



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**DESARROLLO DE UNA TECNICA INMUNOENZIMATICA
PARA LA DETECCION DE ALFA-FETOPROTEINA
EN SUERO**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JULIA REYES REALI

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en los Departamentos de Ingeniería Bioquímica e Inmunología de la ENCB del IPN bajo la dirección y asesoría de la IBQ. Patricia Arce Paredes y del Dr. Oscar Rojas Espinosa y forma parte del proyecto "Diseño de un Prototipo de Laboratorio para la Producción de Suero Anti Alfa Feto Proteína", subvencionado por CoSNET-ENCB IPN (Convenio No. 419.85).

Durante la realización de la primera etapa del trabajo la alumna fue apoyada con una beca otorgada por el CoSNET y en la parte final del mismo con una beca crédito otorgada por el CONACyT (No. de registro 54936).

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la IBQ. Patricia Arce Paredes y al Dr. Oscar Rojas Espinosa por sus enseñanzas y dirección en la realización de este trabajo.

Al Biol. J. Efraín Garrido Guerrero por su apoyo incondicional y por la transcripción de este trabajo.

Al Dr. Rafael Jiménez Flores por el auxilio en el trabajo fotográfico

Al Jurado Dictaminador por la revisión del escrito.

DEDICATORIA

A mis padres Ofelia y José Luis por su apoyo moral y económico
para la culminación de mi carrera

A Efraín por su amor y estímulo para seguir adelante

A mis Hermanos

A mis Maestros y Amigos

INDICE

INDICE	1
RESUMEN	4
INTRODUCCION	6
Características fisicoquímicas de la AFP	6
Síntesis de AFP y niveles en suero y líquido amniótico	7
Niveles de AFP en suero materno	8
Tamizaje para la detección de defectos del tubo neural (DTN) mediante la cuantificación de AFP en suero materno	9
Amenaza de aborto y muerte fetal intrauterina	11
Toxemia y sufrimiento fetal	12
Isoinmunización severa	12
Mola hidatiforme y neoplasia trofoblástica	13
Síndrome de Down	13
AFP durante la oncogénesis	14
Métodos para la cuantificación de AFP	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y METODOS	20
Precipitación de gamma globulina de suero de chivo monoespecífica anti alfa-fetoproteína con sulfato de amonio	20
Determinación de proteínas por el método de Lowry	21
Activación de Sepharosa 4B con bromuro de cianógeno	22
Acoplamiento de gamma globulina de chivo monoespecífica anti AFP (GG de ch anti AFP) a Sepharosa 4B activada	

con bromuro de cianógeno	22.
Obtención de sangre de cordón umbilical y separación de suero	23
Purificación de AFP a partir de SCU	24
Reconstitución del inmunoadsorbente	25
Electroforesis en gel de poliacrilamida	25
Tinción de geles	27
Obtención de suero normal libre de AFP (SHN AFP ⁻)	27
Inmunodifusión radial (IDR)	28
Secado y tinción de placas	29
Obtención de suero de conejo hiperimmune anti AFP	29
Análisis de reactividad de sueros de conejo hiperimmune anti AFP por inmunolectroforesis bidimensional (IEB) o de Lebeq	30
Obtención de suero de conejo monoespecífico anti AFP	32
Insolubilización de proteínas con glutaraldehído y su uso como inmunoadsorbente	35
Preparación de conjugados anticuerpo-enzima (Ac-Ez) por el método de oxidación con periodato de sodio	36
Separación de los conjugados Ac-Ez por cromatografía en Sephadex G-200	37
Concentración de los conjugados Ac-Ez	38
ELISA por el método directo empleando los conjugados GG de ch anti AFP y GG de co anti AFP	38
ELISA por el método directo empleando el conjugado de GG de ch anti GG de co	39

Efecto de la concentración de GG ch-PO anti GG co	41
Efecto del bloqueador (SHN AFP ⁻ al 5%)	41
Curva estándar	43
Suero estándar	43
RESULTADOS	45
Purificación de AFP	45
Obtención de suero de conejo monoespecífico anti AFP	48
Purificación de los conjugados Ac-Ez	52
ELISA por el método directo	56
Efecto de la concentración de GG ch-PO anti GG co	56
Efecto del bloqueador (SHN AFP ⁻ al 5%)	60
Curva estándar y suero estándar	60
DISCUSION	64
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA	71
INDICE DE FIGURAS	80

RESUMEN

La Alfa-fetoproteína (AFP) es una glicoproteína que es sintetizada en etapa fetal principalmente por el hígado, y puede ser detectada en el suero materno a partir de la séptima semana de embarazo. Se han reportado niveles anormales de AFP en suero materno en un gran número de condiciones patológicas fetales tales como: defectos del cierre del tubo neural (DTN), toxemia, sufrimiento fetal, isoinmunización severa, mola hidatiforme, neoplasia trofoblástica y síndrome de Down.

En adultos sanos, los niveles de AFP en suero son muy bajos; sin embargo, estos niveles se incrementan en pacientes con cáncer primario de hígado o cáncer testicular no seminomatoso.

Por tales motivos, la cuantificación de AFP en suero ha sido de gran importancia. Las técnicas comunmente empleadas para este fin son el RIA y el ELISA; ambas ofrecen una gran sensibilidad y reproducibilidad, sin embargo, el ELISA presenta varias ventajas como son su rapidez, la estabilidad y el bajo costo de los reactivos.

Durante el desarrollo del presente trabajo se produjeron los reactivos biológicos necesarios para el montaje de técnicas inmunoenzimáticas para la cuantificación de AFP en suero, tales como: preparaciones enriquecidas de AFP, anticuerpos mono-específicos anti AFP, conjugados enzimáticos anti AFP y anti gamma globulina de conejo (GG de co) y un suero estándar el cual

presentó una concentración de 430 mg de AFP por mililitro.

Mediante el empleo de los reactivos biológicos obtenidos, se logró desarrollar una técnica inmunoenzimática por el método directo para la cuantificación de AFP en suero. Esta técnica presentó una sensibilidad de 15 ng/ml y la ventaja de poderse realizar en un periodo de tiempo relativamente corto (3 h).

INTRODUCCION

En 1944, se reportó el descubrimiento de una proteína en suero fetal de becerros con una movilidad electroforética alfa₁ a la cual se le llamó fetuina.

Posteriormente, en 1956 se detectó por primera vez en suero fetal humano una proteína análoga a la fetuina y aparentemente ausente en suero de adultos sanos. Esta proteína se designó con el nombre de Alfa₁-Fetoproteína (AFP) por mostrar una movilidad electroforética entre la de la Albúmina y la región de las Alfa₁-Globulinas (1).

Mediante estudios posteriores, y con el desarrollo de técnicas con elevada sensibilidad, se ha podido establecer que el suero de adultos sanos presenta concentraciones de AFP en un rango de 4 a 10 ng/ml (2).

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LA AFP

La AFP humana es una glicoproteína con movilidad electroforética de alfa₁ y consta de una sola cadena polipeptídica con un 4% de carbohidratos; presenta un P.M. de 68,000 a 69,000 daltones (3). Su coeficiente de extinción a 278 nm es de 5.3 , su coeficiente de sedimentación es de 5.5 S y su punto isoeléctrico es de 4.8 (3,4).

La secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica de la AFP es muy similar a la de la albúmina, lo que sugiere que la AFP y la albúmina pudieran tener un gene ancestral común.

SINTESIS DE AFP Y NIVELES EN SUERO FETAL Y LIQUIDO AMNIOTICO

La síntesis de AFP durante el embarazo empieza alrededor de los 29 días después de la concepción. En esta etapa del desarrollo embrionario, el primordio hepático es capaz de sintetizar no solo AFP sino también otras proteínas plasmáticas.

Entre los 32 a 35 días de gestación se inicia la síntesis de AFP en el saco vitelino, el cual disminuye su aporte a los 60 días (8.5 semanas de gestación) aproximadamente.

La síntesis de AFP también puede efectuarse en el tracto gastrointestinal fetal, pero la cantidad producida es mucho más pequeña que la sintetizada por el hígado. Aunque se ha demostrado que el riñón fetal y la placenta ocasionalmente pueden producir trazas de AFP, la síntesis en estos sitios no es común y las cantidades producidas son pequeñas (5).

La AFP es secretada al torrente circulatorio, alcanzando una concentración máxima en el suero fetal de 3 mg/ml entre la 10^a y 13^a semana de gestación. Toda la AFP presente en esta etapa del desarrollo fetal es de origen hepático, después de este período su concentración disminuye paulatinamente, detectandose niveles de 13 a 86 µg/ml al momento del nacimiento (5,6,7), posteriormente decrece en forma gradual hasta una concentración de 2-10 ng/ml, que corresponden a los niveles encontrados en el suero de adultos sanos (8).

La AFP es transmitida por el feto al líquido amniótico a través de la orina fetal (9). En embarazos normales la concen-

tracción máxima de AFP en líquido amniótico es de 15 $\mu\text{g/ml}$, alcanzándose entre la 10^a y 13^a semana de gestación (2). Después de esta etapa la concentración de AFP disminuye en forma paralela a su concentración en suero fetal hasta el término del embarazo (7).

NIVELES DE AFP EN SUERO MATERNO

Los primeros datos cuantitativos de los niveles de AFP en suero materno, fueron reportados en 1972 (10).

En el transcurso del embarazo la concentración de AFP se incrementa en el suero materno debido al paso de ésta a través de la placenta y membranas amnióticas por gradiente de concentración del feto a la madre (11,12).

La concentración de AFP en el suero materno se empieza a elevar gradualmente a partir de la 7^a semana de embarazo, alcanzando su nivel máximo durante el tercer trimestre del mismo, siendo éste de 450 ng/ml. A partir de este periodo, la concentración de AFP en el suero de la madre decrece gradualmente hasta que se alcanza el rango correspondiente a los niveles encontrados en el suero de adultos sanos en un lapso de 4 a 5 días después del parto (10,14).

Al nacimiento los niveles de AFP en suero materno son de 300 a 600 veces más bajos que los correspondientes a niveles fetales. Los niveles de AFP en suero materno a veces se incrementan durante el parto, probablemente reflejo de transfusión fetomaterna.

Existen diferentes condiciones patológicas durante el embarazo, las cuales pueden causar un incremento en los niveles de AFP materna, por lo cual la AFP se ha empleado como un marcador bioquímico para detectar estas patologías.

TAMIZAJE PARA LA DETECCIÓN DE DEFECTOS DEL TUBO NEURAL (DTN)

MEDIANTE LA CUANTIFICACION DE AFP EN SUERO MATERNO

En 1972, Brock y Sutcliffe fueron los primeros en establecer una asociación entre un feto afectado por Defectos del cierre del Tubo Neural abierto (DTN) y un incremento por arriba del rango normal en las concentraciones de AFP en líquido amniótico (13).

Dos reportes publicados un año más tarde sugirieron que una elevación en la concentración de AFP en líquido amniótico puede reflejarse en el suero materno dando concentraciones más elevadas que las correspondientes a embarazos normales (14,15). Estos hallazgos han sido confirmados por varios grupos de investigadores en embarazos con anencefalia y espina bífida (16,17,18).

La cuantificación de AFP en líquido amniótico, es un método confiable para la detección de DTN, sin embargo no es recomendado como método rutinario directo en los programas de detección de estos defectos debido a que el procedimiento de amniocentesis implica un riesgo para el bienestar fetal.

Por este motivo, varios autores han sugerido la cuantificación de AFP en suero materno como un método de tamizaje para la detección de DTN, siendo el objetivo principal seleccionar aquellos casos en que la amniocentesis es necesaria (2,19).

En 1974, se obtuvieron datos preliminares de un estudio "piloto" realizado en el Reino Unido y organizado por el "Institute for Research into Mental and Multiple Handicap". En este estudio sólo pudo ser detectado un pequeño número de embarazos afectados con DTN, por lo que fue propuesto un estudio colaborativo para poder obtener una estimación real de la eficiencia de la cuantificación de AFP en el suero materno. Dicho estudio fue realizado un año más tarde y publicado en 1977. En este estudio colaboraron 19 centros hospitalarios del Reino Unido, se incluyeron un total de 18,684 embarazos únicos, de los cuales 301 presentaron DTN (146 con anencefalia, 142 con espina bífida y 13 con encefalocele). Los resultados establecieron que el mejor tiempo para discriminar entre un embarazo normal y uno afectado es entre las semanas 16 y 18 de la gestación. En este estudio se estableció la línea de corte en 2.5 veces el valor de la media, de tal manera que los valores de AFP en suero materno que estuvieron 2.5 veces por arriba del valor de la media se confirmaron tomando una segunda muestra y realizando posteriormente un exámen por ultrasonido para establecer si el embarazo era único o múltiple, ya que estos últimos están asociados con niveles elevados de AFP en suero materno. Mediante este procedimiento se pudieron detectar el 88% de los casos con anencefalia, el 79% de los casos con espina bífida y el 3% de los casos de embarazos únicos no afectados que tuvieron concentraciones de AFP por arriba de 2.5 veces el valor de la media. A través de este estudio se confirmó que la cuantificación de AFP en suero materno

puede considerarse como una prueba bioquímica de gran importancia para la detección de embarazos con DTN (20).

Programas similares se han llevado a cabo en otros países como Inglaterra, Holanda, E. U. y Canada. Los resultados obtenidos al igual que en el estudio anterior, han demostrado que la eficiencia de detección de defectos del tubo neural, es del orden del 92 al 96% de los casos, por tal motivo, estos programas se han implementado como una prueba de rutina en hospitales de ginecobstetricia ya que además es de gran utilidad para el diagnóstico y manejo de otras complicaciones durante el embarazo (21,22).

AMENAZA DE ABORTO Y MUERTE FETAL INTRAUTERINA

La primera asociación entre aborto espontáneo y concentraciones anormales de AFP en suero materno fue reportada por Tatarinov en 1965 (23).

En un estudio realizado en 1977, se llegó a la conclusión de que una elevación de AFP en suero materno durante el segundo trimestre del embarazo indica una posibilidad 6 veces mayor de que el embarazo se asocie con aborto espontáneo, si se compara con embarazos con valores normales de AFP (24).

Se ha demostrado que la elevación de la AFP en suero materno en los casos de amenaza de aborto, está asociada con muerte fetal intrauterina (25).

Cuando la muerte fetal ocurre en útero, se supone que la AFP se escapa por varios compartimientos fetales a la circulación

materna. Por lo tanto, es probable que la concentración de AFP en suero materno se incremente inicialmente después de la muerte fetal. Cuando el feto no es expulsado inmediatamente, la madre puede eliminar la AFP fetal de su circulación antes de que los signos clínicos del disturbio se manifiesten (23,25).

TOXEMIA Y SUFRIMIENTO FETAL

La literatura sobre el tema está en desacuerdo en cuanto a los niveles de AFP en suero de mujeres toxémicas. Brettes y cols. y Cahill y cols. en estudios realizados independientemente, señalaron un aumento en los niveles de AFP en suero materno en el tercer trimestre de embarazos afectados por toxemia severa y sufrimiento fetal (26,27). Sin embargo, las publicaciones de Garoff y Seppala, en términos generales señalan que en toxemia los niveles de AFP maternos tienden a ser más bajos que los niveles normales y que solo en algunos casos éstos tienden a incrementarse (28).

ISOINMUNIZACION SEVERA

La isoinmunización Rh severa está frecuentemente asociada con elevados niveles de AFP en suero, especialmente en aquellos casos en que se requiere transfusión intrauterina (29,30). Brock y cols. han señalado que la transfusión intrauterina no influye uniformemente en el patrón de AFP en el suero y que la valoración de AFP en suero materno es un parámetro adicional valioso en este tipo de embarazos (30).

MOLA HIDATIFORME Y NEOPLASIA TROFOBlastICA

Pacientes con carcinoma gestacional, tienen niveles de AFP similares a los encontrados en mujeres no embarazadas sanas (31). Seppala estudió un grupo de mujeres con mola hidatiforme, de las cuales una de cada ocho presentaron niveles elevados de AFP en suero. En estos casos, los úteros contenían una simple masa molar sin evidencias del feto (19). Hishiguro describió una mola asociada con niveles elevados de AFP en suero materno, pero en este caso la masa molar coexistió con el feto (32).

En la mayoría de los casos es difícil distinguir entre un embarazo anormal y una mola hidatiforme o una neoplasia trofoblástica, particularmente en mujeres que han tenido antecedentes (19).

SINDROME DE DOWN

Varios autores han asociado los niveles bajos de AFP en suero materno, con síndrome de Down (33,34,35,36).

En 1987 se realizó un estudio en el cual se estimó el riesgo de una mujer embarazada de tener un hijo afectado por síndrome de Down, la estimación fue realizada correlacionando la edad de la madre y los niveles de AFP en suero materno entre las 14 y 20 semanas de gestación.

De este estudio se concluyó que el tamizaje para síndrome de Down usando tanto la edad materna como los niveles de AFP en suero materno, es más eficiente que el usar solo uno de ambos

parámetros (37).

En ese mismo año se realizó un estudio similar en el cual se incluyeron 2104 embarazos únicos, de los cuales 2018 resultaron no afectados. En este estudio se construyó una curva de isoriesgo que correlaciona la edad materna (16-46 años) con los niveles de AFP en el suero materno (múltiplos de la media) en muestras tomadas entre las 14-20 semanas de gestación.

Mediante la curva de isoriesgo pudieron detectarse el 58% de los fetos afectados, mientras que con el empleo de uno solo de los parámetros sólo se diagnosticó el 28% de los fetos afectados.

Basándose en los resultados anteriores los autores sugieren que los valores de AFP en suero materno no pueden ser empleados como una prueba de diagnóstico para síndrome de Down, pero sí puede ser usada conjuntamente con la edad materna para estimar la probabilidad de que el embarazo se asocie con un feto con síndrome de Down (38).

AFP DURANTE LA ONCOGENESIS

En 1963, por primera vez se demostró la asociación entre la presencia de una proteína fetal en suero y el desarrollo de procesos cancerosos en ratones (39).

Diversos estudios indican que la AFP es normalmente sintetizada durante el desarrollo embrionario por el hígado embrionario y el saco vitelino, pero también puede ser producida en el estado adulto por células de cáncer de hígado (40). La síntesis de AFP por estas células se cree que resulta de la desrepresión de genes

los cuales estuvieron activados y después reprimidos durante la ontogenesis (41).

Tatarinov en 1965 demostró en pacientes con cáncer primario de hígado la presencia de AFP y sugirió que esta proteína pudiera ser la base de una prueba serológica para esta enfermedad (42).

Estos hallazgos han sido confirmados y empleados por varios autores (43,44,45).

En 1966 se realizó un estudio colaborativo por la International Agency for Research on Cancer, para evaluar y comparar la especificidad y sensibilidad de la prueba de AFP para la detección de cáncer primario de hígado. Los resultados indicaron que de los 247 pacientes diagnosticados con cáncer primario de hígado el 61% mostró niveles elevados de AFP, el 32.4% mostró resultados negativos y el 6.5% resultados discordantes.

Los resultados de este estudio fueron la base de reportes posteriores en donde se evaluó la utilidad de la prueba de la AFP para cáncer primario de hígado (42,46).

Otros estudios han demostrado que la elevación de los niveles de AFP en el suero ocurre además en otros procesos neoplásicos, como el cáncer testicular no seminomatoso. En este caso se ha observado que existe una relación entre los niveles de AFP y el estado de la enfermedad, ya que los niveles de AFP en el suero de estos enfermos, frecuentemente se incrementan durante la progresión del cáncer y disminuyen durante la remisión de la enfermedad.

La cuantificación de la AFP en este tipo de padecimientos es

útil para el seguimiento del tratamiento, ya que se ha observado que cuando los valores de AFP post-operatorios disminuyen y después se incrementan, se ha detectado la presencia de tumor residual. La recurrencia del tumor está frecuentemente acompañada por un incremento en los niveles de AFP en el suero antes de que la enfermedad presente síntomas clínicos (47,48).

Niveles elevados de AFP han sido encontrados ocasionalmente asociados con cáncer del tracto gastrointestinal con o sin metástasis en el hígado (49).

También existe un estudio en el cual se reportó un caso en el cual se encontraron niveles elevados de AFP en suero asociados con cáncer de pulmón, en este caso, los niveles disminuyeron hasta el rango normal, 8 semanas después de la intervención quirúrgica (50).

MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACION DE AFP

El primer método introducido para la cuantificación de AFP fue la inmunodifusión con la cual se podían demostrar concentraciones de AFP del orden de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (26).

Posteriormente fueron empleados otros métodos basados en técnicas de inmunoprecipitación, todos ellos con una baja sensibilidad y aplicados sólo para la cuantificación de AFP en altas concentraciones. Además de los métodos de inmunoprecipitación, también fueron introducidos métodos basados en la aglutinación de partículas de latex e inhibición de la aglutinación, con estas técnicas se podían cuantificar niveles de AFP arriba de

0.25 $\mu\text{g/ml}$ y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (51).

En 1971, se describió la técnica del Radioinmunoensayo (RIA) para AFP, en la cual se utilizó al antígeno o al anticuerpo marcado con un isótopo radioactivo (40).

Mediante el RIA se pudo evidenciar por primera vez la existencia de cantidades traza de AFP en suero humano normal.

La sensibilidad del RIA para cuantificación de AFP está en el rango de 1 a 50 ng/ml , pero se han establecido varias modificaciones que han mejorado la sensibilidad, pudiéndose cuantificar concentraciones hasta de 500 pg/ml (52,53).

En el mismo año, dos grupos de investigadores por separado proponen la técnica del Inmunoensayo Enzimático (ELISA), en la cual se utiliza el antígeno o el anticuerpo conjugado a una enzima (54,55).

En 1973 se introdujo la técnica de ELISA para la cuantificación de AFP de rata por los métodos competitivo y de sandwich obteniéndose una sensibilidad de 5 ng/ml por ambos métodos (56).

En 1975 se empleó el método del sandwich con el anticuerpo inmovilizado a un polvo de celulosa. El método fue utilizado para la cuantificación de AFP de rata y humana obteniéndose resultados reproducibles en el rango de 10-1000 ng/ml y de 3-1000 ng/ml respectivamente (57).

Otros autores han empleado el método de sandwich en el cual se emplean como fase sólida, micropartículas hidrofílicas derivadas de la N-hidroxisuccimida, obteniendo un análisis con una sensibilidad de 2 ng/ml (58).

La sensibilidad de la técnica se ha tratado de elevar empleando anticuerpos monoclonales dirigidos hacia dos diferentes determinantes antigénicos de la AFP, logrando una sensibilidad de 0.1 ng/ml a 3 ng/ml (52).

Debido a que el RIA y más recientemente el ELISA son las técnicas comunmente usadas para la cuantificación de AFP en suero, tanto en los laboratorios de diagnóstico clínico como en los de investigación, varios autores han realizado estudios comparativos entre ambas técnicas, considerando que aunque el RIA es superior en eficiencia, sensibilidad y reproducibilidad, el ELISA ofrece una gran sensibilidad, los reactivos implicados son estables, no radioactivos ni costosos, es rápida, da un alto grado de reproducibilidad y se puede efectuar con equipo sencillo de laboratorio. Lo anterior hace que las técnicas de ELISA sean fuertemente competitivas con las del RIA, además de que este último presenta el inconveniente de que los reactivos que son requeridos además de ser de alto costo tienen una vida media corta, se manejan isotopos radioactivos que representan un riesgo para el técnico que lo realiza y se necesita equipo complicado como un contador de centelleo gamma que incrementa aún más el costo (59,60).

OBJETIVOS GENERALES

- 1.- Obtención de reactivos biológicos empleados en técnicas inmunoenzimáticas para la cuantificación de AFP.
- 2.- Montaje y estandarización de la técnica de ELISA para la cuantificación de AFP en suero.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1a.- Purificación de AFP.
- 1b.- Preparación de un suero humano normal libre de AFP.
- 1c.- Obtención de un suero de conejo monoespecífico anti AFP.
- 1d.- Preparación de conjugados enzimáticos (gamma globulina de chivo-peroxidasa anti AFP, gamma globulina de conejo-peroxidasa anti AFP y gamma globulina de chivo-peroxidasa anti gamma globulina de conejo).

- 2a.- Desarrollo de dos técnicas inmunoenzimáticas para la cuantificación de AFP en suero, empleando tres diferentes conjugados enzimáticos.
- 2b.- Elaboración de una curva estándar a partir de AFP comercial, mediante la técnica de ELISA desarrollada y seleccionada.
- 2c.- Preparación de un suero estándar interno para la sustitución de un suero estándar comercial en la técnica de ELISA seleccionada en el laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

1.- PRECIPITACION DE LA FRACCION GAMMA GLOBULINA DE SUERO DE CHIVO MONOESPECIFICA ANTI ALFA-FETOPROTEINA CON SULFATO DE AMONIO

A un volumen de 50 ml de suero de chivo mono específico anti Alfa-Fetoproteína (AFP) contenido en un vaso de precipitado, se le adicionó lentamente y con agitación constante, un volumen de una solución saturada de sulfato de amonio pH 7.4 (la concentración final queda al 50% de saturación), la agitación se mantuvo durante 15 min después de terminada la adición de sulfato de amonio. A continuación se centrifugó la suspensión a 5,000 rpm durante 15 min y el precipitado se disolvió en solución salina al 0.85%, pH 7.4 hasta alcanzar un volumen igual al volumen original del suero.

Posteriormente se repitió tres veces el procedimiento anterior, modificando el volumen de sulfato de amonio para tener una concentración final del 33% de saturación. El sedimento de la última centrifugación se disolvió en solución salina amortiguadora de boratos pH 8.4 hasta alcanzar la mitad del volumen original del suero y se dializó contra la misma solución a 4°C durante 3 días, realizando dos cambios diarios. Una vez dializada la muestra, se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min para eliminar cualquier agregado (61).

2.- DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

En tubos de ensayo de 13 x 100 mm se colocaron alícuotas apropiadas de una solución estándar de proteína (500 mg/ml de albúmina sérica bovina).

Para elaborar la curva de calibración se dispusieron 6 tubos por duplicado y se les agregaron 50 ul, 100 ul, 200 ul, 300 ul y 400 ul de la solución estándar de proteína, el volumen se completo a 1 ml con solución salina 0.85%. Además de los tubos empleados para la curva de calibración, se dispuso de otros tubos para colocar las muestras problema e introducir un blanco de reactivos. Después de colocar las respectivas muestras en cada tubo se adicionaron 3 ml de una solución de carbonato al 1% en hidróxido de sodio 0.1 N conteniendo 1 ml de sulfato de cobre al 1% y 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2% por cada 100 ml de la solución anterior.

Los tubos se agitaron con un vortex y se dejaron reposar durante 10 min, posteriormente se agregaron 100 ul de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitaron nuevamente dejando reposar 30 min, al termino de los cuales se midió la absorbancia de cada tubo a 600 nm, ajustando el espectrofotómetro a 0 con el blanco de reactivos. Para conocer la concentración de proteínas de las muestras problema, la absorbancia se interpoló en la curva estándar construida con la densidad óptica (D.O.) de los tubos que contenían la concentración conocida de proteína (62).

El rango de sensibilidad de la prueba es de 20 a 200 ug de proteína por ml.

3.- ACTIVACION DE SEPHAROSA 4B CON BROMURO DE CIANOGENO (Br CN)

Un volumen de 30 ml de Sepharosa 4B se lavó 3 veces consecutivas mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 3 min, utilizando agua bidestilada fría, el sedimento obtenido se resuspendió en un volumen igual de agua bidestilada fría y se transfirió a un vaso de precipitados conteniendo una barra magnética y mantenido en un baño de hielo colocado sobre una plataforma de agitación, posteriormente el electrodo del potenciómetro se introdujo en la suspensión y se añadió rápidamente 150 ml de una solución de BrCN con una concentración de 30 mg de BrCN por ml de Sepharosa (concentración total adicionando 900 mg de BrCN). El pH de la suspensión se mantuvo entre 10.5 y 11 durante 25 min adicionando al principio hidróxido de sodio (NaOH) 5 N (cuando baja rápidamente el pH) y adicionando después NaOH 1 N (cuando baja lentamente el pH).

Posteriormente la solución se transfirió a un embudo Buchner, la Sepharosa ya activada se lavó por centrifugación con 10 volúmenes de agua bidestilada fría y después con 10 volúmenes de amortiguador de acoplamiento (NaHCO_3 0.1 M, NaCl 0.5 M) (63).

4.- ACOPLAMIENTO DE GAMMA GLOBULINA DE CHIVO MONOESPECIFICA ANTI AFP (GG ch anti AFP) A SEPHAROSA 4B ACTIVADA CON Br CN

Un volumen de 30 ml de Sepharosa se secó y se mezcló con 30 ml de GG ch anti AFP ajustada a una concentración de 10 mg de proteína por ml y dializada previamente contra el amortiguador

empleado en el acoplamiento.

La muestra se dejó agitando por rotación a 4°C durante toda la noche y después se lavó por succión con 10 volúmenes de amortiguador de acoplamiento, se succionó casi a sequedad y se resuspendió en un volumen de etanolamina 1 M, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h, posteriormente se lavó con 10 volúmenes de amortiguador de acoplamiento, 5 volúmenes de agua bidestilada, 10 volúmenes de glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8 y 10 volúmenes de regulador de fosfatos (NaHPO₄ 0.01 M, NaH₂PO₄ 0.01 M, NaCl 0.85%) pH 7.4 (PBS). El inmunoadsorbente se almacenó a 4°C en PBS conteniendo timerosal al 0.01% como conservador (63).

5.- OBTENCION DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL Y SEPARACION DE SUERO

El espécimen ideal para la purificación de AFP es el suero de fetos de menos de 20 semanas de gestación, o bien el hígado fetal; sin embargo, por su dificultad de obtención se prefirió manejar el suero de la sangre extraída del cordón umbilical, después del parto.

Para la obtención del suero de cordón umbilical (SCU) se extrajo la sangre del cordón umbilical inmediatamente después del parto, colectandola en recipientes estériles. Se esperó a que se formara el coágulo, se retiró y el suero se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min.

Con el suero obtenido de varios cordones umbilicales se formó una mezcla la cual se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.- PURIFICACION DE AFP A PARTIR DE SCU

Se colocó una jeringa hipodérmica de 50 ml a manera de columna cromatográfica y se adicionó el inmunoadsorbente de Sepharosa 4B activada con BrCN acoplada a GG ch anti AFP, posteriormente se aplicó un volumen de 30 ml de SCU, el drenado se recuperó y se pasó 3 veces más a través de la columna. Se guardó una alícuota de 1 ml para determinar mediante una prueba de inmunodifusión, si el volumen empleado de SCU fue suficiente para saturar el inmunoadsorbente.

Después de hacer reaccionar el SCU con el inmunoadsorbente, la columna se lavó exhaustivamente con PBS conteniendo timerosal al 0.01%, el lavado se continuó hasta que el drenado registró una D.O. menor de 0.002 a 280 nm.

Posteriormente se procedió a eluir la AFP retenida en la columna, empleando para esto, 60 ml de solución reguladora glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8. Se colectó una fracción de 60 ml a la cual se le ajustó inmediatamente el pH a 7.4 con una solución saturada de tris (hidroximetil) aminometano.

El contenido de proteínas del eluido se recuperó mediante precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, después de precipitar con sulfato de amonio la suspensión se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min y el precipitado se disolvió en 2 ml de solución salina amortiguadora de boratos pH 8.4, la muestra se dializó contra la misma solución durante 3 días realizando 2 cambios diarios.

Por último la muestra obtenida se esterilizó por filtración

y se almacenó a -20°C hasta su uso. Se guardó una alícuota de 100 μl para analizar la concentración de proteínas por el método de Lowry y el grado de pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

7.- RECONSTITUCION DEL INMUNOADSORBENTE

Inmediatamente después de eluir la AFP de la columna, el inmuoadsorbente se reconstituyó lavando la columna con PBS hasta registrar un pH de 7.4 en el líquido drenado.

La columna se reutilizó tantas veces como fue necesario, el volumen de SCU empleado fue incrementado cada vez, hasta alcanzar un volumen de suero que lograra saturar la columna.

8.- ELECTROFORES EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se analizó la pureza de los diferentes lotes de AFP obtenidos mediante el empleo del inmuoadsorbente preparado con Sepharosa activada con BrCN.

I.- Preparación de geles:

a).- Gel espaciador: En un matraz Kitazato se mezclaron 2.5 ml de solución reguladora tris 1.5 M, pH 8.8, 3.33 ml de una solución de acrilamida/bisacrilamida al 30% en proporción de 36:1 respectivamente y 4.15 ml de agua bidestilada. La mezcla se desgasificó haciendo vacío durante 15 min. Poco antes de vaciar la mezcla en el molde, se añadieron 50 μl de una solución de persulfato de amonio al 10% y finalmente 5 μl de N,N,N,N-Tetrametiletilendi-

amina (TEMED), la mezcla se agitó cuidadosamente para no incorporar aire e inmediatamente después se vació en la cámara hasta una altura de 8 cm, evitando la formación de burbujas. Antes de que la acrilamida gelificara, se colocó en la superficie 1 ml de regulador de corrimiento (tris 31 mM, glicina 0.25 M, pH 8.3) con la finalidad de evitar la formación de bordes irregulares.

La polimerización del gel se produjo después de 10 a 15 min de haber sido colocada la mezcla en la cámara.

b).- Gel concentrador: Para eliminar el regulador de corrimiento del gel de poli(acrilamida), se inclinó el molde, se drenó el regulador y el remanente se absorbió con papel filtro.

Para la preparación del gel concentrador, en un matraz Kitazato se mezclaron 2.5 ml de solución reguladora tris 0.5 M, pH 6.8, 1.3 ml de acrilamida/bisacrilamida al 30% y 6.2 ml de agua bidestilada. La mezcla se desgasificó haciendo vacío durante 15 min. Poco antes de vaciar la mezcla en el molde se añadieron 50 μ l de la solución de persulfato de amonio al 10% y 10 μ l de TEMED. En seguida la mezcla se colocó sobre la superficie del gel espaciador, cuidando de no formar burbujas. Los carriles se formaron antes de la gelificación con un peine de 10 dientes, el cual se sumergió hasta quedar su borde inferior a una distancia de 1 cm del gel espaciador.

Una vez que se formó el gel, se retiró el peine y el molde se colocó en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con 500 ml de regulador de corrimiento.

II.- Preparación de las muestras y condiciones de corrimiento.

En las hendiduras del gel concentrador se aplicó un volumen de 20 μ l de las muestras por analizar, utilizando una microjeringa Hamilton, las muestras contenían 50 μ g de proteína y fueron preparadas en solución reguladora de corrimiento conteniendo azul de bromofenol al 0.5% y glicerol al 20%.

Una vez aplicadas las muestras, se llevó a cabo el corrimiento electroforético a 200 volts durante 45 min o hasta que el frente del corrimiento llegara a 0.5 cm del extremo inferior del gel espaciador.

9.- TINCION DE LOS GELES

Los geles se tiñeron durante 3 h con una solución fijadora-colorante [azul brillante de Coomassie 0.25% (p/v), metanol absoluto 45.4% (v/v), ácido acético glacial 9% (v/v)], después del tiempo requerido para la fijación y tinción, los geles se sumergieron en una mezcla de metanol absoluto-ácido acético glacial en la misma proporción que la solución anterior. Se realizaron varios cambios de esta solución hasta eliminar el exceso de colorante.

10.- OBTENCION DE SUERO NORMAL LIBRE DE AFP (SHN AFP⁻)

Para la eliminación del fibrinógeno, a una unidad de plasma humano normal (300 ml), se le adicionaron 3 ml de una solución de cloruro de calcio 0.5 M y se incubó en un baño de agua a 37°C durante 30 min, el coágulo formado se despegó de las paredes del

recipiente y éste se refrigeró durante 15 min para permitir la contracción del coágulo y la liberación del suero.

Una vez separado el suero se recuperó y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, posteriormente se pasó a través del inmunoabsorbente de Sepharosa.

El SHN AFP⁻ se colectó y se esterilizó por filtración, almacenándolo en alícuotas de 5 y 10 ml a -20°C.

11.- INMUNODIFUSION RADIAL (IDR)

Se preparó un volumen de 25 ml de una solución de agarosa al 1% en solución salina 0.85% conteniendo timerosal al 0.01% y polietilén glicol al 2%. La agarosa se disolvió por ebullición y el volumen evaporado se reconstituyó con agua bidestilada. Una vez fundida la agarosa, se filtró en papel Whatman No. 1, cuando la temperatura de la solución bajó a 50°C y se adicionó 1.25 ml de suero de chivo monoespecífico anti AFP (S ch anti AFP).

La solución de agarosa se vació en una placa de plástico Hyland y se dejó gelificar a temperatura ambiente.

El patrón de cortado para los geles se realizó con la ayuda de moldes y sacabocados.

Las muestras aplicadas en los pozos fueron: SCU, SCU pasado a través del inmunoabsorbente de Sepharosa y AFP eluída del inmunoabsorbente. El volumen aplicado de cada muestra fue de 5 µl. Después de colocadas las muestras las placas se cerraron herméticamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el diámetro de

los halos de precipitación. Para conocer la concentración de AFP de las muestras, el diámetro de los halos de precipitación se interpoló en una curva estándar (61).

12.- SECADO Y TINCIÓN DE PLACAS

Para eliminar el exceso de proteínas que no formaron el halo de precipitación, las placas de agarosa se colocaron en solución salina 0.85% durante 3 días realizando dos cambios diarios. El cuarto día se lavaron con agua destilada para eliminar los residuos de sal.

Los geles se desprendieron de las placas de plástico y se transfirieron a una placa de vidrio de las mismas dimensiones que el gel, en donde se secaron manteniéndolas a 37°C durante 24 h, posteriormente se tiñeron durante 15 min con una solución fijadora-colorante [azul brillante de Coomassie 0.25% (p/v), metanol absoluto 45.4% (v/v), ácido acético glacial 9% (v/v)], después del tiempo requerido para la fijación y tinción, las placas se sumergieron en una mezcla de metanol absoluto-ácido acético glacial en la misma proporción que la solución anterior. Se realizaron varios cambios de esta solución hasta eliminar el exceso de colorante.

13.- OBTENCION DE SUERO DE CONEJO HIPERINMUNE ANTI AFP

Para la obtención de suero de conejo hiperinmune anti AFP se inmunizaron 10 conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 3 meses de edad, utilizando como inóculo 1 ml de AFP eluida del inmunoad-

sorbente de sepharosa con una concentración de 120 µg de AFP por ml. En la primera inoculación el antígeno se emulsificó con un volumen igual de adyuvante completo de Freund y en la segunda con adyuvante incompleto de Freund. En ambos casos la vía de inmunización fue intradérmica en sitios múltiples.

Las siguientes inmunizaciones se realizaron cada 15 días con la misma dosis de antígeno pero sin adyuvante. La vía de inmunización después de la segunda dosis fue intramuscular.

El sangrado de los animales se realizó cada 15 días después de haber inoculado la tercera dosis.

Para la obtención del suero, la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el coágulo y el suero se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min.

El sangrado de los animales, así como la separación del suero se realizó en condiciones de esterilidad.

Los sueros obtenidos se conservaron a -20°C hasta su uso, guardando una alícuota de 1 ml de cada suero para realizar el análisis de reactividad (61).

14.- ANALISIS DE REACTIVIDAD DE SUEROS DE CONEJO HIPERINMUNE ANTI AFP POR INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (IEB) O DE LEBEQ

Para realizar la IEB se preparó una solución de agarosa al 1% en regulador tris 37 mM, glicina 0.1 M, pH 8.8. La solución se mantuvo en ebullición hasta que se fundió completamente la agarosa reconstituyendo el volumen evaporado con agua destilada .

Aparte se preparó una solución de agarosa al 1% en agua

destilada y se disolvió por calor, en esta solución se sumergieron placas de vidrio de 8 x 8 cm limpias y desengrasadas, las placas se retiraron de la solución de agarosa y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las placas secas se colocaron en una superficie completamente horizontal y con la ayuda de una pipeta con punta ancha se colocaron 6.4 ml de agarosa caliente en cada placa y se dejaron gelificar a temperatura ambiente.

El patrón de cortado para los geles se realizó con la ayuda de moldes y sacabocados.

Para realizar la primera corrida electroforética se colocaron en los pozos del gel 5 μ l de los antígenos (SHN y SCU), conteniendo azul de bromofenol como indicador del frente de corrimiento, las placas con las muestras aplicadas se transfirieron a la cámara de electroforesis conteniendo 500 ml de regulador tris-glicina pH 8.8. Para establecer contacto entre el gel y el regulador de corrimiento se emplearon tiras de papel filtro Whatman No. 1 de 8 x 4 cm.

La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder y la electroforesis se corrió a 100 volts durante 1 h.

Para realizar la segunda corrida, se retiró la placa de agarosa de la cámara de electroforesis colocándose en forma centrada sobre la superficie del gel una hoja de papel filtro Whatman No. 1 de 6 x 6 cm. El papel se retiró después de 20 seg de haber estado en contacto con el gel y el regulador absorbido se reemplazó por 200 μ l del antisuero, el cual se distribuyó en

el gel por capilaridad con la ayuda de una película de PVC de las mismas dimensiones del papel filtro (la técnica se ilustra en la fig. 1).

La película de PVC se dejó en contacto con el gel y la segunda electroforesis se corrió perpendicular a la primera, aplicando 50 volts durante 18 h a 4°C.

Finalmente se retiró de la placa la película de PVC y se observó la aparición de bandas de precipitación (64).

15.- OBTENCION DE SUERO DE CONEJO MONOESPECIFICO ANTI AFP

Para la obtención de sueros monoespecíficos fue necesario adsorber los antisueros con SHN, para esto se elaboró una curva de precipitación antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) a nivel de tubo de ensayo, la cual nos permitió conocer la cantidad óptima de SHN que debía adicionarse a los antisueros con el fin de eliminar los anticuerpos dirigidos contra proteínas de SHN.

Para elaborar la curva de precipitación se dispuso de 11 tubos de 10 x 75 mm, por duplicado, a los cuales se les adicionó lo siguiente:

# de Tubo	µl de Antisuero	µl de SHN
1	500	0
2	450	50
3	400	100
4	350	150

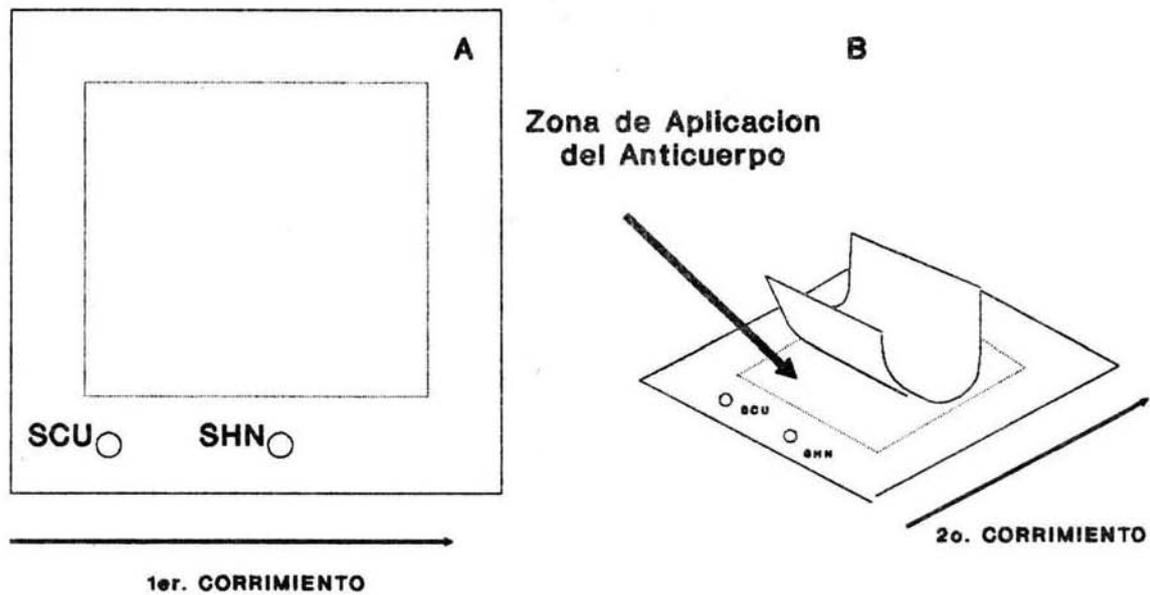


FIG 1.- INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (IEB)

5	300	200
6	250	250
7	200	300
8	150	350
9	100	400
10	50	450
11	0	500

Los tubos se incubaron a 37°C durante 30 min y después se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó 3 veces consecutivas mediante centrifugación con solución salina 0.85%. El precipitado de la última centrifugación se resuspendió en 100 µl de la solución salina y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry.

Para la adsorción de los sueros se eligió a partir de la curva de precipitación Ag-Ac la relación que mostró la mayor concentración de proteína; una vez que se mezclaron ambos reactivos, se incubaron a 37°C durante 30 min, y después a 4°C durante toda la noche. El precipitado se eliminó por centrifugación y la monoespecificidad de los antisueros adsorbidos se probó por IEB.

Finalmente se purificó la fracción gamma globulina de los antisueros adsorbidos mediante su precipitación con sulfato de amonio, almacenandola a -20°C hasta el momento de usarse.

16.- INSOLUBILIZACION DE PROTEINAS DE SHN CON GLUTARALDEHIDO Y SU USO COMO INMUNOADSORBENTE

La adsorción de la gamma globulina de conejo anti AFP (GG co anti AFP) con proteínas de SHN insolubilizadas con glutaraldehído fue empleada solo en aquellos casos en los cuales la GG co anti AFP no quedó monoespecífica al adsorberla con SHN.

Para la insolubilización de proteínas con glutaraldehído se dializaron 50 ml de SHN contra PBS 0.01 M pH 7.0 durante toda la noche a 4°C. El suero dializado se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min para remover cualquier precipitado formado en la diálisis, después se adicionaron 10 ml de PBS 0.1 M pH 7.0 y finalmente se agregó gota a gota y con agitación constante 30 ml de una solución de glutaraldehído al 2.5% (v/v). Terminada la adición del glutaraldehído, la mezcla se mantuvo en reposo hasta que se formó un gel el cual se mantuvo a 4°C durante toda la noche para permitir que la gelificación fuera completa.

Al día siguiente el gel se fraccionó pasándolo varias veces a través de una jeringa hipodérmica sin aguja y después con ella. El gel ya fraccionado se lavó exhaustivamente en un embudo Buchner con PBS 0.01 M pH 7.0 hasta registrar en el líquido de lavado una absorbancia menor a 0.002 a 280 nm. Posteriormente el gel se resuspendió en una solución reguladora de glicina-HCl 0.2 M pH 2.8 durante 15 min y se lavó nuevamente con PBS hasta registrar una absorbancia menor a 0.002 a 280 nm. El gel se resuspendió finalmente en 50 ml de PBS conteniendo timerosal al

0.01% como conservador y se adicionó a la GG co anti AFP por adsorber, empleando 5 ml del inmunoadsorbente por cada 10 ml de la gamma globulina. La mezcla se dejó incubar a 37°C durante 1 h y después a 4°C durante toda la noche. El inmunoadsorbente se descartó por centrifugación y la monoespecificidad de la GG co anti AFP se comprobó nuevamente por IEB (65).

17.- PREPARACION DE CONJUGADOS ANTICUERPO-ENZIMA (Ac-Ez) POR EL METODO DE OXIDACION CON PERIODATO DE SODIO

Por este método se prepararon 3 diferentes conjugados:

- 1.- Gamma globulina de chivo-peroxidasa anti AFP (GG ch-PO anti AFP).
- 2.- Gamma globulina de conejo-peroxidasa anti AFP (GG co-PO anti AFP).
- 3.- Gamma globulina de chivo-peroxidasa anti gamma globulina de conejo (GG ch-PO anti GG co).

La metodología a seguir fue la siguiente:

Se disolvieron 5 mg de peroxidasa de rábano fuerte (HRP) RZ 3.0, en 1 ml de una solución recién preparada de bicarbonato de sodio 0.3 M pH 8.1; a la solución anterior se le adicionaron 100 µl de fluorodinitrobenceno (FDNB) al 1% en etanol absoluto, la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, después se adicionó 1 ml de periodato de sodio 0.06 M y se mezcló nuevamente durante 30 min. Enseguida se adicionó 1 ml de etilenglicol 0.16 M y se continuó agitando durante 1 h. Transcurrido el tiempo de agitación la solución se dializó contra una

solución de carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.5 a 4°C durante 48 h realizando cambios continuos.

Al término de la diálisis, se mezclaron 5 mg de gamma globulina (previamente dializada contra la solución de carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.5) con 3 ml de la solución de HRP-aldehído. La mezcla se mantuvo en agitación durante 3 h a temperatura ambiente y después se le adicionó 5 mg de borohidruro de sodio, manteniéndose a 4°C durante toda la noche.

La mezcla se dializó contra PBS 0.01 M, pH 7.4 a 4°C durante 24 h. Después de la diálisis el material se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min para eliminar el precipitado formado en el proceso de diálisis (66).

18.- SEPARACION DE LOS CONJUGADOS Ac-Ez POR CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200

Para eliminar de los conjugados Ac-Ez, la peroxidasa libre y los anticuerpos no marcados, se montó una columna de vidrio de 2.5 x 80 cm con Sephadex G-200 previamente hidratado con PBS 0.1 M, pH 7.4; la columna se equilibró haciendo pasar a través de ella 3 volúmenes del mismo regulador.

Una vez equilibrada la columna, se aplicó uno de los 3 conjugados Ac-Ez y se efectuó la elución con PBS conteniendo timerosal al 0.01% y colectando 60 fracciones de 2 ml con un colector de fracciones automático.

Se tomaron lecturas de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro, mezclándose así las fracciones del primer pico de

elución, correspondiente al conjugado Ac-Ez.

19.- CONCENTRACION DE LOS CONJUGADOS AC-EZ

En un vaso de precipitados conteniendo el conjugado, se adicionó lentamente y con agitación constante una determinada cantidad de sulfato de amonio en cristales para obtener una concentración final del 70% de saturación.

Después de terminada la adición de sulfato de amonio, la agitación se continuó por 15 min más y la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 5 ml de una solución de sulfato de amonio al 50% de saturación. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su uso (67).

20.- ELISA POR EL METODO DIRECTO EMPLEANDO LOS CONJUGADOS GG ch anti AFP Y GG co anti AFP

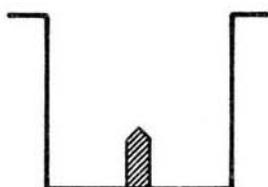
Para la estandarización del ELISA inicialmente se buscaron las condiciones apropiadas para la adsorción de la AFP a la fase sólida (placas de poliestireno para microtitulación Dynatech). Para esto se realizaron diluciones seriadas al doble de SCU en tres diferentes reguladores con distintos valores de pH (regulador de citratos 0.01 M, pH 5; solución salina boratos 0.01 M, pH 8.4; solución salina amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 7.4) y se colocaron alícuotas de 100 µl de cada dilución en los pozos de la placa, dejando incubar durante toda la noche a 4°C; posteriormente se retiró el suero y se lavó la placa tres veces con solución de lavado (PBS conteniendo albúmina al 5% p/v, tween 20

al 0.05% v/v y timerosal al 0.01%). Inmediatamente después se adicionó en cada pozo 100 µl de solución bloqueadora (PBS conteniendo albúmina al 5% p/v) y se dejó incubar durante 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, la placa se lavó tres veces con solución de lavado y enseguida se adicionó en cada pozo 100 µl del conjugado AC-EZ diluido 1:500. La placa se incubó con el conjugado durante 1 h a 37°C y finalmente se lavó tres veces con solución de lavado y se incubó durante 15 min en la oscuridad con el sustrato de la enzima (ácido cítrico 0.025 M, fosfato de sodio monobásico 0.05 M, pH 5.4 conteniendo 4 mg de o-fenilendiamina, más 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30% por cada 10 ml de solución). Transcurridos los 15 min de incubación, la reacción se paró adicionando en cada pozo 20 µl de ácido sulfúrico 8 N. Se leyó la absorbancia a 490 nm. (La metodología se ilustra en la figura 2).

21.- ELISA POR EL METODO DIRECTO EMPLEANDO EL CONJUGADO DE GG ch anti GG co

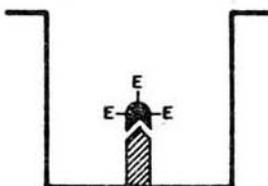
Para la estandarización del ELISA por este método, inicialmente se buscaron las condiciones apropiadas para la adsorción de AFP a la fase sólida. Para esto, se emplearon los mismos reguladores que para el montaje del método descrito anteriormente.

Utilizando los tres diferentes reguladores, se realizaron diluciones seriadas al doble de SCU y se colocaron alícuotas de 100 µl en los pozos de la placa, dejándose incubar toda la noche a 4°C, posteriormente se retiró el suero y se lavó tres veces con



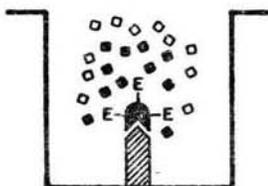
1: Adición de la AFP a la fase sólida

LAVADO



2: Adición del conjugado (GG de ch-PO anti AFP o GG de co-PO anti AFP.)

LAVADO



3: Adición del sustrato

Figura 2.- ELISA por el método directo para la cuantificación de AFP empleando dos diferentes conjugados enzimáticos (GG de ch-PO anti AFP, GG de co-PO anti AFP.)

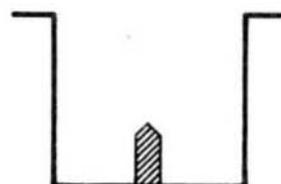
solución de lavado. En seguida se adicionó a cada pozo 100 μ l de GG co anti AFP diluida 1:500 e inmediatamente después se dejó incubar durante 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de la incubación, la placa se lavó tres veces con solución de lavado y se adicionó a cada pozo, 100 μ l de la solución bloqueadora. La placa se mantuvo a 37°C durante 30 min y después se lavó tres veces con regulador de lavado, adicionando posteriormente a cada pozo 100 μ l de GG ch-PO anti GG co, diluido 1:500, y se dejó incubar 1h a 37°C. La placa se lavó tres veces y por último se incubó con el sustrato de la enzima durante 15 min en la oscuridad. La reacción se paró adicionando a cada pozo 20 μ l de ácido sulfúrico 8 N y se leyó la D. O. a 490 nm. (La metodología se ilustra en la figura 3).

22.- EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE GG ch-PO anti GG co

Para observar el efecto de la concentración del conjugado, se recubrió una placa con AFP, para esto se realizaron diluciones seriadas al doble de SCU en regulador de citratos 0.1 M, pH 5.0 y se siguió la metodología descrita anteriormente, pero variando las diluciones de la GG ch-PO anti GG co (1:500, 1:1000, y 1:2000).

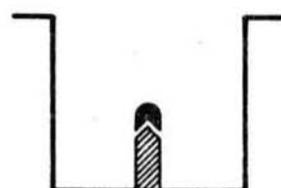
23.- EFFECTO DEL BLOQUEADOR (SHN AFP⁻ AL 5%)

Inicialmente se recubrió una placa con diluciones seriadas al doble de SCU en regulador de citratos, para realizar el inmunoensayo se emplearon la GG co anti AFP y la GG ch anti AFP,



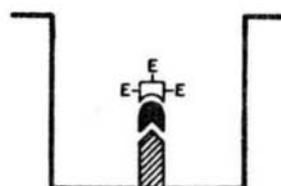
1- Adsorción de la AFP a la fase sólida

LAVADO



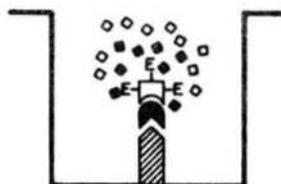
2- Adición de la GG de co anti AFP

LAVADO



3- Adición de GG de ch - PO anti GG de co .

LAVADO



4- Adición del sustrato

Figura 3.- ELISA por el método directo para cuantificación de AFP empleando el conjugado de GG de ch-PO anti GG de co

diluidas 1:500.

Para observar el efecto del bloqueador, éste se adicionó al sistema como sigue:

- 1) Antes de adicionar el primer anticuerpo.
- 2) Después de adicionar el primer anticuerpo.
- 3) Antes y después de adicionar el primer anticuerpo.

24.- CURVA ESTANDAR

La curva estándar se realizó empleando AFP pura (10,000 UI/ml) a partir de la cual se realizaron diluciones apropiadas en regulador de citratos 0.1 M, pH 5.0 conteniendo SHN AFP⁻ al 5% v/v para obtener las siguientes concentraciones de AFP: 1.5 ng (2.5 UI), 3.12 ng (5 UI), 6.25 ng (10 UI), 12.5 ng (20 UI), 25 ng (40 UI), 50 ng (80 UI), 100 ng (120 UI). Como control se empleó el mismo regulador en el que se diluyó la AFP.

25.- SUERO ESTANDAR

A un volumen de 50 ml de SCU se le adicionó 4 ml de AFP eluida del inmunoabsorbente, con el fin de aumentar la concentración de AFP en el suero.

Se realizaron diluciones seriadas al doble del suero estándar (1:25 hasta 1:12,800) en regulador de citratos 0.1 M, pH 5.0 conteniendo SHN AFP⁻ al 5% v/v.

Con las diluciones obtenidas se recubrió una placa y el inmunoensayo se realizó empleando ambos anticuerpos diluidos 1:500 y la solución bloqueadora después de haber adicionado el

primer anticuerpo.

La cuantificación de AFP del suero estándar se realizó interpolando los valores de la D. O. en la curva estándar descrita anteriormente.

RESULTADOS

PURIFICACION DE AFP

A partir del suero de chivo monoespecífico previamente preparado en el laboratorio, se precipitó la fracción gamma globulina con sulfato de amonio y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry, ajustando la muestra a una concentración de 10 mg/ml.

Se acopló un volumen de 30 ml de la solución de gamma globulina de chivo anti AFP, a 30 ml de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno. El inmunoadsorbente así preparado se montó en una jeringa hipodérmica de 50 ml y se hizo reaccionar con SCU, eluyendo posteriormente la AFP retenida en la columna con solución reguladora glicina-HCl pH 8.2.

El inmunoadsorbente se reutilizó más de 30 veces sin perder su reactividad.

Para conocer el grado de pureza de la AFP obtenida a través del inmunoadsorbente, se procedió a analizar la muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) (Fig. 4). En el electroferograma se observó la presencia de una banda muy marcada con corrimiento de alfa globulina, correspondiendo a la AFP, y otras con diferente corrimiento, lo cual indica que no se obtuvieron muestras puras, pero sí ricas en AFP.

La concentración de AFP de cada una de las muestras eluidas del inmunoadsorbente se determinó por inmunodifusión radial (Fig.

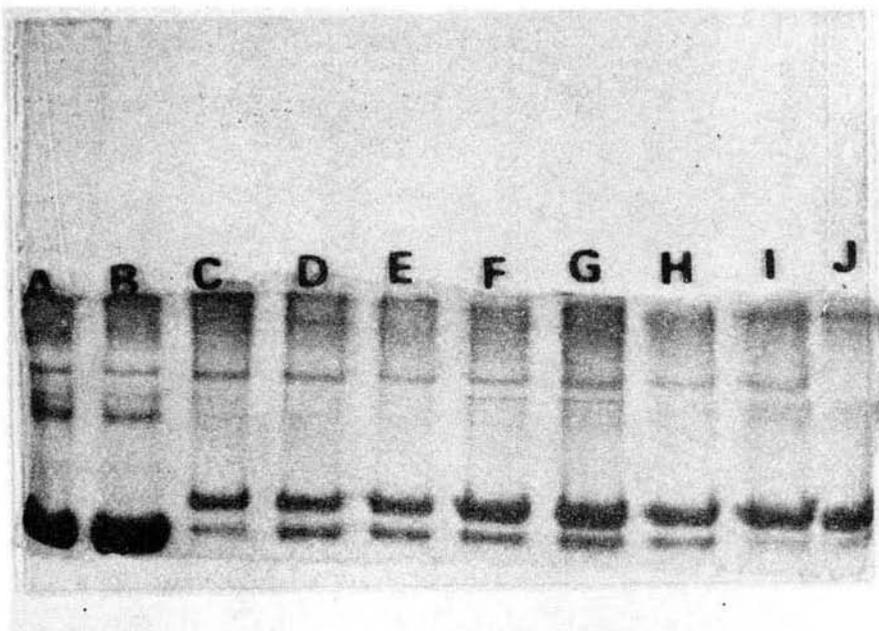


Figura 4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la AFP eluida del inmunoabsorbente de Sepharosa.

A) SHN

B) SCU

C)-J) Diferentes eluidos del inmunoabsorbente de Sepharosa.

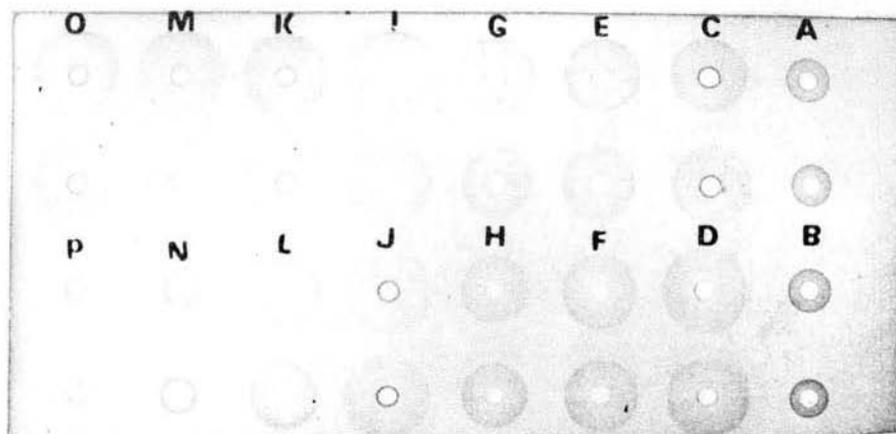


Figura 5.- IRD para determinar la concentración de AFP de los eluidos del inmunoadsorbente de Sepharosa.

A) y B) SCU

P) SHN

C)-O) Diferentes eluidos del inmunoadsorbente de Sepharosa.

5), obteniéndose una concentración promedio de 300 $\mu\text{g/ml}$ de muestra.

Por otra parte también se realizó la determinación de proteínas por el método de Lowry, obteniéndose una concentración promedio de 2 mg/ml de muestra.

La AFP recuperada del inmunoabsorbente fue empleada como inóculo para la inmunización de conejos, así como para enriquecer una muestra de SCU, empleado como estándar interno de AFP para ensayos tipo ELISA.

OBTENCION DE SUERO DE CONEJO MONOESPECIFICO ANTI AFP

Una vez que se purificó la AFP se procedió a la inmunización de conejos. El sangrado de animales se realizó después de haber aplicado la tercera dosis del antígeno, probando la reactividad de los antisueros por IEB. En la figura 6 se muestra una IEB de suero de conejo hiperinmune anti AFP, en la cual se emplearon como antígenos SCU y SHN. En ella se observa la presencia de una banda de precipitación con corrimiento de alfa globulina correspondiente a la AFP cuando se utilizó como antígeno SCU y no se presenta cuando se utiliza como antígeno SHN. También se observó la presencia de otras bandas de precipitación correspondientes a proteínas de SHN.

Con el fin de eliminar de los antisueros los anticuerpos dirigidos contra proteínas del SHN, éstos se adsorbieron utilizando SHN, probando la mono especificidad de los sueros adsorbidos por IEB (Fig. 7)

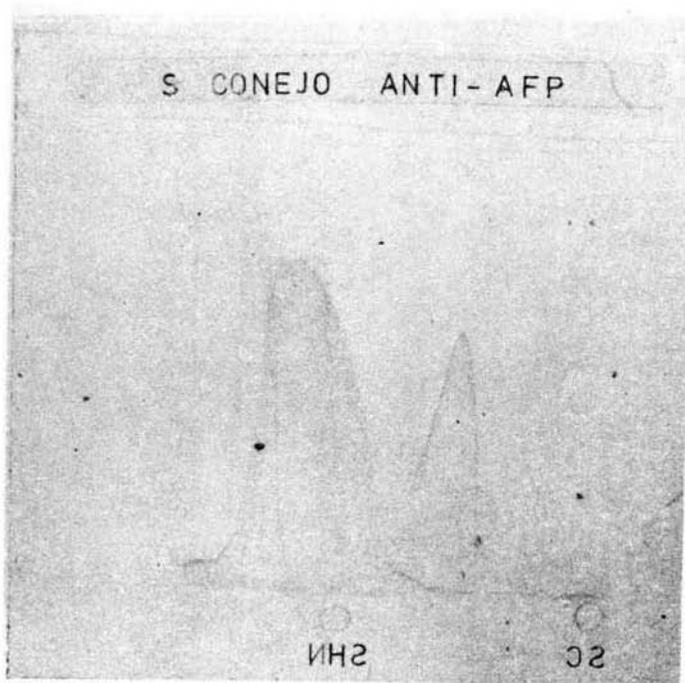


Figura 6.- IEB de suero de conejo hiperinmune anti AFP.



Figura 7.- IEB de suero de conejo monoespecifico anti AFP.

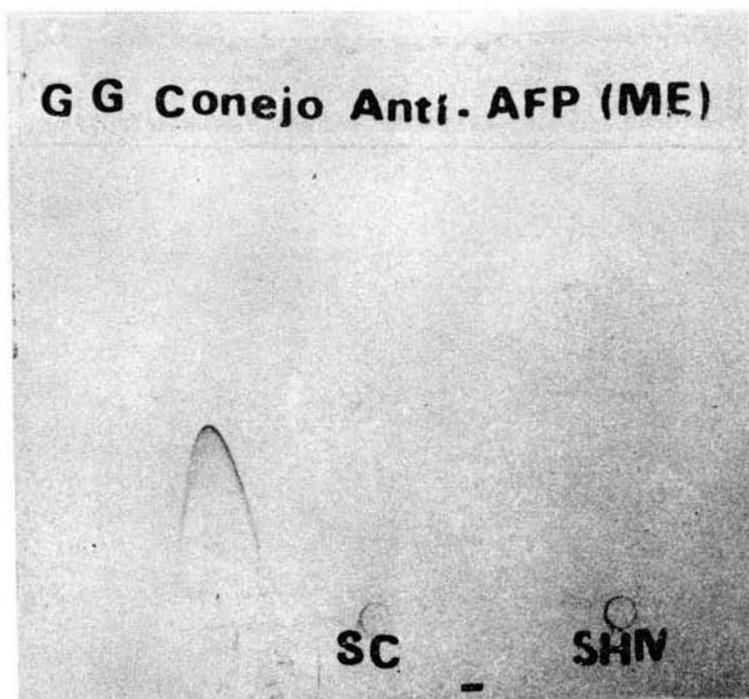


Figura 8.- IEB de gamma globulina de conejo monoespecifica anti AFP.

Después de haber adsorbido varios lotes de antisuero se hizo una mezcla de éstos y se purificó la fracción γ -globulina mediante su precipitación con sulfato de amonio.

Para probar la monoespecificidad de la GG co anti AFP se realizó otra IEB, en la cual se observó la aparición de otras bandas de precipitación, por lo que se decidió adsorber la gamma-globulina con proteínas de SHN, insolubilizadas con glutaraldehído. Se decidió emplear este inmunoadsorbente debido a que tiene la ventaja de no diluir la muestra.

Finalmente se probó la monoespecificidad de la muestra realizando otra IEB (Fig. 8).

PURIFICACION DE LOS CONJUGADOS ANTICUERPO-ENZIMA

Después de la preparación de los conjugados enzimáticos por el método de oxidación con periodato de sodio, éstos se purificaron pasándolos a través de una columna de Sephadex G-200. De las fracciones colectadas se tomaron lecturas de la absorbencia a 280 nm (Figs. 9, 10 y 11)

Del conjugado de GG co-PO anti AFP se mezclaron de la fracción 20 a la 34; del conjugado GG ch-PO anti AFP se mezclaron de la fracción 25 a la 31 y del de GG ch-PO anti GG co se mezclaron de la fracción 24 a la 33.

La mezcla de cada uno de los conjugados enzimáticos se concentró y se resuspendió finalmente en 5 ml de sulfato de amonio al 50% de saturación, almacenándolas a 4°C hasta su uso.

CROMATOGRAFIA DE CONJUGADO ENZIMATICO (GG-PO vs AFP)

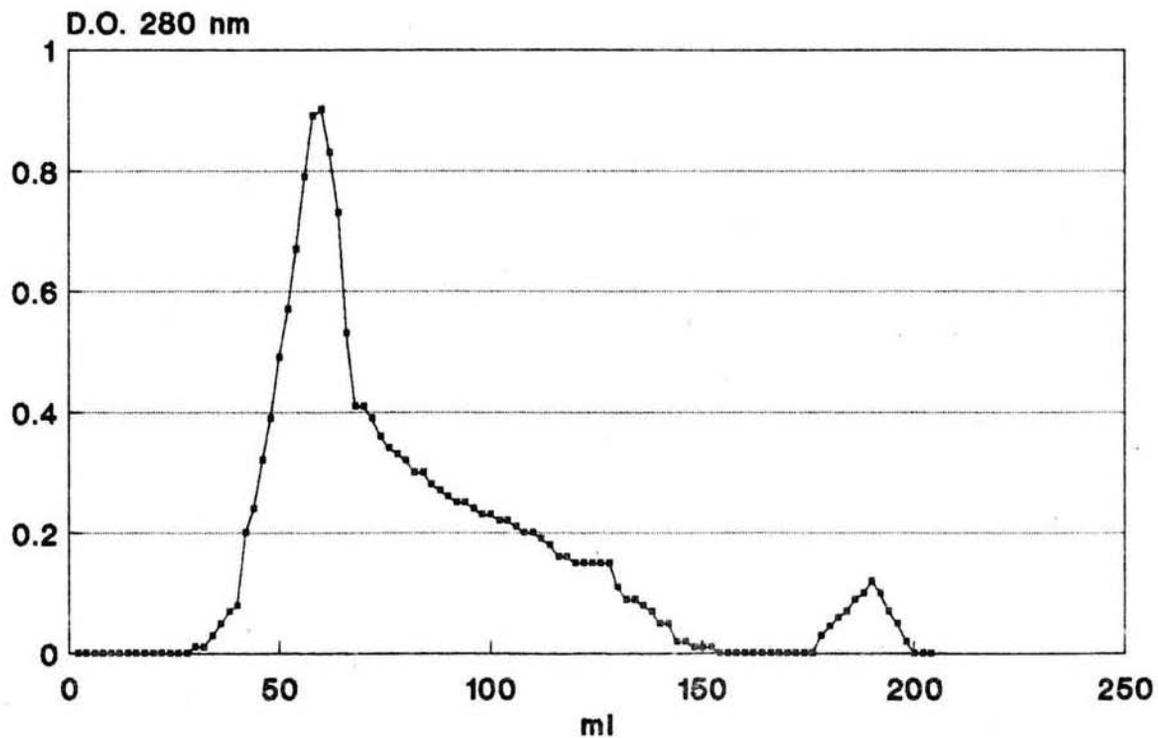


FIG. 9

GG vs AFP obtenida en conejo.

CROMATOGRAFIA DE CONJUGADO ENZIMATICO (GG-PO vs AFP)

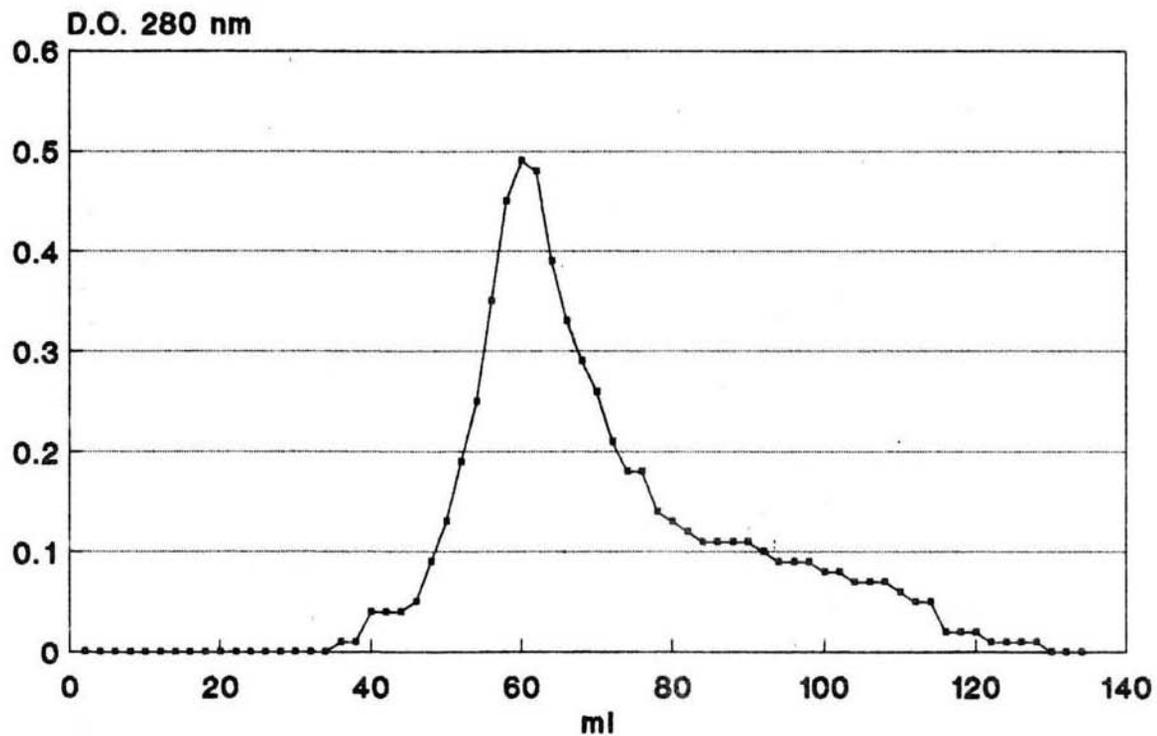


FIG. 10

GG vs AFP obtenida en chivo

CROMATOGRAFIA DE CONJUGADO ENZIMATICO (GG-PO vs AFP)

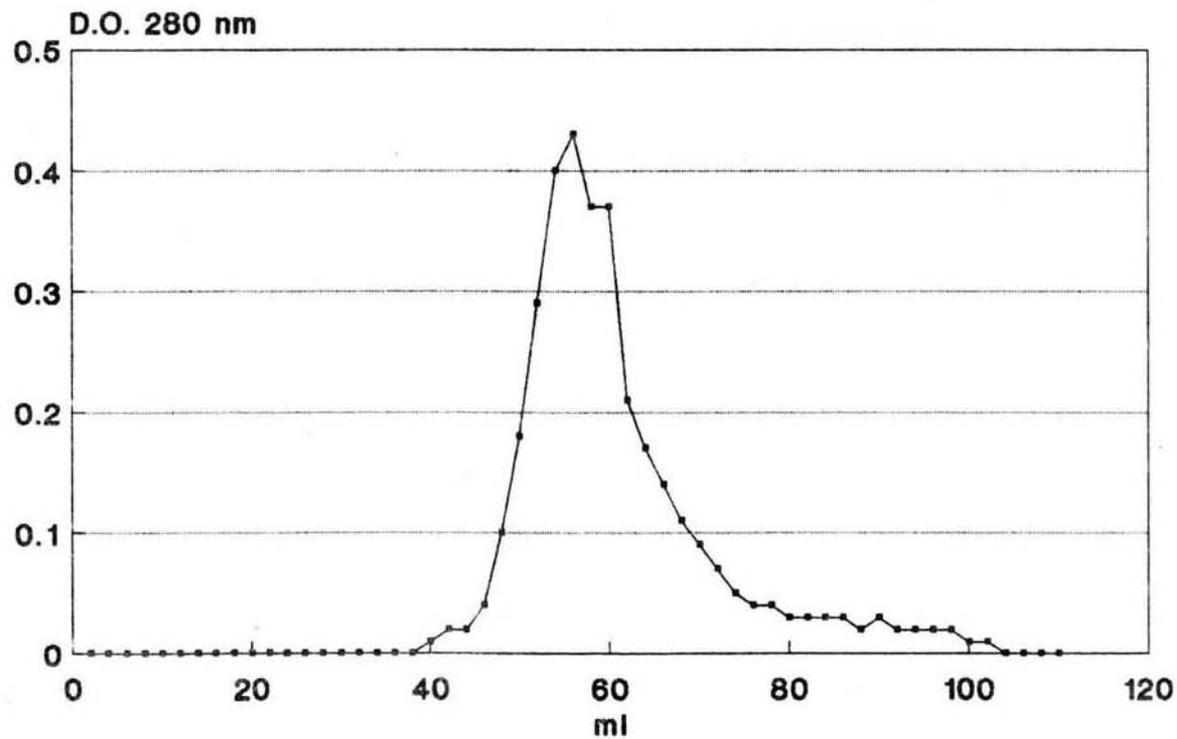


FIG. 11

GG de chivo anti GG de conejo

ELISA POR EL METODO DIRECTO

Para la estandarización del ELISA por este método, en donde se emplearon los conjugados de GG co-PO anti AFP y GG ch-PO anti AFP, se trataron de establecer las condiciones óptimas de adsorción de la AFP a la fase sólida. Para esto se incubó una placa durante toda la noche con diluciones seriadas de SCU (1:100-1:51200) en diferentes reguladores a distintos valores de pH; encontrándose que en cualquiera de los reguladores empleados para ambos conjugados, las lecturas de D.O. a 492 nm resultan de 0, tomando como referencia las lecturas de los pozos en los que se colocó el blanco de reactivos (0 ng de AFP). Sin embargo, cuando se empleó el conjugado de GG ch-PO anti GG co, los mejores resultados se obtienen con el regulador de citratos 0.1 M pH 5.4 en el forramiento de la placa con SCU (Fig. 12).

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE GG ch-PO anti GG co

Una vez determinadas las condiciones óptimas de adsorción de AFP a la fase sólida, se trató de establecer la concentración óptima de conjugado que debería emplearse en el inmunoensayo. Las diluciones de conjugado que se probaron fueron: 1:500, 1:1000 y 1:2000.

En la figura 13 se puede observar que bajo las condiciones empleadas, la concentración más apropiada del conjugado enzimático fué la de 1:500, ya que es en esta dilución en donde se obtienen los valores más altos de D.O. a 492 nm.

MONTAJE DE LA TECNICA ELISA (EFECTO DEL pH EN EL RECUBRIMIENTO DE LAS PLACAS CON SCU.)

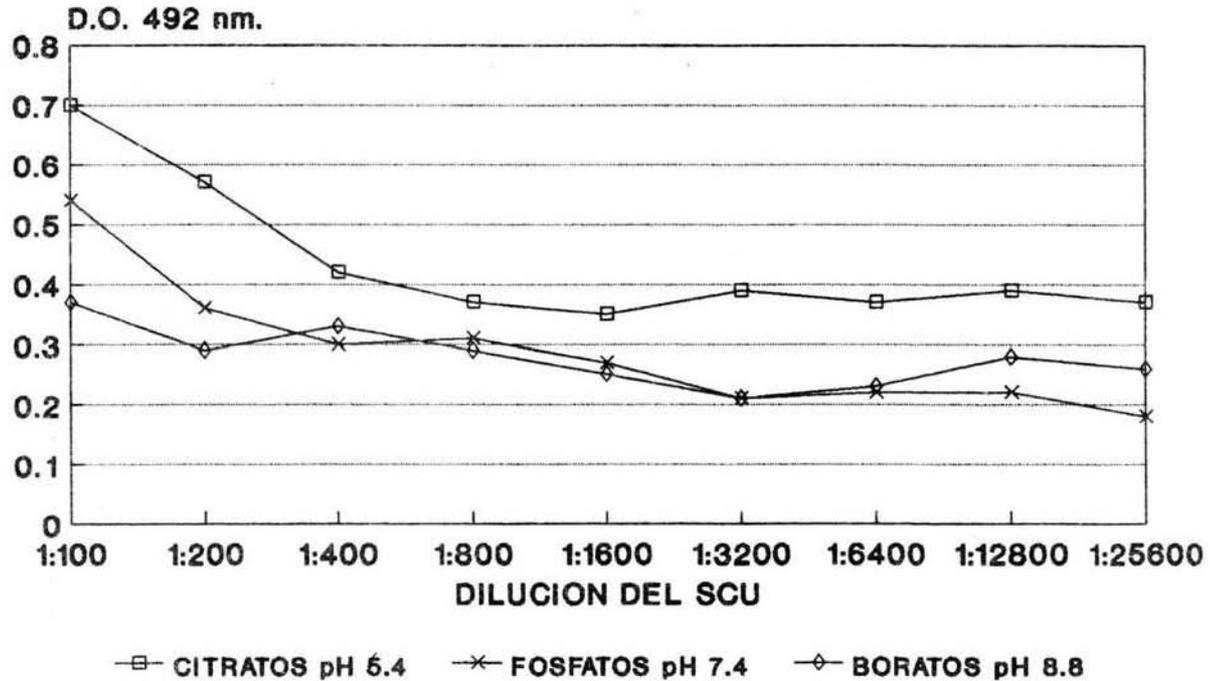


FIG. 12

MONTAJE DE LA TECNICA ELISA (EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AC-PO)

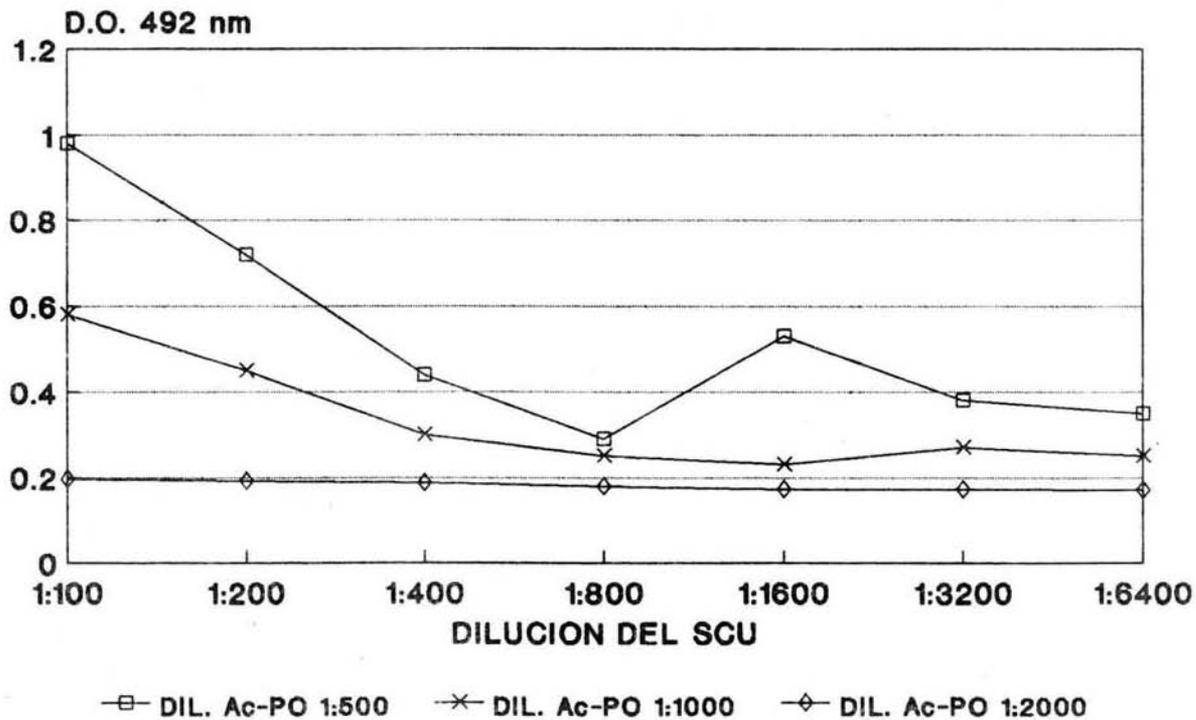
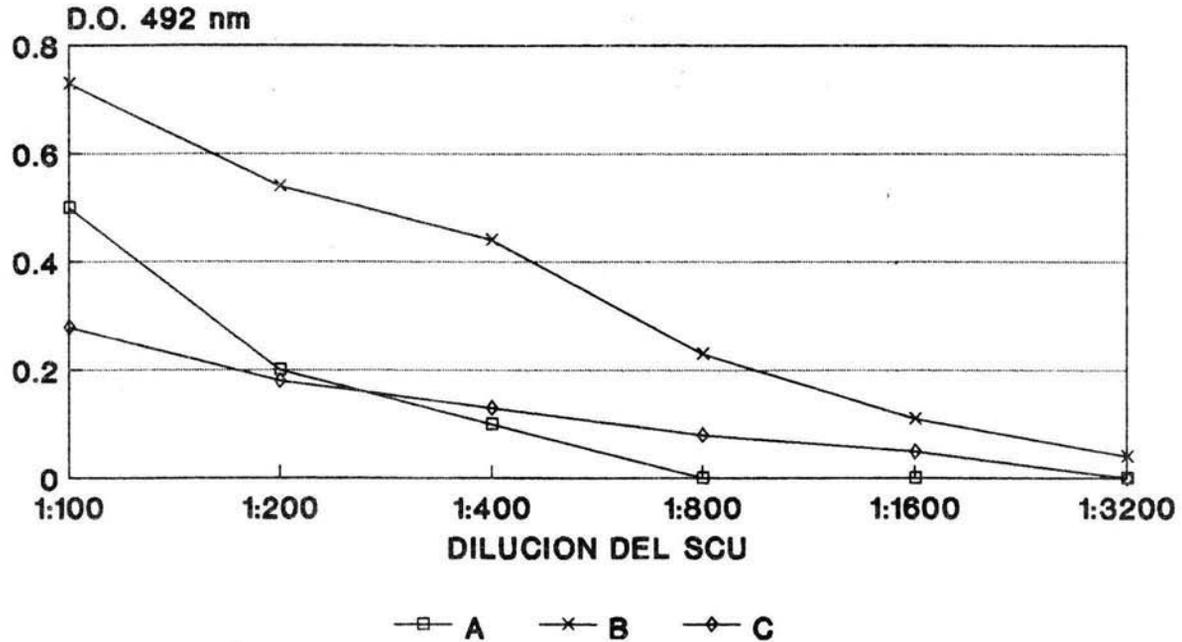


FIG 13

MONTAJE DE LA TECNICA ELISA (EFECTO DEL BLOQUEADOR SHN-AFP 5%)

FIG. 14



A: AFP/BLOQ/Ac vs AFP/Ac-PO
B: AFP/Ac VS AFP/BLOQ/Ac-PO
C: AFP/BLOQ/Ac vs AFP/BLOQ/Ac-PO

EFFECTO DEL BLOQUEADOR (SHN AFP⁻ AL 5%)

Para observar el efecto del bloqueador, éste se adicionó en tres diferentes pasos del inmunoensayo: 1) antes de adicionar el primer anticuerpo, 2) después de adicionar el primer anticuerpo y 3) antes y después de adicionar el primer anticuerpo.

En la figura 14 se observa que los mejores resultados se obtienen cuando el bloqueador es adicionado al sistema después del primer anticuerpo.

CURVA ESTANDAR Y SUERO ESTANDAR

Una vez estandarizada la técnica de ELISA por el método directo empleando el conjugado de GG ch-PO anti GG co, se elaboró una curva estándar utilizando AFP comercial, a partir de la cual se practicaron cinco diluciones para abarcar un rango de 1.5 a 100 ng/ml. La curva se construyó graficando D.O. contra concentración de AFP (Fig. 15). La curva así obtenida se ajustó a una recta empleando el método de regresión lineal por mínimos cuadrados (Fig. 16).

Para la preparación del suero estándar fue necesario enriquecer un volumen de 50 ml de SCU con AFP eluida del inmuno-adsorbente. Una vez preparado el suero se realizaron diluciones seriadas al doble en regulador de citratos 0.1 M pH 5.4 y el inmunoensayo se realizó bajo las mismas condiciones que para la curva estándar (Fig. 17). Para determinar la concentración de AFP del suero estándar se interpolaron los valores de D.O. de las diluciones del suero estándar que quedaron dentro del rango de

sensibilidad de la curva estándar, resultando por este método una concentración de 430 mg de AFP por 1 ml de suero estándar.

CURVA ESTANDAR PARA AFP

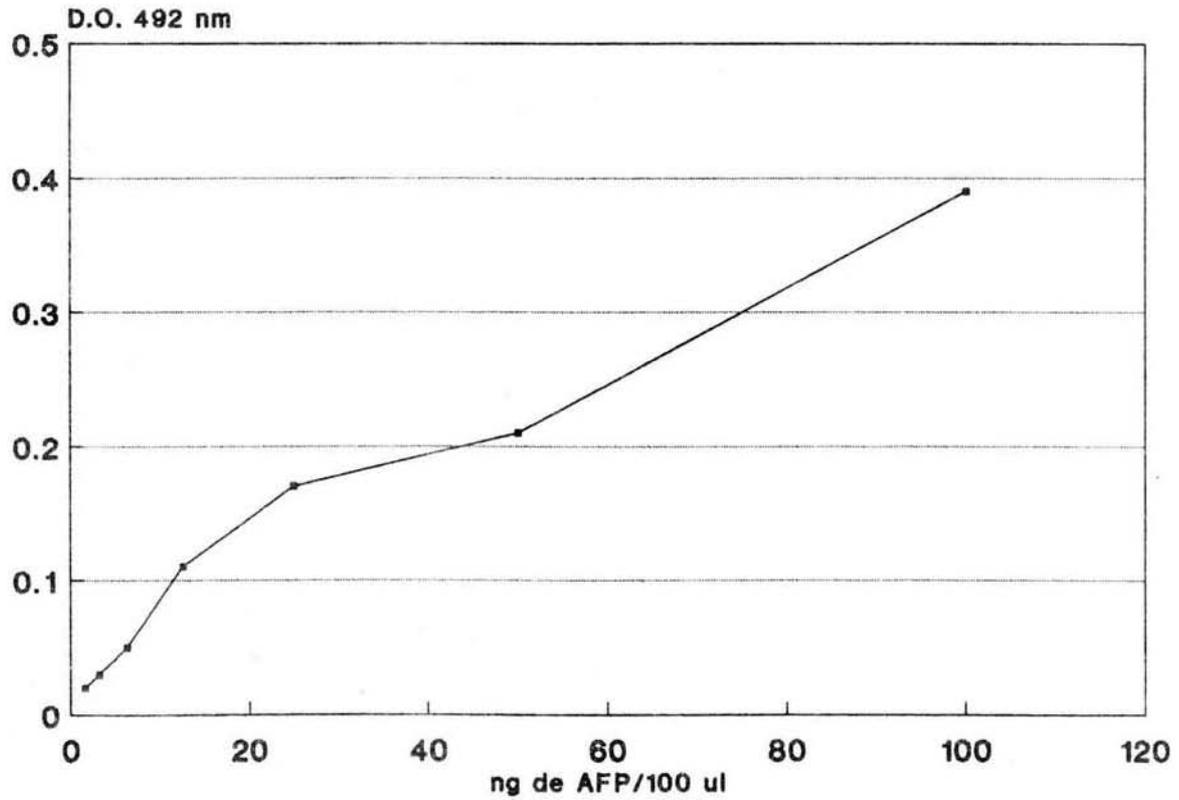


FIG 15

CURVA ESTANDAR PARA AFP
(CURVA AJUSTADA POR MINIMOS CUADRADOS)

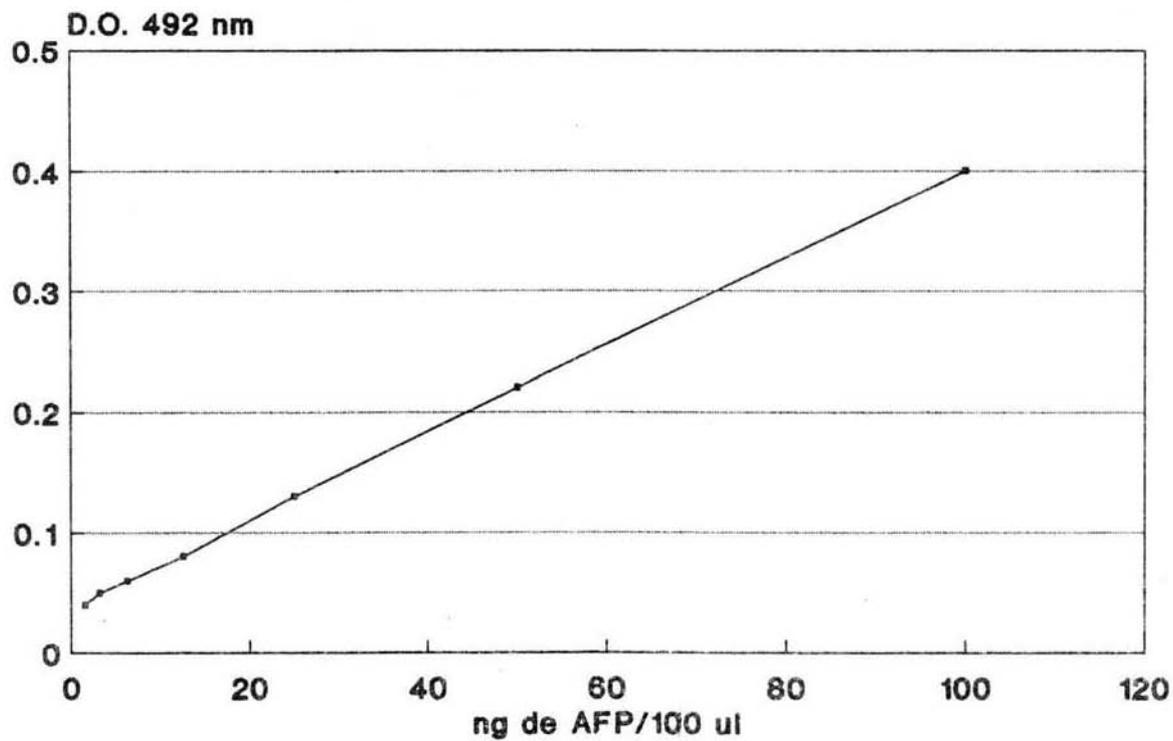


FIG. 16

$r=0.98$ $m=0.0036$ $b=0.037$

DISCUSION

Dentro de la gran variedad de métodos desarrollados a la fecha para la purificación de proteínas, nosotros decidimos utilizar un método de inmunoadsorción selectiva para la purificación de la AFP. Se seleccionó este método debido a que permite aislar grandes cantidades de proteína, además de que tiene la ventaja de que los inmunoadsorbentes preparados pueden reutilizarse varias veces. En el caso concreto del presente trabajo se empleó un inmunoadsorbente de Sepharosa 4B-anti AFP, el cual fue utilizado más de 30 veces consecutivas y solamente hasta el final sufrió una pequeña pérdida de su actividad.

Las preparaciones de AFP obtenidas del inmunoadsorbente presentaron pequeñas cantidades de proteínas contaminantes. Según se pudo observar en la EGPA estas proteínas fueron principalmente gamma globulinas, las cuales se liberaron del adsorbente, así como otras proteínas de suero normal que se retuvieron de manera inespecífica en el adsorbente y después se liberaron al eluir la AFP.

Las preparaciones de AFP fueron empleadas sin remover de ellas las proteínas contaminantes, debido a que para nuestros fines no era necesario obtener preparaciones puras de AFP, sino más bien con concentraciones relativamente elevadas de AFP.

En lo que respecta a la obtención de suero de conejo monoespecífico anti AFP, inicialmente los sueros hiperinmunes fueron adsorbidos con SHN, las preparaciones obtenidas se

analizaron mediante IEB y se observó una sola banda de precipitación utilizando como antígeno SCU. Sin embargo, al purificar la fracción gamma globulina se detectaron otras bandas de precipitación en la IEB; esto se atribuye a que la técnica de electroforesis empleada para analizar las muestras no tiene un alto grado de sensibilidad, por lo que no pudieron ser evidentes las pequeñas cantidades de anticuerpos dirigidos contra proteínas de SHN que contenía la muestra, y estas solo se pudieron detectar cuando la muestra se concentró mediante el procedimiento de purificación de la fracción gamma globulina del antisuero.

Finalmente los anticuerpos contaminantes fueron eliminados mediante la inmunoadsorción con proteínas de SHN insolubilizadas con glutaraldehído y los resultados de la última IEB realizada, comprobaron la monoespecificidad del antisuero anti-AFP, al aparecer una sola banda de precipitación cuando se empleó como antígeno SCU.

Por otra parte la purificación de conjugados Ac-Ez se realizó mediante fraccionamiento cromatográfico utilizando Sephadex G-200. El perfil de elución de la GG co-PO anti AFP mostró dos picos; el primero de ellos correspondió a los complejos Ac-Ez (este pico presentó una cauda de la fracción 35 a la 151, la cual corresponde posiblemente a los anticuerpos no acoplados) y un segundo pico correspondiente a la enzima libre. Los perfiles de elución tanto de la GG ch-PO anti AFP como de la GG ch-PO anti GG co, mostraron un solo pico que corresponde a complejos Ac-Ez, y una cauda de la fracción 26 a la 65 para el

conjugado de GG ch-PO anti AFP y de la 34 a la 52 para el conjugado de GG ch-PO anti GG co, las cuales corresponden posiblemente a anticuerpos no acoplados y/o enzima libre.

Las diferencias observadas en los perfiles de elución de las tres diferentes muestras se debe a la técnica seleccionada para la preparación de los conjugados Ac-Ez, ya que algunos autores han reportado grandes variaciones en cuanto a la eficiencia, empleando el mismo método de acoplamiento (66).

Los ensayos tipo ELISA comunmente empleados para la cuantificación de AFP son el método del sandwich y el método del doble anticuerpo. Preliminarmente a este trabajo intentamos desarrollar el método de sandwich para la cuantificación de AFP, sin embargo, en los diferentes ensayos realizados no se observaron diferencias entre las muestras problema y los blancos de reactivo (0 ng de AFP), atribuyendo esto a que no fue posible unir el primer anticuerpo a los diferentes materiales utilizados como fase sólida, entre los cuales se probaron poliestireno en forma de perlas, discos de papel activados con BrCN, placas para ELISA Dynatec y placas de ELISA forradas con proteína A.

Por lo anterior se decidió utilizar un método directo que es comunmente empleado para la cuantificación de anticuerpo, adaptandolo para los fines de este trabajo para cuantificar antígeno. De esta manera, la fase sólida fue recubierta con el antígeno a ser cuantificado.

Al tratar de implementar el método directo empleando los conjugados de GG co-PO anti AFP y GG ch-PO anti AFP no se

obtuvieron buenos resultados, pues las lecturas de D.O a 492 nm dieron cero en todas las muestras problema tomando como referencia los pozos en los que se colocó el blanco de reactivos (0 ng de AFP), sin embargo, al ser empleado el conjugado de GG ch-PO anti GG co se encontraron diferencias entre el blanco de reactivos y las distintas diluciones de SCU. Estos resultados se pueden deber a que al emplear un segundo anticuerpo se aumentó la sensibilidad del método.

En nuestros resultados obtenidos para establecer las condiciones óptimas de adsorción de la AFP a la fase sólida, observamos que en el regulador de citratos pH 5.4 se obtiene la mayor adsorción, mientras que para los reguladores de fosfatos pH 7.4 y boratos pH 8.8 la adsorción es mas baja siendo casi igual para ambos en las diluciones de SCU más elevadas.

En cuanto a la concentración del Ac-Ez la dilución 1:1000 da una D.O. baja sin mostrar grandes diferencias entre las lecturas de las diluciones más altas de SCU; la dilución 1:2000 no muestra ninguna diferencia entre las distintas diluciones de SCU utilizadas; la dilución 1:500 da una adecuada respuesta, por lo que fue usada rutinariamente.

Al probar el suero humano normal libre de AFP (SHN-AFP⁻) empleado como bloqueador en las diferentes etapas del sistema, se decidió llevar a cabo la adición de éste después de poner en el sistema el primer anticuerpo, ya que a este nivel es cuando más se reduce la adsorción no específica del Ac-Ez. Se han citado una gran variedad de proteínas que pueden ser empleadas como

bloqueador, pero nosotros decidimos emplear SHN AFP⁻ por ser más accesible y de bajo costo.

Los resultados obtenidos de la curva estándar en donde se empleó AFP comercial muestran que a partir de los 50 ng/μl la curva presenta una tendencia lineal, no así concentraciones inferiores, por lo que se procedió a ajustar la curva realizando una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados; sin embargo, se observa que es probable que puedan ser cuantificadas concentraciones más elevadas de AFP, ya que parece ser que cumple con la ley de Lamber y Beer por arriba de los 100 ng/100 μl.

CONCLUSIONES

Los reactivos biológicos que son requeridos para las técnicas inmunoenzimáticas para la cuantificación de AFP en suero, son en su mayoría de importación; en consecuencia presentan costos elevados y su importación está sujeta a trámites administrativos muy tardados, situación que representa un problema serio ya que los reactivos mencionados presentan fecha de caducidad.

En base a lo anterior, consideramos que la producción de tales reactivos biológicos en el laboratorio, es de gran importancia.

Durante el desarrollo del presente trabajo se lograron producir en el laboratorio preparaciones enriquecidas de AFP provenientes de SCU, SHN libre de AFP, GG de conejo anti AFP, tres diferentes conjugados enzimáticos (GG de ch-PO anti AFP, GG de co-PO anti AFP y GG de ch-PO anti GG de co) así como un suero estándar interno.

Mediante el empleo de algunos reactivos arriba mencionados (GG de co anti AFP, GG de ch-PO anti GG de co y SHN libre de AFP) se implementó en la técnica de ELISA un método directo para la cuantificación de AFP en suero, el cual tiene la ventaja de que se puede realizar en un período de tiempo relativamente corto (3 h).

Desarrollada la técnica, se elaboró una curva estándar empleando para ésto un estándar de AFP comercial. La curva se

linearizó por el método de mínimos cuadrados y se utilizó para determinar la concentración del suero estándar interno producido en el laboratorio, siendo ésta de 430 mg/ml.

Con la obtención de la curva estándar también fué posible determinar el rango inferior de sensibilidad de la técnica, siendo éste de 15 ng/ml.

La sensibilidad de este método es baja, si se le compara con la obtenida en otros métodos de ELISA descritos por Belanger y cols., en los cuales la mayor sensibilidad reportada es de 5 ng/ml. Sin embargo, consideramos que aunque la sensibilidad obtenida no fue la deseada, ésta es lo suficientemente alta como para ser utilizada en la detección de algunas patologías que involucran elevación en los niveles normales de AFP.

Un ejemplo claro de la utilidad del método desarrollado es en patologías durante el embarazo, ya que los niveles de AFP en suero materno durante el segundo trimestre de éste, están por arriba del rango inferior de sensibilidad de la técnica (se toma como referencia el segundo trimestre porque es el mejor tiempo para discriminar entre un embarazo normal y uno afectado).

También consideramos que la técnica desarrollada puede ser útil como prueba complementaria en el diagnóstico de cáncer primario de hígado, ya que los niveles de AFP en éstos padecimientos son mucho más elevados que los niveles normales, y pueden ser detectados fácilmente por este método.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bergstrand, C. G. and Czar, B. (1956). Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 8:140.
- 2.- Brock, D. J. H. (1980). Feto-specific proteins in prenatal diagnosis. *Molec. Aspec. Med.* 3:431.
- 3.- Rouslahti, E. and Seppala, M. (1971). Studies of carcinofoetal proteins: physical and chemical properties of human alpha-fetoprotein. *Int. J. Cancer* 7:218.
- 4.- Grandall, B. F. and Brazier, M. A. (1981). Prevention of neural tube defects. Ed. Board L. New York. pp. 2-15.
- 5.- Gitlin, D. (1975). Normal biology of AFP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 259:7-16.
- 6.- Brock, D. J. H. (1976). Prenatal diagnosis-chemical methods. *Br. Med. Bull.* 32:16-20.
- 7.- Gitlin, D. and Boesman, M. (1966). Serum Alpha-fetoprotein, albumin and gamma-globulin in the human conceptus. *J. of Clin. Invest.* 45(11):1826-1832.
- 8.- Cowchock, F. S. (1978). Use of maternal blood protein levels in identification and management of high risk obstetric patients. *Clin. Obstet. Gynecol.* 21:341-352.
- 9.- Cowchock, F. S. (1976). Use of alpha-fetoprotein in prenatal diagnosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 12:871-878.
- 10.- Seppala, M., Rouslahti, E. (1972). Radioimmunoassay of

maternal serum alpha-fetoprotein during pregnancy and delivery.
Am. J. Obstet. Gynecol. 112:208.

11.- Kelleher, P. C., Smith, C. J. R. (1979). Origin of maternal serum AFP. Lancet 11:999.

12.- Seppala, M. and Rouslahti, E. (1972). Alpha-fetoprotein in normal and pregnancy sera. Lancet 1:375-3766.

13.- Brock, D. J. H. and Sutcliff, R. G. (1972). Alpha fetoprotein in antenatal diagnosis on anencephaly and spina bifida. Lancet 1:197.

14.- Brock, D. J. H., Bolton, A. E. and Managhan, J. M. (1973). Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein measurement. Lancet 2:923.

15.- Leek, A. E., Rooss, C. F., Kitau, M. J. and Chard, T. (1973). Raised alpha-fetoprotein in maternal serum with anencephalic pregnancy. Lancet 2:385.

16.- Brock, D. H. J., Scrimgeour, J. B., Bolton, A. E., Wald, N., Peto, R. and Barker, S. (1975). Effect of gestational age on screening for neural-tube defects by maternal plasma-AFP measurement. Lancet 2:195-199.

17.- Leighton, P. C., Gordon, W. Y., Kitau, M. J., Leek, A. E. and Chard, T. (1975). Levels of alpha-fetoprotein in maternal blood as a screening test for fetal neural-tube defects. Lancet 2:1012.

18.- Monk, A. M. and Goldie, P. M. (1976). The significance of raised maternal serum alpha-fetoprotein levels. Br. J. Obstet. Gynecol. 83:845.

- 19.- Seppala, M. D. (1977). Immunologic detection of alpha-fetoprotein as a marker of fetal pathology. Clin. Obstet. Gynecol. 20:737-757.
- 20.- Report U. K. collaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube defects: Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy.(1977). Lancet 1:1323.
- 21.- Burton, B. J., Sowers, S. G. and Nelson, L. H. (1983). Maternal serum alpha-fetoprotein screening in North Carolina: experienced with more than twelve thousand pregnancies. Am. J. Obstet. Gynecol. 146:439.
- 22.- Report Council on Scientific Affairs (1982). Maternal serum alpha-fetoprotein monitoring. J. A. M. A. 247:1478.
- 23.- Lidbjork, G., Kjessler, B. and Johansson, S. G. O. (1977). Alpha-fetoprotein (AFP) levels in maternal serum in 115 patients with spontaneous abortion. Acta Obstet. Gynecol. Scan. Supl. 69:50-53.
- 24.- Wald, N. J., Barker, S., Cuckle, H., Brock, D. J. H. and Stirrat, G. M. (1977). Maternal serum alpha-fetoprotein and spontaneous abortion. Br. J. Obstet. Gynecol. 84:357-362.
- 25.- Seppala, M. and Rouslahti, E. (1973). Alpha-fetoprotein: physiology and pathology during pregnancy and application to antenatal diagnosis. J. Perinat. Med. 1:104.
- 26.- Brettes, J. P., Tourné, C. and Gandar, R. (1974). Dosage radio-immunologique de l'alpha-fetoprotéine dans le sérum maternel au cours de la grossesse, du travail et du post-partum.

- J. Gynec. Obstet. Biol. Reprod. 3:843.
- 27.- Cahill, J., Cohen, H. and Starkousky, N. (1974). A rapid screening test for detection of alpha-fetoprotein as an indicator of fetal distress. Amer. J. Obstet. Gynec. 119:1095-1100.
- 28.- Garoff, L. and Seppala, M. (1976). Toxemia of pregnancy: assessment of fetal distress by urinary estriol and circulating human placental lactogen and alpha-fetoprotein levels. Am. J. Obstet. Gynecol. 126:1026.
- 29.- Seppala, M. and Rouslahti, E. (1973). Alpha-fetoprotein in rh immunized pregnancies. Obstet. and Gynec. 42:701-706.
- 30.- Brock, J. E., Norgaard-Pedersen, B. and Trolle, D. (1976). Alpha-fetoprotein in amniotic fluid serum from pregnant women with severe Rhesus isoimmunization. Acta Obstet. Gynec. Scand. 55 (Suppl.53):7.
- 31.- Seppala, M., Bagshawe, K. D. and Rouslahti, E. (1972). Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein: a contribution to the diagnosis of choriocarcinoma and hydatiform mole. Int. J. Cancer 10:478-481.
- 32.- Ishiguro, T. (1975). Serum alpha-fetoprotein in hydatiform mole, choriocarcinoma and twin pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 121:539-541.
- 33.- MerKats, I. R., Nitowsky, H. M., Macri, J. N. and Johnson, W. E. (1984). An association between low serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. Am. J. Obstet. Gynecol. 148:886-894.
- 34.- Cuckle, H. S., Wald, N. J. and Lindenbaum, R. H. (1984).

Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. *Lancet* 1:926-929.

35.- Murday, V. and Slack, J. (1985). Screening for Down's syndrome in the North East Thames region. *Br. Med. J.* 291:1315-1318.

36.- Cowchock, F. S. and Ruch, D. A. (1984). Low maternal serum AFP and Down syndrome Litter. *Lancet* 11:161-162.

37.- Cuckle, H. S., Wald, N. J. and Thompson, S. G. (1987). Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein levels. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 94:387-402.

38.- Tibor, A., Larsen, S. O., Nielsen, J., Philip, J., Pilgaard, B., Videbech, P. and Norgaard-Pedersen, B. (1987). Screening for Down's syndrome using an iso-risk curve based on maternal age and serum alpha-fetoprotein levels. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 94:636-642.

39.- Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramacov, N. I., Postnikova, Z. A. and Irlin, I. S. (1963). Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1:174-180.

40.- Abelev, G. I. (1971). Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* 14:295.

41.- Rouslahti, E. and Seppala, M. (1971). Studies of carcino-fetal proteins. III. Development of radioimmunoassay for alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults. *Int. J. Cancer* 8:374-383.

- 42.- Tatarinov, Y. S. (1965). Content of embryospecific alpha-globulin in the blood serum of human fetus. New-born and adult man in primary cancer of the liver. Vop. Med. Khim. 11:20-24.
- 43.- Masopust, J., Kithier, K., Rádl, J., Koutecky, J. and Kotál, L. (1968). Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases. Int. J. Cancer 3:364-373.
- 44.- Foli, A. K., Sherlock, S. and Adinolfi, M. (1969). Serum alpha-fetoprotein in patients with liver disease. Lancet 11:1267-1269.
- 45.- Purves, L. R., Bersohn, I. and Geddes, E. W. (1970). Serum alpha-fetoprotein and primary cancer of the liver in man. Cancer 25:1261-1270.
- 46.- O'Conors, G. T., Tatarinov, Y. S., Abelev, G. I. and Uriel, J. (1970). A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. Cancer 25:1091-1098.
- 47.- Kohn, J., Orr, A., Mc Elwain, T. J., Bentall, M. and Peckman, M. J. (1976). Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumors. Lancet 2:433-436.
- 48.- Scardino, P. T., Cox, D. H., Waldman, T. A., Mc Intire, K. R., Mittemeyer, B. and Javadpour, N. (1977). The value of serum tumors markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. J. Urol. 118:994-999.
- 49.- Takahashi, Y., Mai, M., Ogino, T., Hueda, H., Sawaguchi, K. and Ueno, M. (1987). Clinicopathological study of AFP producing gastric cancer significance of AFP in cancer gastric. Nippon Geka Gakkai Zasshi. 88(6):696-700.

- 50.- Miyake, M., Ito, M., Mitsuoka, A., Taki, T., Hitomi, S., Kino, T. and Matsui, Y. (1987). Alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin-producing lung cancer. *Cancer* 59(2): 27-232.
- 51.- Hirai, H. and Nishi, S. (1974). Mass screening of alpha-fetoprotein by hemagglutination test. In R. Masseyeff (ed). *L'Alpha-fetoprotéine*. Paris. INSERM. pp. 555.
- 52.- Nomura, M., Imai, M., Usuda, S., Nakamura, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1983). A pitfall in two-site sandwich 'one step' immunoassay with monoclonal antibodies for the determination of human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods* 58:13-17.
- 53.- Nomura, M., Imai, M., Takahashi, K., Kumakura, T., Tachibana, K., Aoyagi, S., Usuda, S., Nakamura, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1983). Three-site sandwich radioimmunoassay with monoclonal antibodies for a sensitive determination of human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods* 58:293-300.
- 54.- Van Weemen, B. K. and Schuur, A. H. W. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS. Lett.* 15:232-235.
- 55.- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971). In *Protides of the biological fluids*, proceedings of the nineteenth Colloquium Brugge (Peeters, H. ed.), Pergamon Press, Oxford. pp. 553-556.
- 56.- Bélanger, L., Sylvestre, C. and Dufour, D. (1973). Enzyme linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. *Clin. Chim. Acta* 48:15-18.
- 57.- Maiolini, F., Ferrua, R. and Masseyeff, R. (1975). Enzymology immunoassay of human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods*

6:355-362.

58.- Burgett, M. W. and Kwan, S. (1982). An enzyme-labelled immunoassay for the measurement of alpha-fetoprotein. *La Ricerca in Clinica e in Laboratorio*. 12:298-306.

59.- Bélanger, L., Hamel, D., Dufor, D. and Pouliot, M. (1976). Double antibody enzyme immunoassay applied to human alpha-fetoprotein. *Clin. Chem. Acta* 22:198.

60.- Maiolini, R. and Masseyef (1975). A sandwich method of enzymoimmunoassay: Application to rat and human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods* 8:223.

61.- Campbell, D. H., Garvery, J. S., Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. (1977). *Methods in Immunology*. 2a. ed. ED. W. A. Benjamin Inc. New York. pp. 189-191.

62.- Lowry, O. H. L., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.

63.- Porath, J. (1974). General Methods and coupling procedures. *Methods in Enzimology*. 34:13-30.

64.- Lebecq, J. C., Salhi, S. L. and Bastide, J. M. (1984). A novel antibody overlay technique for two-dimensional immunoelectrophoresis. *J. Immunol. Methods*. 66:219-226.

65.- Avrameas, S. and Ternynek, T. (1969). The crosslinking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry* 6:53.

66.- O'Sullivan, M. J. and Marks, V. (1981). Methods for the preparation of enzyme-antibody conjugates for use in enzyme

immunoassays. Methods in Enzimology 73:147.

67.- Montoya, A. and Castell, J. U. (1987). Long term storage of peroxidase-labelled immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. J. Immunol. Methods 99:13-20.

INDICE DE FIGURAS

1.- Inmunoelectroforesis bidimensional	33
2.- ELISA por el método directo para la cuantificación de AFP empleando dos diferentes conjugados enzimáticos (GG de ch-PO anti AFP y GG de co-PO anti AFP)	40
3.- ELISA por el método directo para la cuantificación de AFP empleando el conjugado de GG de ch-PO anti GG de co	42
4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la AFP eluída del inmuoadsorbente de Sepharosa	46
5.- Inmunodifusión radial para determinar la concentración de AFP de los eluidos del inmuoadsorbente de Sepharosa ..	47
6.- IEB de suero de conejo hiperinmune anti AFP	49
7.- IEB de suero de conejo monoespecífico anti AFP	50
8.- IEB de gamma-globulina de conejo monoespecífica anti AFP	51
9.- Cromatografía del conjugado enzimático (GG anti AFP obtenida en conejo)	53
10.- Cromatografía de conjugado enzimático (GG anti AFP obtenida en chivo)	54
11.- Cromatografía de conjugado enzimático (GG de chivo anti GG de conejo)	55
12.- Montaje de la técnica de ELISA (Efecto del pH en el recubrimiento de las placas con SCU)	57
13.- Montaje de la técnica de ELISA (Efecto de la	

concentración de Ac-PO)	58
14.- Montaje de la técnica de ELISA (Efecto del bloqueador SHN AFP ⁻ 5%)	59
15.- Curva estándar para AFP	62
16.- Curva estándar para AFP (Curva ajustada por mínimos cuadrados)	63