

51
2e;



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"SINTESIS DE CONJUGADOS ESTEROIDE-PROTEINA PARA
LA INDUCCION DE ANTISUEROS POLICLONALES"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
DAVID ROBERTO CHAVIRA RAMIREZ

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1.-	INTRODUCCION:	1
	I) FORMACION DE ANTICUERPOS Y RESPUESTA INMUNOLOGICA EN FORMA NATURAL.	
	A.-RESISTENCIA NATURAL E INMUNIDAD ADQUIRIDA	
	B.-CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA	
	C.-INMUNOGLOBULINAS	
	II) PRODUCCION DE ANTICUERPOS CON FINES TERAPEUTICOS.	
	A.-VACUNAS SINTETICAS	
	B.- ACTIVADORES	
	C.-IDENTIFICACION DE COMPLEJOS INMUNITARIOS	
	III) SINTESIS DE INMUNOGENOS.	
	A.-SINTESIS DE CONJUGADOS	
2.-	JUSTIFICACION	23
3.-	OBJETIVOS	24
4.-	MATERIAL Y METODOS	25
5.-	RESULTADOS	29
6.-	DISCUSION	33
7.-	CONCLUSIONES	44
8.-	BIBLIOGRAFIA	46
9.-	APENDICES	50

1.- INTRODUCCION

Desde los inicios del hombre, siempre ha tratado de explicarse su propia naturaleza, a través de los años y con los conocimientos adquiridos por sus observaciones, creó reglas que fueron transmitiendo de generación en generación, con el enriquecimiento del conocimiento dichas reglas al pasar del tiempo, formaron las ciencias que rigen el saber y conducta humana actual. Dentro de todos estos conocimientos generados, el hombre ha ido progresando y respondiendo a sus preguntas cada vez más complejas, acerca de su comportamiento y del medio que lo rodea así como la adaptación de su cuerpo al mismo, adentrándose con el pasar del tiempo en procesos cada vez más complejos. Es así que de las ciencias básicas creadas (Biología, Química, Física, Matemáticas) se derivan ramas que auxilian al hombre en su súbito progreso de conocimiento sobre el mismo, dentro de estas ramas de la ciencia se encuentran las que ayudan al hombre a conocer su cuerpo más íntimamente como pueden ser la Bioquímica, Fisiología, e Inmunología entre otras. Estos conocimientos ya más enfocados y depurados, son los que ayudan en la elaboración del proyecto de trabajo, siendo los conocimientos de la Inmunología las bases sobre las que se elabora el trabajo. Se sabe desde tiempos inmemorables, que muchas enfermedades que hoy conocemos como transmisibles como las virales de la infancia (sarampión, varicela y parotiditis, entre otras), no reaparecen en aquellos individuos que ya las han padecido. Tucídides hace referencia a estos hechos al describir la plaga que azotó Atenas en el año 429 a.c. donde elogia la devoción con que aquellas personas que habiéndose recuperado del mal, atendían a los enfermos sin riesgo de volverlo a contraer. Parece ser que el primer trabajo de mayor interés en la Inmunología y desde luego en Virología, data del 14 de mayo de 1796 con el famoso experimento en el que Jenner inoculó la "materia" en una persona. Sin embargo, el

primer inmunólogo experimental fue Louis Pasteur, quien inició sus estudios con el cólera, continuó con el antrax y alcanzó la fama con el estudio de la Hidrofobia (rabia). Paul Ehrlich, contemporáneo de Pasteur, hablaba ya de receptores de membrana (concepto muy en boga en nuestros días) y planteó la teoría de la formación de anticuerpos. Los últimos 30 años del siglo XVIII son considerados la época de oro de la Inmunología (1).

A principios del siglo actual, Karl Landsteiner caracterizó los grupos sanguíneos que hoy conocemos como "A", "B" y "O", después describió los grupos sanguíneos M y N y junto con Levine en 1940, los grupos Rh. Landsteiner fue quien introdujo el término de "hapteno", para designar así a moléculas asociadas a proteínas capaces de inducir la formación de anticuerpos. Los hechos antes descritos a manera breve, forman parte de lo que hoy en día se conoce como Inmunidad Humoral. Existen propuestos a la fecha dos mecanismos que producen anticuerpos en el organismo, uno es el mecanismo Humoral y otro el mecanismo Celular, Elie Metchnikoff fue el pionero de la inmunidad Celular, estudió la fagocitosis y acuñó el término de macrófago, sostuvo controversias con los partidarios de la inmunidad Humoral, hasta que Paul Wright concilió las dos teorías demostrándolas a ambas en procesos inmunitarios. Roberto Koch describió el fenómeno que lleva su nombre, teniendo que transcurrir 40 ó 50 años antes de comprender que el fenómeno de Koch es de origen celular, esto fue debido a que Landsteiner y Chase continuaron con sus estudios demostrando que este tipo de inmunidad podía ser transferido a otro individuo por medio de células. En la primera mitad del presente siglo se sabía que los mediadores de la inmunidad Celular eran distintos de los de la inmunidad Humoral; sin embargo, los primeros no habían sido caracterizados, sino hasta que Bloom, Bennett y David en 1966 describieron el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (FIM) y el factor reactivo en la piel (FRP), por otro lado Porter en 1957 ya había propuesto la estructura de las

globulinas. En el decenio de 1960 fue notorio el énfasis que se dio a los estudios sobre la diferenciación de los linfocitos en T y B, al igual que la función que juega el timo en este proceso, mientras en el decenio de 1970, las investigaciones estuvieron orientadas hacia la inmunogenética de los antígenos y su histocompatibilidad, así como a la producción de inmunoglobulinas y el reconocimiento de los circuitos inmunológicos (2), en la década recién pasada (1980), las investigaciones sobre la caracterización de las linfocinas así como la obtención de vacunas sintéticas, fue lo que acaparó la mayor atención de la Inmunología (3). Gracias al avance y conjunción de las ciencias se han elucidado muchos fenómenos inmunológicos que se dan a lugar en los organismos vivos. Y es que de esta forma el presente trabajo aprovecha los avances de esta ciencia, proyectando sus objetivos para obtener un mejor resultado. A continuación se da una reseña de los conocimientos y avances que se tomaron en cuenta para diseñar los objetivos del trabajo.

I.- FORMACION DE ANTICUERPOS Y RESPUESTA INMUNOLOGICA DE FORMA NATURAL.

La respuesta inmunológica en un organismo, es dada de dos formas: "humoral" y "celular".

RESPUESTA HUMORAL.

La respuesta humoral está dada para ciertos antígenos en donde los encargados del mecanismo de respuesta son los linfocitos (por la formación de anticuerpos por medio de células T y B), se ha demostrado en forma definitiva que las células "T" no secretan anticuerpos en la

respuesta humoral, las células formadoras de anticuerpos fueron detectadas in vitro por la técnica de Jerne, y la actividad de estas células solo puede ser inhibida mediante el uso de suero anticélulas "B" y no por el suero anticélulas "T"; así el linfocito "B" se transforma en célula productora de anticuerpos (célula plasmática) como consecuencia de la estimulación antigénica, mientras que el mecanismo de cooperación entre las células "T" y "B" comprenden además al macrófago y al antígeno (6).

Se sabe que el antígeno debe de llenar ciertos requisitos para estimular en forma directa al linfocito "B", y el antígeno que no sea capaz de hacerlo directamente, puede desatar la función cooperativa entre las células T y B por la existencia de otros determinantes (acarreadores) dentro del complejo de cooperatividad T-B en el cual el reconocimiento está a cargo de las células T (H) de ayuda, la cual proporciona un estímulo adicional al linfocito "B" que responde a una serie de mediadores o linfocinas liberadas por T (interleucina IL-2, factor de crecimiento de células B en ingles siglas BCGF y otras), pero para realizar dicha liberación la célula T necesita una estimulación de la célula accesoria (Macrófago) en forma de IL-1 (interleucina)(3).

RESPUESTA CELULAR.

El desarrollo de la respuesta inmunitaria celular está dirigida por lo general contra organismos intracelulares, este tipo de respuesta es función principal del linfocito "T", que a su vez es también importante en la destrucción de células anormales que pudieran convertirse en tumores, así como en el rechazo de transplantes, en este tipo de respuesta inmunitaria no participan los linfocitos "B" (5). La inmunidad mediada por células puede ser transferida por medio de linfocitos (Factor de transferencia), es necesario que el antígeno sea reconocido y presentado en forma especial a el linfocito "T", labor que lleva acabo el macrófago, con la cual

al recibir la señal de estímulo el linfocito "T" inicia un proceso de diferenciación, transformándose en una célula blástica, desatando una gran actividad proliferativa, muchas de estas células se especializan en la producción de factores solubles biológicamente activos (linfocinas) las cuales modulan la actividad de otras células (macrófagos y monocitos) (4). Otro grupo de las mencionadas células adquiere una actividad citotóxica, capaz de destruir células infectadas, las cuales exhiben en su superficie determinantes antigénicos propios del agente infeccioso o que muestran alteraciones de membrana reconocidas por los linfocitos "T" activados. Por último en estas células blásticas existen unas que no asumen ninguna de las dos actividades mencionadas, pero permanecen en el organismo como células de memoria (7).

A.- "RESISTENCIA NATURAL" E "INMUNIDAD ADQUIRIDA".

Así tenemos que la capacidad de un individuo para afrontar y combatir de manera espontánea microorganismos real o potencialmente patógenos, con los cuales nunca había estado en contacto y a los que está expuesto de manera cotidiana se llama "resistencia natural" la cual consiste en la acción combinada de una serie de eventos y factores innatos del individuo, cuya efectividad está determinada genéticamente, caracterizándose, además, por tener un efecto inespecífico; esto es, que su acción está dirigida a cualquier antígeno extraño, para este efecto, participan las barreras tegumentarias (piel, mucosas) y fisiológicas, así como procesos fagocíticos inespecíficos, el complemento y otros factores humorales, mientras que el funcionamiento de estos se ve influido a la vez por factores intrínsecos del huésped (como su estado nutricional, edad, y balance hormonal) o ambientales (como las radiaciones ionizantes) esta resistencia natural puede ser absoluta o relativa (3).

La sangre y otros líquidos tisulares no permiten la implantación de microorganismos debido

a las sustancias antimicrobianas que normalmente contienen. Por ejemplo la enzima mucolítica lisozima es una proteína básica con un alto contenido de arginina que actúa a pH de 3 a 6, su función es la degradación de los aminopolisacáridos de la pared celular, provocando la lisis bacteriana. Se ha observado que los polipéptidos básicos están contenidos en los líquidos corporales de los animales resistentes al ántrax; estos polipéptidos son ricos en lisina y al combinarse con la lisozima y la protamina a pH elevado, atacan la pared celular y desintegran a las bacterias (8).

Los interferones son grupos de proteínas que impiden la replicación viral y participan en la regulación de la respuesta inmunitaria, se unen a la membrana de la célula blanco a través de receptores, ya en el interior, estimulan la producción de dos enzimas, una de ellas es la 2-5 oligoadenilatosintetasa que actúa sobre el ATP, formando un polímero de adenilfosfato, el cual activa a su vez una endoribonucleasa celular que inhibe la producción del RNA viral. La otra enzima es una cinasa activada por la unión de un RNA, ésta inhibe la síntesis de proteínas virales e impide la actividad del factor de iniciación. Una de las propiedades del interferon es la activación de las células asesinas naturales (NK, del inglés, natural killer).

El sistema del complemento tiene una participación decisiva en la resistencia natural, ya que puede ser activado de manera espontánea por varios microorganismos a través de la vía alterna, dando como resultado la lisis bacteriana, después algunos de sus componentes causan opsonización y otros activan la quimiotaxia (9). La capacidad de fagocitar es sin duda uno de los logros más exitosos de las células, las células fagocíticas se han dividido en micrófagos y macrófagos, los primeros comprenden a los polimorfonucleares, células sanguíneas de origen mielóide provenientes directamente de la médula ósea. Los macrófagos se derivan de células mesenquimatosas indiferenciadas, se localizan fijos en los tejidos y forman parte del sistema

fagocítico mononuclear. La función de los fagocitos en la resistencia natural es atrapar partículas, material soluble y microorganismos vivos o muertos que penetran en los tejidos, éstos materiales después de ser englobados, son digeridos. Los microfagos son los primeros en acudir a sitios infectados, a través de las paredes capilares adyacentes, allí fagocitan con avidez, sin embargo son células relativamente frágiles, y el ácido que se acumula en el área de inflamación en ocasiones los destruye. En cambio, los macrófagos llegan con lentitud, pero son elementos que fagocitan no solo material extraño sino también leucocitos muertos y otros detritus celulares, además de tener la capacidad de dividirse *in situ*, lo que permite la acumulación de estos en el área problema. Además, llegan a formar localmente células gigantes como resultado de la fusión de células individuales o de la división nuclear, comparados con los neutrófilos polimorfonucleares, su capacidad fagocítica es mucho mayor (10).

INMUNIDAD ADQUIRIDA: La respuesta inmunitaria es heterogénea, es decir, está dirigida a diferentes porciones de la molécula de manera que se producen tantas células efectoras, anticuerpos y células de memoria específicas como determinantes antigénicos contenga el antígeno, este no es un fenómeno inato como la resistencia natural, sino un proceso elaborado que se adquiere poco a poco a partir del momento en que el antígeno establece contacto con las células adecuadas (11). Cuando la respuesta inmunitaria es inducida por una infección clínica o subclínica, por la aplicación de una inyección con fines terapéuticos de microorganismos vivos, muertos o de sus extractos antigénicos (vacunas), por la absorción de sus productos (toxinas), o por material antigénico derivado de éstos (toxoides), se dice que la inmunidad es adquirida activamente. Esta respuesta se da con lentitud (días o semanas) teniendo la ventaja de persistir por largo tiempo, debido a que sus células han tenido un aprendizaje de reconocimiento y respuesta contra ese antígeno. La inmunidad también puede ser proporcionada

artificialmente por la transferencia de células sensibilizadas (adoptiva) o de anticuerpos (pasiva) provenientes de un individuo inmune. En ambos casos se dice que la inmunidad es adquirida en forma pasiva, ya que el huésped no desarrolla mecanismo alguno, sólo es receptor de productos ya elaborados, la inmunidad pasiva demuestra su efecto protector inmediatamente después de la administración del anticuerpo, pero su efecto es de corta duración, uno a seis meses ya que el material transferido es desechado por el metabolismo (5). Estos dos procesos importantes tienen características propias que los hacen diferentes, la resistencia natural se caracteriza por ser innata, inespecífica y genéticamente determinada, mientras que la respuesta inmunitaria se distingue por tener memoria y ser inducida, además de ser específica, heterogénea y transferible (3).

B.- CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA.

A través de la investigación conjunta de la ciencia se ha llegado a establecer las vías de la respuesta inmune, reconociéndose los tipos celulares que intervienen en ella, como ya se ha dicho las dos principales clases de células mononucleares que intervienen en los procesos inmunitarios son los linfocitos y los macrófagos (9). La inmunidad Celular desempeña una función crucial en la resistencia a patógenos intracelulares, como son ciertas bacterias, hongos, protozoarios y virus. El macrófago está considerado como una pieza fundamental en contra de algunos de éstos patógenos. El crecimiento de dichos microorganismos no se detiene por el simple hecho de ser fagocitados; se necesitan otros mecanismos adicionales que propician la activación y confluencia de fagocitosis hacia el foco de infección para inhibir su multiplicación y diseminación (7). Es precisamente el linfocito T el que activa el sistema fagocítico mononuclear que por último se encarga de destruir al microorganismo agresor (6).

C.- INMUNOGLOBULINAS.

Las inmunoglobulinas son moléculas proteicas que tienen actividad de anticuerpo, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con las sustancias que indujeron su formación (antígenos). La definición de la OMS es: "Las inmunoglobulinas son proteínas de origen animal capacitadas con actividad de anticuerpo y ciertas proteínas relacionadas con ellas por estructura química y en consecuencia con especificidad antigénica" (13).

Las inmunoglobulinas son glucoproteínas compuestas de 82-96% de polipéptidos y de 4-18% de carbohidratos el componente polipeptídico posee casi todas las propiedades biológicas asociadas con las moléculas de los anticuerpos (14), las inmunoglobulinas tienen una unidad básica llamada "monómero", la cuál comprende 4 cadenas polipeptídicas idénticas, un par con un peso molecular más elevado designadas como cadenas H (heavy) y las de bajo peso molecular L (light), cada cadena contiene una porción amino terminal la región variable (V), y una porción carboxilo terminal, la región constante (C), las cadenas polipeptídicas no existen tridimensionalmente como secuencias lineales de aminoácidos, sino que están plegadas por enlaces disulfuro en regiones globulares llamadas dominios los cuales en las cadenas H se designan VH y CH 1-CH 4, así como en las cadenas L se designan VL y CL., en las cadenas L se han encontrado dos tipos de cadena kappa y lambda sobre la base de los determinantes antigénicos, mientras que en las cadenas H se ha encontrado 4 subtipos de cadena lambda (15). Existen cinco clases de inmunoglobulinas designadas IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

De estos 5 tipos de Inmunoglobulinas la IgG es la responsable de iniciar la respuesta de formación de anticuerpos. La digestión de una molécula de IgG por la enzima papaína produce dos fragmentos Fab (fijadores de antígeno, antigen-binding) y un fragmento Fc (cristalizable), en las cadenas H entre el primer y el segundo dominio de la región C se constituye la región de

la bisagra que es la más flexible y expuesta a enzimas y a sustancias químicas, así mismo la digestión de una molécula de IgG por la enzima pepsina produce una molécula de $F(ab)''_2$ y péptidos pequeños, esta molécula está integrada por dos unidades de Fab y la región de la bisagra con enlaces disulfuro intercadena H, dado que la pepsina desdobla la molécula de IgG sobre el lado del carboxilo terminal (16). El análisis genético de las inmunoglobulinas en diversas especies animales y en el hombre, ha puesto de manifiesto tres tipos de marcadores antigénicos en sus cadenas:

- 1.- **Alotipos.** Constituyen variables de las inmunoglobulinas que exhiben un patrón mendeliano de segregación. Estas inmunoglobulinas con diferencias antigénicas se encuentran en diferentes individuos de la misma especie, los cambios en aminoácidos que determinan la alopatía se localizan por lo general en la región C.
- 2.- **Isotipos.** Son determinantes antigénicos que caracterizan cada clase y subclase de cadena pesada, cada tipo y subtipo de cadena ligera, los anticuerpos específicos contra un isotipo se obtienen por inmunización heteróloga. En el hombre se ha descrito cuatro variantes en la región C lambda.
- 3.- **Idiotipos.** Determinantes antigénicos que distinguen un dominio V de otro, generalmente se obtienen por inmunización homóloga (17).

FORMACION DE UN ANTICUERPO

Después de la estimulación de una célula B por un antígeno, llegan a ocurrir mutaciones durante la selección clonal, en algún momento no definido aún en forma precisa, aunque relativamente temprano de la ontogenia de la célula B, se llevan a cabo rearrregios moleculares en el DNA de los cromosomas codificadores de los polipéptidos que constituyen la molécula del

anticuerpo, de manera que segmentos del DNA, alguna vez separados por un amplio margen uno del otro, son ahora reunidos. El mRNA resultante es diseñado después por un proceso de corte y unión ("splicing") y traducido en un producto polipeptídico que al ensamblarse es anclado a la membrana plasmática o secretado, dando a lugar a un rearrreglo somático de los genes de inmunoglobulinas (18).

Durante la ontogenia de la célula B, se observa primero la producción de cadenas α presentes en el citoplasma, que después se expresan en la membrana plasmática como IgM. Una célula B puede tener en superficie IgM e IgD con una especificidad determinada.

Todo parece indicar que cuando el linfocito se pone en contacto con el antígeno, es estimulado a proliferar y diferenciarse, expresando una de las otras clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgE) en la superficie o secretando anticuerpos de esta nueva clase de globulina en cantidades elevadas (células plasmáticas) (19).

II. PRODUCCION DE ANTICUERPOS CON FINES TERAPEUTICOS

Utilizando las características de los elementos de la respuesta inmunológica el hombre ha hecho uso de ésta con fines terapéuticos, el principal elemento que ha aprovechado es el antígeno y toda la cadena de sucesos que derivan de este. La definición tradicional de un antígeno es aquella que le adjudica a una sustancia exógena la capacidad de inducir una repuesta inmunitaria cuando se introduce en un animal, recientemente se ha propuesto el término de inmunogenicidad para indicar esta capacidad: "La inmunogenicidad es una propiedad de las sustancias que pueden inducir una respuesta inmunitaria reconocible (Humoral, Celular o más comunmente

ambas) cuando son introducidas en un animal". La inmunogenicidad no es una propiedad inherente a una molécula como lo son sus características fisicoquímicas, pero en cuanto a su eficacia depende de las condiciones experimentales del sistema. Estas condiciones que se piden son: el antígeno, el modo de inmunización, el organismo que se inmuniza y la sensibilidad de los métodos usados para determinar la respuesta. Los factores que confieren inmunogenicidad sobre las moléculas son complejos e incompletamente comprendidos, pero se sabe que hay condiciones que deben ser satisfechas para que una molécula sea inmunógena, las cuales son: Exogenicidad, tamaño molecular, complejidad química, constitución genética del animal y método de administración del antígeno (20). Aunque los inmunógenos fuertes son grandes moléculas, solo porciones restringidas de las mismas intervienen en la combinación real con los sitios de activos de los anticuerpos, dichas áreas que determinan la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, se designan como determinantes antigénicos, el número de determinantes diferentes en una molécula de antígeno varía, por lo general con su tamaño y complejidad química. Mucho del conocimiento sobre la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo proviene de los estudios fundamentales de Karl Landsteiner durante los primeros años del siglo XX, con sustancias pequeñas químicamente definidas que no son inmunógenas, pero que pueden reaccionar con anticuerpos de especificidad apropiada, a la cual le dio el nombre de **Hapteno**, de la palabra griega haptain "sujetar", el hapteno conjugado se comporta como un determinante antigénico parcial o completo (5). El determinante total puede incluir a los aminoácidos de la proteína a los cuales está ligado el hapteno. La proteína llamada portador, tiene un conjunto de determinantes integrantes o nativos, así como nuevos determinantes inducidos por el hapteno conjugado. El empleo de conjugados de hapteno-proteína ha hecho resaltar la notoria diversidad de los mecanismos inmunológicos, así como la especificidad

estructural de las reacciones antígeno-anticuerpo. La reacción de un anticuerpo con un antígeno o hapteno diferente al que indujo su formación se denomina reacción cruzada, los estudios de esta clase han demostrado que el anticuerpo reconoce la forma global tridimensional del grupo antígeno determinante más que una propiedad química específica como la carga iónica. Se cree que los determinantes antigénicos y los sitios de combinación del anticuerpo poseen una complementariedad estructural que puede representarse figurativamente como un dispositivo de "llave-cerradura". La complementariedad de los anticuerpos está dirigida contra partes limitadas de la molécula del antígeno, las pruebas indican que toda la superficie expuesta de una proteína puede ser antigénica, en consecuencia las grandes proteínas expresan múltiples posibles determinantes, sin embargo un individuo elaborará anticuerpos, sólo contra un pequeño subgrupo del total (21).

Un factor importante en la selección de determinantes es la exposición al medio acuoso y en consecuencia al aparato inmunológico, aprovechando una de las características de la proteínas que es la hidrofiliidad la cual correlaciona bien con la accesibilidad, se obtiene un valor de predicción para identificar determinantes en regiones locales dentro de la proteína. Cuanto mayor sea la hidrofiliidad promedio, más alta la posibilidad de que la región sea antigénica. En los determinantes antigénicos se maneja el termino de inmunodominancia, la cual se da en determinantes cuya especificidad está dictada por el orden de sucesión de las subunidades dentro del determinante y se designan determinantes secuenciales, en tales circunstancias los componentes del determinante pueden actuar como haptenos y unirse con el anticuerpo (22).

A.- VACUNAS SINTETICAS.

Las vacunas sintéticas se obtienen de la síntesis de péptidos cortos a partir de las secuencias conocidas de las proteínas y la unión de los haptenos péptidos a portadores de proteína, creando en consecuencia "antígenos sintéticos", este método se basa en la suposición, de que los anticuerpos inducidos por péptidos cortos, de 6 a 15 aminoácidos, reaccionarán con las secuencias homólogas en las proteínas naturales. Si bien es cierto que los anticuerpos a proteínas suelen ser específicos de conformación y reaccionan debilmente, o no del todo, con fragmentos péptidos de la proteína.

Lerner señala que los anticuerpos elaborados para 17 de 20 péptidos sintéticos, representan un 75% de la proteína-hemaglutinina del virus de la influenza, unida al virus en sí (23). Una consideración importante a los trabajos de Lerner es que en la memoria inmunológica (anamnesis), la respuesta al conjugado (hapteno), se dirige al portador y al hapteno, ya que los portadores son diferentes en las vacunas sintéticas y la proteína natural de la cual proviene el péptido, así que un encuentro con el agente infeccioso después de la inmunización con la vacuna debe despertar muy poca anamnesis, o ninguna (24).

B.- ACTIVADORES EXOGENOS POLICLONALES DE CELULAS B.

La característica fundamental de muchas, si no de todas las enfermedades autoinmunitarias, es la síntesis de anticuerpos por las células B contra muchos antígenos propios. La hipótesis de que los activadores policlonaes de la células en el organismo que no son tolerantes a lo propio y en la capacidad de los mitógenos para estimular las células B ya sea directamente o sustituyendo a la células T cooperadoras. Así cuando los antígenos propios están presentes en concentraciones bajas, las células B con receptores cuya reactividad oscila desde una avidéz baja

hasta una alta, se considera que escapan a la inducción de tolerancia y asumen competencia para interactuar con los antígenos autólogos, mientras que las células T sí se vuelven tolerantes, los activadores policlonales de células B pueden desencadenar tal efecto para inducir a las células B a que produzcan autoanticuerpos. Existe una diversidad de activadores policlonales que van desde productos bacterianos, algunos componentes virales, parásitos y sustancias las cuales pueden actuar como activadores policlonales (25).

ACTIVADORES POLICLONALES DE LOS LINFOCITOS B.*

Lipolisacrido (LPS)

PPD

Proteína A de Staphylococcus aureus

Mitógeno hidrosoluble de nocardia

Lípido A asociado a proteína

2-Mercaptenol (2-ME)

α -Triglicerol (α -TG)

Linfocinas derivadas de macrófagos y de células T

Fragmento Fc de las inmunoglobulinas

Enzimas proteolíticas (tripsina)

Polianiones, sulfato de dextrán y Poli I-C

Antibióticos, por ejemplo, nistatina

Lanatócido C

Mycoplasma

Algunos virus y componentes virales (VEB, gp70)

Parásitos (Trypanosoma brucei, T. cruzi, Plasmodium malarie). *(25).

C.- IDENTIFICACION DE COMPLEJOS INMUNITARIOS.

La identificación de complejos inmunitarios se da tanto en tejidos como en suero y otros líquidos biológicos.

Identificación de complejos inmunitarios en los tejidos .

La identificación de los complejos inmunitarios en los tejidos, es llevada a cabo por técnicas inmunohistológicas empleando la inmunofluorescencia o la tinción con inmunoperoxidasa.

Los antisueros usados son específicos para las clases de inmunoglobulinas, los componentes del complemento, la fibrina, el fibrinógeno y en los enfermos seleccionados, el antígeno sospechoso.

Identificación de complejos inmunitarios en el suero y otros líquidos biológicos.

Hasta hace algunos años, la presencia de complejos inmunitarios circulantes sólo podía inferirse indirectamente cuando las cifras del complemento bajas o cuando se hallaba que el suero era anticomplemento durante la ejecución de una prueba serológica. Se ha desarrollado recientemente una gama de métodos, en un intento para lograr máxima sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Los métodos actualmente en uso están basados en diferentes propiedades biológicas y químicas de los complejos inmunitarios. Existen tres métodos con diversas técnicas:

- 1.- Métodos físicos:ultracentrifugación,filtración.
- 2.- Interacción con Clq, factor reumatoide o conglutina.
- 3.- Interacción con los receptores celulares: Nefelometría, valoración de la unión de

ligandos, técnicas inmunohistoquímicas (26).

Sin duda, uno de los métodos analíticos más importantes en el último cuarto de siglo es la valoración de la unión de ligandos (también conocida como valoración de ligandos, valoración de la unión competitiva de proteínas y análisis de saturación). El primer método de valoración de ligandos fue la radioinmunovaloración (RIA). En la dos décadas desde que surgió la valoración de ligandos ha revolucionado disciplinas dentro de la biología y la medicina. Se ha aplicado a la cuantificación de hormonas, fármacos, marcadores de tumor y anticuerpos relacionados con alergias. También ha sido posible descubrir con rapidez infecciones bacterianas y virales al igual que detectar anticuerpos relacionados con enfermedades infecciosas como la hepatitis y el SIDA, además con los métodos modernos de producción de anticuerpos, es posible elaborar anticuerpos monoclonales y policlonales para muchas sustancias.

La meta principal de una valoración es determinar la concentración de alguna molécula de interés, el analito.

Como el analito puede ser más pequeño que las moléculas normalmente capaces de estimular la producción de anticuerpo, es muy posible si no de hecho frecuente que en algún momento se haya unido a una molécula más grande para permitir la producción de anticuerpo; en este papel, el analito/ligando se conoce como **inmunógeno** (27).

III.- SINTESIS DE INMUNOGENOS

No se puede decir cual debiera ser el tamaño necesario para que una molécula sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En términos generales se dice que moléculas simples como

la glucosa o un aminoácido no son inmunogénicas y que casi siempre las sustancias con pesos moleculares bajos o menores de 5000 daltons poseen una inmunogenicidad débil. Sin embargo, las moléculas pequeñas no inmunogénicas pero sí antigénicas, llamadas haptenos son las que pueden estimular una respuesta inmunitaria y tomarse inmunogénicas si se acoplan químicamente con moléculas inmunógenas, por lo general de mayor tamaño, que se le conoce como acarreadores (2). Así tenemos que compuestos tales como esteroides, iodotironinas y glicosidos son poderosamente inmunogénicos después de acoplarse químicamente a un acarreador, como ASB u otra proteína heteróloga. Es necesario mencionar que los haptenos simples son capaces de reaccionar de manera específica con su anticuerpo. En la superficie de las macromoléculas existen zonas contra las cuales van dirigidas las respuestas inmunes, y son en las cuales tienden a unirse los anticuerpos. Estas zonas se llaman "determinantes antigénicos o Epítomos".

En general, el número de determinantes antigénicos presentes en una molécula está en relación directa con el tamaño de la misma, existen aproximadamente un determinante antigénico por cada 5000 unidades de peso molecular.

Es posible producir anticuerpos sumamente específicos de un hapteno, debido a que los anticuerpos pueden combinarse con el hapteno sin que importe la molécula acarreadora del mismo (3).

A.- SINTESIS DE CONJUGADOS.

La idea de producir inmunógenos sintéticos surgió desde que Landsteiner propuso el uso de los haptenos en la inmunología.

Erlanger (28) describió en 1957 el uso de la reacción anhídrica con haptenos formando conjugados (inmunógenos) con distintos vehículos. La técnica de conjugación usando la

carboxilación de la reacción anhídrica no ha variado mucho. Los reportes publicados desde entonces, muestran modificaciones con respecto a obtener una mayor especificidad del antisuero a obtener, entre los que son considerados con mayor éxito encontramos a aquellos que utilizan como vehículo del hapteno a: O-carboximetil oxima, hemisuccinato, mercaptoacetato, carboximetil esteroide, glucoronidos, y sulfatos (29). Para poder producir un inmunógeno de moléculas esteroideas, los esteroides tienen que estar en una forma químicamente reactiva antes de su conjugación. En la conjugación llevada a cabo con proteínas los sitios de unión más importantes se ubican en los grupos *epsilon*-amino que contenga la proteína.

La proteína que más comúnmente se utiliza para la conjugación por carboxilación es la albúmina misma que contiene 59 grupos *epsilon*-amino mas un grupo α -amino, por lo que la albúmina se considera de tener un número de 60 determinantes antígenicos (epítopos) ó sitios de unión.

La reacción más usada para obtener al esteroide químicamente reactivo para la conjugación es la **reacción anhídrica**, de la cuál se obtiene un derivado esteroide, como resultado de hacer reaccionar al esteroide puro con Oximas de grupos cetónicos, hemisuccinatos y/o derivados clorocarbonados. Estos compuestos son aislados por recristalización y tratados en una cromatografía de capa fina, para después caracterizarlos por espectroscopía infrarroja, resonancia magnética y/o espectrofotometría ultravioleta ó la combinación de procedimientos (30).

La reacción anhídrica fue descrita por Erlanger y col (1957) (28), y se sigue reportando su uso hasta el momento en combinación con otro reactivo u otras variantes. Las variantes encontradas para la metodología de conjugación es principalmente conforme a los sitios de unión del acarreador, el mismo acarreador, y la disposición espacial que guarda el esteroide con respecto a su vehículo reactivo (derivado esteroide que se obtiene de la reacción anhídrica).

Entre las metodologías que cambian el sitio de unión del derivado esteroide a la proteína

encontramos la descrita por Pang y col (31) donde utiliza como acarreador a la albúmina (ASB) pero el sitio de unión inmunodeterminante (epítipo) para llevar a cabo la conjugación es el grupo sulfhidrilo.

Midgley (32) utiliza la técnica descrita por Oliver (33) con resultados más inmediatos, esta metodología consistió en la iodización de la molécula acarreadora y conjugada con el derivado estérico por medio de ester metil de tirosina, no obstante los resultados obtenidos la limitante de ésta técnica es el tiempo que la marca radiactiva (125 I) permanece en el conjugado. Los esteroides en general no contienen grupos funcionales que unan directamente a las moléculas acarreadoras. Por esta razón para unir covalentemente el esteroide a la cadena polipeptídica es necesario formar un grupo reactivo, que se obtiene por la reacción anhídrica (32). El éxito de la síntesis del conjugado (esteroide-proteína) depende en gran medida del método de conjugación, y una de sus consecuencias más importantes es la especificidad del antisuero a obtener, que viene a ser el resultado inmediato o dependiente de la unión estérica del esteroide (o sea la disposición espacial del esteroide) al unirse al vehículo (grupo reactante), esto es que la posición del enlace esteroide-vehículo (reacción anhídrica) confiere en la reacción de conjugación un mayor número de sitios inmunodeterminantes para unir al esteroide y lo más importante la mayor especificidad del antisuero que se induzca con el inmunógeno.

En los trabajos publicados se utilizan diferentes posiciones de sitio de unión del esteroide con la proteína buscando encontrar ó provocar una mayor especificidad de los antisueros inducidos, esta variante de posiciones es debida a las características que puedan otorgar los anillos de la molécula esteroide por su disposición dimensional en unión con la proteína (Anillo A, B, C, D). Así tenemos que del Carbón 1-5 dependen del anillo A, Carbón 6-9 Anillo B, Carbón 10-14 anillo C, 15 a 19 anillo D, y por consiguiente los trabajos publicados sobre síntesis de antisueros

para hormonas estéricas como Cortisol, Estradiol, Progesterona, Testosterona entre otras varían en sus sitios de unión (28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39). Por otra parte el número de molas de esteroide conjugado por mola de albumina raramente excede un número de 30 molas por mol de proteína (40). Esto no es evidencia de que el título, afinidad o especificidad del antisuero sea dependiente del número de moléculas de esteroide conjugadas, sino como ya se mencionó con anterioridad esta depende entre otras de la interacción espacial del esteroide con la molécula acarreadora, esto provocara que los anticuerpos que se obtengan puedan discriminar estructuras similares a el inmunógeno que lo provocó. Las metodologías de conjugación en la que se utiliza a la reacción anhídrica únicamente, son observables ciertas limitantes como son: manejo, temperatura, luz y pH.

El grupo carboxil en muchos de los casos contribuye con el hapteno, y en otros casos se puede presentar originalmente como hapteno o ser introducido a la molécula usando varios procedimientos químicos. La introducción del grupo reactivo por carbodiimida perfecciona este proceso ya que se pueden llevar a cabo procesos como la unión de una sustancia nativa con varios grupos, ó cuando el grupo funcional nativo es responsable de la actividad biológica del compuesto y al acoplarlo entre uno u otro grupo se formen los determinantes antigénicos con mayor especificidad (41).

Goodfried (42) describió el uso de las carbodiimidias en la inmunología, de esta forma tenemos que el uso de un reactante como carbodiimida en una reacción de conjugación confiere un método más rápido y con menores dificultades de manejo en la síntesis de conjugados antigénicos. Las carbodiimidias acoplan los compuestos por sus grupos funcionales como son: ácidos carboxílicos, aminas, fosfatos, alcoholes y tioles. Bauminger (41) concluye en su revisión que realiza sobre el uso de las Carbodiimidias que es el método más popular que hasta la fecha

se utiliza en este tipo de reacciones (Conjugación) ya que tiene la ventaja de ocurrir bajo pocas condiciones limitantes de temperatura, luz, pH y tiempo, además que la mayoría de las moléculas acarreadoras contiene grupos Carboxilo y las carbodiimidas son reactivos que pueden realizar una rápida unión a la molécula acarreadora por medio de la introducción de grupos Carboxilo.

A todo esto se debe ahora el uso de las carbodiimidas en el campo de la inmunología, principalmente con lo que respecta en la conjugación de compuestos inmunógenos o no inmunógenos con grandes proteínas acarreadoras y/o antígenos sintéticos para producir inmunogenicidad. Los inmunógenos sintéticos son complejos que contienen péptidos de alto peso molecular, fragmentos de proteínas [como la unión de péptidos con lisosimas (43)] ó hormonas [ACTH, Bradikinina, y hormonas gonadotropicas (44)], además de hormonas esteroides [estrógenos, progestinas, y andrógenos (45)], prostanglandinas (46), nucleótidos cíclicos [3' adenosin, fosfato 5'-cíclico (47)] y finalmente como hormonas vegetales como genosteno y ácido giberélico (48). La conjugación de dos compuestos por el método de carbodiimidas requiere de la presencia de un grupo amino y uno carboxil. En muchos de los casos el grupo amino se envuelve en la reacción con residuos lisil de la proteína acarreadora (49) o residuos de lisil y analil del polipéptido sintético acarreador (50).

2.- JUSTIFICACION

La investigación biomédica y la prestación de servicios médicos en el área de reproducción humana, particularmente en la regulación de la fertilidad (planificación familiar e infertilidad), es una prioridad en materia de salud en nuestro país. La evaluación del aspecto funcional de los diferentes órganos (glándulas de secreción interna) que participan en el fenómeno reproductor, se realiza mediante la producción de hormonas específicas y/o la respuesta que manifiestan a estímulos hormonales o farmacológicos específicos.

Las concentraciones en el plasma sanguíneo de la denominadas hormonas esteroides, en la mayoría de los mamíferos incluyendo al hombre es del orden de nanogramos ó picogramos por mililitro (1×10^{-9} y 1×10^{-12} g/l) lo cual implica que para su cuantificación se requiere de un método analítico que sea sensible, específico, reproducible, preciso, y principalmente económico.

El aspecto económico es aún más limitante que el tecnológico y para que el radioinmunoanálisis sea una metodología accesible a la mayoría de los centros de investigación y asistencia que trabajan en el área de la reproducción humana y animal, se debe de producir el material necesario a nivel local, es decir antiseros y estándares principalmente.

En efecto la gran mayoría de los laboratorios que cuantifican este grupo de hormonas en instituciones del sector salud obtienen el material mediante representantes de compañías transnacionales o por importación directa. En México el INNYS lleva a cabo un programa de investigación, evaluación, y producción de antiseros para estas hormonas, por lo que el presente trabajo aportará material para utilizarse en su momento en el desarrollo de dicho programa.

3.- OBJETIVOS

En el trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- 1.- Sintetizar conjugados esteroide-proteína, para la inducción de antisueros policlonales contra:
 - a) CORTISOL.
 - b) PROGESTERONA.
 - c) TESTOSTERONA.
- 2.- Manejo y aplicación de la metodología de conjugación Esteroide-Proteína utilizando como grupo reactivo a la Carbodiimida.
- 3.- Evaluar los residuos de esteroide conjugados a la proteína por espectrofotometría (U.V).
- 4.- Evaluar la metodología de conjugación utilizando Carbodiimida, por la comparación de sus resultados con los reportados por Erlangher (28).

4.- MATERIAL Y METODOS

Las hormonas esteroides son tratadas con una reacción química en la cual se acoplan a un grupo funcional obteniéndose un derivado esteroideal reactivo que recibe el nombre de hapteno.

Los derivados esteroidales utilizados en los experimentos fueron preparados por el Dr Gustavo García de la Mora del Departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, el Dr García de la Mora tiene amplia experiencia en estos procesos y está reconocido como experto en la síntesis de compuestos orgánicos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En la síntesis de los conjugados se utilizaron los siguientes materiales:

DERIVADOS ESTEROIDALES (HAPTENOS) :

- Cortisol 21 hemisuccinato
- 3 Carboximetiloxima Progesterona
- 3 Carboximetiloxima Testosterona

REACTIVOS:

- Albumina Sérica Bovina (Sigma).
- 1 Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Carbodiimida HCL (Sigma).
- Buffer de Fosfatos de pH 7.8.
- Buffer Tris 0.05 M pH 8.5.
- Dimetil Formamida (DMF) (Sigma).

UTENSILIOS:

- Membranas de Diálisis (Thomas Scientific).

METODOLOGIA

METODO.

PREPARACION DEL CONJUGADO ESTEROIDE-PROTEINA PARA LA INDUCCION DE ANTISUEROS PARA CORTISOL, PROGESTERONA Y TESTOSTERONA.

1).- Reactivos.

I.- Albumina + Buffer de fosfatos.

II.- Derivado esteroidal + DMF.

III.- Carbodiimida + Buffer de fosfatos.

2).- Procedimiento.

El diagrama de la reacción es el siguiente:

I + (II + III) reaccionando por 20 min.

Las cantidades sugeridas para los reactivos son variables en la literatura, de la relación entre la cantidad de albúmina y derivado esteroidal la más aceptable es la relación 1:2 respectivamente (30, 31, 32), las cantidades manejadas en cada uno de los métodos de conjugación son las mismas:

50 mg de Albumina + 4 ml de Buffer de fosfatos pH 7.8.

25 mg de Derivado esteroidal + 3 ml de DMF

25 mg de Carbodiimida HCl + 3 ml de buffer de fosatos pH 7.8.

El derivado esteroide (hapteno) es pesado en un vaso de pp de 25 ml con la cantidad sugerida (25 mg) y disuelto en 3 ml de Dimetilformamida (DMF) (formando el compuesto II), de igual

forma se pesan la albumina (ASB) y la Carbodiimida HCl con las cantidades respectivas (50 y 25 mg), los cuales son disueltos en 4 y 3 ml de Buffer de fosfatos pH 7.8 respectivamente (formandose los compuestos III y I). Una vez disueltos los compuestos, se mezclan entre sí el III con el II, agregando el compuesto III en el compuesto II llevandose a cabo una reacción exotérmica en poco grado (aumento de temperatura en la reacción de 5 °C) la mezcla se coloca en el agitador magnético dejandose reaccionar por 20 min, una vez terminado el tiempo de reacción se agrega el compuesto I a la mezcla formada por II y III, la mezcla final donde ya se encuentran los 3 compuestos formados, se deja en agitación constante a temperatura ambiente por un tiempo de 64 hrs, tapando la reacción con un vidrio de reloj para evitar contaminaciones por polvo o microorganismos circulantes en el aire u otras sustancias.

A lo largo del tiempo de reacción se llevaron a cabo observaciones sobre la formación de precipitados coloidales o grumosos que se ha reportado en la literatura (30, 31).

Al término de las 64 horas de iniciada la reacción se suspende la agitación. A las 60 horas de reacción se preparan las membranas de diálisis (Spectrapor membrane tubing) serie 3787 F-25, el poro de la membrana permite la salida de moléculas con un peso molecular inferior a 8000, reteniendo aquellas moléculas con peso molecular mayor a 8000. La mezcla obtenida (conjugado + residuos), es transferida a una probeta de 25 ml para medir el volumen resultante, el total del volumen de la mezcla es transferido a una membrana de diálisis (previamente cortada a una longitud de 20 cm), comenzando así el proceso de diálisis con una duración de 24 hrs. Se realiza un cambio total de agua deionizada a las 12 hrs de iniciada la diálisis, al término de las 24 hrs de diálisis, se transfiere el volumen total dentro de la membrana a una probeta para conocer el volumen total de conjugado purificado en solución.

Ya conociendo el volumen total obtenido del conjugado puro, se procede a distribuirlo en

varias alícuotas de (1 ml) en viales especiales (volumen de 10 ml) que soportan un enfriamiento brusco ya que el siguiente proceso es el de liofilizado.

En el proceso de liofilizado se lleva a cabo una extracción al vacío de todo el líquido contenido en las muestras, para esto las muestras problema son congeladas a -20°C con una solución de acetona-hielo seco. El proceso de liofilizado dura aproximadamente de 4-6 hrs; una vez obtenido el liofilizado del Conjugado Esteroide-Proteína se colecta el total obtenido en un solo vial, del total se toman 5 mg los cuales son diluidos en 25 ml de buffer tris 0.05 M pH 8.5 en un matraz aforado de dicho volumen. Al mismo tiempo se prepara una muestra de Albumina (ASB) que al igual que el conjugado es diluida en un matraz aforado de 25 ml con buffer tris 0.05 M pH 8.5, con el fin de tener el mismo coeficiente de dilución en ambas muestras. Una vez hecho esto se procede a registrar la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro.

Utilizando al buffer tris como blanco para calibrar al aparato los límites usados para la lectura de las muestras fueron:

0.0 - 2.0 de Absorbancia y las longitudes de onda de 230-270 nm, lo que dió como resultado una gráfica de barrido de cada muestra (ver apéndice 1). Para realizar los cálculos de la pureza de los conjugados (mol de hapteno por mol de proteína) obtenidos, se realizó una nueva lectura en la región de máxima absorción del esteroide que es a los 247 nm.

5.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las diferentes conjugaciones fueron analizados por espectrofotometría ultravioleta, los datos pueden observarse en las tablas que se muestran a continuación.

TABLA I

Conjugado Esteroido-ASB	Longitud de onda en n.m.	Absorbancia del Esteroido-ASB	Absorbancia de ASB	Cóeficiente de extinción	Peso molecular	Concentración de ASB mg/l
Cortisol 21- Hemisuccinato	247	1.319	0.232	14,256	462	204
3-CMO Testosterona	247	0.684	0.131	19,244	365	208
3-CMO Testosterona C ¹⁴	247	0.683	0.102	19,244	365	208
3-CMO Progesterona	247	0.633	0.117	14,647.5	387.5	232

En la tabla podemos observar todos los datos específicos de cada uno de los conjugados para poder realizar los cálculos de unión esteroide proteína.

TABLA II

CONJUGADO ESTEROIDE-PROTEINA	# DE MOLES DE ESTEROIDE x MOL DE PROTEINA (ASB)(UV)
CORTISOL 21-HEMISUCCINATO	30.62
3-CARBOXIMETIL OXIMA TESTOSTERONA	12.85
3-CARBOXIMETIL OXIMA PROGESTERONA	11.95

En la tabla se observan los resultados obtenidos para cada uno de los conjugados obtenidos siendo el valor obtenido para el conjugado de cortisol el más productivo en cuanto a número de residuos de esteroide unidos a la proteína.

TABLA III

DERIVADO	METODO DE REFERENCIA No DE RESIDUOS	EXPERIMENTO No DE RESIDUOS
CORTISOL 21 HEMISUCCINATO	ERLANGER 22 (100 %)	30 (136 %)
3 CARBOXIMETIL OXIMA TESTOSTERONA	ERLANGER 41 (100 %)	12.85 (31.2 %)
3 CARBOXIMETIL OXIMA PROGESTERONA	ERLANGER 12 (100 %)	11.9 (99 %)

En la tabla observamos la comparación de los resultados obtenidos por el experimento contra la referencia, así como los valores de porciento del número de residuos.

TABLA IV

DERIVADO	ESTIMACION DE RESIDUOS ENTRE CONJUGACIONES	REPRODUCIBILIDAD INTRA CONJUGACION
3 CARBOXIMETIL OXIMA TESTOSTERO	1 2 . 8 5	9 9 %
3 CARBOXIMETIL OXIMANA TESTOSTERONA C-14	1 2 . 9 5	1 0 0 %

En la tabla observamos los promedios de las conjugaciones realizadas, para comprobar el resultado obtenido en el número de moles de testosterona unidos a la albúmina, además se obtuvo en porcentaje la reproducibilidad de los resultados en las conjugaciones realizadas.

6.- DISCUSION

Para obtener el número de moles de esteroide unidos a una mol de proteína acarreadora (albúmina), se llevó a cabo una lectura de absorción U.V a cada uno de los conjugados obtenidos (ver apén. 1); los datos obtenidos en la espectrofotometría de las moléculas, fueron analizados por el método de cálculo propuesto por Erlangher (28). Los datos necesarios para desarrollar el cálculo están expresados en la tabla I. Adicionalmente se dá un diagrama del cálculo y los resultados se observan en la tabla II. En la tabla III se comparan los resultados obtenidos por la metodología experimental con los reportados por la metodología de referencia (28). A los resultados reportados por la referencia se les asignó un valor del 100 por ciento de unión esteroide proteína. Los datos observados en la tabla III son llevados a un análisis gráfico en las figuras 1, 2, y 3. En las gráficas, el eje de las ordenadas corresponde al porcentaje de unión esteroide-proteína (moles de esteroide por mol de albúmina sérica bovina (ASB)), mientras las metodologías a comparar se muestran en el eje de las absisas. En la figura 1 se observa el análisis gráfico del conjugado obtenido para Cortisol, la columna de la izquierda corresponde a el dato reportado por la metodología de referencia, el cual es de 22 residuos de esteroide conjugados a la proteína, a este resultado se le asigna un valor del 100 % de unión esteroide proteína, en la columna de la derecha se muestra el resultado obtenido en la metodología experimental, que es de un 140 % de unión esteroide-proteína, ya que el número de moles de esteroide unido a ASB fue de 31 residuos (moles). Al analizar la gráfica observamos que la columna de la metodología experimental supera en un 40 % la unión esteroide-proteína del método empleado como referencia, demostrando que el uso de Carbodiimida, en la conjugación de Cortisol con la proteína (ASB), dá resultados satisfactorios en cuanto a la unión covalente del

esteroide con la proteína.

Para el caso del esteroide Progesterona, la posición reportada para conjugar utilizando la metodología de referencia fué en posición Carbono 20 C-20. Los reportes en los cuales se utilizaba otra posición de conjugación era utilizando otra metodología de conjugación como por ejemplo brominación (31) y iodización (32). Además como ya se había comprobado la eficiencia en el porcentaje de unión esteroide-proteína, utilizando a la Carbodiimida como grupo introductor en la metodología de conjugación, se buscó de manera adicional a los objetivos planteados obtener un derivado esteroide proteína que diese una mayor especificidad al ser utilizado como inmunógeno. Se revisó la literatura y se encontró que al realizar la conjugación de los derivados esteroides de Progesterona y Testosterona en la posición Carbono 3 (C-3) (34) se podía obtener este objetivo adicional.

Para el esteroide Progesterona se obtuvo el conjugado Progesterona 3-CMO-ASB, utilizando a la Carbodiimida como grupo introductor. Los resultados de la espectrofotometría se observan en la tabla II, y en la figura 2 y la tabla III se expone la comparación de éstos con los reportados por la referencia [Erlanger(1959)(29)]. Se hace notar que tanto el método de referencia como el método experimental llevan a cabo la conjugación del derivado esteroide en posiciones terminales de la molécula (ver fig 4), esto es debido a que la exposición de los grupos ceto en las partes terminales de la molécula esteroide son más susceptibles a un ataque químico. Si observamos los resultados reportados por ambas metodologías veremos que son semejantes; ya que mientras el método de referencia reporta 12 residuos (moles) de esteroide conjugados a la ASB, con la metodología experimental se obtuvieron 11.95 residuos (moles) (ver fig 2). El hecho de obtener los mismos resultados, en cuanto al porcentaje de unión esteroide proteína, no quiere decir que es lo mismo conjugar en posición C-3 que en posición C-20; ya que el conjugar

en posición C-3, ofrece la ventaja de que al ser usado el conjugado como inmunógeno e inducir la formación de un antisuero policlonal contra Progesterona, la posibilidad de que el antisuero tenga reacción cruzada con la 17 Hidroxiprogesterona sea baja.

Al llevar a cabo la reacción de conjugación, esteroide-proteína de Testosterona, se obtuvo el conjugado Testosterona 3-CMO-ASB, que de igual forma que para la Progesterona, el sitio de unión que se reporta como el recomendable para la obtención de antisueros específicos es para la posición C-3.

Los resultados de la espectrofotometría se dan en la tabla II, y en la figura 3 como en la tabla III se observa la comparación de estos con el método de referencia. Como se puede observar el valor de cantidad de residuos conjugados por la referencia es mayor que el obtenido en la experimental, lo que nos lleva a observar a la tabla IV que nos muestra los resultados de la espectrofotometría para dos conjugados de Testosterona, con la diferencia de que en uno de los conjugados el esteroide está marcado radioactivamente con C^{14} . Esta variante se introdujo, cuando al analizar los resultados obtenidos, por la metodología de conjugación experimental con respecto a los reportados por la referencia, el porcentaje de unión esteroide proteína obtenido por la metodología de conjugación experimental usando Carbodiimida fue muy bajo, siendo del orden del 39 % de unión esteroide proteína. Ante la obtención de estos resultados se decidió realizar un análisis metódico de cada uno de los pasos del proceso de conjugación experimental, de acuerdo al esquema que se muestra en la figura 5. La cual al analizarse se observara que el cambio más distintivo es en el grupo introductor (isobutil cloroformiato vs Carbodiimida); el siguiente cambio fué en los disolventes utilizados, mientras que en la metodología de referencia se utilizan metanol, etanol, y dioxano entre otros, en la metodología experimental se utilizan sólo buffer tris 0.05 M pH 8.5 y dimetilformamida (DMF).

Analizando las propiedades de los disolventes detectamos que aquellos disolventes utilizados en la metodología de referencia son totalmente anhidridos, o sea tienen una polaridad baja, mientras que la polaridad de los disolventes en la metodología experimental fue alta, ya que un 75 % de su volumen total era agua. Si analizamos cada uno de los resultados que se obtuvieron con esta técnica de conjugación experimental, el resultado más satisfactorio fue obtenido para Cortisol, ya que de todas las hormonas esteroides es aquella con mayor polaridad lo que quiere decir que tuvo la mayor disolución en los solventes y su reacción de conjugación fue la más adecuada, siguiendo en el orden de polaridad de las hormonas utilizadas la que ocupa el segundo escalafón de polaridad es la Progesterona, dejando a la Testosterona en tercer lugar, que aunque es de las hormonas andrógenas una de las más polares, es menor su polaridad y por lo tanto su disolución en los solventes. Esto explica un porqué del pobre porcentaje de unión esteroide-proteína obtenido en la Testosterona, aunque la polaridad no puede influenciar tanto en la reacción de conjugación si se considera un factor importante, otro de los factores a los que se les puede atribuir el porque de este bajo porcentaje de unión en Testosterona es el grupo reactivo 1-*etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida* HCl, el cual es muy probable no favorezca la reacción de conjugación de la Testosterona, suponiendo que la reacción de la Testosterona con el grupo inductor disuelto en buffer debió ser muy baja, por lo que el grupo reactivo sólo pudo introducir a la ASB muy poco esteroide. Para verificar la hipótesis, se realizó un proceso de conjugación empleando esteroide marcado con C^{14} , de tal forma que se pudiese llevar un seguimiento del porcentaje de esteroide presente en cada paso de la metodología de conjugación (ver apéndice 2). Al realizar la operación de seguimiento se encontró un 70 % del porcentaje de esteroide radioactivo en el primer cambio de volumen de agua de la diálisis, otro pequeño porcentaje del 15 % fue captado en el otro volumen de agua del proceso de diálisis, al realizar

la lectura del conjugado obtenido después de liofilizar y resuspender en buffer, encontramos que el porcentaje de esteroide marcado registrado en la fase de diálisis, correspondía al faltante en el conjugado obtenido del total de esteroide marcado que fue puesto a reaccionar. Con todo esto se demuestra, que la polaridad de los disolventes utilizados en la metodología de conjugación experimental, si interfiere de manera definitiva en el porcentaje de la unión esteroide-proteína de los derivados esteroide, y que la Carbodiimida utilizada como grupo introductor en la metodología de conjugación no favorece mucho la conjugación de la Testosterona. Sin embargo se llevaron a cabo reacciones simultáneas de conjugación para Testosterona en repetidas ocasiones, utilizando derivado de esteroide marcado y sin marcar, los resultados fueron comparados como se puede observar en la tabla IV, y en la figura 6, observándose una adecuada reproducibilidad de los resultados de conjugación, lo que descarta el hecho de que la baja incorporación del esteroide a la proteína, esté causada por imprecisión ó falta de reproducibilidad en la metodología de conjugación. Al evaluar comparativamente los procedimientos de conjugación empleados en este trabajo, se comprueba que la metodología de referencia (28) es muy laboriosa, por el uso de disolventes como metano, dioxano, etanol, NaOH, HCl, lo cual provoca que el proceso de purificación del conjugado sea muy largo. Por el contrario la metodología de conjugación utilizando Carbodiimida sólo usa como disolventes DMF y buffer tris que son eliminados fácilmente en el proceso de diálisis junto con las moléculas de esteroide que no quedaron conjugados a la proteína, además de la úrea (único producto secundario que se forma en la reacción de conjugación) que también es desechada en el mismo proceso de diálisis. Esto hace que la metodología experimental sea poco laboriosa, práctica y limpia. Comparando los resultados obtenidos para cada una de las hormonas, en cuanto a la unión del esteroide con la proteína (ASB), la metodología de conjugación es más útil para Cortisol, y

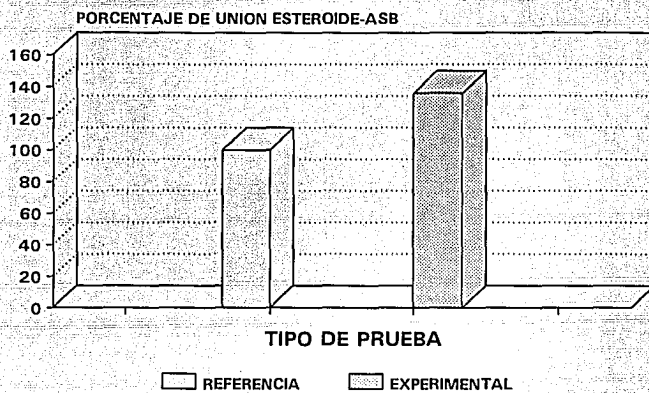
Progesterona que para Testosterona. Cabe mencionar que la conjugación del Cortisol con la proteína (ASB) en la posición C-21, hace que el antisuero a obtener, no tenga una gran especificidad, ya que en reportes previos se estableció que la conjugación de Cortisol en posición C-3, produce anticuerpos más específicos. Si recordamos los objetivos planteados para este trabajo fueron, el probar y evaluar la metodología de conjugación utilizando a la Carbodiimida como grupo introductor, sintetizando conjugados para esteroides. El primer conjugado obtenido, fue para Cortisol, y en él se comprobó la gran eficiencia de la metodología experimental, por lo que se buscó que los otros conjugados a obtener, tuviesen las mejores características para ser usados como inmunógenos, éstas características son: a) Pureza del conjugado, b) sitio de unión (disposición espacial) del esteroide al grupo reactivo el cuál determina la especificidad del antisuero, y c) número de sitios de unión esteroide-proteína.

En el conjugado obtenido para Cortisol observamos que cumple con dos de las características mencionadas que son: pureza del conjugado y el número de sitios de unión esteroide-proteína.

En el caso de Testosterona el número de sitios de unión que ya fue analizado y discutido fue muy bajo, pero el conjugado cumple con dos de las características mencionadas, siendo el sitio de unión covalente el más importante, pasando a segundo término la pureza del conjugado.

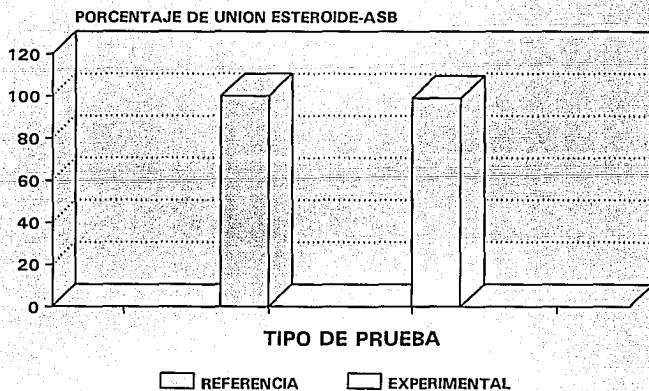
El conjugado de Progesterona cumple con las tres características que se piden para que un inmunógeno sea el más apropiado en su uso: Sitio de unión esteroide proteína, pureza del conjugado y el número de residuos de esteroide conjugados a la proteína. De esta forma se sabe que la especificidad que logra obtener un antisuero no depende solamente del número de sitios de unión esteroide-proteína, sino que depende en gran parte de la pureza del conjugado, y sobre todo de la posición de unión entre el esteroide y la proteína, por medio del cual el antisuero no reaccionará de esta forma con compuestos que presenten una estructura parecida.

FIGURA 1
CORTISOL 21 Hemisuccinato-ASB



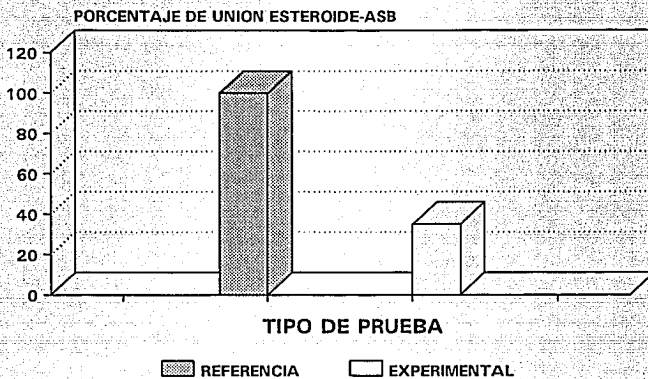
En la figura observamos que los resultados obtenidos del porcentaje de unión esteroide proteína superan en un 32% a los reportados en la referencia.

FIGURA 2
PROGESTERONA 3-CMO-ASB



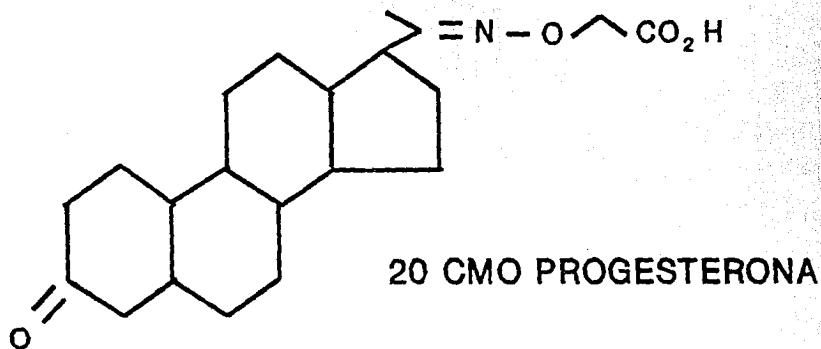
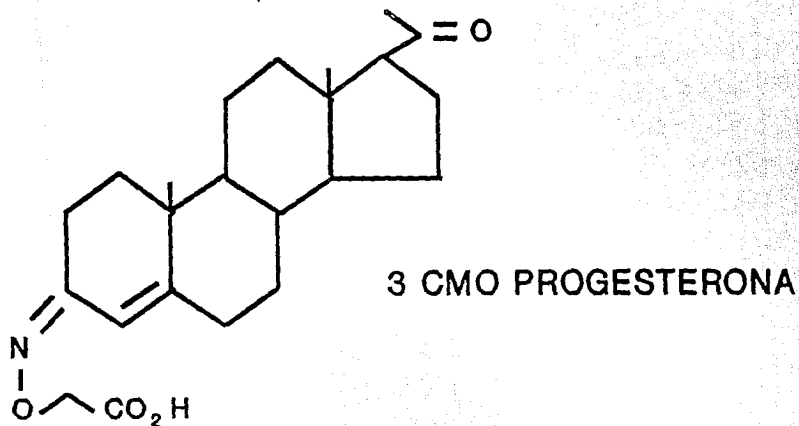
En la figura se observa que tanto los resultados obtenidos como los reportados en la referencia en cuanto a porcentaje de unión esteroide proteína son semejantes.

FIGURA 3
TESTOSTERONA 3-CMO-ASB



En la figura observamos la deficiencia en el porcentaje de unión esteroide proteína de la técnica de conjugación experimental con respecto a los resultados reportados en las referencias.

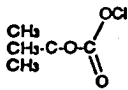
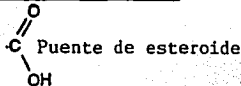
Fig. 4



En la figura se aprecia el cambio de posición de la unión del esteroide entre dos haptenos de progesterona.

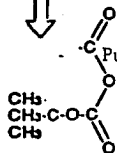
FIGURA 5

MEZCLA DE REACCION ANHIDRA



Isobutilcloroformato

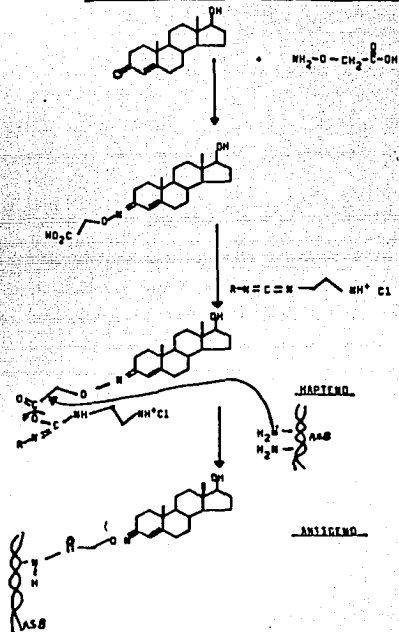
Removedor de HCl
 + (N-metilmorfolina)
 (tri-n-butilamina)



+ H₂N-lisina (ASB, enzima)
 H₂N-histamina

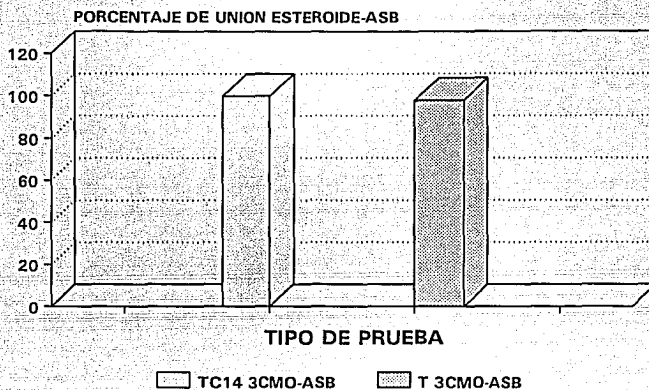
Puente esteroide-CO-NH-lisina.

REACCION CON CARBOXIMETILOXIMA



En la figura podemos observar claramente el sistema de ataque nucleofílico, que realiza la carboximetiloxima para introducir un grupo de esteroide a la proteína además de la comparación con la reacción, donde se aprecia es más optima en su manejo la reacción de conjugación con carboximetiloxima.

FIGURA 6
REPRODUCIBILIDAD DE LA TECNICA



En la figura podemos observar que la reproducibilidad de las conjugaciones, variando las características del esteroide, no perjudican los resultados del porcentaje de unión esteroide proteína, así de esta forma se muestra en esta figura la similitud de resultados usando la misma técnica de conjugación.

7.- CONCLUSIONES

- 1.- El empleo del método de conjugación de derivados esteroide a proteínas, usando al reactivo Carbodiimida como grupo introductor, es una metodología adaptada a las condiciones del laboratorio que se dan en nuestro país, y esto da como resultado la síntesis de conjugados esteroide proteína de los Esteroides: Cortisol, Progesterona, y Testosterona.
- 2.- El usar Carbodiimida como grupo introductor en la metodología de conjugación esteroide-proteína, ofrece las siguientes ventajas sobre el método tradicional de Erlangher (1957) como:
 - a) Empleo del mismo tiempo en la reacción de conjugación.
 - b) El uso de dos disolventes en la reacción de conjugación hace el método más práctico y menos laborioso.
 - c) Se produce un sólo grupo secundario junto con el conjugado al término de la reacción de conjugación.
 - d) La pureza del conjugado se obtiene por un proceso de diálisis únicamente, removiendose el grupo secundario (úrea), partes no reactantes del derivado esteroide y grupo introductor, así como disolventes.
- 3.- Los conjugados obtenidos cuentan con las características necesarias para ser utilizados satisfactoriamente como inmunógenos e inducir la producción de antisueros policlonales en el laboratorio de investigación.
- 4.- Los solventes utilizados en esta metodología de conjugación si interfieren en el porcentaje de union esteroide proteína, si la polaridad de la molecula a conjugar varía, o sea que no es disuelta en los solventes.

- 5.- El desarrollo de proyectos de investigación en la producción de reactivos u otras materias, sirve para adiestrar profesionistas en la rama de la investigación trayendo beneficios en recursos humanos para el país.

8.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Montgomery. D. (1979) Endocrinología medica y quirúrgica. Salvat Editores S.A. Barcelona .España. 654 pp.
- 2.- Ochoa.S. y col. (1986) Bioquímica y Biología Molecular. Salvat Editores S.A. Barcelona. España. 586 pp.
- 3.- Ortiz. O.L. (1987) INMUNOLOGIA. Interamericana. México. 251 pp.
- 4.- Paul. W.E. Fundamental Immunology. Raven Press New York 1984.
- 5.- Stites. P., Stobo. D., Wells. J. (1988) Inmunología básica y clínica. El Manual Moderno. S.A. 6a. México, D.F. 750 pp.
- 6.- Singer. A., Hodes. R. Mechanisms of T cell-B cell interaction. Ann Rev Immunol. 1. 211. 1983.
- 7.- Gell. P.G.H., Coombs. R.A., and Lachman. P.(1975) Clinical aspects of immunology. 3rd ed. Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- 8.- Roitt. I.M., Brostoff. J., Male. D.(1985) Immunology. Mosby St Louis. U.S.A.
- 9.- North. R.J. Cell-Mediated immunity and the response to infection. En R.T. McClusk and S. Cohen (ends) Mechanisms of cell-mediated Immunity. Jhon Wiley, New York 1974.
- 10.- Stossel. T.P. Phagocytosis. New England. Med. 290. 717. 1974.
- 11.- Ortiz. L. y col. (1983) Introducción a la Inmunología. EDUG. Guadalajara. México. 342 pp.
- 12.- Tood. J., Sanford. A., Davidshon. E. (1979) Clinical Diagnosis and Management by laboratory methods. W. B. Saunders Company. Phil. U.S.A.

- 13.- Rose, N., Milgrom, F., Van Oss, E. (1978) Principles of Immunology. Mac Millan Second Edith. New York. 543 pp.
- 14.- Nisonoff, A., Hopper, J.E., and Spring, S.B. The antibody molecular. Academic Press. New York. 1975.
- 15.- Hood, L. and Prahl, J. Adv. Immunol. 14:291. 1971.
- 16.- Lamm, M.E. Adv. Immunol. 22:223, 1976.
- 17.- Natving, J.B. and Kunkel, H.G. Adv. Immunol. 16:1, 1973.
- 18.- Fahey, J.L. Antibodies and Immunoglobulins. Structure and Funtion. J. AMA. 194:71-74. 1965.
- 19.- Chesebro, B., Bloth, B., and Suchag, S.E. J. Exp. Med. 127. 1968.
- 20.- Goodman, J.W, et al. Immunol. Rev. 1978, 39:36.
- 21.- Benjamin, D.C, et al. Annv Rev Immunol. 1984, 2:67.
- 22.- Buttler, V.P. Jr, Beiser, S.M. Adv Immunol. 1973, 17:255.
- 23.- Lerner, R.A. Synthetic vaccines. Sci Am (feb) 1983, 248:66.
- 24.- Goodman, J.W, Sercarz, E.E. Annu Rev Immunol. 1983, 1:465.
- 25.- Kabat, E.A. Structural concepts in Immunology and Immuno-chemistry. Holt, Rinehart & Winston, Inc. New York 1976.
- 26.- Day, E.D. Advanced Immunochemistry. Williams and Wilkins. Baltimore, 1972.
- 27.- Parker, C.W. Radioimmunoassay of Biologically active compounds. Prentince Hall. Englewood. Clifts, N.J. 1976.
- 28.- Erlanger, B.F., Beiser, S.M., and Lieberman, S. J. Biol. Chem. 228, 713. 1957.
- 29.- Regional (RCA) Training Course on Optimisation of Production Techniques and Distribution Schemes for Reagents for Radioimmunoassay. Thailand., October, 1989.

- 30.- Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M., and Lieberman, S. *J. Biol. Chem.* 234:5, 1090. 1959.
- 31.- Pang, C.N., Johnson, D.C. *Steroids.* 23:2, 203. 1974.
- 32.- Midgley, A.R., Niswender, G.D., Gay, V.L., and Riechert, L.E. *Recent Progress in Hormone Research.* 27:235. 1971.
- 33.- Oliver, G.C., Parker, B.M., Bransfield, D.L., Parker, C.N. *J. Clin. Invest.* 47: 1035. 1968.
- 34.- Forest, M.G., Mappus, E., Cuilleron, C. *STEROIDS.* 28: 6. 815-827. 1976.
- 35.- Narashima, P., Moore, P. Jr. *STEROIDS.* 29:4. 461-469. 1976.
- 36.- Exley, D., Woodhams, B. *STEROIDS.* 27:6. 813-821. 1976.
- 37.- Lindner, H.R., Perel, E., Friedlander, A., and Zeitlin, A. *STEROIDS.* 19:3.357. 1972.
- 38.- Baker, T.S., Exley, D. *STEROIDS.* 29:1. 429. 1977.
- 39.- Narashima Rao, D., and Moore, P.H. *STEROIDS.* 29:1. 461. 1977.
- 40.- Hernández, Z.J. Produccion de antisueros policlonales especificos para la cuantificación de hormonas esteroides por radioinmunoanálisis. UAM. México. 1988.
- 42.- Bauminger, S., Wilcheck, M. *Methods in enzymology.* Copyring 1980 by Academic Press. Inc. 151-159.
- 43.- Arnon, R., and Sela, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62,163. 1969.
- 44.- McGuire, J., McGill, R., Leeman, S., and Goodfried, T. *J. Clin. Invest.* 44. 1677. 1965.
- 45.- Bauminger, S., Kohen, F., and Linder, H.R. *Steroid Biochem.* 5. 739. 1974.
- 46.- Levine, L., and Van Vunakin, H. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 41. 1171. 1970.

- 47.- Steiner, L.A., Kipnis, D.M., Utiger, R., and Parker, C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 64, 367. 1969.
- 48.- Fuchs, S., and Fuchs, Y. Biochim. Biophys. Acta. 192, 528. 1969.
- 49.- Bauminger, S., Lindner, H.R., Perel, E., and Arnon, R.J. Endocrinol. 44. 567. 1969.
- 50.- Jeffcoate, S.L., and Searle, J.E. STEROIDS. 19. 181. 1972.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

APENDICE I

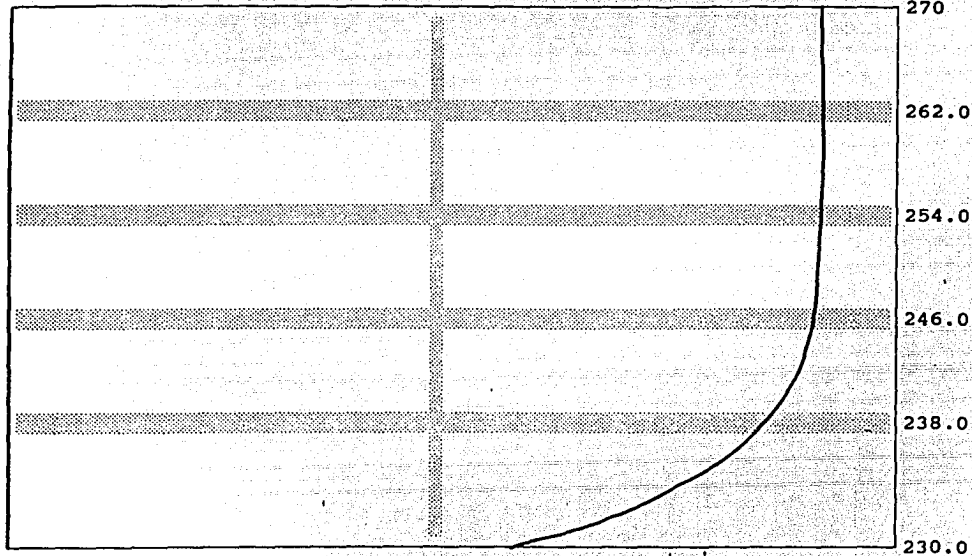
En esta sección se observa las lecturas que se obtienen en el espectrofotómetro, mostrándose una lectura del blanco de albumina serica bovina (ASB) y la lectura de barrido del conjugado esteroide proteina, para cada una de las hormonas comprendidas en el estudio (cortisol, progesterona y testosterona). Cabe mencionar que despues de obtener estas lecturas se procedia a un cálculo para valorar el porcentaje de molas unidas de esteroide a la ASB

ABSORBANCIA

ABS
2.000

1.0000

0.000 **NM**
270



VELOCIDAD DE GRAFICA: 300 NM/MIN

PICO MAXIMO

FUENTE: UV

d ABS

Fecha: 19-Noviembre-1989

260.0 0.248

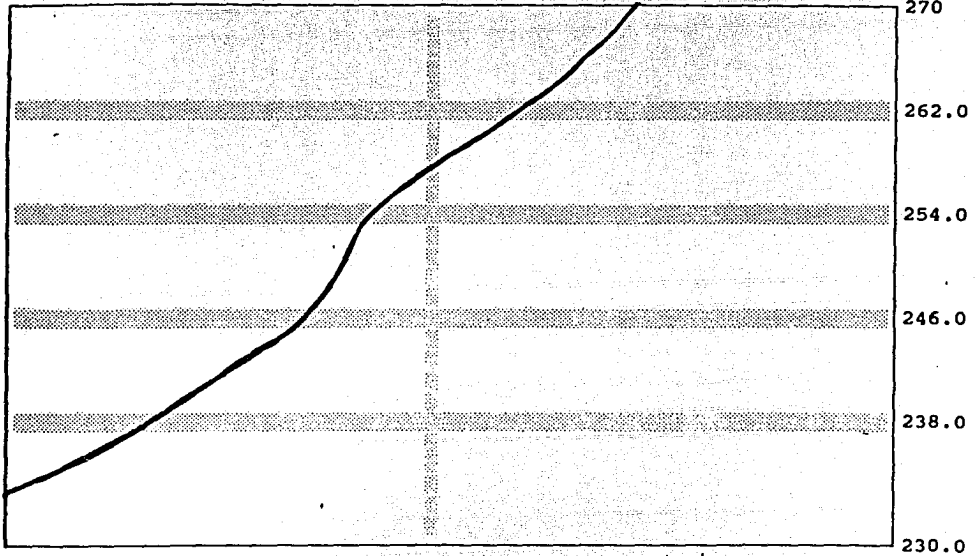
Muestra: ASB

ABSORBANCIA

ABS
2.000

1.0000

0.000

NM
270

VELOCIDAD DE GRAFICA: 300 NM/MIN

PICO MAXIMO

FUENTE: UV

d ABS

Fecha: 19-Noviembre-1989

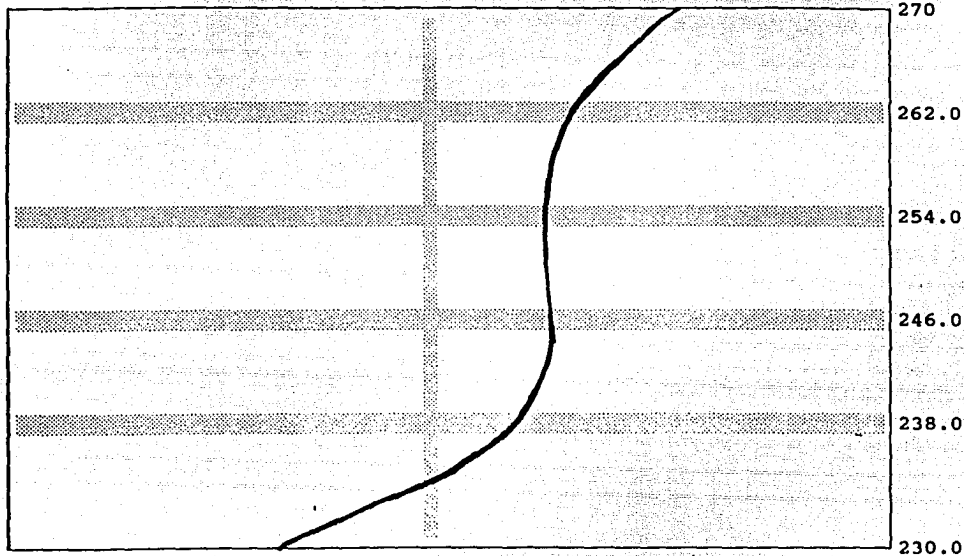
Muestra: Cortisol 21 Hs ASB

ABSORBANCIA

ABS
2.000

1.0000

0.000
NM
270



VELOCIDAD DE GRAFICA: 300 NM/MIN

PICO MAXIMO

FUENTE: UV

λ	ABS
251.0	0.763

Fecha: 3-Junio-1990

Muestra: 3 CMO TC¹⁴ ASB

APENDICE II

Para llevar a cabo el estudio de la unión entre la albumina y el derivado esteroide de Testosterona en la reacción de conjugación se realizó el marcaje radioactivo del derivado esteroide con Carbono¹⁴ C₁₄, una vez obtenido el derivado esteroide marcado radioactivamente, se tomó alícuotas por duplicado de 100 µl de muestra, leyendo la actividad inicial del derivado esteroide antes de reaccionar, esto se hace en un contador de emisores Beta de centelleo líquido, todo este procedimiento se lleva a cabo en cada uno de los pasos de la metodología donde el esteroide interviene, a continuación se muestra un cuadro de registro:

Paso de Metodología	Actividad Especifica cpm	% de Actividad Especifica con respecto a la A.e Inicial	% de Actividad Especifica con respecto a la A.e del Esteroide en conjugación
Esteroides marcados antes de conjugación	3260 = 3489 3718	100	—
Reacción T* + ASB + carbodiimida	3200 = 3200 3201	91.71	100
Reacción de conjugación antes de diálisis	3200 = 3190 3180	91.43	99.68
Primer Vol. de diálisis	2454 = 2448 2442	70.10	76.50
Segundo Vol. de diálisis	536 = 534 532	15.30	16.70
Conjugado después de diálisis	221 = 219 217	6.20	6.80
Conjugado liofilizado y resuspendido	185 = 183 181	5.20	5.70

En la tabla se observa el registro llevado a cabo en el análisis del conjugado marcado.