



Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Química

54

"INVESTIGACION DEL EFECTO DE LA TEM-
PERATURA Y DE LOS ABLANDADORES DE
CARNES EN LAS REACCIONES DE INMUNO-
PRECIPITACION PARA IDENTIFICACION DE
LAS ESPECIES".

394

TESIS MANCOMUNADA
ESTRELLA ROMANO HASSAN
CELIA ESTHER RUBIO CESEÑA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
ORIENTACION: BIOQUIMICO MICROBIOLOGICA

1976



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.

CLAS. TESI
ADQ. 1976
FECHA _____
PROC. 14

~~33~~ 374



QUINCA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MAGDALENA ACOSTA SEGURA.

VOCAL: CARMEN REYNA BORDES.

SECRETARIO: ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA

1er. SUPLENTE: SOCORRO CAO ROMERO MARTINEZ.

2do. SUPLENTE: DEA CORONADO PERDOMO.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. FACULTAD DE
QUIMICA.

SUSTENTANTES: ROMANO HASSAN ESTRELLA,

RUBIO CESEÑA CELIA ESTHER,

ASESOR DEL TEMA: Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.

A MIS PADRES:

SR. ROBERTO RUBIO CORDERO

Y

SRA. BERTHA C. DE RUBIO,

PARA CORRESPONDER AL CARINO

Y ORIENTACION QUE HAN DADO A

MI VIDA.

A MIS HERMANOS:

SILVIA, EMILIA, ROSA Y ROBERTO.

A MI ESPOSO, MARCO ANTONIO Y A MI HIJA

TANIA CON TODO MI CARINO.

NUESTRO AGRADECIMIENTO MAS SINCERO:

A LA PROFESORA Q. F. B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA,
QUIEN CON SU AMPLIA EXPERIENCIA Y ABUNDANTES CO-
NOCIMIENTOS, NOS BRINDO GRAN AYUDA EN LA REALIZA
CION DEL PRESENTE TRABAJO. A LAS Q. F. B. PROFE
SORAS: CARMEN REYNA BORDES Y ERNESTINA BALLESTE-
ROS RUEDA, POR SU ASESORIA EN LA REVISION.

. . .

C O N T E N I D O:

PAGS.

INTRODUCCION

CAPITULO I.- ANTECEDENTES Y GENERALIDADES. .	1
CAPITULO II.- MATERIAL Y METODOS	61
CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSION.	84
CAPITULO IV.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.	88
CAPITULO V.- B I B L I O G R A F I A	94

INTRODUCCION.

I N T R O D U C C I O N .

Es importante determinar el origen de las especies, en carnes y derivados, porque hay ocasiones en que son adulterados o sustituidos por otra especie con el riesgo para el consumidor cuando la especie sustituida no ha sido controlada sanitariamente. La identificación se lleva a cabo por diversos métodos inmunológicos. Sin embargo estos métodos de identificación se ven afectados por ciertos factores que la dificultan o la inhiben, tales como la temperatura o la adición de sustancias con acción enzimática como la papaína: ya que alteran la estructura antigénica de la carne. Por este motivo, es importante conocer cómo afectan los procesos de cocción y el tratamiento con ablandadores a la especificidad de las reacciones de identificación.

CAPITULO I.

ANTECEDENTES Y

GENERALIDADES.

C A P I T U L O I .

A N T E C E D E N T E S .

I.- ANTIGENOS DE ESPECIE:

- a) Desarrollo del mecanismo de reconocimiento de lo propio y lo extraño.

La mayoría de las sustancias antigénicas son exógenas al individuo que reacciona ante ellas pudiendo proceder de organismos de la misma especie o de especies distintas; sin embargo en condiciones especiales, el organismo puede reaccionar frente a sus propios constituyentes, creándose así el estado de autoinmunidad, en el que prácticamente puede verse involucrado cualquier tejido. Al producirse la respuesta inmunológica frente a los propios constituyentes del organismo se van a producir daños tan grandes en él que lo llevan a un desenlace fatal. Este estado de autoinmunidad se debe a una falla del organismo para reconocer -- "lo propio" de lo "no propio".

La capacidad del organismo para reconocer a sus propios componentes de los extraños se trata de explicar en la siguiente forma: muchos datos sugieren que esta capacidad se adquiere duran-

te el desarrollo embrionario, aún cuando sigue -
siendo enigmático el mecanismo por medio del cual
ocurre esto. Desde luego, se reconoce la importante
intervención de las células B y T que integranel
el sistema linfóide ya que éstas intervienen en la
producción de anticuerpos. Burnet sugirió hace algunos
años que los antígenos autólogos se marcan -
como propios "in utero" durante el periodo de la -
embriogénesis. Postuló que cualquier antígeno que
esté en contacto con el embrión en desarrollo, puede
de clasificarse erróneamente como propio. En --
otras palabras, Burnet predijo que la exposición
a cualquier antígeno, durante un periodo determinado
de de inmadurez del sistema linfóide, puede provocar
un estado de tolerancia inmunitaria exponiendo
algunos animales a antígenos extraños durante la -
vida fetal, por ejemplo los experimentos que llevaron
a cabo Medsaw y sus colaboradores con injertos
de piel entre ratones de cepas C₃H y A. La cepa de
ratones C₃H es de pelo pardo y la cepa A es blanco.
El experimento consistió en inyectar por vía intravenosa
tejido de ratones de la línea A a embriones
de ratón C₃H entre el décimo y décimo cuarto día de
vida fetal, la mayor parte de los animales resistieron
la manipulación y nacieron normalmente. Poste-

riormente se hicieron a estos animales, ya adultos, injertos de piel de ratón de la línea A y el injerto persistió. Normalmente los injertos de piel entre animales adultos de estas cepas persisten de 10 a 11 días y luego esfacelan. La prueba concluyente de este fenómeno es observar placas de pelo blanco sano en el ratón CBA. Se han realizado experimentos semejantes en rata, conejo, pollo, y otras especies, con resultados semejantes. La exposición a los antígenos durante la vida fetal siempre logró tolerancia ulterior al antígeno. No obstante, algunos antígenos provocan una tolerancia mayor que otros, y también varía la duración de la tolerancia con los diferentes antígenos.

La madurez del sistema linfóide, en el nacimiento, difiere mucho en las diversas especies animales. Los recién nacidos poseen un grado variable de eficiencia inmunitaria, que se correlaciona hasta cierto punto con la edad gestacional y con la madurez de otros sistemas. La mayoría de los lactantes a término son capaces de producir cantidades apreciables de anticuerpos IgM en el período neonatal. Los anticuerpos IgA empiezan a aparecer alrededor de tres semanas después del nacimiento. Los anticuerpos IgG se producen en cantidades importan-

tes sólo hasta después de la cuarta semana de vida. Las respuestas inmunitarias de los niños o animales prematuros son generalmente más lentas que los de - a término.

En el humano se observa respuesta - inmunológica a las infecciones, cuando éstas ocurren cuando el sistema linfóide ha madurado; ésto se demuestra por los niveles elevados de IgA y/o IgM en el momento del nacimiento y porque se encuentran en estas inmunoglobulinas, anticuerpos específicos para el microorganismo infectante, siendo los casos más frecuentes: citomegalia, rubéola, herpes, sífilis y toxoplasmosis.

b) Respuesta a proteínas de especies alejadas - taxonómicamente.

El empleo de la prueba de inmunoprecipitación para estudiar relaciones entre animales se - inició poco después de descubrirse esta reacción. Bordet, en 1899, señaló que el suero de un conejo inyectado con suero de gallina precipitaba sueros de gallina y de pichón. Al año siguiente, Myers comprobó que el suero insune contra albúmina de huevo de gallina reaccionaba con albúmina de huevo de pato igual que con el antígeno homólogo. Comprobó también que los

anticuerpos contra globulina de carnero precipitaban la globulina de carne de buey menos intensamente que la de carnero; inversamente, la globulina antibuey reaccionaba menos fuertemente con globulina de carnero que con antígeno homólogo. Varios investigadores pronto señalaron que los sueros antihumanos obtenidos en conejo además de reaccionar con el antígeno homólogo reaccionaban con suero de primates. Estas observaciones proporcionaron la base para la prueba forense de inmunoprecipitación para la identificación de manchas de sangre.

Los primeros investigadores utilizaban mezclas simples de suero inmune y antígeno y señalaban la aparición de turbiedad y/o de un precipitado neto después de periodos variables de incubación. A distintas temperaturas generalmente se mezclaba una cantidad constante de suero inmune, como 0.1 ml con 0.5 ml de una o más diluciones de antígeno. Nuttall, incluyó en algunas observaciones, un registro del tiempo requerido para obtener una reacción visible, y desarrolló también un método semicuantitativo, en el cual se medía la altura de la columna de precipitado en el tubo capilar. Más tarde se utilizó la prueba del anillo en estudios de relaciones entre animales y plantas.

Aunque ya se conocía, en mezclas simples puede presentarse la inhibición de la precipitación por exceso de antígeno, se efectuaron muchas pruebas de precipitación en las cuales se utilizaba una sola concentración de antígeno. Por lo tanto, resulta sorprendente que los resultados de los primeros estudios filogénicos correspondieran tan bien, como se vió con la posición sistemática de los materiales utilizados cuando se clasificaban según bases morfológicas u otras.

En 1901 Uhlenhuth señaló que los sueros insunes antihumanos obtenidos en conejo sólo reaccionaban cuando se mezclaban con suero humano y no con los sueros de 16 especies de animales inferiores. Wassermann y Schütze llevaron a cabo experiencias similares comprobando que el suero antihumano precipitaba con el suero de mandril, aunque esta reacción era más lenta y menos intensa que con el suero humano. El mismo año Nuttall comprobó que los sueros de algunos monos europeos reaccionaban fuertemente con suero de conejo antihumano, mientras que los monos sudamericanos sólo reaccionaban ligeramente.

Nuttall publicó en 1904 una monografía en la cual tabulaba y resumía los resultados de 16,000 pruebas de precipitación. Empleó como antígeno

nos sueros sanguíneos de hombre y varios animales, y probó 30 sueros inmunes obtenidos en conejos con tra proteínas séricas de los diversos grupos de animales. Los resultados obtenidos en mezclas de sueros de primates y suero antihumano se presentan en el cuadro 1. Los sueros de orangután, chimpancé gorila y otros monos de Europa, desde el punto de vista serológico estaban más estrechamente relacionados con el suero humano que los de monos y títeres de América. Los lemuridos resultaron no tener relación ninguna con el hombre. Estos resultados correspondían estrechamente a las conclusiones obtenidas con datos morfológicos. Las pruebas de precipitación por el método semicuantitativo de Nuttall -- dieron resultados similares (ver cuadro 2).

Las relaciones se confirmaron por pruebas con sueros antichimpancé, antiorangután y antimonos específicos para varias especies.

Cuadro 1. Precipitación de sueros de primates por suero antihumano obtenido en conejo.

Sueros de primate	No. de estudios	Porcentaje de pruebas positivas
antropoides	34	100
Hombre		
Símidos (orangután, chimpancé, gorila)	8	100
Cercopitecos (Monos de Europa, 26 especies)	36	92
Cébidos (monos de América, 9 especies)	13	77
Hapálidos (titíes, 3 especies)	4	50
Leuroideos Leuridos (lémures, 2 especies)	2	0

Cuadro 2. Cantidades relativas de precipitado obtenidas con suero de conejo antihumano y cantidades iguales de suero de diversos antropoides y monos.

Suero	Precipitado
Humano	100%
Chimpancé	130%
Gorila	64%
Orangután	42%
Cinocéfalo mormón	42%
Cinocéfalo sphinx	29%
Ateles (mono araña)	29%

* Precipitado suelto.

Muttall también estudió sueros de mamíferos, aves y réptiles (cuadro 3). Los anticuerpos contra las diferentes especies de mamíferos daban el mayor porcentaje de reacciones de precipitina positivas cuando se estudiaban con antígenos provenientes de la misma o de otras especies del mismo orden. Así, el suero antibovino daba resultados positivos con el 72% de los antígenos procedentes de ungulados, el suero anticanguro reaccionaba positivamente con el 68% de los antígenos procedentes de

Antígenos (sueros)	Número de antígenos probados	Sueros insuertes de conejo frente a:					
		Primate (hombre)	Insectívoro (erizo)	Carnívoro (ferro)	Ungulado (buey)	Marsupial (canguro)	Ave (gallo)
					Porcentaje	Positivo	
Primates	64-97	90	2	21	11	11	0
Insectívoro	8-15	13	47	14	0	0	0
Carnívoro	76-97	27	5	46	4	5	1
Ungulados	57-70	43	7	3	72	5	0
Marsupiales	21-26	4	0	4	0	68	0
Aves	262-322	0.3		0.3	0.6	0	68
Reptiles	34-51	0		0	0	0	2

Cuadro 3. Precipitación de sueros de animales con sueros inmunes obtenidos en conejos.

Marsupiales. Las aves constituían un grupo distinto, prácticamente sin signo ninguno de relación con los demás animales probados. Los reptiles eran heterogéneos entre sí, y reaccionaban en forma cruzada. - Puede tener importancia el hecho de que la reacción cruzada ocurría en el grupo de las aves, de las cuales los reptiles probablemente sean los antecesores en la evolución.

Se han comprobado gran número de relaciones interesantes mediante las pruebas de precipitación. Ya en 1905, Friedenthal demostró reacciones débiles entre el suero sanguíneo del mamut siberiano congelado y el suero inmune contra elefantes de la India. Boyden y Noble en 1933, ayudaron a aclarar las relaciones entre algunos anfibios. Comprobaron que Siren, Necturus y Amphiuma estaban estrechamente relacionados entre sí, pero sólo a gran distancia con la forma primitiva *Cryptobranchus*. Estas relaciones las representaban gráficamente en un modelo tridimensional. Más tarde, Boyden empleó un método fotoeléctrico para medir los precipitados, demostrando serológicamente que la mula, híbrido del caballo y asno, posee proteínas séricas que se encuentran en los animales progenitores.

Boyden durante años estudió sangre y otras muestras de proteínas de toda clase de fuentes. Las utilizó para estudios serológicos comparativos con aplicación a problemas de filología, sistemática y evolución.

De Falco comprobó que las aves constituyen un grupo serológicamente separado por lo que se refiere a proteínas de su sangre, huevo y cristalino. Cumley, Irwin y Cole estudiaron antígenos séri-

cos de *Streptopelia risoria* (tórtola anillada) y *St. senegalensis* y sus híbridos directos y retrógrados. Las palomas senegal y anillada compartían componentes antigénicos mayores en el suero; además la Senegal poseía un pequeño residuo "específico de especie" probablemente formado cuando menos por cuatro antígenos distintos. Estos cuatro antígenos específicos de especie pueden aparecer en los híbridos, pero cuando los híbridos, se cruzan en forma retrógrada con tórtola anillada, que carece de tales factores, uno o más de los antígenos Senegal pueden perderse. Las pruebas hechas con sueros inmunes absorbidos adecuadamente indicaron el control genético de éstos antígenos séricos. Irwin y colaboradores también demostraron el control genético de antígenos séricos en otras aves.

Moody y colaboradores estudiando la conducta serológica de proteínas plasmáticas, obtuvieron datos que apoyaban la clasificación morfológica de estos animales. También comprobaron que las proteínas séricas de conejo difieren netamente de las de los roedores, confirmando la posición sistemática de los conejos en una orden separada, *Lagomorpha*.

Las reacciones de precipitación se han apli

cado también al estudio de vegetales. Se han preparado sueros inmunizando conejos con soluciones de macerados y extractos secos de tejidos vegetales en solución salina, agua, soluciones amortiguadas o soluciones alcalinas débiles. El trabajo serológico con materiales procedentes de plantas se dificulta por la presencia de sustancias precipitantes no específicas, como ácidos orgánicos, taninos, alcaloides y glucósidos. Muchas de estas sustancias pueden eliminarse con extracción previa de los tejidos vegetales con éter, alcohol, benceno, acetona u otros solventes. Tal tratamiento, claro está, merece la objeción de que también extrae materiales antigénicos específicos. Sin embargo, utilizando extractos de plantas se han obtenido informaciones muy útiles.

Una observación inicial de la índole serológica de las proteínas vegetales fue la de Kowarski. Comprobó, en 1901, que las precipitinas contra una albumosa termoestable de trigo reaccionaban ampliamente con extractos homólogos, pero poco o nada con todas las albumosas de centeno, cebada, avena y chícharo. En 1914, Xade empleó la prueba de precipitación para construir un esquema genealógico, mostrando las relaciones entre especies y variedades dentro

del género *Avena* (avena) y *Triticum* (trigo). Las relaciones observadas corresponden bien a las ideas -- existentes sobre clasificación de estas plantas basándose en su morfología.

Rez y Kiegenspeck resumieron en 1926 el trabajo de los trece años procedentes de la escuela de Königsberg en un árbol genealógico serológico. -- (fig. 1). Las relaciones serológicas comprobadas correspondían bien a los datos anatómicos, morfológicos, citológicos y paleontológicos.

Con la prueba de precipitación pueden descubrirse constituyentes y contaminantes de harinas, -- alimentos diversos, forrajes, medicamentos y otros -- materiales vegetales. Se ha descubierto por ejemplo, cornezuelo, en la harina de maíz, centeno y cebada o patata en la harina de trigo. La reacción de precipitación también se utiliza en la comparación serológica de plantas para saber si permiten más o menos -- difícilmente el injerto. Rives ha señalado que diversas variedades cuyos injertos mutuamente no prenden, poseen diferencias serológicas netas, mientras que las variedades cuyos injertos prenden bien son serológicamente semejantes. Una situación similar -- fué descubierta por Green en estudios de rosáceas, --

solanáceas y otras plantas. Merece señalarse al respecto, la publicación de informes similares sobre fertilización cruzada e hibridación en animales.

Se ha comprobado que serológicamente los híbridos vegetales eran intermedios entre las especies progenitoras. Zade demostró en 1914 que Trifolium pratense y T. repens guardaba relación serológica pero eran diferentes y que su híbrido, T. hybridum, reaccionaba fuertemente con sueros inmunes contra extractos de ambos progenitores.

Para otros híbridos vegetales, se han descubierto situaciones similares. La composición antigénica de un híbrido vegetal parece incluir un número menor o mayor de antígenos de los progenitores, pero sin aparición de antígenos específicos nuevos.

NOTA:

Fig. 1. Arbol genealógico serológico, donde se resumen los trabajos de la escuela de Königsberg sobre las relaciones filogenéticas de las especies y géneros de las plantas, tal como quedan indicadas por las reacciones serológicas.

GENERALIDADES

I. 1 REACCION DE IMMUNOPRECIPITACION.

La reacción de inmunoprecipitación fue descrita por Kraus por primera vez en 1897. Filtra

dos de Vibrio cholera y Salmonella typhi, libres de bacterias, mezclados con sueros inmunes homólogos - presentaban enturbiamiento después de un breve período de incubación; a las 2^a horas, se depositaba en el fondo de los tubos el precipitado. La especificidad de la reacción se comprobó porque el suero anticólera no precipitaba con filtrados de cultivos de Salmonella, y viceversa. Kraus aplicó el nombre de precipitina al anticuerpo que reaccionaba en la precipitación y al antígeno que desencadenaba su formación lo llamó precipitinógeno.

Dos años más tarde, Tchistovitch, estudiando la toxicidad del suero de anguila, inculó - con este material conejos, cobayos, perros y cabras. El suero sanguíneo de los animales que sobrevivieron a los efectos tóxicos del antígeno, formaba un precipitado abundante al mezclarse con suero de anguila.- Casi al mismo tiempo, Bordet señaló que la inyección de leche de vaca al conejo estimulaba la aparición de anticuerpos que originaban precipitación al mezclarse con dicha leche. Análogamente, Myers, en 1900, obtuvo p precipitinas para albúmina de huevo inyectándola a conejos por vía intraperitoneal.

En unos pocos años se produjeron anticuerpos precipitantes para gran número de proteínas provenientes

de animales, plantas superiores y bacterias, y se --
emprendieron estudios de interés teórico, medicole--
gal y filogenético.

Actualmente ya se tiene un mayor cono-
cimiento del mecanismo de la reacción de inmunopre--
cipitación; a grandes rasgos se podría definir a és-
ta como la reacción que se lleva a cabo entre un an-
tígeno en solución, como lisados bacterianos, toxi--
nas, extractos de tejidos heterólogos, extractos ve-
getales, etc. y su anticuerpo y como resultado de -
ésta unión se forma un precipitado. La manifiesta --
ción visible de la reacción depende del estado físi-
co, de la sustancia antigénica y de las condiciones_
del fenómeno.

I. 1. 1.- M E C A N I S M O.

Aunque existen numerosas teorías modernas
del mecanismo de reacción de inmunoprecipitación, ge-
neralmente se acepta como el resultado de dos etapas.
En la primera, hay una combinación del antígeno y el
anticuerpo; en la segunda, se forman agregados de los
complejos antígeno-anticuerpo, por lo que se le cono-
ce como fase de agregación. Esta última requiere más
tiempo que la primera, exige la presencia de electró

litos y supone muy poco cambio de energía libre. Ma--
rrack en su hipótesis de la red para las reacciones -
serológicas, explica de qué manera la agregación hace
visible la reacción: considera que la unión antígeno_
anticuerpo que se lleva a cabo a nivel de sus grupos
determinantes específicos, es firme pero disociable -
y para que haya una agregación entre esas moléculas -
de antígeno-anticuerpo ya combinadas es necesario que
exista afinidad entre ellas; y una disociación y recom
binación de estas moléculas alternas (antígeno-anti---
cuerpo) dá como resultado, en el punto de equivalencia,
donde la cantidad de antígeno y anticuerpo es la ópti
ma, que se forme una red. La unión de los reactivos en
proporciones variables se explica considerando que la
inmunoglobulina es divalente, en tanto que los antígg
nos pueden ser bivalentes o multivalentes.

La necesidad de electrólitos implica que
la reducción en el número o en la eficacia de los ra
dicales polares, que normalmente atraen agua, desen--
peñan un papel importante en la segunda etapa de la -
reacción. Podría consistir en el bloqueo mecánico -
de radicales polares, una neutralización mutua, o la
disminución de cargas por los mismos electrólitos.

I. 1. 2.- FACTORES QUE AFECTAN LA REACCION DE
INMUNOPRECIPITACION.

a) CONCENTRACION DE ANTIGENO Y ANTICUERPO (FENOMENO DE ZONA)

En la prueba de inmunoprecipitación que se realiza en tubos de ensaye o capilares, es decir, en medio líquido, se verifica una reacción entre un antígeno en solución y su anticuerpo homólogo. El resultado positivo se revela por la formación de un precipitado, éste solo sucede cuando la concentración de los reactivos es óptima; pero cuando hay un exceso de antígeno o anticuerpo, se inhibe la formación del precipitado, esto es lo que se conoce como "Fenómeno de Zona".

Se conocen 3 zonas en las reacciones de inmunoprecipitación en medio líquido a saber:

- 1o.- La Prozona.
- 2o.- La Zona o Punto de Equivalencia.
- 3o.- La Postzona.

Un estudio hecho con albúmina de huevo -- muestra el fenómeno de zona en la precipitación. La albúmina de huevo diluída al 1:2 000 dá el máximo de precipitación cuando se mezcla con el suero inmune sin

diluir. Todo el antígeno presente se combina con todo el anticuerpo contenido en la mezcla, según demuestra el estudio del líquido sobrenadante, después de eliminar el precipitado. La precipitación menor - con diluciones menores o sea, concentraciones más altas de antígenos recibe el nombre de fenómeno de -- "inhibición" o prozona. Dentro de la prozona no hay anticuerpo suficiente para precipitar todo el antígeno, aunque parte del antígeno se combina con el anticuerpo. Algunos de los complejos antígeno-anticuerpo evidentemente son tan pequeños que no precipitan. La mezcla también contiene antígeno no combinado, -- que puede demostrarse por adición de suero inmune al líquido sobrenadante. Las diluciones de antígeno de 1:4 000 y mayores también proporcionan precipitados menos intensos que los obtenidos con albúmina de huevo al 1:2 000. Todo el antígeno disponible estaba -- combinado, de manera que las cantidades disminuidas de precipitados pueden atribuirse a la presencia de antígeno insuficiente para combinarse con el anticuerpo presente. En el líquido sobrenadante hay un exceso de anticuerpo. Muchos sistemas antígeno-anticuerpo no son particularmente sensibles a ligeros excesos de antígeno; de manera que con frecuencia hay toda una serie de concentraciones de antígeno, dentro

de las cuales ni éste, ni el anticuerpo se encuentran libres en el sobrenadante. Este rango de concentraciones recibe el nombre de "zona de equivalencia". La precipitación máxima ocurre dentro de esta zona.

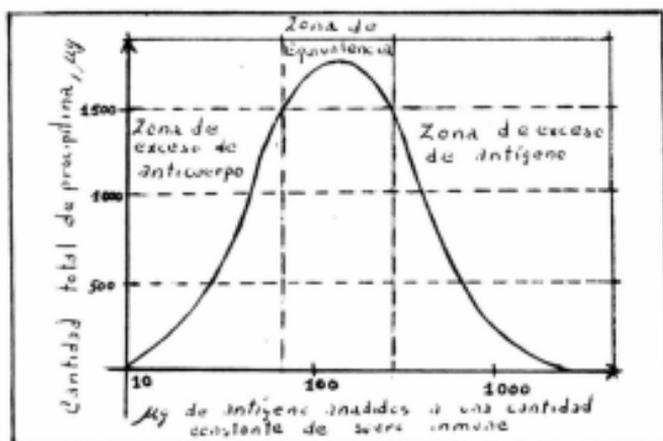


Figura 1. Esta figura presenta una curva típica de insunoprecipitación.

Los precipitados formados en la zona de equivalencia desaparecen cuando se añade más antígeno.

La reacción visible a veces no ocurre si sólo se prueban una o unas pocas diluciones del antígeno, según la concentración en las diluciones en relación con la zona de equivalencia. El estudio adecuado de un sistema precipitante requiere pruebas con varias concentraciones, primero de uno de los elementos reactivos, luego del otro. Aunque generalmente - en estas reacciones de inmunoprecipitación suelen llevarse a cabo con diluciones seriadas de antígeno y una concentración constante y elevada de anticuerpo - (preferentemente sin diluir).

b) TEMPERATURA Y TIEMPO:

En los diferentes sistemas Antígeno-Anticuerpo la etapa de agregación de las reacciones de -- inmunoprecipitación requieren de un tiempo y una temperatura adecuadas. Las temperaturas entre 0°C y - 37°C no afectan la reacción en cuanto a la cantidad de precipitado formado, es decir, la cantidad de éste será la misma ya sea que la reacción se efectúe entre los límites antes descritos. La influencia de la temperatura está en razón indirecta al tiempo en que tarda en aparecer el precipitado, de esta manera, tardará más tiempo en aparecer el precipitado a menor temperatura y menor tiempo cuando la temperatura sea ma:

yor. La mayor rapidez de precipitación y temperaturas altas (37° C), resulta en parte, de la aceleración del movimiento browniano, que puede causar colisiones más frecuentes entre las moléculas o partículas reaccionantes. Sin embargo para realizar las reacciones de inmunoprecipitación a temperaturas mayores a la ambiente, deberá tomarse siempre en consideración que la temperatura escogida no desnaturalice al antígeno.

c) CONCENTRACION IONICA.

Los electrólitos en concentración adecuada son necesarios para que se lleve a cabo la segunda etapa de la reacción de inmunoprecipitación. El papel que desempeñan éstos, se cree que puede consistir en el bloqueo mecánico de radicales polares, una neutralización mutua o la disminución de cargas de los mismos permitiendo de esta manera la agregación de moléculas de antígeno y anticuerpo. La ausencia de los electrólitos impide la precipitación; así mismo, la cantidad del precipitado puede variar según sea la concentración de electrólitos. La concentración de NaCl que se considera óptima, es decir, la concentración en la cual se obtiene una cantidad mayor de precipitado es de 0.15 moles/litro,-

el aumento de la concentración por encima de 0.15 mg les/litro, (8.77 g/1000 ml), valor que corresponde a la concentración salina isotónica produce una ligera disminución en la cantidad de precipitado.

Heidelberger comprobó que la cantidad de precipitado formado con anticuerpos de conejo, en solución, aproximadamente de 0.95 moles/litro de NaCl era menor que el formado con 0.15 moles/litro. Por otra parte, Schmidt señaló que la floculación de mezclas de antitoxina diftérica y su toxina, no ocurren en una solución desprovista de electrólitos. La adición de éstos permite que se produzca la floculación. La disminución del precipitado no parece deberse a un aumento de la solubilidad, sino mas bien, a una desviación del equilibrio entre los reactivos por la presencia de los iones, de tal manera que la misma cantidad de antígeno se combina con menos anticuerpo. Aunque se observó un comportamiento anormal en sueros inmunes de aves, en el que se obtiene mayor precipitación con concentraciones elevadas de NaCl, hasta el grado de producir la floculación de las proteínas. Fuera de esto, puede considerarse como válido para los sueros de las demás especies. Otras sales que también se emplean en las reacciones de inmunoprecipitación son el bromuro sódico y

el yoduro sódico, la concentración óptima de éstos - es la misma del NaCl, 0.15 moles/litro.

d) EFEECTO DEL pH.

Las proteínas son sistemas coloidales - cuyas partículas dispersas tienen la propiedad de -- atraer moléculas de agua formando así una capa pro-- tectora, esto permite a las partículas sostenerse se-- paradas e impide su agregación y precipitación. Es-- tas partículas, de acuerdo al pH, suelen tener carga neta positiva o negativa; en estas condiciones se re-- pelen mutuamente y sus soluciones son estables. En - el punto isoelectrico, cuando tienen el mismo número de cargas negativas que positivas, la repulsión en-- tre las moléculas está al mínimo, y por lo tanto, fá-- cilmente precipitables. Cuando las proteínas en so-- lución tienen carga eléctrica y se colocan en un sig-- terna que tiene dos electrodos, las proteínas emigran hacia el electrodo de carga opuesta a la que poseen. Así, las proteínas con carga positiva emigran hacia el cátodo (de carga negativa) y las proteínas con - carga negativa emigran hacia el ánodo, (de carga po-- sitiva). El pH de una solución por lo tanto, es el factor determinante de la carga neta de la proteína y determinará, por la neutralización de los grupos

carboxilo, COO^- , o amino, NH_3^+ , si la proteína queda cargada positiva o negativamente. La mayor parte de las proteínas tienen su punto isoeléctrico un pH o abajo de 7.0 . Por esta razón, para que se lleguen a cabo las reacciones de inmunoprecipitación satisfactoriamente es necesario que la concentración del ión hidrógeno (pH), se encuentre entre 6.5 y 6.5.

La desnaturalización de las proteínas ocurre a pH más ácidos o alcalinos, de los antes mencionados. La desnaturalización implica modificaciones en la estructura de las cadenas de péptidos, que en general, consisten en el desplegamiento de la molécula, debido al rompimiento de los iones disulfuro y a la ruptura de los puentes de hidrógeno sensibles al efecto de pH fuertemente ácidos o alcalinos, esto trae entonces, la inhibición de la reacción.

I. 2.- IMPORTANCIA DE LAS REACCIONES DE INMUNOPRECIPITACION.

La gran sensibilidad de la reacción de inmunoprecipitación junto con su especificidad, la hace de gran valor para distinguir e identificar diferentes proteínas o polisacáridos. Entre 1946 y -

1946, tres estudios separados demostraron que las pruebas de inmunoprecipitación podían efectuarse en gel, con varias ventajas sobre las pruebas en medio líquido. Una de las principales ventajas de estas pruebas especialmente con las técnicas de doble difusión, es que permiten identificar si un antígeno es puro o está constituido por una mezcla. El artículo de Oudin (Francia), publicado en 1946, se refería a un sistema de difusión simple. Dos años más tarde, Elek (Inglaterra) y Ouchterlony (Suecia) publicaron simultáneamente observaciones sobre una tercera variación técnica de la prueba de inmunodifusión en gel, que era un método de doble difusión, sin mayores ventajas sobre la técnica de Ouchterlony. En la prueba de Oudin sólo difunde un reactivo, razón por la cual se le conoce también como prueba de difusión simple, tanto la técnica de Elek como la de Ouchterlony se --recurre a la doble difusión. Otra variedad de las técnicas de inmunodifusión en gel es la llamada difusión radial, muy útil como técnica cuantitativa. El primero en emplear este método fue Feinberg en 1957. Todas estas técnicas son de gran importancia para diferentes determinaciones, que se podrían agrupar así:

a) Diagnóstico Clínico.- En sueros de pacientes con ciertas enfermedades pueden detectarse -

anticuerpos empleando pruebas cualitativas de inmunoprecipitación, y en algunos casos puede ser cuantitativas. La reacción de inmunoprecipitación también se usa para detectar proteínas específicas. Se pueden citar algunos ejemplos como: la eritroblastosis fetal, una de la variedades más grave de la enfermedad hemolítica del recién nacido, la cual se debe con frecuencia a la llamada incompatibilidad Rh, en ésta la madre frecuentemente forma anticuerpos contra el antígeno Rh. La detección de Proteína C reactiva, Esta proteína se encuentra en el suero de sujetos que sufren una enfermedad inflamatoria, bacteriana o infecciosa de otra índole. Los enfermos de cáncer y las mujeres embarazadas, con frecuencia también la presentan. Etc.

b) Control de Alimentos.- Para distinguir o identificar diferentes proteínas en alimentos vegetales, animales, embutidos, etc. O bien polisacáridos en harinas. Para detectar adulterantes proteínicos o de naturaleza polisacárida, etc.

c) Química Forense.- Una de las aplicaciones más espectaculares es la identificación forense de manchas de sangre. Muchas veces, como en casos de crímenes es necesario determinar a que espe -

cie pertenece una mancha de sangre en papel, ropa, instrumentos u otros materiales y es aquí donde interviene las pruebas de inmunoprecipitación.

d) Investigación.- Para estudiar la composición antigénica de microorganismos, y las relaciones filogenéticas de plantas y animales.

I. 3. FACTORES QUE PRODUCEN DESNATURALIZACION DE -- LAS PROTEINAS.

Las proteínas constituyen el volúmen -- principal de todos los tejidos animales, como el músculo, las vísceras, etc. y representan el grupo de -- sustancias químicas de mayor importancia en la es--- tructura y fisiología celulares ya que desempeñan -- una gran variedad de funciones.

El tejido muscular está constituido por proteínas, esto quiere decir, que si se prepara un -- extracto de carne de una especie determinada y se ha ce reaccionar con un suero insune, preparado en otra especie, dará una reacción de inmunoprecipitación -- específica; y este hecho se utiliza ampliamente para la identificación de especies animales, ya sea en -- Control de alimentos, o para fines exclusivos de in-

vestigación.

Los factores temperatura y el empleo de ablandadores, entre otros, son capaces de modificar los resultados de esas pruebas inmunológicas al afectar la estructura química de las proteínas del extracto y por esa razón es importante conocer cómo actúan estos factores y en qué grado afectan la constitución química de las proteínas.

1. 3. 1. EFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CARNE.

El cocimiento de la carne produce muchos cambios en la estructura de las proteínas. Los cambios químicos y físicos que ocurren durante el cocimiento son numerosos y a pesar de que algunos estudios se han enfocado sobre este problema, las reacciones no se conocen totalmente. Entre los cambios que ocurren se pueden mencionar:

- 1.- Cambio de color.
- 2.- Formación de jugo.
- 3.- Desarrollo de sabor especial.
- 4.- Ruptura de células de grasa y dispersión de ésta.
- 5.- Disminución en vitaminas y posiblemente disminución en el valor nutritivo de las proteínas.
- 6.- Hidrólisis de colágena a gelatina.
- 7.- Desnaturalización de las proteínas.

De todos estos cambios el más importante desde el punto inmunológico es la desnaturalización de las proteínas.

1.- CAMBIO DE COLOR.

Las sustancias que le dan a la carne -- cruda el color rosado son la oxihemoglobina, la oximioglobina; ambas de color rojo, y la hemoglobina y la mioglobina y la mioglobina, de color rojo-púrpura. Estos colores se deben al fierro, que en forma reducida se encuentra en los núcleos de sus moléculas; pero al exponerse la carne a la acción del calor, el ión ferroso es oxidado a ión férrico, dándonos a la carne cocida el característico color café. También puede ocurrir alguna transformación de oximioglobina y oxihemoglobina a metaxioglobina y metahemoglobina, ambas también de color café.

2.- FORMACION DE JUGO.

Durante el cocimiento de la carne, por acción del calor, se observa una pérdida de agua del tejido que junto con otras sustancias hidrosolubles forman el llamado "jugo de la carne". Las sustancias de que está formado el jugo son: creatina, creatinina, sales, particularmente cloruro de sodio, pe-

queñas cantidades de aminoácidos, derivados de -- aminoácidos como aminas, purinas, pirimidinas, proteínas y grasa, en ocasiones también se encuentran ácidos grasos libres. Griswold encontró que la cantidad de compuestos nitrogenados solubles aumentan en el jugo durante el cocimiento, pero no encontró aumento de grupos aminos libres.

3.- DESARROLLO DE SABOR ESPECIAL.

Entre los cambios que sufre la carne al cocerse, la modificación del sabor es uno de los más evidentes.

La carne cruda, ya sea de res, puerco, - carnero o pollo, tiene poco sabor. Es ligeramente - salada y ligeramente dulce. La carne cocida tiene ese ligero sabor dulce y salado pero también posee un aroma que aumenta el sabor. El aroma de la carne se debe a la presencia de compuestos volátiles, de bajo peso molecular, tales como aminas, amoníaco, - sulfuro de hidrógeno y ácidos orgánicos. Estos compuestos probablemente surgen de la ruptura de aminoácidos durante el calentamiento. Las reacciones pueden ser de descarboxilación, desaminación o desulfuración en las cuales los aminoácidos libres o polipéptidos

tidos reaccionan. Los compuestos formados varían de acuerdo a las especies, así, el sabor del carnero - es diferente del sabor de la carne de res y otros.

4.- RUPTURA DE CELULAS DE GRASA, Y DISPERSION DE ESTA

Cuando la carne se cuece, ocurre un cambio en la permeabilidad de las paredes celulares del tejido adiposo y la grasa es liberada; además suele ocurrir la ruptura de las células y haber una dispersión en el medio externo.

5.- DISMINUCION EN VITAMINAS Y POSIBLEMENTE DISMINUCION EN EL VALOR NUTRITIVO DE LAS PROTEINAS.

La disminución de las vitaminas que ocurre durante el cocimiento de la carne ha sido estudiada extensivamente. Las vitaminas del Complejo B, son todas más o menos sensibles al calentamiento, y la tiamina y el ácido pantoténico son particularmente lábiles. Si el cocimiento es prolongado y si la temperatura es elevada, la destrucción de las vitaminas puede ser apreciable. Siempre hay alguna pérdida. La niacina y la riboflabina son más estables al calor y no desaparecen tan rápidamente durante el cocimiento de la carne. Sin embargo, el grupo del ácido fólico es muy sensible al calor y casi el 90% puede desa-

parecer. El ácido ascórbico empieza a disminuir tan pronto como el animal es sacrificado y durante el cocimiento, lo que esté aún presente sufrirá mayor disminución. La carne cocida no puede ser considerada en nuestra dieta como una fuente de ácido ascórbico.

Debido al sobrecalentamiento se produce un sobrecocimiento de la carne, esto causa una pérdida excesiva de jugo y un endurecimiento. La carne llega a ser fibrosa y la cantidad de colágena disminuye, así como la grasa. El sabor también se encuentra disminuído. Puede también ocurrir una disminución en el valor nutritivo. El sobrecocimiento puede ser el resultado de la exposición de la carne al calor durante largo tiempo o bien, a altas temperaturas.

6.- HIDROLISIS DE LA COLAGENA A GELATINA.

La colágena debido a la acción de la temperatura se transforma en gelatina.

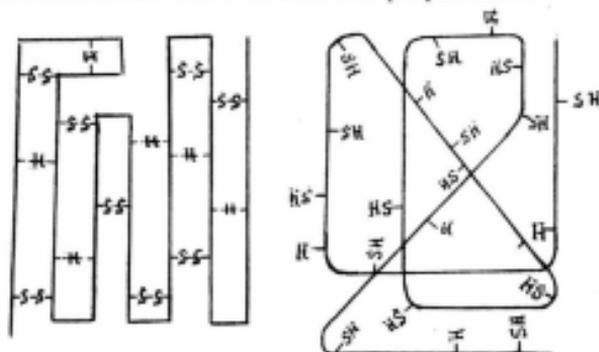
7.- DESNATURALIZACION DE LAS PROTEINAS.

La estructura tridimensional y las propiedades biológicas de los antígenos de la carne (de naturaleza protéica) están determinados en gran par-

te por la clase de aminoácidos presentes, el orden en que están dispuestos en una cadena de polipéptidos y la relación espacial de un antígeno con otro. Existen diversos factores que pueden alterar su estructura química ocurriendo su desnaturalización, entre los cuales se puede citar, la acción del calor. El fenómeno de la desnaturalización consiste en el desplegamiento de la molécula protéica por la ruptura de los puentes disulfuro, regenerando la cisteína a partir de cistina; la ruptura de los puentes de --hidrógeno, dando lugar a un nuevo acomodamiento de la molécula y con ésto una nueva forma tridimensional. Estos cambios químicos intramoleculares ocasionan modificaciones en sus propiedades físicas como son: la disminución de su viscosidad y de la velocidad de difusión, así como la disminución o pérdida de cristalización; y como efecto de estos cambios físicos y químicos se produce también una alteración en sus propiedades inmunológicas; pudiendo ocurrir la pérdida de las determinantes antigénicas y con esto la especificidad. Cuando la desnaturalización es más drástica, pierde también su poder inmunógeno, o sea, la capacidad de estimular la formación de anticuerpos.

Se sabe, que la desnaturalización de los

antígenos por el calor se produce alrededor de 60 a 70° C. La pérdida de la especificidad y la antigenicidad ocurren dentro de las temperaturas antes señaladas. Se produce la coagulación proteica de los antígenos a los 70° C, aproximadamente, y con ésto la destrucción de toda su actividad biológica, por los que se recomienda evitar el calentamiento de los antígenos a estas temperaturas para impedir una destrucción de una o de sus dos propiedades.



Esquema de desnaturalización de los antígenos. Se rompen los puentes disulfuro S-S y los puentes de hidrógeno, lo que permite el estiramiento de las cadenas. Muy a menudo estas cadenas se fragmentan, fenómeno que no se muestra en el esquema.

1. 3. 2. INFLUENCIA DE LOS ABLANDADORES SOBRE LAS
PROTEINAS DE LA CARNE:

1.- ACCION DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS EN LOS ABLAN
DADORES DE CARNE.

Wang y colaboradores investigaron los efectos de las enzimas proteolíticas contenidas en los ablandadores. Un factor implicado en estudios de este tipo es que la penetración de las enzimas en la carne está limitada, particularmente cuando los ablandadores son añadidos en forma de polvo. En estos estudios, el problema se minimizó debido a que la carne se liofilizó y se rehidrató con soluciones acuosas conteniendo varios agentes ablandadores. La acción de las preparaciones de enzimas proteolíticas fue seguida por evaluaciones histológicas de los cambios que ocurren en varios componentes del músculo y tejido conectivo, y por una evaluación sucesiva de la blandura inicial y final para carnes control y tratada. Se encontró una relación muy estrecha entre ambas evaluaciones.

También se midieron las potencias relativas de preparaciones enzimáticas por ensayos en hemoglobina y gelatina. Sin embargo; no coincidieron en todos

los casos con los hallazgos histológicos y organolépticos (TABLA A).

T A B L A A

Actividad de preparaciones enzimáticas proteolíticas como medida en ensayos de hemoglobina y gelatina.

Enzima	Hemoglobina Unidades de hemoglobina	Potencia relativa para referencias	Gelatina Unidades de gelatina	Potencia relativa para referencias estándar.
Papaína standard	5 300	1.0	1 300	1.0
Rhozyme P-11	2 900	0.6	6 700	5.4
Bromelina	14 600	2.8	18 200	14.5
Ficina	28 500	5.4	12 700	10.1
Papaína	9 800	1.9	7 200	5.8

Ciertas enzimas actúan primariamente sobre las fibras del músculo, mientras otras actúan sobre las fibras musculares y fibras de tejido conectivo como se muestra en la tabla B. Parece que sólo una pequeña porción de las proteínas del tejido total necesitan ser alteradas por la acción de las enzimas pro-

teolíticas, para producir un cambio significativo en la blandura. Por otro lado, son requeridas alteraciones relativamente grandes para observar cambios estructurales o para producir suficiente cantidad de aminoácidos libres para medir los cambios químicos.

Zender y asociados (1958) han mostrado que el mayor efecto de la papaína es liberar proteínas solubles del músculo, mientras que la tripsina incrementa las cantidades de aminoácidos liberados.

T A B L A B

Potencia relativa de 20 preparaciones enzimáticas sobre tejido muscular basada en manifestación estructural.

Preparación enzimática	pH	Fibras de músculo Actomiosina	Fibras de tejido conectivo Colágena	Elastina
Proteasa	6.4	+++	-	-
Rhozime P-11	6.8	++	-	-
Rhozime A-4	7.3	++	-	-
HT Proteolítica	6.9	++++	trazas	-
Amilasa - fungal	7.1	+++	trazas	-
Hidralasa D	7.4	+++	trazas	-
Hidralasa TP	6.9	++	trazas	-
Picina	5.2	+++	+++	++++
Papaína	5.1	++	+	++
Bromelina	6.3	trazas	+++	+
Tripsina	5.7	++	+	+
Vickasa	5.8	+++	+	+

2.- ENZIMAS PROTEOLITICAS DE ORIGEN VEGETAL

(PAPAÍNA).

Composición de dos ablandadores de carne -
comerciales:

Ablandador "ROSA BLANCA"

Sal yodatada

Glutamato monosódico
(sazonador)

Papaína

Proteínas hidrolizadas veg.

Azúcar

Ajo.

Ablandador "MC CORMICK"

Sal yodatada

Dextrosa

Papaína

Estearato de calcio

La papaína es muy importante, ya que se -
usa extensamente en forma comercial como ablandador -
de carne.

La papaína fue el primer miembro reconoci-
do de la clase de las enzimas proteolíticas que nece-
sita un grupo sulfhidrilo libre para su actividad. -

Otras enzimas pertenecientes a este grupo son: quimi-papaína, la cual puede ser aislada del látex de la papa; la ficina, del árbol de higo; y bromelina, de la piña.

La papaína tiene una cadena polipeptídica compuesta por 212 residuos de aminoácidos; y de su composición se puede calcular un peso molecular de 23 350.

A.- PROPIEDADES FISICAS.

a).- PROPIEDADES HIDRODINAMICAS.

$s_{20,w}$	2.425
$D_{20,w} \left(10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1} \right)$	10.23
$\bar{v}(\text{ml/g})$	0.723
Relación Friccional (f/f ^o)	1.16
Punto Isoeléctrico pI	8.75
Absorbancia $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ a 278 nm	25.0
Peso Molecular (S, D)	21 000
Peso Molecular (sedimento)	23 700
Peso Molecular (secuencia Aminoácidos)	23 406

b).- PROPIEDADES ESPECTROFOTOMETRICAS Y FLUORESCENTES.

La papaína no contiene más grupos cromóforos que sus aminoácidos constituyentes. Es rica en tirosina (19 residuos) y triptofano (5 residuos). La ionización de los grupos fenólicos de la papaína es compleja. La curva de la titulación para la ionización de los grupos fenólicos arriba de pH 12 es irreversible. Además, la papaína muestra a pH mayor de 12 agregados y precipita a pH menor de 9.5, indicando cambios totales en la conformación de la molécula.

Las propiedades fluorescentes de la papaína han recibido considerable atención. El espectro de emisión de la papaína se obtiene por excitación -- a 295 m μ , originado por los residuos de triptofano.

c).- ESTABILIDAD.

La papaína muestra una no usual alta estabilidad a temperaturas elevadas a pH cercano al neutro. En valores de pH ácido (menor que 4), la papaína es rápida e irreversiblemente inactivada a altas temperaturas. En pH fuertemente ácidos (menor de 2) - ésta inactivación irreversible es extremadamente rápida aún a 25°C.

B.- PROPIEDADES ENZIMATICAS.

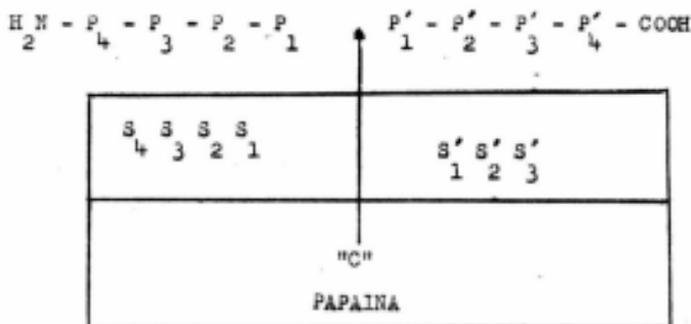
a).- ESPECIFICIDAD.

Los estudios de la especificidad de la papaína sobre una variedad de sustratos sintéticos, así como polipéptidos naturales, han sido ampliamente revisados por Kimmel y Smith. Se le incluye dentro del grupo de las proteinasas (endopeptidasas) por la propiedad que posee de atacar las uniones peptídicas interiores de proteínas y péptidos convirtiéndolos en aminoácidos, fragmentos más pequeños, de fácil absorción. Específicamente hidroliza los grupos amido de los α -amido-sustituidos en arginina, lisina, glutamina, histidina, glicina y tirosina. Las amidas de α -N-benzoil-L-arginina y lisina son los más susceptibles.

Los enlaces peptídicos implicando el grupo γ -carboxilo del ácido glutámico son separados mucho más rápidamente por papaína a pH 4 que a pH 7, - indicando que influye el estado de ionización del γ -carboxilo de la catálisis.

La amplia variedad de enlaces peptídicos hidrolizados por papaína pueden ser superficialmente interpretados como un bajo grado de especificidad de la enzima. Sin embargo, los estudios de --

Schechter y Berger han demostrado que los factores que gobiernan la especificidad de la papaína no -- pueden ser detectados del exámen de su acción so-- bre pequeños sustratos sintéticos o sobre pequeños péptidos escogidos al azar. Estos estudios fueron dirigidos al exámen de la premisa de que las endopeptidasas tienen un gran sitio activo el cual se extiende sobre muchos residuos de aminoácidos del sustrato, es decir, una enzima proteolítica es capaz de "reconocer" una gran porción de una cadena de péptido. De un estudio hecho por Schechter y Berger se concluyó que la papaína tiene un sitio activo extendiéndose sobre casi 25 \AA , el cual puede ser dividido en 7 "subsitos" cada uno acomodado en los residuos de aminoácidos del sustrato. Los subsitos están localizados en ambos lados del sitio catalítico, cuatro sobre un lado y tres sobre el otro, como se ilustra, donde C es el sitio catalítico y el punto de ruptura del sustrato.



Por su amplia especificidad, la papaína no ha sido usada comúnmente para la hidrólisis de proteínas y polipéptidos muy grandes en trabajos de secuencia; sin embargo, ha sido de valor excesivo para la hidrólisis de péptidos de tamaño moderado, particularmente cuando éstos no contienen enlaces del tipo susceptible a tripsina, quimotripsina, etc. tan ampliamente usadas.

De todo lo expuesto anteriormente se puede concluir que la papaína tiene un gran efecto sobre la especificidad de los antígenos. Estos al ser desnaturalizados por la enzima pierden su propiedad de combinarse con sus respectivos anticuerpos.

1. 4.- MÉTODOS PARA LLEVAR A CABO LA REACCIÓN DE
INMUNOPRECIPITACIÓN.

Las técnicas de inmunoprecipitación se basan en la propiedad que tiene un antígeno en solución de formar un precipitado con su respectivo anticuerpo "in vitro", (desde luego, estas reacciones también se llevan a cabo "in vivo"), los métodos para realizarlos son varios y son:

a) PRECIPITACIÓN EN FASE LÍQUIDA: MEZCLA EN TUBO O EN
CAPILAR.

Las pruebas de inmunoprecipitación cualitativas pueden efectuarse muy fácilmente mezclando antígeno con suero inmune. Estas pruebas se realizan ya sea en tubos o capilares. Con objeto de eliminar el fenómeno de zona, generalmente se utilizan diluciones suficientes de antígeno para asegurar resultados positivos, que de lo contrario fracasaría por inhibición en presencia de una concentración excesiva de antígeno.

El utilizar capilares en lugar de tubos de ensayo tiene dos ventajas: gasta pocos reactivos y permite una apreciación semicuantitativa de la reacción porque el precipitado se separa de la solución formando una columna de precipitado que se puede ne-

dir y constituye un índice de la cantidad de anti--- cuerpo o antígeno presente en la zona de equivalen--- cia ya que en esta técnica también se puede observar el fenómeno de zona.

Entre las aplicaciones importantes de esta técnica está la detección de la Proteína C reactiva, en Química Legal, la identificación de la especie de que proceden las manchas de sangre, en Microbiología para la identificación de antígenos bacterianos y la determinación de antropofagia y zoofilia en vectores.

b) PRECIPITACION EN FASE LIQUIDA. ANILLO DE INTERFASE EN TUBO.

Fue creada por Ascoli en 1902 y constituye una de las modificaciones para hacer más sensible - la reacción de inmunoprecipitación. Suelen utilizarse tubos muy pequeños. Se colocan los reactivos de tal - manera que no se produzca la mezcla, el suero inmune - constituye la capa inferior y el antígeno la capa superior. Se incuban los tubos a temperatura ambiente , o a 37°C, durante un plazo hasta de 4 horas. Puede ob - servarse la formación de un anillo visible o una capa de precipitado en la interfase de suero y antígeno.El punto final, o sea el título, está representado por - la máxima dilución de antígeno que dá resultado posi - tivo. Con este método se reduce bastante la inhibición

por exceso de antígeno, porque la difusión a nivel de la interfase brinda una zona proporciones casi óptimas en la cual se produce la precipitación. Puede obtenerse resultado positivo con antígenos diluidos - un millón de veces o más todavía.

La aplicación de esta técnica es la misma - que en el caso de mezcla simple.

c) DIFUSION SIMPLE (OUDIN).

En este método intervienen los fenómenos de difusión y precipitación. Consiste en preparar una mezcla de agar (solución al 1.5% fundida y enfriada a - 50° C) con el anticuerpo purificado, o suero inmune, una vez que se logra una buena mezcla de los reactivos, se coloca en un tubo del tamaño deseado y se deja enfriar para que solidifique el gel, se coloca después una capa de antígeno líquido. Al difundir el antígeno líquido en el agar, se va diluyendo hasta alcanzar la concentración adecuada para precipitar con el suero inmune.

El fenómeno de difusión que se observa en este método está expresado por la primera Ley de Fick que dice: La cantidad de sustancia que difunde en una área (A) en un tiempo (t), es directamente proporcio-

nal a la concentración e inversamente proporcional a la distancia recorrida, donde el gradiente de -- concentración original va decreciendo en función -- del tiempo, aproximándose a cero. La expresión -- matemática de la primera ley de Fick es la siguiente:

$$dq = -DA \frac{dc}{dx} dt$$

Siendo:

dq: cantidad de sustancia

D: Coeficiente de difusión

A: área

dc: cambio de concentración

dx: cambio de distancia

dt: cambio de tiempo

d) DIFUSION DOBLE EN TUBO.

Esta técnica consiste en colocar en un tubo, una zona de agar entre el antígeno y el suero -- inmune, en este método los dos reactivos difunden a diferencia del de Oudin donde sólo un reactivo difunde. La mayor parte de las ventajas de la prueba de difusión simple se aplican también a este método. Estas dos últimas técnicas tienen en la actualidad po-

cas aplicaciones.

e) DOBLE DIFUSION EN PLACA (OUCHTERLONY)

Consiste en colocar en el seno de un gel de agar purificado, que se encuentra en una placa, o tira de acetato de celulosa, el antígeno y el anticuerpo, ambos elementos difunden en la capa de agar y cuando se encuentran, si se corresponden, se forma una banda de precipitación. Este método es muy útil para reconocer cuando un antígeno está constituido por una mezcla de reacciones ya que forman frente a una mezcla de anticuerpos, varias bandas de precipitación y cada una corresponde a una fracción antigénica diferente. Si se prueban varios antígenos diferentes, pero que contienen una fracción común, las bandas de precipitación se unen, en las figuras siguientes se observan los tres tipos de precipitación posibles:



Figura 3. A, los antígenos del pozo superior precipitan en una línea de fusión completa, que significa identidad completa de los antígenos. B, el espelón significa que los antígenos superiores son parecidos, pero no idénticos. C, el cruzamiento de los arcos de precipitación significa que los antígenos son diferentes sin ninguna fracción común.

Otra de las aplicaciones importantes de este método, además de las antes mencionadas, es estudiar la pureza de muchos antígenos biológicamente activos, como enzimas, hormonas y otros componentes celulares. Esta técnica también puede ser semicuantitativa llevando a cabo diluciones de los antígenos.

f) CONTRAIMUNOELECTROFORESIS.

Como el método de Ouchterlony anteriormente descrito presenta las desventajas de requerir -- de 24-48 horas para que se efectúe la reacción y que mucho del antígeno así como del anticuerpo se difunda en la zona en que no está el otro reactivo, lo que reduce la sensibilidad del método, se ha desarrollado la contraimmunolectroforesis también llamada electroforesis a contracorriente. Esta técnica consiste en someter a una corriente eléctrica el sistema antígeno-anticuerpo para forzar a que todo el antígeno migre hacia el anticuerpo impidiendo con esto la pérdida de los reactivos. Al emigrar el antígeno y el anticuerpo hacia un sólo sentido aumenta la sensibilidad del método.

Una condición necesaria para que se realice la reacción por este método, es que el antígeno -

migre hacia el ánodo ya que como el anticuerpo migra hacia el cátodo sólo de esta manera se lleva a cabo. Es entonces, esta condición, también una desventaja del método ya que sólo se puede realizar la técnica cuando se cumple.

g). INMUNODIFUSION RADIAL.

La inmunodifusión radial se utiliza fundamentalmente para la determinación cuantitativa de proteínas plasmáticas en sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, etc. El método fue descrito originalmente por Mancini, Carbonara y Heremans, y por Fahey y Mc Lelvey en forma independiente. En ambos métodos se utilizan sueros monovalentes para el antígeno que se desee cuantificar que se incorporan al gel de agar purificado (o tira de acetato de celulosa), en horadaciones de un diámetro regular se coloca la solución de antígeno medida exactamente; al cabo de una hora se forma un anillo de precipitado alrededor de la horadación en que se colocó el antígeno, cuyo diámetro es directamente proporcional a la concentración de éste, realizando esta prueba simultáneamente con estándares se puede calcular la concentración del antígeno. Ya existen comercializadas las placas con el suero monovalente, y las soluciones estándar. Los

antígenos se dejan difundir en el seno de la placa durante 50-80 horas a temperatura ambiente o de -- 4-12 horas a 37° C., se mide el diámetro de la zona de precipitación y se grafican estos datos contra la concentración de los estándares, obteniéndose así una curva de donde se extrapolan los resultados de los problemas.

Esta técnica se utiliza para la cuantificación precisa de un antígeno, pues permite detectar concentraciones tan bajas como 3 µg de antígeno por mililitro de suero, o también puede llevarse a cabo a la inversa con placas de agarosa conteniendo antígenos conocidos para cuantificar anticuerpos, pero_ ésto se hace sólo con fines experimentales.

h). INMUNOELECTROFORESIS.

Una modificación muy empleada en las pruebas de precipitación en gel es la técnica de inmunoelectroforesis. La palabra inmunoelectroforesis fué acuñada dos años después de la publicación de los detalles del método, en 1953.

La gran ventaja de la inmunoelectroforesis es que los antígenos de una mezcla se separan unos de otros de dos maneras, primero por electroforesis a través del gel de agar o acetato de celulosa, y más -

tarde por difusión doble en el gel. En este método (más aún que en los métodos de difusión simple,) - la formación de un sólo arco de precipitina suele_ indicar la presencia de un antígeno único, o de un anticuerpo único, pues dos antígenos o anticuerpos con la misma velocidad de difusión con frecuencia_ presentan diferencias electroforéticas.

La electroforesis es el desplazamiento - de partículas cargadas en un campo eléctrico. El - rango de desplazamiento depende de la magnitud de - la carga de cada partícula, la viscosidad del medio y otros factores, la intensidad de la corriente que influye sobre el tiempo de separación. La partícula cargada está afectada por el pH, por los electrolitos y su concentración en el medio de suspensión.

Técnicamente, el método de inmunolectroforesis consiste en colocar en un campo eléctrico - una placa de agar o acetato de celulosa, conteniendo el antígeno puro o una mezcla, en un pequeño pozo -- cortado en el agar o en una marca de la tira de acetato de celulosa. Por las condiciones que requiere_ la electroforesis, para un corrimiento satisfactorio de las muestras es conveniente conocer de antemano - el comportamiento electroforético de los antígenos o

anticuerpos que se están estudiando y considerar los factores antes mencionados como son el pH, la fuerza iónica, etc. Después de la electroforesis, se coloca en el agar, a todo lo largo de la placa de vidrio o del portaobjetos, en un surco el suero inmune. Se inicia entonces la doble difusión en ambos sentidos, y al cabo de un periodo de incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda 20 a 24 horas, se forman zonas de precipitación como en la técnica de Ouchterlony, correspondiendo cada banda de precipitación a un antígeno y su anticuerpo diferentes.

La inmunolectroforesis es muy útil para separar los antígenos o anticuerpos y tiene un alta poder de resolución. Si se corre la inmunolectroforesis paralelamente con antígeno estándar, colocado en la otra mitad de la placa o portaobjetos, se obtiene una imagen "en espejo" de la ó las bandas en cuestión para una identificación exacta e inclusive su cuantificación, por medio de un integrador o bien por observación visual del problema o testigo.

Con este método se puede casi asegurar que un arco de precipitación único significa un sistema antígeno anticuerpo único también. Debido a é

to, este método se aplicó como prueba crítica de pureza serológica de antígenos o anticuerpos.

1). ELECTROIMMUNODIFUSION.

Se utiliza en esta técnica una placa de gel de agarosa adicionada con el anticuerpo específico, o tira de acetato de celulosa impregnado con el anticuerpo, se cortan pequeños pozos en el gel, tres se llenan con el suero estándar y los demás con antígeno problema. Se establece el paso de la corriente eléctrica conectando en los extremos de la placa, los electrodos positivo y negativo. La migración del antígeno se lleva a cabo en pocos minutos, desde 10 minutos a 60 minutos, dependiendo del antígeno de que se trate. El amortiguador y la intensidad de corriente que se aplique también depende del sistema que se esté estudiando. La lectura se lleva a cabo sobre fondo oscuro con iluminación lateral. Para evitar el fenómeno de zona se hacen diluciones del antígeno, dependiendo también del sistema que se esté estudiando.

Este método tiene grandes ventajas: es muy simple y rápido. Puede ser cualitativo o cuantitativo. Cuantitativo, porque las zonas de precipita

ción que se obtienen son directamente proporcionales a la concentración del antígeno. Otra ventaja, además de las antes mencionadas, es su sensibilidad ya que puede llegar a detectar hasta 300 ng/ml .

. . . .
. .
.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS:

EQUIPO:

Agitador magnético con magneto
Balanzas analíticas y granatarias
Centrífuga con cabezal y canisas para tubo de 50 ml
Equipo Sietz para filtración, estéril
Licuadora con vaso de 250 ó 500 ml
Liofilizadora
Potenciómetro
Placa calentadora
Baño de agua con temperatura regulada

MATERIAL:

Matraces erlenmeyer de 125, 200, 500 y 1000 ml
Vasos de precipitado de 250 y 1000 ml
Probetas de 100 y 1000 ml
Pipetas de 1 ml y 10 ml divididas 1/10
Pipetas capilares
Embudos de 6 cm de diámetro de tallo corto
Tubos de ensaye de 16 X 150
Jeringas hipodérmicas de 2 ml con agujas No. 24 de 1"
y del No. 20 de 2"
Jeringa hipodérmica de 20 ml con aguja No. 17 de 3"

Tubos de plástico para centrifuga de 50 ml
Termómetros
Frascos vial con capacidad de 10 y 50 ml
Cajas de plástico desechables de 10 cm de diámetro
Cortador de metal de 5 mm de diámetro
Tijeras de punta o rectas o bisturí
Tabla para sujetar conejos
Plantilla
Papel filtro de poro grueso
Gasa

REACTIVOS BIOLÓGICOS

Sueros de cerdo, equino y bovino
Adyuvante de Freund completo
Carnes de cerdo, equino y bovino (muestras problema)

a) REACTIVOS QUIMICOS Y SU PREPARACION:

SOLUCION DE GEL DE AGAR PURIFICADO.

Amortiguador de Michaelis 1:10	10 ml
Agua bidestilada	90 ml
Agar purum	1.5 g
Fenol en cristales	0.05 g

Disolver la mezcla anterior en un baño de agua a temperatura regulada (evitando el reiterado calentamiento).

Agregar a esta solución los cristales de fenol.

Se reparten en cantidades de 10 ml en tubos de ensaye que se guardan tapados a 4° C hasta usarlos.

AMORTIGUADOR DE MICHAELIS.

Diethyl barbiturato de sodio	2.943 g
Acetato de sodio (trihidratado)	1.943 g

Disolver en 100 ml de agua bidestilada, rógicamente hervida y enfría a temperatura ambiente.

A 8 volúmenes de ésta solución agregar 9.6 partes de agua bidestilada. Ajustar el pH con 8.2 con

HCl 0.1 N.

Diluir esta solución mezclando dos partes con una de agua destilada. La fuerza iónica de este amortiguador es de 0.1 .

SOLUCION 0.1 N DE ACIDO CLORHIDRICO (HCl)

Acido clorhídrico conc.	9 ml
Agua destilada	1 000 ml

Se disuelve el ácido en 500 ml de agua destilada. Se completa la solución con los otros 500 ml de agua destilada.

SOLUCION SALINA AMORTIGUADA CON BORATOS.

AMORTIGUADOR DE BORATOS pH; 8.4-8.5	
Acido bórico (H_3BO_3)	6.184 g
Bórax ($Na_2B_2O_7 \cdot 10 H_2O$)	9.536 g
Cloruro de sodio (NaCl)	4.384 g

Disolver en agua bidestilada cbp. 1000 ml

Preparar 8 litros de solución salina isotónica. A esta solución agregar 400 ml del amortiguador de boratos. La solución final es la solución salina amortiguada con boratos.

SOLUCION SALINA ISOTONICA.

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua bidestilada	1000 ml

Disolver el cloruro de sodio en el agua --
bidestilada.

SOLUCION 2 N DE HIDROXIDO DE SODIO (NaOH).

Hidróxido de sodio	80 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el hidróxido de sodio en el agua destilada.

SOLUCION SATURADA DE SULFATO DE AMONIO $(NH_4)_2SO_4$.-

Sulfato de amonio	535 g
Agua destilada	708 ml

Disolver el sulfato de amonio en el agua destilada.-
(debe quedar una capa de sal sin disolver).

b) REACTIVOS BIOLÓGICOS Y SU PREPARACION.

ADYUVANTE DE FREUND (COMPLETO).-

10 ml de adyuvante de Freund
40 mg de bacilos tuberculosos muertos

En una zona estéril se le adicionan al adyuvante -- los bacilos.

PREPARACION DE LOS ANTIGENOS (SUEROS HETEROLOGOS ES
TERILES DE CERDO, BOVINO Y EQUINO.)

- 1.- Mediante la jeringa de aguja del No.17 se tomó por punción venosa 40 ml de sangre de cerdo, - equino y bovino y se colocaron 20 ml en cada - tubo de centrífuga de 50 ml.
- 2.- Se dejaron coagular las sangres de las tres especies y mediante un aplicador de madera se separaron los coágulos de las paredes de los tubos. Se centrifugaron durante 30 minutos a -- 3 000 r.p.m.
- 3.- Mediante una pipeta de 10 ml con un bulbo de hule adaptado, se separaron los sobrenadantes y - se pasaron a matraces erlenmeyer de 100 ml.
- 4.- Se esterilizaron los sobrenadantes por filtración en filtro Seitz con material filtrante - EKS-1, aplicando sólo un vacío ligero, para evitar que se formara espuma en el filtrado estéril.

- 5.- Trabajando en condiciones de esterilidad, se --
comó con una pipeta de 10 ml, dividida en 1/10
estéril, cada filtrado y se colocó 1.0 ml en -
uno de los frascos vial con tapón de hule per-
forable, estéril y el resto en un segundo fras-
co.
- 6.- Se adicionó al primer frasco de cada suero ---
9.0 ml de solución salina isotónica estéril y
se mezcló. Estos antígenos tuvieron una concen-
tración de 1:10 para las primeras inyecciones -
endovenosas al conejo. El filtrado sin diluir -
de cada suero se utilizó para las otras inyecció-
nes, tanto las intramusculares como las intrave-
nosas.
- 7.- Los filtrados, tanto diluídos como concentrados,
se conservaron en refrigeración.

PREPARACION DE LOS SUEROS ANTI-BOVINO, ANTI-EQUINO Y
ANTICERDO:

- 1.- Se utilizaron dos conejos para la preparación de
cada suero anti-especie, llevándose a cabo el eg
guena de inmunización en la forma siguiente:

1er. día	0.5 ml del suero	Intramuscular
	0.5 ml adyuvante de Freund completo	
8o. día	1.0 ml suero	"
	1.0 ml Adyuvante Freund Completo	
15o. día	0.2 ml de suero diluido 1:10	endovenosa
16o. día	0.5 ml de suero diluido 1:10	"
17o. día	1.0 ml de suero diluido 1:10	"
18o. día	0.2 ml de suero	"
19o. día	0.5 ml de suero	"
20o. día	1.0 ml de suero	"

2.- Al terminar el esquema de inmunización, se dejaron descansar a los conejos una semana y se llevaron a cabo las sangrías de prueba que consistieron en tomar 2 ml de sangre por punción en la oreja, de cada uno, se dejó coagular, se separaron los sueros y en ellos se investigaron la presencia de anticuerpos por el método de Ouchterlony.

3.- Como los resultados en el primer intento dieron negativos, se procede a aplicarles 2 dosis más de suero de 3 ml cada una, a cada conejo, por vía intraperitoneal a intervalos de una semana entre la primera y la segunda.

- 4.- Se dejaron descansar a los conejos de 4 a 5 días.
- 5.- Se repitieron las sangrías de prueba y al repetirse los resultados negativos se desecharon los conejos y se comenzó de nuevo la técnica, con otros conejos.
- 6.- La investigación de anticuerpos por la técnica de Ouchterlony fue satisfactoria, después de un refuerzo (ver punto 3 de esta técnica).
- 7.- Se procedió a las sangrías de cosecha consistentes en extraer por punción cardíaca 50 ml de sangre, se colocaron en tubos de centrifuga dejando coagular la sangre y se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 30 minutos.
- 8.- Mediante el uso de pipetas se separaron los sueros y se midieron los volúmenes obtenidos, aproximadamente fueron 30 ml lo que se obtuvo de cada suero.

DOBLE INMUNODIFUSION EN PLACA (TECNICA DE OUCHTERLONY).

TECNICA:

- 1.- Se colocó una caja desechable de plástico en una superficie perfectamente nivelada, y se depositó en el fondo 10 ml de agar fundido.

- 2.- Se tapó la caja y ya solidificado el agar se -- guardó en refrigerador por 10 minutos.
- 3.- Con un cortador de 5 mm de diámetro, se practicaron cortes en la caja de acuerdo al siguiente esquema:

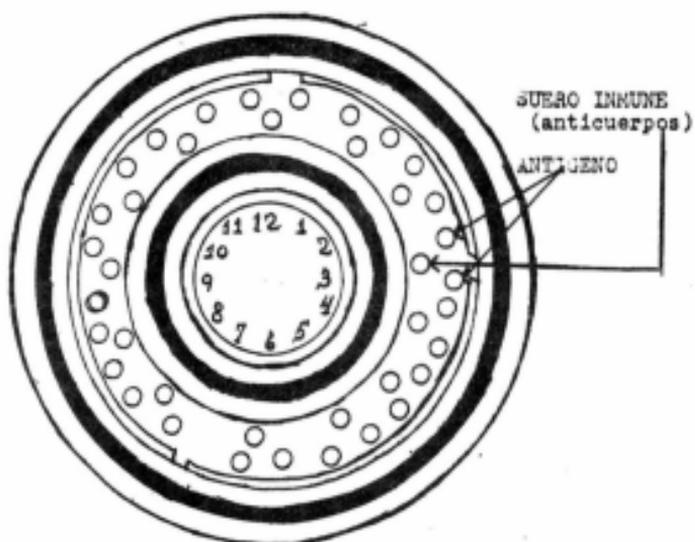


Figura 2. Placa para inmunodifusión por Técnica de Ouchterlony, donde se muestra la forma en que se hicieron los pozos y la aplicación de las muestras.

Para facilitar la ejecución de los cortes se trazó un esquema con las medidas reales en una hoja de papel milimétrico colocándola debajo de la caja con gel.

- 4.- Después de hacer los cortes se extrajo el gel de agar de los mismos, mediante un aplicador de madera con la punta rota.
- 5.- Mediante una pipeta capilar se colocó en la horadación del lado izquierdo una gota del suero que contiene los anticuerpos (suero inmune) a manera de llenar el pocito, pero sin derramar su contenido.
- 6.- En los pozos de la derecha se pusieron los antígenos.
- 7.- Se guardó la caja tapada a temperatura ambiente 24-48 horas al cabo de las cuales se leyeron los resultados. Se consideró como resultado positivo la presencia de una o varias bandas de precipitación definidas y como resultado negativo la ausencia de dichas bandas.

PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD.

- 1.- Usando la técnica de Ouchterlony se probaron --
cada suero inmune obtenido en conejo con los --
sueros de las otras especies, con el objeto de
probar si no había reacciones cruzadas, de --
acuerdo al siguiente cuadro:

ANTIGENOS (SUEROS)	ANTICUERPOS (SUEROS INMUNES)	REACCION
Equino	Anti-porcino	+
Equino	Anti-bovino	+
Porcino	Anti-equino	+
Porcino	Anti-bovino	+
Bovino	Anti-equino	+
Bovino	Anti-porcino	+

- 2.- Debido a que hubo cruzamiento entre las especies
utilizadas, se tuvieron que absorber los sueros_
inmunes para eliminar los anticuerpos comunes, ya
que la presencia de reacciones cruzadas entre -
los sueros ocasionarían errores en las determing
ciones para identificación de las especies.

ABSORCION DE LOS SUEROS ANTIESPECIE OBTENIDOS:

Una vez obtenidos los sueros anti-especie fué necesario absorberlos, es decir, hacer reaccionar el suero inmune con los sueros de las otras especies con el objeto de eliminar anticuerpos comunes ya que la presencia de éstos en los sueros inmunes causaría reacciones cruzadas.

Las reacciones cruzadas consisten en que el suero anti-especie estudiado presenta reacción inmune positiva con otra especie por la presencia de -- los anticuerpos comunes, antes mencionados, a ambas -- especies.

TECNICA:

- 1.- Se midieron partes iguales de suero anti-bovino -- obtenido de los conejos, técnica anterior, suero equino y suero porcino, se mezclaron y calentaron a 37° C., dos horas.
- 2.- Se guardó en refrigerador la mezcla anterior, durante 18 horas.
- 3.- De esta manera quedó absorbido el suero anti-bovino. La absorción de los sueros anti-equino y -- anti-porcino se realizó en la misma forma que --

el anterior, tomando como reactivos para la absorción del suero anti-equino, suero bovino y porcino y en el caso del suero anti-porcino, - se tomaron suero equino y bovino.

Posteriormente se procedió a la purificación de los sueros anti-especie absorbidos.

PURIFICACION DE LOS SUEROS ANTIESPECIE. PRECIPITACION DE LA γ GLOBULINA CON SULFATO DE AMONIO.

En este método se precipitó a la γ globulina mediante la adición de solución saturada de sulfato de amonio a tener una concentración de la mezcla de 1/3 de saturación. Esta precipitación se realizó 3 veces con lo que se logró tener a la globulina con un grado bastante alto de pureza, el sulfato de amonio se eliminó mediante diálisis contra solución salina amortiguada con boratos. El producto resultante de este método de purificación fue una mezcla de todos los anticuerpos contenidos en el suero, pero libres de las demás proteínas que constituyen el suero.

TECNICA:

- 1.- Se colocó en un vaso de precipitado de 150 ml los 50 ml de suero inmune absorbido. Se colocó el mag

neto dentro del vaso y éste sobre el agitador magnético, se ajustó la velocidad de la agitación para que no hubiera formación de espuma y se adicionó gota a gota 25 ml de solución saturada a temperatura ambiente de sulfato de amonio. Al principio el precipitado que se formó se redisolvió inmediatamente, la adición de otra gota de la misma solución se agregó hasta que el precipitado se hubo redisolto completamente. Posteriormente el precipitado fué ya persistente pero la adición de la solución de sulfato de amonio se siguió haciendo gota a gota, de lo contrario quedarían englobadas en el precipitado otras proteínas además de la Yglobulina.

- 2.- Cuando se terminó de adicionar la solución de sulfato de amonio se ajustó el pH de la suspensión a 7.8 mediante la adición de solución de NaOH 2 N.
- 3.- Se continuó con la agitación magnética durante 2 ó 3 horas para eliminar mecánicamente las proteínas que hubieran quedado englobadas en el precipitado de globulina.
- 4.- Se centrifugó la suspensión a temperatura ambiente durante 30 minutos a 3 000 r.p.m.

- 5.- Se decantó y desechó el sobrenadante. Se disolvió el precipitado en el volumen original -- (50 ml) de solución salina isotónica.
- 6.- La purificación de la γ globulina se logró mediante dos precipitaciones más; para la segunda se repitieron los pasos del 1 al 5 y para la tercera se repitieron los pasos 1 y 4.
- 7.- Se disolvió el precipitado obtenido en la tercera precipitación en la mitad del volumen original (25 ml) de solución amortiguada con boratos.
- 8.- Se eliminó el sulfato de amonio mediante diálisis contra solución salina amortiguada con boratos y se cambió esta solución tres veces al día durante 4 días hasta que el dializado dió negativa la reacción de sulfatos.
- 9.- Al término de la diálisis se pasó el dializado a un tubo de centrífuga de plástico, de 50 ml, y se centrifugó a 4° C. durante 30 minutos a --- 3 000 r.p.m. Esta centrifugación tiene como objeto eliminar algunas partículas insolubles que se formaron durante la diálisis. La solución resultante presentó sólo una ligera opalescencia.

10.- A la Yglobulina purificada obtenida se liofili
zó para concentrarla.

Nota:- Este método se llevó a cabo para los tres sug
ros antiespecie obtenidos.

LIOFILIZACION DE LOS SUEROS ANTIESPECIE ABSORBIDOS Y
PURIFICADOS.

TECNICA:

- 1.- Se midieron volúmenes iguales de los sueros (5 ml)
y se pasaron a frascos vial.
- 2.- Se congelaron los sueros en la mezcla hielo seco-
acetona.
La congelación se hizo en forma de capa.
- 3.- Se conectaron los frascos a la liofilizadora y se
procedió a liofilizarlos, durante 12 horas aproxí
madamente.

Una vez liofilizados se procedió a rehidra
tar 3 frascos, uno de cada suero inmune, en la mínima
cantidad de agua con el fin de probar su potencia --
(para fines de este trabajo, la potencia mínima que -
se requirió fué de 1: 1 000).

Ya rehidratados los sueros, se les adicionó conservador.

PRUEBA DE POTENCIA DE LOS SUEROS ANTIESPECIE POR
TECNICA DE OUCHTERLONY.

TECNICA:

- 1.- Utilizando la técnica de Ouchterlony, se probaron los sueros antiespecie con sus respectivos sueros diluidos 1:10, 1:100, 1:1 000.
- 2.- Los sueros dieron reacción positiva con los sueros respectivos.

Los sueros entonces ya se pudieron ocupar para los fines determinados para este trabajo.

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS DE TEJIDO MUSCULAR DE
ORIGEN EQUINO, BOVINO Y PORCINO.

TECNICA:

- 1.- Mediante un cuchillo se eliminó toda la grasa y aponeurosis de un trozo de tejido muscular de cada una de las tres especies.

- 2.- Se cortaron trozos de 20 gramos.
- 3.- (Paso exclusivo para la carne tratada con ablandador y calor: Los trozos de 20 gramos se rebagan finamente y se espolvorearon con ablandador, ver técnica posterior; los pasos siguientes son comunes para los dos tratamientos, con calor o con calor y ablandador).
- 4.- Cada trozo, por separado, se pasó a un vaso de licuadora. Se adicionó solución salina isotónica a tener la proporción de una parte de tejido muscular por dos de solución y se trituró durante unos 5 minutos, hasta que el tejido estuviera bien triturado.
- 5.- Se pasó el tejido triturado a un matraz erlenmeyer de 125 ml, se dejó en refrigeración durante 24 horas con el objeto de extraer las proteínas.
- 6.- Se filtró la mezcla en un embudo conteniendo 3 capas de gasa, exprimiendo ésta al final, esto se hizo con el fin de eliminar las partículas gruesas y en seguida se filtró por papel grueso.
- 7.- El filtrado obtenido se trató con calor (ver técnica siguiente).



- 8.- Se procedió a filtrar nuevamente el filtrado -
tratado por papel grueso.
- 9.- Con el filtrado obtenido se realizaron las prue-
bas de Cuchterlony.
- 10.- Nota: al mismo tiempo se preparó un filtrado teg-
tigo de la misma forma que el filtrado problema;
pero éste sin tratar (con calor o con ablandado-
res y calor).

ESTUDIO DE LAS DIFERENTES TEMPERATURAS SOBRE EL TE-
JIDO MUSCULAR DE LAS CARNES DE PUERCO, EQUINO Y BO-
VINO.

TECNICA:

- 1.- Una vez obtenidos los filtrados, se procedió a -
tratarlos con diferentes temperaturas conforme -
al siguiente cuadro:

PORCION (Nos.)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min.)
1 (testigo)	--	--
2	50	30
3	60	30
4	60	60
5	70	30
6	70	60
7	70	75
8	70	90
9	80	30

- 2.- Después del tratamiento anterior se siguió con la
técnica anterior de preparación de extractos.

- 3.- El paso 9 se llevó a cabo 2 veces con los mismos filtrados con el objeto de que el resultado obtenido fuera más confiable.
- 4.- El tratamiento a diferentes temperaturas (ver cuadro anterior) se llevó a cabo por segunda vez para corroborar resultados con el primero.

USO DE LOS ABLANDADORES Y ACCION DE ESTOS SOBRE LA CARNE.

TECNICA:

- 1.- Se cortaron pequeños trozos de carne de 20 gramos cada uno, se rebanaron finamente.
- 2.- A cada fina rebanada se le espolvoreó ablandador y se le dejó actuar 10 minutos.
- 3.- Se lavaron perfectamente al chorro de la llave durante 15 minutos, aproximadamente.
- 4.- De aquí en adelante, se siguieron todos los pasos de la técnica anterior (Estudio de las diferentes temperaturas sobre el tejido muscular de las carnes de puerco, equino y bovino.)

Nota:- Es importante hacer notar que las tres técni-

cas anteriores se llevaron a cabo con las tres especies antes mencionadas: equino , porcino y bovino.

• • • • •
• •
•

CAPITULO III

RESULTADOS

Y DISCUSION.

RESULTADOS:

a) EFFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TEJIDO MUSCULAR
DE ORIGEN EQUINO, BOVINO Y PORCINO:

TABLA NO. 1

PORCIONES (Nos.)	TEMPERATURA (° C)	TIEMPO (Min.)	RESULTADOS		
			EQUINO	BOVINO	PORCINO
1	--	--	+	+	+
2	--	--	+	+	+
3	50	30	+	+	+
4	60	60	+	+	+
5	70	30	+	-	+
6	70	60	+	-	-
7	70	75	-	-	-
8	70	90	-	-	-
9	80	30	-	-	-

b) EFFECTOS DE LOS ABLANDADORES DE CARNE SOBRE EL
TEJIDO MUSCULAR DE ORIGEN EQUINO, BOVINO Y PORCINO.

TABLA NO. 2

PORCIONES (NOS.)	TEMPERATURA (°C) ^a	TIEMPO (Min)	RESULTADOS		
			EQUINO	BOVINO	PORCINO
1	--	--	+	+	+
2	50	30	+	+	+
3	60	30	-	+	+
4	60	60	-	+	-
5	70	30	-	-	-
6	70	60	-	-	-
7	70	75	-	-	-
8	70	90	-	-	-
9	80	30	-	-	-

D I S C U S I O N .

- 1.- La temperatura desempeña un importante papel en la especificidad inmunológica de las especies , de cerdo, bovino y equino que fueron las estudiadas en el presente trabajo, observando que - la especie equina tiene una mayor resistencia a la temperatura que la de cerdo o bovino ya que la reacción en la especie equina dió positiva - hasta 70°C, 60 minutos; siguiendo la porcina, - 70° C, 30 minutos, siendo la especie bovina la más sensible a los efectos de la temperatura ya que sólo hasta 60° C, 60 minutos; dió positiva la reacción.

- 2.- El efecto de los ablandadores también es un factor importante sobre la especificidad inmunológica de las especies.

La acción de éstos es mayor en el caso de la especie equina ya que sólo hasta 50°C, 30 minutos dió positiva la reacción de inmunoprecipitación; la especie porcina hasta 60° C, 30 minutos y la menos sensible a la acción de los ablandadores - fué la bovina donde la reacción fué positiva a - 60°C, 60 minutos.

3.- La acción de los ablandadores a distintas temperaturas sobre la especie bovina no tuvo efecto ya que los resultados fueron los mismos con la acción de la temperatura, sola, dando en -- los dos casos la reacción positiva hasta -- 60° C, 60 minutos.

CAPITULO IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN.

Para poder estudiar cómo afectan los -- procesos de cocción y el tratamiento de ablandadores la identificación de diversas especies animales tales como bovina, equina y porcina, por el método de inmunoprecipitación en gel (Técnica de Ouchterlony), fue necesario preparar los sueros inmunes de las tres especies antes mencionadas y los extractos de las mismas especies. Los extractos tratados con diferentes temperaturas y otros con ablandadores y diferentes temperaturas.

Para la preparación de los sueros inmunes adecuados para poder llevar a cabo satisfactoriamente las reacciones de inmunoprecipitación se tuvieron que seguir los siguientes pasos:

- 1.- Esterilización de los sueros de cerdo, equino y bovino, que constituyeron los antígenos.
- 2.- Se inmunizaron a conejos con los antígenos; usando dos conejos para cada suero. Debido a que la reacción de identificación de anticuerpos dió negativa al final del esquema, fué necesario dar refuerzos; pero la reacción aún fue negativa, por los que se desecharon los conejos y se volvió a llevar a ca-

bo el esquema de inmunización con nuevos conejos, al final del cual las reacciones de identificación de anticuerpos fueron positivas. Se procedió a sangrar a los conejos para obtener los sueros inmunes.

- 3.- Se llevaron a cabo pruebas de especificidad, detectando anticuerpos comunes en los sueros inmunes obtenidos.
- 4.- Posteriormente se absorbieron los sueros inmunes, haciendo reaccionar el suero inmune con los sueros de las otras especies, con el objeto de eliminar los anticuerpos comunes a ambas especies.
- 5.- Se purificaron los sueros por la técnica de precipitación de la γ globulina con sulfato de amonio.
- 6.- Se liofilizaron para concentrar los anticuerpos.
- 7.- Se midió potencia de cada suero inmune, considerando como mínima una potencia de 1: 1 000.

La identificación, especificidad, pureza y potencia de los sueros inmunes se realizaron por la técnica de Ouchterlony de inmunodifusión en gel.

De esta manera, se tuvieron listos los sueros inmunes (anticuerpos).

Para la preparación de los extractos de carne (antígenos) se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Se tomaron porciones pequeñas de tejido muscular de cada especie animal. Se molieron con solución salina isotónica. Se dejaron reposar en refrigerador 24 horas.
- 2.- Cada uno de estos extractos se trataron con diferentes temperaturas.
- 3.- Otras porciones de carne se espolvorearon con -
ablandador, dejándolo actuar por un determinado tiempo y a diferentes temperaturas, se enjuagaron y después se siguió la misma técnica que para las otras porciones.
- 4.- Cada muestra tratada se hizo reaccionar con el -
suero inmune (preparado anteriormente) por el método de inmunoprecipitación en gel, técnica de -
Ouchterlony, haciendo las pruebas por duplicado, considerando la presencia de una o varias bandas de precipitación definidas como resultado positivo y la ausencia de éstas, resultado negativo. -
Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En la especie equina, la prueba de inmunoprecipitación dió positiva debido a la acción de la temperatura a 70° C, durante 60 minutos; la reacción dió positiva en la bovina hasta 60° C, 60 minutos y por último, la porcina dió positiva hasta 70° C, 30 minutos. Los resultados debido al efecto de los ablandadores de carne sobre el tejido de las diferentes especies dió como sigue: la equina dió reacción positiva hasta 50° C, 30 minutos; la bovina a 60° C, 60 minutos y la porcina hasta 60° C, 30 minutos.

C O N C L U S I O N E S :

1.- La técnica de inmunoprecipitación en gel, técnica de Ouchterlony, entre otras técnicas inmunológicas, es una ayuda valiosa en la identificación de especies animales; pero debido a que la temperatura y los ablandadores tienen un efecto importante sobre su especificidad será necesario tomarlos muy en cuenta, siempre que se desee identificar las especies:

- a) De este estudio se desprende que las determinantes antigénicas de la carne equina son - inhibidas si el producto se somete a 70° C , 75 minutos; la bovina a 70° C, durante 30 minutos y la porcina a 70° C, durante 60 minutos.
- b) Por lo que respecta a los ablandadores se ve claramente que aceleran la desnaturalización de las proteínas; así la carne equina sometida a 60° C, durante 30 minutos y la porcina a 60° C, durante 60 minutos ya no dieron reacción positiva. En tanto que no tuvieron efecto sobre la desnaturalización de la carne bovina.

- 2.- La identificación de las especies con sueros - preparados como aquí se describe, se deberá llevar a cabo cuando las carnes estén crudas, no así cuando estén cocidas ya que la reacción dará negativa. La carne podrá proceder de embutidos u otros productos.
- 3.- Un estudio posterior podría ser la investigación de especificidad de las carnes asadas o fritas - donde la acción de la temperatura no es uniforme pudiendo haber partes crudas o semi-crudas, sobre todo en el interior, cuando los trozos son gruesos, y que por lo tanto pudieran dar reacciones positivas con sus respectivos anticuerpos. - Así como también el estudio de carnes cocidas empleando sueros inmunes obtenidos con antígenos sometidos a las mismas temperaturas para evaluar su eficacia. El presente trabajo sentaría las bases de estos estudios posteriores.

...

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA :

- 1.- Allison, D.: A mechanism for the generation of self-tolerance. *J. Theor Biol* 54 : 2. 1975 (201).
- 2.- Barret, J.: *Inmunología. Interamericana. México, 1972* (60, 84, 99).
- 3.- Boyd, W.: *Fundamentos de Inmunología. Tercera edición. Universitaria. Argentina, 1968* (61,134).
- 4.- Boyer, P.: *The Enzymes. Tercera edición. Vol. 3. Academic Press, New York and London, 1971* (171).
- 5.- Carpenter, P.: *Inmunología y Serología. La Prensa Médica Mexicana. México, 1972* (125,102,141).
- 6.- Cushing, J.: *Principios de Inmunología. Acribia. España, 1960* (82).
- 7.- Elmslie, W. P.: *Digestibility of Proteins. J. -- Assoc. Offic. Agr. Chemists, 41* (233).
- 8.- *Etude bio clinique du procede d' electroimmuno-diffusion pour la recherche del ' alphafoetoprotéine sérique. Ann Biol Clin* 33 : 1. 1975 (29).
- 9.- Fiyiwara, M.: *Mechanism of termination of immunological tolerance. Immunology, 29* : 6.1975 (1171)

- 10.- Folleto "Placas para inmunodifusión Behring".
- 11.- Gordon, B.: Lo esencial de la Inmunología. El Manual Moderno. México, 1973 (76).
- 12.- Handbook of Biochemistry selected data for Molecular Biology. Second edition. C.R. Press. - Ohio, 1968 (C-142).
- 13.- Harper, H.: Manual de Química Fisiológica. Tercera edición. El Manual Moderno, S.A. México, - 1971 (49, 54, 154).
- 14.- Harrow, B.: Textbook of Biochemistry. Tercera edición. W. B. Saunders Company. E.E.U.U., -- 1973 (100).
- 15.- Miller, S.: Effect of tolerance and of antibody mediante immune suppression on the avidity of - the cellular and humoral immune response. Cell Immunol 6 : 1. 1973. (59)
- 16.- Humphrey, J.: Immunology for Students. Tercera edición. Oxford. Blackwell Scientific, 1970 (234)
- 17.- Kaplan, A. M.: Cellular aspects of tolerance. I Parameters of tolerance induction in T cells of spleen and thymus. Cell Immunol 6 : 3; 1973 (429)

- 18.- Kaplan, A. M.: Cellular aspects of tolerance.
II Unresponsiveness of B cells. Cell Immunol
p : 3. 1973 (442)
- 19.- Kabat, E.: Inmunología experimental. Segunda
edición. La Prensa Mexicana. México, 1968 (18)
- 20.- Laguna, J.: Bioquímica. La Prensa Médica Mexi-
cana. México, 1960 (228, 333, 507).
- 21.- Meyer, H.: Food Chemistry. Reinhold Pub. Corpo.
New York, 1960 (171)
- 22.- Pelczar and Reid: Microbiología. Segunda edi-
ción. Mc Grawhill. Madrid, 1966 (376)
- 23.- Roitt, I.: Essencial Immunology. Black well ---
Scientific Publications. Great Britain, 1971 -
(57).
- 24.- Symposium on food enzymes. Oregon State Collage.
1959. The Avi Publishing Company, Inc. 1960.
- 25.- Vogel, A.: Química Analítica Cuantitativa. Vol.
1. Segunda Edición. Kapelusz. Argentina, 1960 -
(320)
- 26.- White, A.: Principles Of Biochemistry. Segunda
edición. Mc Graw-hill Book Co. New York, 1959
(228).