 8.4).
2. Se elimina el contenido de los pozos por succión con una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío, se adicionan 20 microlitros de PBS-T dejando reposar cuatro minutos, al cabo de los cuales se desecha el contenido. Esta operación se repite cuatro veces.
3. A cada pozo se adicionan 100 microlitros de glicina al 2 % y se incuba a 37 grados centígrados durante 1 hr.
4. Se repite el paso 2.
5. Se adiciona a cada pozo 100 microlitros de la dilución del suero (en PBS-T) y se incuba a 37 grados centígrados por una hora.
6. Se repite el paso dos.
7. Se adiciona a cada pozo 100 microlitros del conjugado (peroxidasa-IgG de cabra anticonejo) en PBS-T, se incuba a 37 grados centígrados durante una hora.
8. Se repite el paso dos.
9. Se adiciona a cada pozo 100 microlitros de sustrato (peróxido de hidrógeno) se deja a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min.
10. Sin retirar el contenido del pozo, se adiciona una gota de ácido sulfúrico 8 N (12.5 microlitros) para detener la reacción.
11. Se lee en un lector de placas a 492 nm. (Fig. 4)

**SENSIBILIZAR**

**LA PLACA.**



**FIG.4 DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIDIGITALICOS.**

## V. CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS ANTIDIGITALICOS.

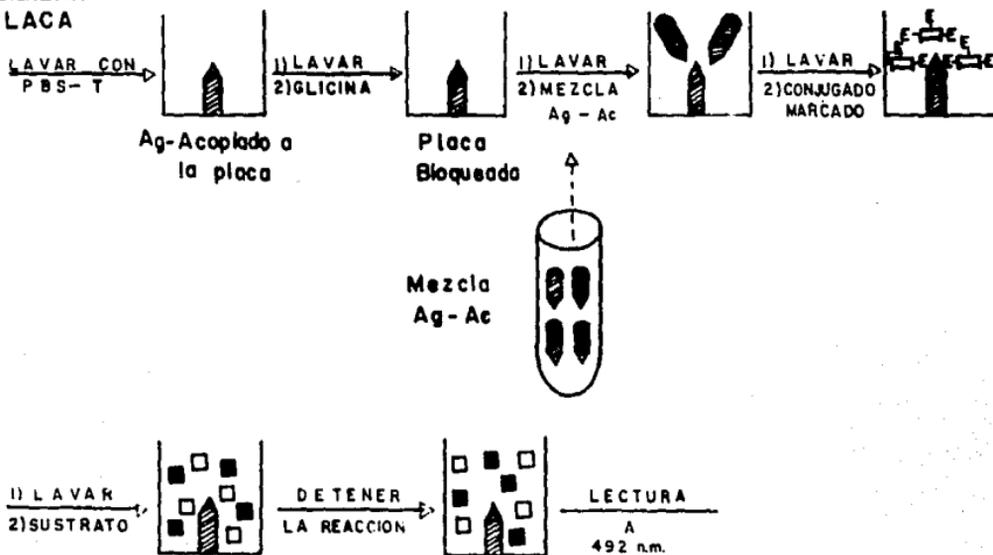
### Pruebas de inhibición por hapteno.

Esta prueba nos permite comprobar la especificidad de los anticuerpos antidigoxina y antidigitoxina y determinar las concentraciones de hapteno necesarias para obtener un máximo de inhibición.

### Método.

1. Se hacen las diluciones requeridas de suero en PBS-T.
2. Se agrega a cada una de ellas antígeno en una concentración conocida (diluido en PBS-T).
3. Se repiten los pasos anteriores para cada concentración de antígeno usada.
4. Una vez hecha la mezcla se agita perfectamente.
5. Se incuba a 37 grados centígrados durante 1 hora.
6. Se adiciona la mezcla a las placas previamente sensibilizadas con el antígeno y bloqueadas (en el paso 5 de la técnica de ELISA en lugar del suero).
7. Se continúa como lo indican los pasos del 6 al 11 de la técnica de ELISA anteriormente escrita. (Fig.5)

**SENSIBILIZAR  
LA PLACA**



**FIG.5 DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS**

#### ANEXO. SOLUBILIZACION DE CONJUGADOS Y HAPTENOS.

Debido a que los compuestos digitálicos son poco solubles en medio acuoso se realizaron las siguientes pruebas:

##### Conjugados:

- Variación de pH con HCl ó NaOH en una mezcla de un miligramo de hapteno en 10 ml de PBS.
- Sonicación de una mezcla de un mg de conjugado en PBS, y cuantificación del producto disuelto, por el método de Lowry.
- Homogenización de una mezcla de conjugado en PBS, a pH 7.3, posterior centrifugación y cuantificación de la cantidad de conjugado disuelto, por el método de Lowry.

##### Haptenos.

En este caso se emplearon dimetilformamida (DMF), etanol (ET-OH) y etilenglicol 6000 (EG-6000).

Para el caso de DMF y ETOH la muestra se trató de la siguiente manera:

A dos mg de hapteno se le adicionan por goteo lentamente y con agitación 0.5 ml de etanol, posteriormente 0.5 ml de PBS y finalmente se afora a 10 ml con solución de PBS, quedando una concentración de 200 ug/ml en etanol al 5 %. Con el objeto de determinar la cantidad de hapteno solubilizado, se toma una alícuota de 0.3 ml de la solución y se lleva a 3 ml con ácido sulfúrico se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 340 nm para Dt y 390 nm para Dx. Lo anterior se realiza con las soluciones recién preparadas; a las 24 horas se vuelve a determinar la lectura.

En el caso del etilén glicol 6000 primero se realizó la incorporación de éste al hapteno, por preparación de una mezcla de hapteno-etilén glicol 6000 en una proporción 1:49 y posterior fusión en un baño de aceite a 170 grados centígrados hasta obtener una solución transparente, la cual se dejó solidificar a temperatura ambiente, en seguida se guardó en un desecador (por varios días). La solubilidad de hapteno-EG en PBS se determinó midiendo la absorbancia de la muestra en ácido sulfúrico como en el caso anterior.

## R E S U L T A D O S   Y   D I S C U S I O N

La tabla No.1 muestra el rendimiento obtenido en la preparación de los conjugados digoxina-ovoalbúmina, digitoxina-ovoalbúmina empleados como antígenos para inmunizar (conjugados homólogos) y digoxina-albúmina sérica bovina, digitoxina-albúmina sérica bovina (conjugados heterólogos) utilizados para comprobar la especificidad de los anticuerpos antidigoxina y antidigitoxina respectivamente.

TABLA No. 1 RENDIMIENTO DE CONJUGADOS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS

CONJUGADO	RENDIMIENTO
Digoxina-ovoalbúmina .....	392.2 mg
Digitoxina-ovoalbúmina .....	432.6 mg
Digoxina-albúmina sérica bovina .....	460.6 mg
Digitoxina-albúmina sérica bovina .....	282.1 mg
Digoxina-albúmina sérica humana (31) .....	461.0 mg

Como se puede observar el rendimiento de los conjugados obtenidos fue similar al reportado en la bibliografía (31), a excepción del conjugado digitoxina-albúmina sérica bovina, esto quizá fue debido a pérdidas del producto durante el proceso de preparación.

### SATURACION TEORICA PARA PROTEINAS

Considerando que se prepararon los diferentes conjugados empleando una relación p/p de 436 mg de hapteno por 560 mg de proteína, se calculó el % de saturación teórico (7).

#### DATOS

P.M. de ASB	70 000.00	Contenido de Lisina 12.3 %
P.M. de OVA	40 000.00	" " " 6.5 %
P.M. de Lisina	147.00	
P.M. de Digoxina	780.98	
P.M. de Digitoxina	765.00	

#### Cálculo de saturación teórico para ASB

70000 g	-----	100 %	X = 8610 g del PM son capaces
x	-----	12.3 %	de acoplarse al hapteno

$$\begin{array}{l} 147 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ M} \\ 8610 \text{ g} \text{ ----- } X \end{array} \quad X = 58.57 \text{ moles}$$

En un mol de proteína hay 58.57 moles de lisina capaces de acoplarse a la misma cantidad de hapteno por un mol de proteína.

Para el caso de Digoxina se tiene:

$$\begin{array}{l} 780.98 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ M} \\ X \text{ ----- } 58.57 \end{array} \quad X = 45741.998 \text{ g de digoxina}$$

$$\frac{70000.000}{45741.998} = 1.5303223$$

La relación anterior indica que para obtener el 100% de saturación de la proteína, se requiere 1.53 g de albúmina sérica bovina por cada gramo de digoxina. Experimentalmente se usaron 436 mg de digoxina por 560 mg de proteína obteniéndose la siguiente proporción:

$$\frac{560}{436} = 1.284$$

$$\begin{array}{l} 1.53 \text{ ----- } 100 \% \\ 1.284 \text{ ----- } X \end{array} \quad X = 83.92 \% \text{ de saturación}$$

Como se observa el conjugado DX-ASB teóricamente está saturado en un 83.92 %.

Este cálculo se repitió para los diferentes conjugados, considerando el peso molecular de cada proteína, su contenido de lisina y el peso molecular del hapteno, los resultados se presentan en la tabla 2.

TABLA No.2 SATURACION TEORICA DE LAS PROTEINAS.

CONJUGADO	PROTEINA	% DE SATURACION
DX-ASB	ASB	83.92 %
DT-ASB	ASB	82.30 %
DX-OVA	OVA	40.26 %
DT-OVA	OVA	42.09 %

ASB	Albumina sérica bovina
OVA	Ovoalbúmina
DX-ASB	Conjugado de digoxina albúmina sérica bovina
DT-ASB	Conjugado de digitoxina albúmina sérica bovina
DX-OVA	Conjugado de digoxina ovoalbúmina
DT-OVA	Conjugado de digitoxina ovoalbúmina

En la tabla No. 2 se muestran los diferentes porcentajes de saturación teóricos, en donde se puede observar que el % de saturación para los conjugados obtenidos con ASB es aproximadamente el doble comparados con el % de saturación de los conjugados preparados con OVA. Este comportamiento se explica por la relación proteína/hapteno empleada en ambos casos (560 mg/436 mg), para el caso de ASB eran necesarios 1.53 g (cálculo teórico) de proteína por g de hapteno, mientras que para OVA se requerían 2.98 g de proteína/g hapteno.

#### PROTEINA EN LOS CONJUGADOS

A los conjugados obtenidos se les determinó el contenido de proteína por el método de Lowry (19) con el objeto de establecer las diluciones adecuadas del conjugado para realizar su caracterización espectrofotométrica. Las figuras 6 y 7 muestran las curvas tipo de OVA y ASB respectivamente.

TABLA No. 3 DETERMINACION DE PROTEINA POR LOWRY.

CONJUGADO	CONTENIDO
Digoxina-ovoalbúmina	216.0 mg
Digitoxina-ovoalbúmina	130.0 mg
Digoxina - ASB	156.0 mg
Digitoxina - ASB	40.0 mg

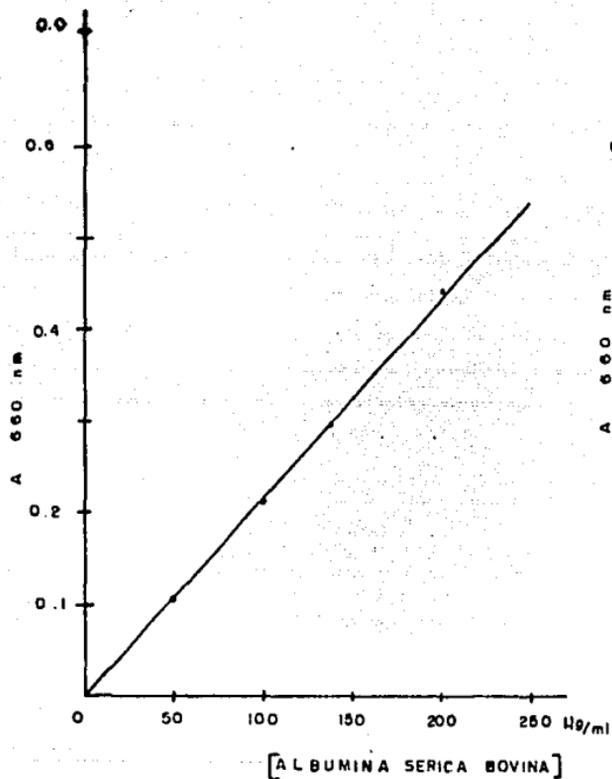


FIG. 6  
CURVA TIPO DE ALBUMINA SERICA BOVINA  
POR EL METODO DE LOWRY

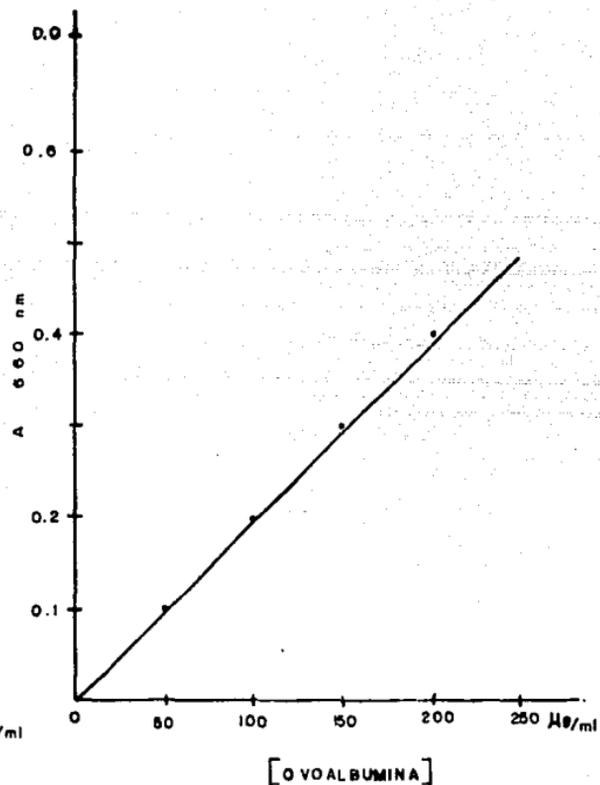


FIG. 7  
CURVA TIPO DE OVOALBUMINA  
POR EL METODO DE LOWRY

## ESPECTROFOTOMETRIA DE LOS CONJUGADOS

La comprobación de la unión entre hapteno y proteína, se realizó mediante la obtención de los espectros de absorción de los conjugados y de cada uno de sus componentes (glucósidos cardíacos y proteínas) (3).

El análisis de los espectros de las figuras 8 y 9 muestra que la digoxina presentó dos máximos de absorción, uno a 390 y otro a 490 nm, mientras que en los conjugados de digoxina estos máximos estaban ligeramente desplazados a la derecha, este desplazamiento indica que se efectuó la unión entre hapteno y proteína.

En el caso de la digitoxina se observaron tres máximos de absorción, a 340, 420 y 485 nm., valores que se vieron desplazados en los espectros de absorción de los conjugados de digitoxina, indicando como en el caso anterior que ocurrió el acoplamiento entre hapteno y proteína.

El hecho de que el conjugado había sido dializado en forma exhaustiva excluyendo moléculas de peso molecular menor de 10 000 garantizó que los picos máximos de absorción de los diferentes espectros de los conjugados se debieran exclusivamente al hapteno unido a la proteína.

La diferencia de absorbancia entre el conjugado y la proteína sola, dió el valor que corresponde a la absorbancia del hapteno unido a la proteína. Con esta absorbancia y el coeficiente de extinción molar se calculó la concentración real del hapteno en el conjugado.

### CONCENTRACION DE HAPTENO POR MOL DE PROTEINA

Cálculo de concentración real de digoxina unida a albúmina sérica bovina.

#### D A T O S

P.M.		
Digoxina	.....	780.98
Digitoxina	.....	765.0
OVA	.....	40000.0
ASB	.....	70000.0
D.O. de DX	.....	2.411
Coef. de extinción molar de DX		25100
D.O. ASB		0.02
D.O. conjugado DX-ASB		0.8764

D.O. del conjugado - D.O. de la proteína = D.O. HAPTENO

0.8764 - 0.02 = 0.8564

0.8564 = absorbancia de la digoxina unida a la ASB.

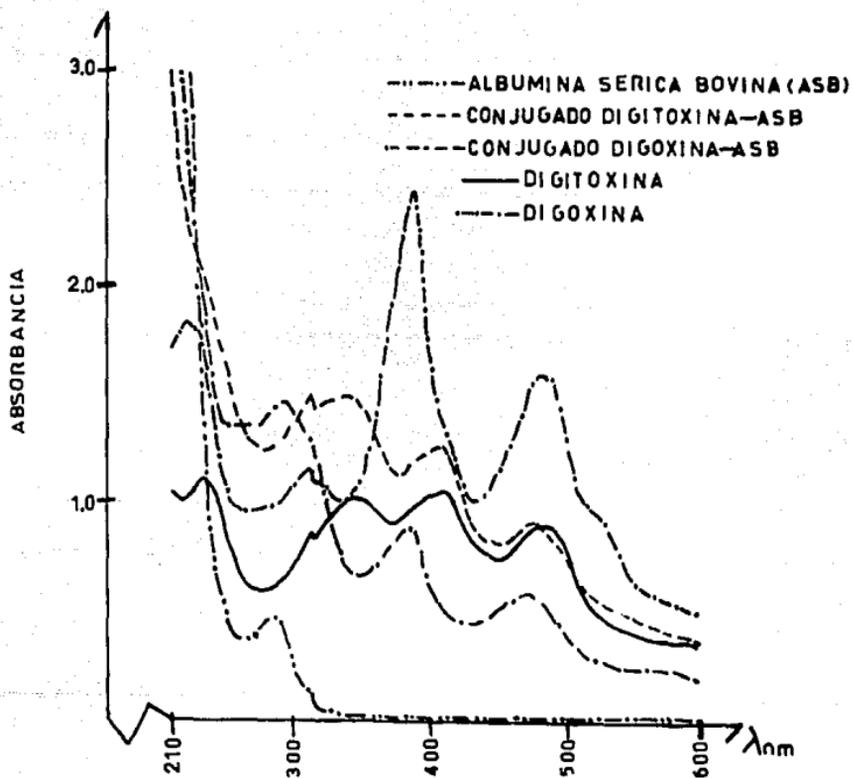


FIG. 8 ESPECTROS DE ABSORCION DE PROTEINA, HAPTENOS Y CONJUGADOS HETEROLOGOS.

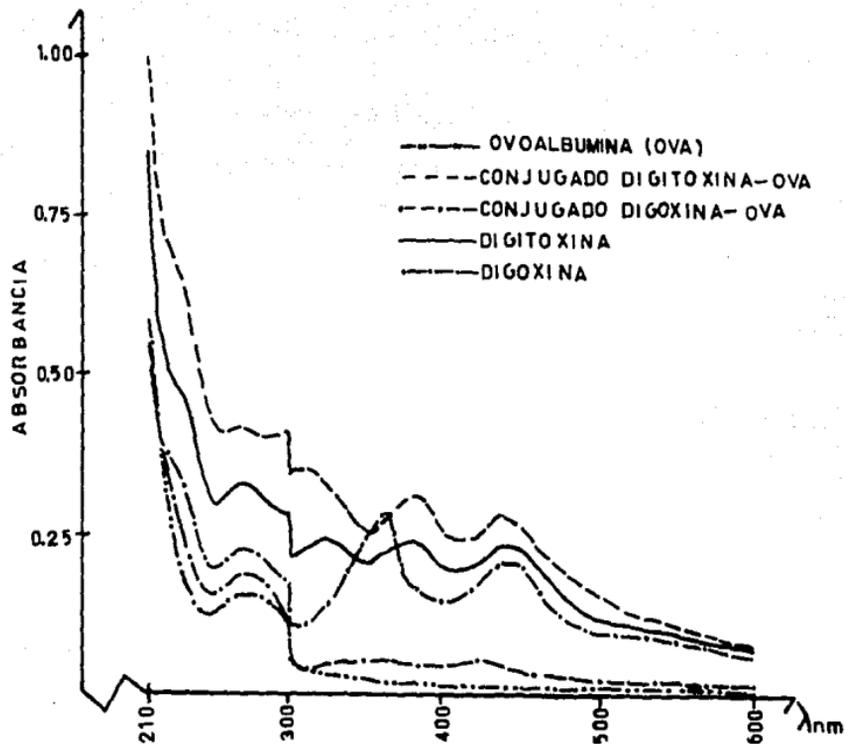


FIG. 9 ESPECTROS DE ABSORCION DE PROTEINA, HAPTENOS Y CONJUGADOS HOMOLOGOS.

$$\begin{array}{r} 25100 \text{ ----- } 1 \text{ M} \\ 0.8564 \text{ ----- } X \end{array} \quad X = 3.41 \times 10^{-5} \text{ moles de digoxina}$$

$$\begin{array}{r} 1 \text{ mol ----- } 780.98 \text{ g} \\ \quad \quad \quad -5 \\ 3.4 \times 10^{-5} \text{ ----- } X \end{array} \quad X = 26.63 \times 10^{-3} \text{ g de digoxina}$$

$$X = 26.63 \text{ mg}$$

De los 460 mg de conjugado (DX-ASB) solo 23.46 mg son de digoxina y los restantes 433 mg corresponden a ASB.

$$\begin{array}{r} 1 \text{ Mol de ASB ----- } 70 \text{ 000 g} \\ X \text{ ----- } 0.433 \text{ g} \end{array} \quad X = 6.191 \times 10^{-6}$$

El número de residuos de DX por mol de proteína se calculó mediante la siguiente relación:

$$\frac{\text{Moles de hapteno}}{\text{Moles de proteína}} = \text{No. de residuos de digoxina/mol de ASB.}$$

$$\frac{3.41 \times 10^{-5}}{6.19 \times 10^{-6}} = 5.5 \text{ residuos de digoxina por mol de ASB.}$$

Estos mismos cálculos se realizaron para determinar el número de residuos de hapteno en los demás conjugados.

TABLA No.4 RESIDUOS DE HAPTENO POR MOL DE PROTEINA.

CONJUGADO	Residuos/Mol de proteína
Digoxina-ovoalbúmina .....	5.0
Digitoxina-ovoalbúmina .....	6.0
Digoxina-albúmina sérica bovina .....	5.5
Digitoxin-albúmina sérica bovina .....	12.4

La tabla 4 muestra que el acoplamiento de digitoxina fue mejor al de digoxina para ambos tipos de proteínas. No obstante el número de residuos de digoxina en ASB y OVA, éstos fueron comparables al valor reportado por Smith 1970 (6.7 residuos de dx/mol de albúmina sérica humana).

### INMUNIZACION Y DETECCION DE ANTICUERPOS

Los sueros obtenidos Dx-OVA y Dt-OVA en cada cuadro de inmunización (tablas 5 y 6) fueron probados por precipitación en capilar después de sangrar los conejos, usando como antígenos los conjugados heterólogos Dx-ASB y Dt-ASB respectivamente para detectar posibles reacciones cruzadas.

De los 18 conejos que se inmunizaron, 11 respondieron favorablemente, y con ellos se continuaron las pruebas.

#### a) Precipitación en capilar.

Con esta prueba se demostró la presencia de anticuerpos contra la digoxina y digitoxina acopladas a la ASB.

Las tablas 5 y 6 presentan los resultados para los diferentes sueros, donde se observa una respuesta que puso de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo, la cual no mostró en un principio reactividad cruzada contra la proteína heteróloga.

Sin embargo los sueros de los siguientes sangrados presentaron reacción cruzada con ASB, además de observarse problemas de solubilidad del conjugado (anexo), por lo que no se realizó la prueba en forma cuantitativa.

TABLA No.5 PRECIPITACION EN CAPILAR DE SUERO DIGOXINA-OVA.

DILUCION DEL SUERO	CLAVE DEL CONEJO				
	Z-01	Z-02	Z-03	Z-06	Z-07
	m m	m m	m m	m m	m m
1:1	1	1	+ -	1	1
1:2	1	1	+ -	1.5	1
1:4	1	1	1	1.5	2
1:8	1	2	2	2	3
1:16	1.7	2.5	2	2.5	4
1:32	3	3	4	3	5
1:64	3	4	3	3	4
1:128	2	3	2	4	3
1:256	-	2	2	3	3
ANTIGENO	-	-	-	-	-
ASB/ANTISUERO	-	-	-	-	-
ANTISUERO	-	-	-	-	-

ASB Albúmina sérica bovina  
 ANTIGENO Conjugado heterólogo (Dx-ASB)  
 CONC. ANTIG.: 1 mg/ml  
 + - Dudoso - Negativo

TABLA No. 6 PRECIPITACION EN CAPILAR DE SUERO DIGITOXINA-OVA.

DILUCION DEL SUERO	CLAVE DEL CONEJO				
	Z-09 mm	Z-10 mm	Z-11 mm	Z-13 mm	Z-14 mm
1:1	+ -	+ -	+ -	+ -	1
1:2	1	1	1	1	1
1:4	1	1	1	1	1
1:8	2	2	1	2	2
1:16	3	3	2	2	2
1:32	4	2	3	3	2
1:64	5	3	4	4	3
1:128	6	4	+ -	+ -	+ -
SUERO	-	-	-	-	-
ANTIGENO	-	-	-	-	-
ASB/ANTIGENO	-	-	-	-	-

ASB Albúmina sérica bovina  
 ANTIGENO Conjugado heterólogo (Dt-ASB)  
 CONC. ANTIG.: 1 mg/ml.  
 + - Dudoso - Negativo.

#### b) Método de ELISA indirecto.

Los conjugados heterólogos preparados con los mismos haptenos pero con hemocianina (KLH) que es una proteína filogenéticamente más distante que la ASB respecto a la OVA, aseguraron una respuesta específica a la parte esteroideal del conjugado en los ensayos por éste método.

En los resultados que se muestran en las figuras 10 y 11 se observa que los antisueros con claves Z-18 y Z-07 obtenidos contra digoxina-OVA mostraron una mayor afinidad por este hapteno que por digitoxina. Mientras que los antisueros Z-10 y Z-13 dirigidos contra digitoxina-OVA presentaron un mejor reconocimiento para digitoxina.

Respecto a la titulación de los antisueros, cuyos resultados se muestran en la fig. 12, se observa que una concentración de 20 ug/ml dió una separación más amplia en las gráficas, lo cual permitió una mejor diferenciación de la afinidad del anticuerpo por su antígeno específico.

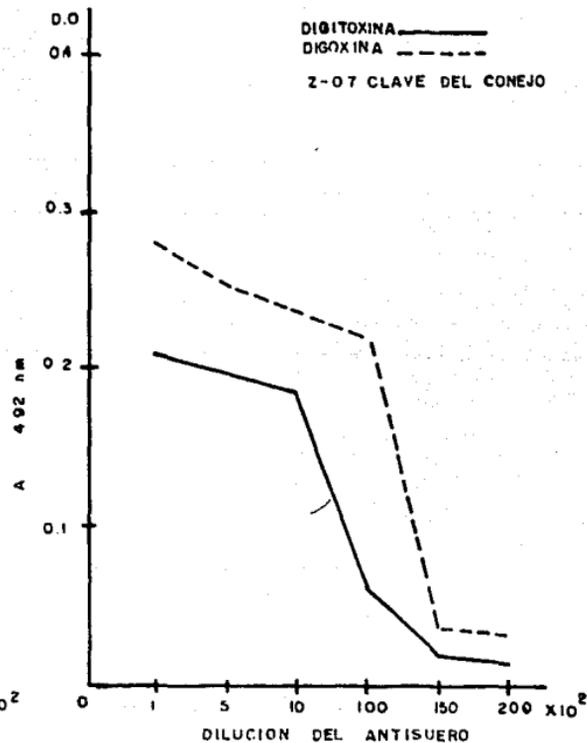
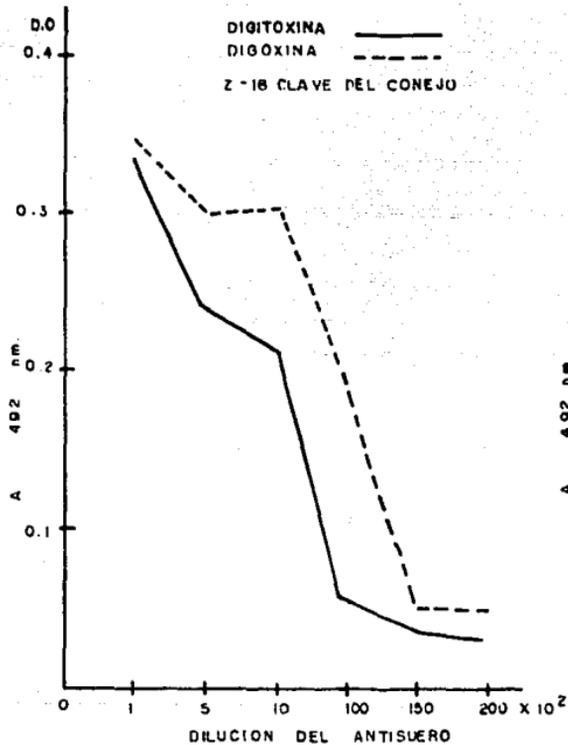


FIG 10 TITULACION DE SUEROS ANTIDIGOXINA. SE EMPLEO DX-KLH O DT-KLH PARA FORRAR LA PLACA A UNA CONCENTRACION DE 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$

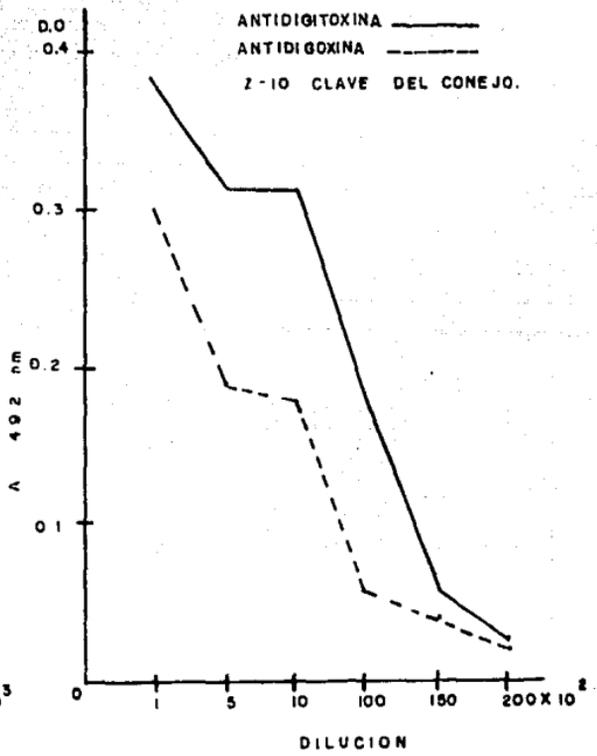
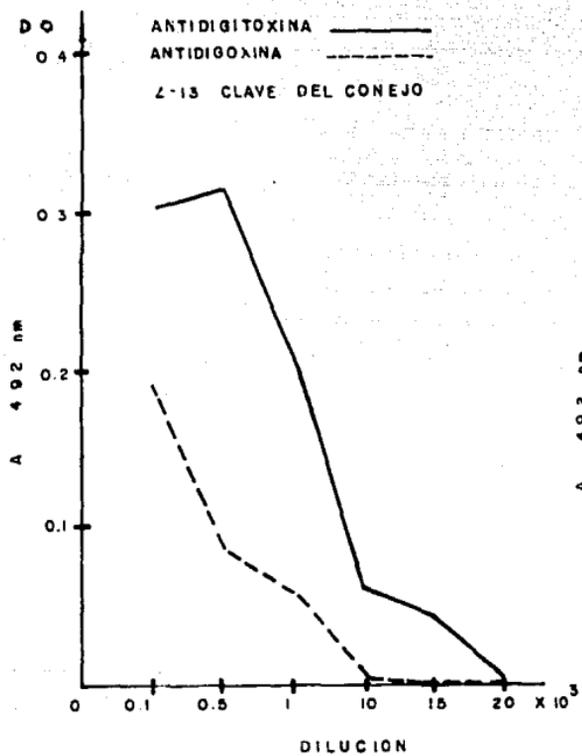


FIG. II TITULACION DE DOS SUEROS ANTIDIGITOXINA. SE EMPLEO DX-KLH O DT-KLH PARA FORRAR LA PLACA A UNA CONCENTRACION DE 10 µg/ml

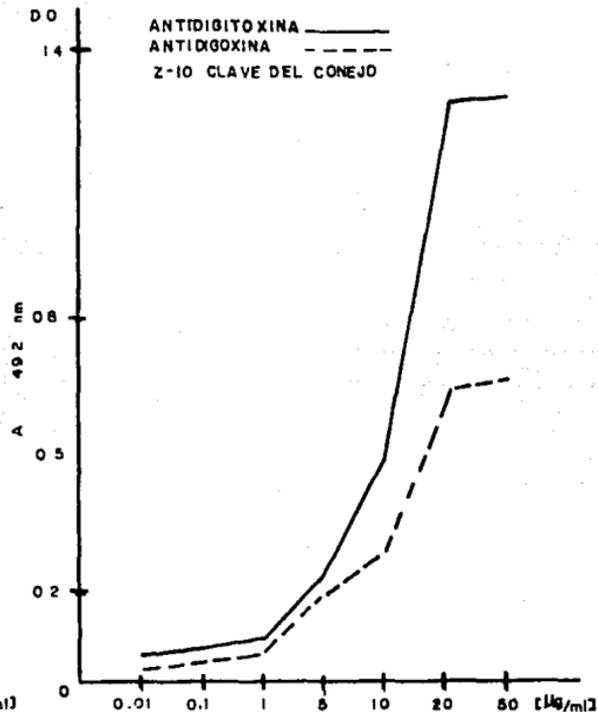
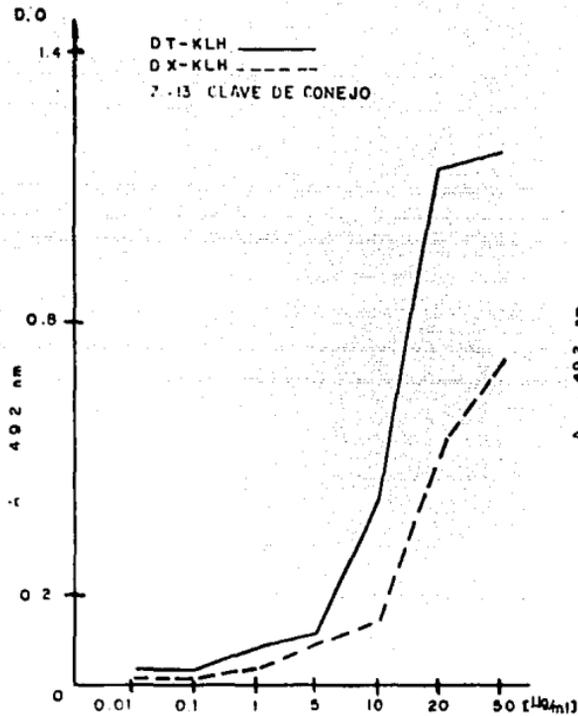


FIG 12 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DEL ANTIGENO POR ELISA SE EMPLEARON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ANTIGENO LOS SUEROS EMPLEADOS Z-10 Y Z-13.

### CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS ANTIDIGITALICOS.

Los resultados de especificidad de los anticuerpos, determinada por la prueba de Inhibición de la precipitación por hapteno, mediante el enlace previo de digoxina y digitoxina a sus anticuerpos específicos, se muestran en la tabla 8.

En las figuras 13 y 14 de los sueros Z-01 y Z-07 se muestran las curvas de inhibición que caracterizan a los anticuerpos anti-digoxina. En ellas se observó una mejor inhibición hacia digoxina lo que indicó un alto grado de especificidad a éste compuesto.

Mientras que los antisueros con claves Z-11 y Z-13 (figuras 15 y 16) presentaron curvas de inhibición con una relativa especificidad, ya que mostraron a la vez un reconocimiento importante por la digoxina (de 45 a 73 %).

TABLA 7. CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS POR INHIBICION DE LA PRECIPITACION POR HAPTENO.

Antisuero	Dilución	Conjugados		% de inhibición	
		Homól.	Heteról.	Dx	Dt
Z-01	1:100	Dx-OVA	Dx-KLH	85	33
	1:10000			60	22
Z-07	1:100	Dx-OVA	Dx-KLH	97	30
	1:10000			80	20
Z-11	1:100	Dt-OVA	Dt-KLH	45	80
	1:10000			60	80
Z-13	1:100	Dt-OVA	Dt-KLH	67	80
	1:10000			73	58

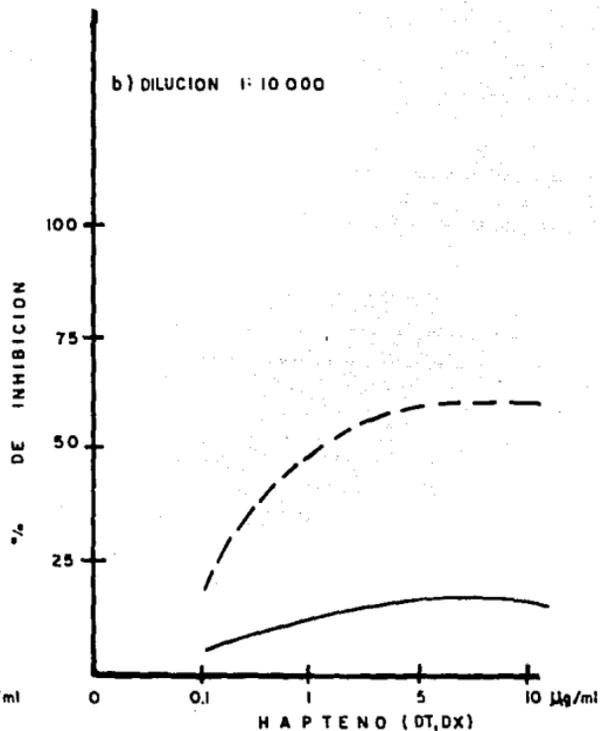
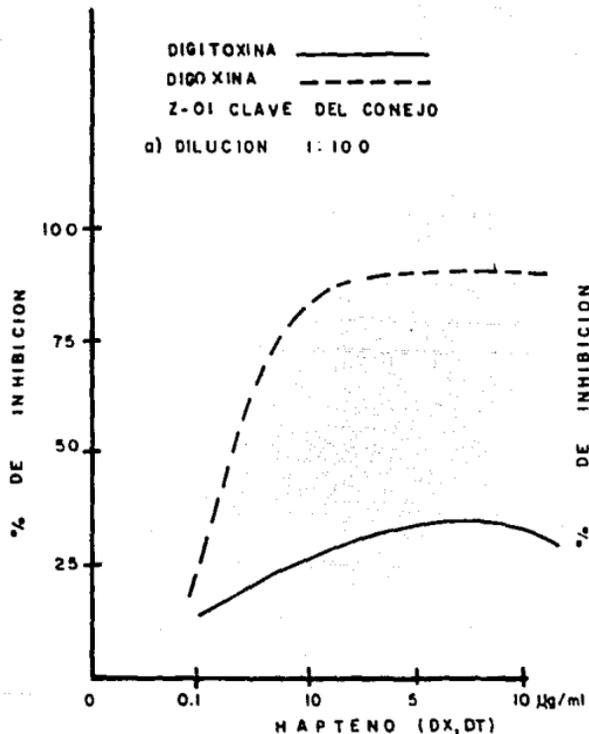


FIG.13 SISTEMA DE INHIBICION LA PLACA SE SENSIBILIZO CON 20  $\mu\text{g/ml}$  DE DX-KLH SE USO EL SUERO Z-OI (ANTIDIGOXINA) EN DILUCIONES: a) 1:100 b) 1:10 000 LOS HAPTENOS EMPLEADOS SON: DIGOXINA Y DIGITOXINA.

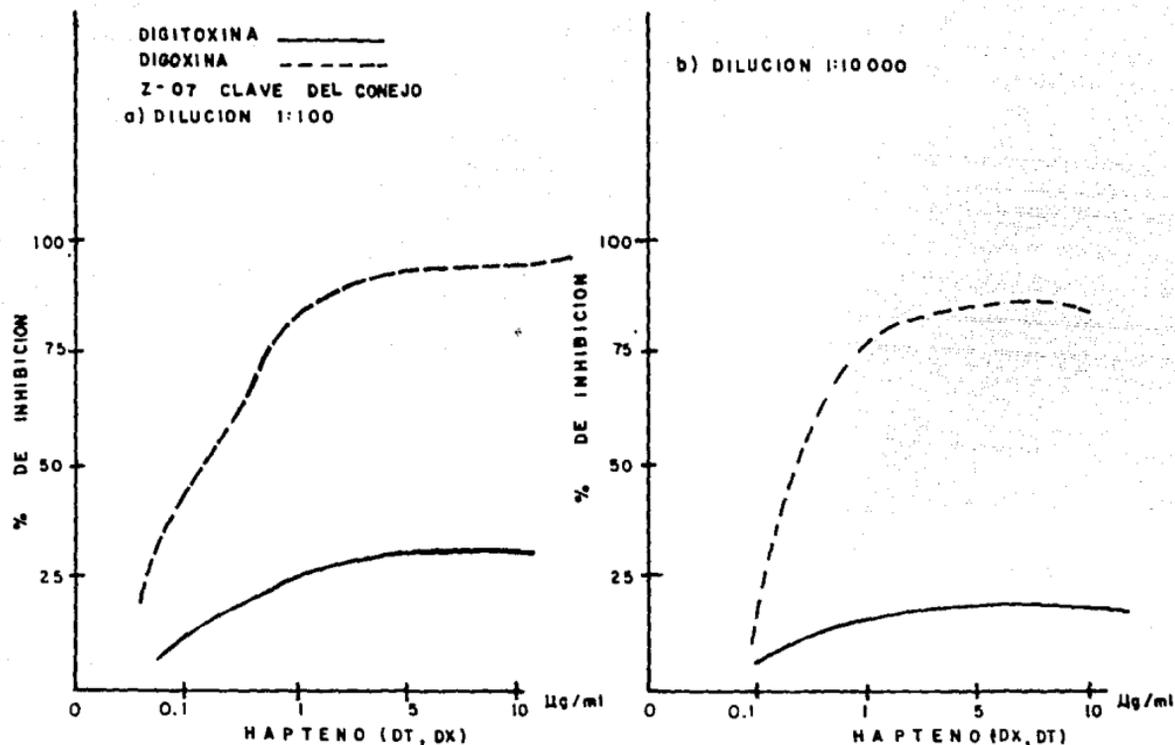


FIG. 14 SISTEMA DE INHIBICION. LA PLACA SE SENSIBILIZO CON 20  $\mu\text{g/ml}$  DE DX-KLH SE USO EL SUERO Z-07 ANTIDIARRHOEA EN DILUCIONES: a) 1:100 b) 1:10000 LOS HAPTENOS EMPLEADOS SON: DIGITOXINA Y DIGOXINA

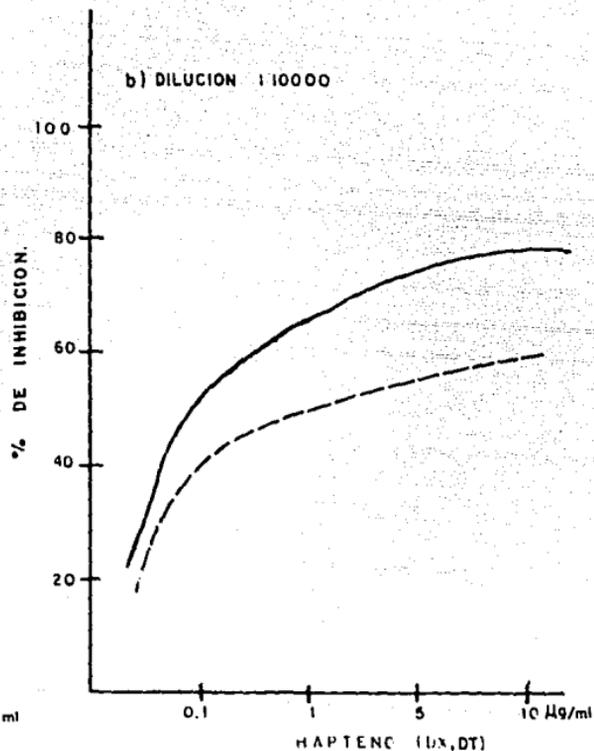
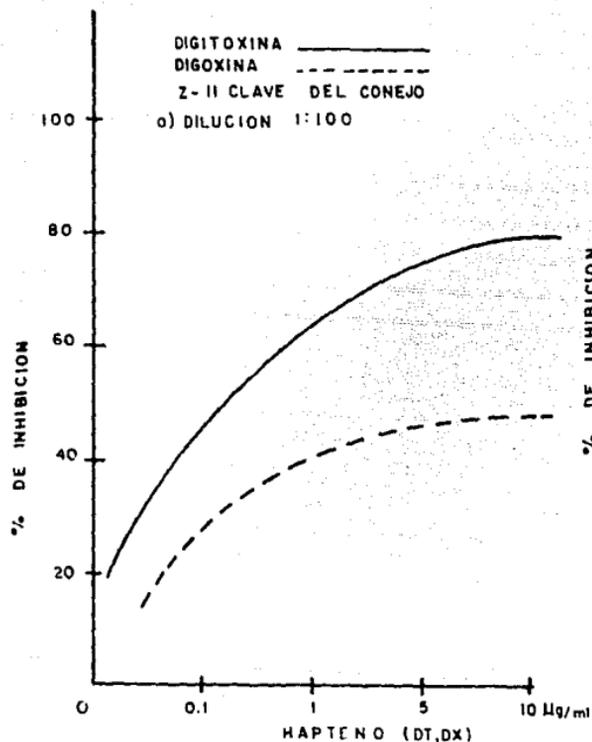


FIG. 15

SISTEMA DE INHIBICION. LA PLACA SE SENSIBILIZO CON 20  $\mu\text{g/ml}$ . DE E DT-KLH3 Y SE USO  
 SUERO Z-II A DIFERENTES DILUCIONES 1:100 1:10000. LOS HAPTENOS EMPLEADOS SON:  
 DIGITOXINA Y DIGOXINA.

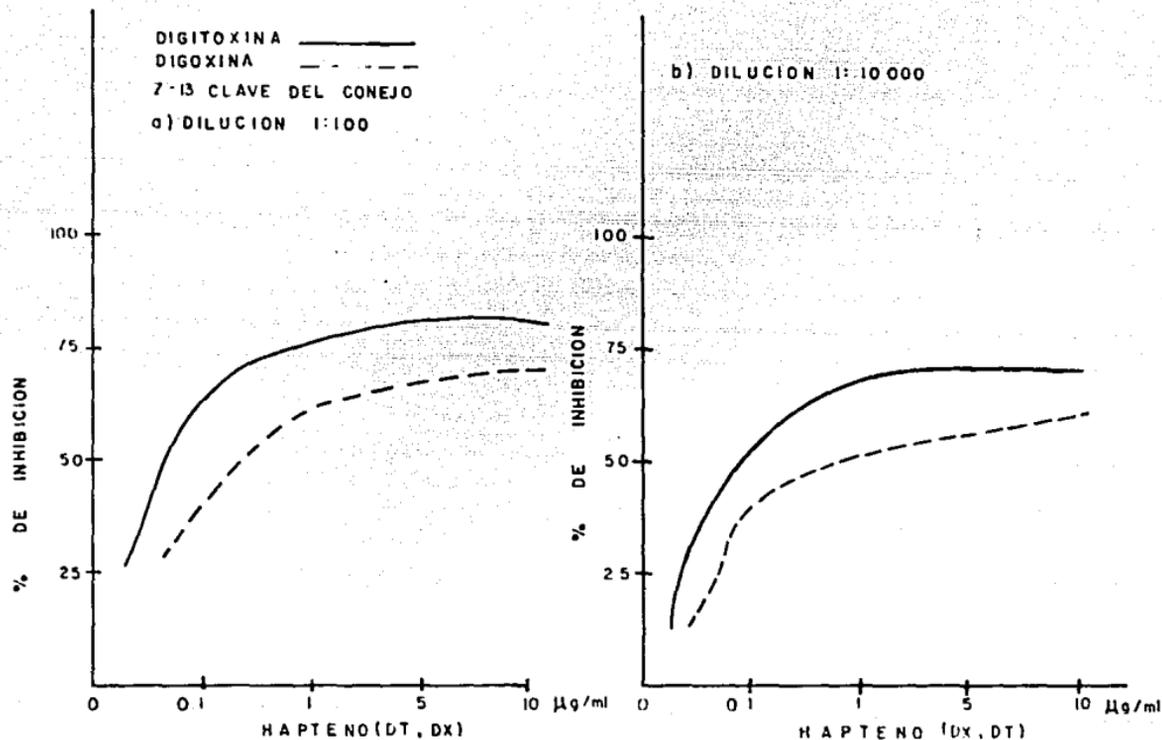


FIG. 16 SISTEMA DE INHIBICION. LA PLACA SE SENSIBILIZO CON 20  $\mu\text{g/ml}$  DE  $\Gamma\text{DT-KLH}$  SE USO EL SUERO 7-13 ANTIDIGITOXINA EN DILUCIONES: a) 1:100, b) 1:10000. LOS HAPTENOS EMPLEADOS SON: DIGITOXINA Y DIGOXINA.

## ANEXO. SOLUBILIZACION DE CONJUGADOS Y HAPTENOS.

En las pruebas para mejorar la solubilidad de los conjugados se observó que al variar el pH en la solución de Dx ó Dt en PBS no hubo ningún incremento de la solubilidad. Al emplear la sonicación se obtuvo un aumento del 30 % en la solubilidad del producto. Finalmente al utilizar la homogenización, el resultado de solubilidad obtenido fue del 70 %, por lo que se consideró como mejor prueba aunque no óptima, debido a que no se alcanzó el 100 % de solubilización, y con el tiempo de reposo tiende a disminuir la concentración del conjugado soluble.

Respecto a las pruebas de solubilidad de los haptenos en etanol, dimetil formamida y etilén glicol, se observó (tabla 7) que el mejor disolvente para Dx y Dt fue el etanol al 5 %, sin embargo a las 24 hrs. de preparadas las soluciones disminuye la solubilidad.

TABLA No. 8. SOLUBILIDAD DE DIGOXINA Y DIGITOXINA EN ETANOL, DIME TILFORMAMIDA Y ETILEN GLICOL.

Solución recién preparada			Solución 24 horas después	
Solución	D.O. nm	Conc. Hapteno ug/ml	D.O. nm	Conc. Hapteno ug/ml
* Dx-H SO 2 4	0.52	20.0	0.52	20.0
ETOH-Dx-H SO 2 4	0.49	18.8	0.38	14.9
DMF-Dx-H SO 2 4	0.34	13.0	0.039	1.5
EG-Dx-H SO 2 4	0.057	2.19	0.043	1.65
* Dt-H SO 2 4	0.55	20.0	0.55	20.0
ETOH-Dt-H SO 2 4	0.268	9.74	0.11	4.0
DMF-Dt-H SO 2 4	0.140	5.09	0.021	0.76
EG-Dt-H SO 2 4	0.052	1.96	0.041	1.49

\* Soluciones estándar preparadas al momento de emplearse  
- Lecturas de D.O. a 390 nm para Dx y 340 nm para Dt.

### CONCLUSIONES

1. De los sueros obtenidos de la inmunización de 18 conejos con los conjugados Dx-OVA y Dt-OVA, sólo en 11 se detectaron anticuerpos contra estas substancias.
2. El esquema de inmunización prolongado condujo a problemas de reactividad cruzada de la parte protéica entre los conjugados.
3. La baja solubilidad de los conjugados heterólogos llevó a cambiar el sistema de detección por precipitación en capilar de los anticuerpos obtenidos por el método de ELISA indirecto.
4. De los 10 sueros probados por ELISA, sólo 6 (Z-01, Z-07, Z-16, Z-10, Z-11, Z-13) dieron resultados positivos en la producción de anticuerpos.
5. La inhibición de anticuerpos de digoxina para Z-01 y Z-07 fue del orden de 60 a 97 % con digoxina, mientras que con digitoxina fue de 22 a 33 %, esto indica un alto grado de especificidad de dichos anticuerpos.

En el caso de los anticuerpos de digitoxina, la inhibición fue de 58 a 80 % con su mismo hapteno, mientras que con digoxina fue de 45 a 73 %, lo que muestra una relativa especificidad, ya que presentan un reconocimiento importante por la digoxina.

### SUGERENCIAS

En base a los problemas de solubilidad que se tuvieron para realizar las pruebas de reactividad cruzada con compuestos de estructura química semejante (esteroides), se recomienda determinar las condiciones de solubilidad de éstos compuestos.

Implementar una técnica de cuantificación usando éstos anticuerpos para la determinación de digoxina y digitoxina.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barrett, J.T., 1972. *Inmunología*. Interamericana S.A.de C.V. México : 161-172.
2. Bowman, W.C. and Rond M.J. 1975 *Textbook of Pharmacology* 2nd. ed. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford Londres.
3. Brown, B.T., Wright S.E., 1960. Absortion spectro of cardiac glycosides and aglycones in sulfuric acid. *J.Am. Pharm. A.* 49: 777-779.
4. Butler, V.P. Jr. & J.P. Chen. 1967. Digoxin specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57: 71-78.
5. Butler, V.F. Jr., Tse-Eng, D., Lindebaum, J., Summer, M. Jacek, K., Preibisz, J. Rund D.G. & Wissel, P.S. 1982. The development and aplication on a radioinmmuoassay for dihidrodigoxin a digoxin metabolite. *Am. Sc. Pharm. Exptl. Therap.* 221: 123-131.
6. Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. & Sussdorf D.H. 1970. *Immunology*. 2 nd edn. W.A. Benjamin, Inc. New York: 61-79.
7. Cortes, C.M. 1981. Efecto del radio atómico o molecular en la interaccion hapteno-anticuerpo. Tesis para obtener el título de O.B.P. ENCB I.P.N.
8. Eisen, H.N. 1964. Equilibrium dialysis for measurement of antibody hapten affinities. *Methods. Med. Res.* 10: 10-106.
9. Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Stobo, D.J. and Wells, V.J. 1982. *Inmunología básica y clínica*. 3 nd. El manual moderno. México: 350-730.
10. Griffiths, N.M., Hewich, D.S. & Stevenson, H. 1984. The effect of immunization with digoxin specific. *Biochem. Pharm.* 33: 3041-3046.
11. Hagimori, M., Matsumoto, T. & Kasaki, T. 1980. Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. *Plant cell Physiol.* 21 (8): 1391-1404.
12. Hernández, L.J., Santos, A.L., 1985. Aspectos relevantes del inmunoanálisis enzimático (ELISA). *Infectología.* 2: 52-57.
13. Hernández, L.J., 1985. Estandarización de la técnica de ELISA para su uso en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Tesis para obtener el título de O.B.P. ENCB I.P.N.

14. Kabat, A.E. y Meyer, M.M. 1968. 2 nd. edn. La prensa médica mexicana. México: 512-519.
15. Keating, M. & Rechwitz, G.A. 1984. Potentiometric digoxin antibody measurement with antigen-ionophore based membrane electrodes. *Anal. Chem.* 56: 801-806.
16. Keneth, R.W., Hasall, H. and Heineman, W. 1986. Competitive heterogeneous enzyme immunoassay for Digoxin with electrochemical detection. *Anal. Chem.* 58: 135-139.
17. Lehtola, T., Huhtikangas, A. & Schtz, M.V. 1981. Radioimmunoassay of digoxin glycosides in *Digitalis lanata*. *Planta Med.* 42: 250-254.
18. Linares G.J. 1986. Inmunohematología y transfusión. Crometip C.A. Caracas.: 2-12.
19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 193: 265.
20. Male, D. 1986. Immunology. The CV. Mosby Company St Louis Toronto.
21. Manual de Prácticas de Inmunología E.N.C.B. I.P.N.
22. Martindale, 1977. The extrapharmacopeia. 27 nd edn. The pharmaceutical Press. London: 486-496.
23. Nickel, S.L. & Staba, E.J. 1977. Suitability of antidigoxin antiserum for digoxin plant extracts. *Lloydia.* 40: 232-235.
24. Oliver, G.C., Jr., Parker, b.m., Brasfield, D.L. and Parker P.W. 1968. The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 47: 1035-1042
25. Reinhard, E., 1974. Biotransformation by tissue culture. In tissue culture and plant science (Street, H. Ed.) p.433-459. London-New York, San Francisco, Academic Press.
26. Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. 1985. Immunology. Mosby Company. New York.
27. Santos, A.L., Hernandez, L.J., Quezada, P.F., Estrada, P.S. 1986. Estandarización del inmunoanálisis enzimático. *Infectología.* 3: 18-23.
28. Sela, M., Fuch, S., & Arnon, R. 1962. Studies of the antigenicity of proteins. *Biochem. J.* 85: 223.
29. Syva Co. 1983. Digoxin Assay Batch Reagents.
30. Siskind, G.W., & Benacerraf B. 1969. Cell selection by antigen in the immune response. *Advan. Immunol.* 10: 1-45.

31. Smith, T.W., Butler, V.P. Jr. & Haber, E. 1970. Characterization of antibodies of high affinity and specificity. *Biochem. J.* 331-337.
32. Voller, A. Bidwell, D.E. y Barlett, A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories, Inc. Virginia: 23-41.
33. Vunakis, H.V. & Langone, J.J. 1980. *Immunochemical techniques* Academic press. New York: 454-467.
34. Weiler, E.W. & Zenk, M.H. 1976. Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Biochem. J.* 1537-1545.
35. Weir, D.M. 1976. *Handbook of experimental immunology* 2 nd. edn. Blackwell Scientific. London.

## RESUMEN

Con el fin de obtener anticuerpos específicos contra digoxina (Dx) y digitoxina (Dt), se inmunizó un lote de 14 conejos con conjugados de Dx-OVA y Dt-OVA, obteniéndose sueros con títulos altos de anticuerpos por precipitación en capilar.

Posteriormente, estos sueros se estudiaron en un sistema de ELISA indirecto, en donde se establecieron las condiciones para determinar su especificidad.

La concentración óptima de antígeno para recubrir placas de microtitulación de poliestireno fue de 20 ug/ml, en un intervalo de diluciones del suero entre 1:100 y 1:10000. Con estas condiciones se probaron todos los sueros con conjugados heterólogos de Dx-Hemocianina (KLH) y Dt-KLH, de los cuales se seleccionaron aquellos con capacidad de diferenciar ambos haptenos.

Los sueros seleccionados se utilizaron en sistemas de inhibición por hapteno. Los haptenos se disolvieron en etanol al 5 % en PBS y se demostró que esta concentración de etanol no afecta significativamente la interacción de los anticuerpos con los conjugados, además se observó que los sueros obtenidos contra Dx se inhiben mejor con su hapteno homólogo que con Dt. En cambio los sueros contra Dt dan mayor reactividad cruzada con Dx.