

47



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DESARROLLO Y VALIDACION DE SEGUNDO ANTICUERPO COMO METODO DE SEPARACION ENTRE TRAZADOR UNIDO Y LIBRE EN UN RADIOINMUNOENSAYO DE FASE LIQUIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

JULIO RODRIGO VELASCO MONCADA

ASESORES: CARLOS GUTIERREZ AGUILAR ARANTZATZU LASSALA IRUESTE LUCIA ELIANA RANGEL PORTA



MEXICO, D. F.

200422
2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE SEGUNDO ANTICUERPO COMO MÉTODO DE
SEPARACIÓN ENTRE TRAZADOR UNIDO Y LIBRE EN UN
RADIOINMUNOENSAYO DE FASE LÍQUIDA.

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Julio Rodrigo Velasco Moncada.

Asesores :
Carlos Gutiérrez Aguilar.
Arantza Lassala Irueste.
Lucía Eliana Rangel Porta.

México, D.F., 2000.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres por la motivación y el amor que siempre me han dado.

A mis hermanas: Ivonne, Sandra, Vanessa y Cristina.

A Tania con mucho cariño.

A mis asesores: Doctores, Carlos Gutiérrez, Arantzazu Lassala y Lucía Rangel, por la confianza, el apoyo así como los conocimientos que me brindaron desde un principio.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a Lucy, Arantza y Carlos porque siempre me impulsaron para seguir adelante.

A la Doctora Laura Cobos por sus conocimientos y el tiempo que me dedico.

A los Doctores Susana, Clara y a Gerardo por su ayuda

Al Doctor Mario Cárdenas del Instituto de Nutrición por su tiempo y disposición.

A los miembros del jurado revisor de tesis Doctores: Javier Valencia, Joel Hernández, Antonio Porras, Laura Cobos y Carlos Gutiérrez por sus opiniones, gracias.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	22
LITERATURA CITADA.....	28

RESUMEN

VELASCO MONCADA, JULIO RODRIGO. Desarrollo y validación de segundo anticuerpo como método de separación entre trazador unido y libre en un radioinmunoensayo de fase líquida. (Bajo la dirección de: Carlos Gutiérrez Aguilar, Arantza Lassala Irueste y Lucía Eliana Rangel Porta).

El objetivo de este trabajo fue el de producir un segundo anticuerpo en burros contra IgG de conejo y de borrego, para su utilización como método de separación entre trazador unido y libre en un RIA de fase líquida. Se aislaron inmunoglobulinas G de borregos y de conejos, mediante precipitación con solución saturada de sulfato de amonio y cromatografía de afinidad, para ser utilizadas como antígenos. Se inmunizaron cuatro burros (dos burros por especie de IgG) con intervalos mensuales, en siete ocasiones. El antisuero obtenido se tituló mediante inmunoprecipitación en tubo capilar. Los títulos de anticuerpo aumentaron con cada inmunización, hasta alcanzar un plateau entre la cuarta y sexta inmunización. Así mismo, se demostró que el segundo anticuerpo fue capaz de separar el trazador unido del libre en un RIA de fase líquida. Se concluye que inmunizando burros contra IgG de conejo y borrego se logra la obtención de lotes abundantes de segundo anticuerpo. Además, estos anticuerpos tuvieron una alta afinidad por la IgG correspondiente, siendo capaces de precipitarla en inmunoensayos (inmunoprecipitación en tubo capilar y RIA). El segundo anticuerpo desarrollado en este estudio puede ser utilizado en la separación del trazador

INTRODUCCIÓN

El radioinmunoensayo (RIA), técnica inicialmente desarrollada para la cuantificación de insulina humana por Yalow y Berson en 1960, es una de las metodologías más utilizadas para la medición hormonal en el estudio de la endocrinología y fisiología reproductivas (1). Presenta grandes ventajas sobre otras técnicas, ya que tiene una alta sensibilidad y especificidad, además de que puede realizarse con rapidez, lo que permite el procesamiento ágil de un gran número de muestras (2).

Entre los requisitos indispensables para el desarrollo del RIA se encuentran: a) Contar con la sustancia que se va a medir (antígeno u hormona en estudio), b) poseer anticuerpos específicos con alta afinidad para el antígeno en estudio (primer anticuerpo), c) tener moléculas altamente purificadas iguales al antígeno en estudio, las cuales se utilizarán como sustancia de referencia (estándar), d) disponer de la sustancia a medir marcada radioactivamente (trazador u hormona marcada), e) tener un método de separación que permita distinguir las fracciones unidas y libres; siendo este último punto de gran importancia para evitar sobreestimaciones en la cuantificación hormonal (3).

El RIA es un sistema de competencia entre el trazador y el antígeno en estudio por unirse al primer anticuerpo. Así, mientras mayor concentración de hormona exista en la muestra, menor cantidad de trazador podrá unirse al primer anticuerpo y viceversa. Como resultado, al final de la reacción podrán encontrarse tanto anticuerpos que se encuentran unidos a la hormona en estudio como a la marcada, además de hormona y anticuerpos libres. Por ello, para obtener una cuantificación precisa de la hormona de interés, es esencial realizar una

adecuada separación de las fracciones unida y libre. El método de separación más conveniente debe ser sencillo, económico, reproducible y aplicable a un gran número de tubos, así como a distintos volúmenes de muestra, además debe lograr una separación completa de las fracciones. Entre los más comúnmente utilizados se encuentran al carbón dextrán, a la proteína A (pansorbina), al segundo anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo y al polietilenglicol (PEG) y debe seleccionarse aquel que se adapte mejor a cada análisis (3). Cuando se utiliza un segundo anticuerpo en un RIA de fase líquida, este reacciona con el primer anticuerpo formando un complejo que se precipita. De este modo, la fracción unida y la fracción libre son separadas y puede determinarse la radioactividad presente mediante un contador específico para el tipo de radiación utilizada (2).

En nuestro país, los medios de separación para las pruebas de RIA se compran a casas comerciales, generando un gasto importante para los laboratorios que utilizan esta metodología rutinariamente. Particularmente en el laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se gastaron alrededor de 15,000 pesos por este concepto en el periodo 1996-1997 (Bitácora del laboratorio). Como una alternativa más costeable, es posible utilizar un segundo anticuerpo dirigido contra IgG, desarrollado en una especie de la que puede obtenerse gran cantidad de suero, como son los burros, cubriéndose a un menor precio las necesidades impuestas por las pruebas de rutina.

El objetivo de este trabajo fue el de producir un segundo anticuerpo en burros contra IgG de conejo y de borrego, para su utilización como método de separación entre trazador unido y libre en un RIA de fase líquida.

HIPOTESIS.

La inmunización de burros con gammaglobulinas de conejo o de borrego es efectiva para la producción de anticuerpos específicos contra las mismas.

REVISION DE LITERATURA.

En 1937, Tiselius dividió a las proteínas del suero en cuatro grupos principales, de acuerdo a las características bioquímicas y estructurales que les confieren un patrón diferente de movimiento en un campo eléctrico, denominándolas albúmina y globulinas α , β y γ (4).

Las globulinas forman cerca del 50% de la proteína total del suero. Los anticuerpos se encuentran principalmente entre las gamma-globulinas y algunas beta-globulinas y tienen la capacidad de unirse de manera específica con un antígeno para contribuir a su secuestro y/o destrucción (5). Cuando se observan bajo el microscopio electrónico, se puede apreciar que tienen forma de "Y", ya que están compuestos por dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas, cuyo peso molecular es de 50,000 daltons y dos cadenas ligeras con un peso aproximado a 25,000 daltons. Las cadenas pesadas están unidas a las cadenas ligeras mediante puentes disulfuro y cada una está formada por una región que es constante y otra que es variable. La estructura de las regiones constantes de las cadenas pesadas, determina

la clasificación de las inmunoglobulinas en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Por otra parte, la región variable es la que define la especificidad de la molécula, ya que es el sitio que tiene la capacidad de unirse con el antígeno (paratope) (6).

La inmunoglobulina G (IgG) constituye el 75% de las inmunoglobulinas séricas, tiene un peso molecular de 160,000 daltons y una constante de sedimentación de 7S. Debido a su tamaño, puede atravesar vasos sanguíneos relativamente más fácil que otras moléculas, siendo un anticuerpo de gran importancia para el mecanismo de defensa.

Cuando se inyectan inmunoglobulinas a animales de una especie diferente a la de procedencia, estas pueden comportarse también como antígenos. Así, es posible preparar antisueros (sueros que contienen anticuerpos) que reaccionan con las inmunoglobulinas (7).

Para la producción de antisueros pueden inmunizarse diferentes especies animales, dependiendo del volumen que se desea obtener y del tipo de antígeno utilizado. Los animales como el conejo, la gallina o el cobayo, se manejan fácilmente y tienen un bajo costo de mantenimiento, pero proporcionan poco suero; mientras que el sustento de los animales mayores, como el caballo, el borrego o la cabra es más costoso, pero se obtiene mayor cantidad de suero (3). El segundo anticuerpo utilizado en el RIA, suele generarse en grandes especies, ya que se requiere de lotes abundantes con características homogéneas que permitan la estandarización de los ensayos (3,8).

Un antisuero de buena calidad depende en gran medida de la pureza del antígeno (3), por lo que se han desarrollado diferentes métodos tanto específicos como no específicos, que redundan en diferentes grados de aislamiento y purificación. En los métodos no específicos,

todas las inmunoglobulinas y otras proteínas con características similares a estas, son separadas de los demás componentes que forman el suero. Sin embargo, cuando se quiere desarrollar un segundo anticuerpo es necesario el aislamiento de una sola clase de inmunoglobulina. Para su aislamiento debe recurrirse a los métodos específicos, en los cuales el anticuerpo deseado puede ser separado del suero mediante inmunoabsorbentes, utilizando una matriz insoluble (microesferas de celulosa, poliestireno, agarosa o dextrán) como soporte sólido para un antígeno específico (9,10); este método es conocido como cromatografía de afinidad (11). Cuando el suero es pasado a través de la matriz, los elementos que no tienen especificidad por el antígeno unido a la misma pasan libremente, mientras que los anticuerpos específicos se unen a su antígeno mediante fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, de Van der Waals y/o por puentes de hidrógeno. Todas las proteínas que no se hayan fijado a la matriz, se lavan posteriormente con solución salina o amortiguador alcalino. Finalmente, el anticuerpo unido al antígeno es liberado utilizando un agente de disociación (tal como un cambio en el pH) y recibido en soluciones de alta molaridad, para evitar su desnaturalización. Igualmente, puede aislarse un antígeno, si lo que se une a la matriz es un anticuerpo con afinidad por el antígeno.

Generalmente, con los métodos no específicos de purificación se logra el aislamiento de una gran cantidad de anticuerpos de poca pureza, mientras que con los métodos específicos se obtiene un número menor de anticuerpos con una pureza mayor (12). Es posible así mismo combinar ambos métodos, separando inicialmente a las inmunoglobulinas del resto de los elementos del suero y posteriormente solo a la inmunoglobulina de interés obteniendo preparaciones altamente puras.

La antigenicidad de una molécula depende tanto de su estructura química como de su tamaño. Las moléculas mayores a 5,000 daltons y con una estructura química compleja son por definición buenos antígenos, ya que estimulan la producción de anticuerpos por sí mismas, mientras que aquellas que son más pequeñas (haptenos) o con una estructura química sencilla necesitan unirse a moléculas acarreadoras para formar complejos que resulten inmunogénicos (13).

La respuesta antigénica puede incrementarse con el uso de sustancias capaces de prolongar y estimular la producción de anticuerpos, a estas se les conoce como adyuvantes. Algunos ejemplos de adyuvantes son el hidróxido de aluminio o el adyuvante de Freund, que puede ser incompleto (aceite mineral y ceras) o completo (con micobacterias inactivadas) (12).

La administración de entre 0.2 y 2.0 mg del antígeno es por lo general suficiente para estimular una producción eficiente de anticuerpos, pudiéndose utilizar las vías intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, o la aplicación directa en los linfonodos (13). El volumen total de la preparación antigénica se divide, inoculándose en varios sitios del animal y empleando una o más de las vías ya mencionadas. Los esquemas de inmunización varían dependiendo del antígeno y especie animal utilizados, efectuándose por lo general una inmunización inicial seguida de por lo menos un refuerzo a los 21 días. Sin embargo, para obtener un suero de buena calidad se requiere generalmente de un mayor número de refuerzos distribuidos en un periodo mínimo de entre 3 y 6 meses (14).

La cantidad de anticuerpos que se ha desarrollado en el animal, se determina en las muestras de suero obtenidas entre una y dos semanas después de cada inmunización. A este proceso se le conoce como titulación y existen diferentes metodologías para su realización, entre las que se encuentra la inmunoprecipitación. Este es un método que puede ser cualitativo o cuantitativo, y que puede desarrollarse en medio líquido o semisólido (6). En

un medio líquido, la reacción se presenta cuando los antígenos se conjugan con los anticuerpos específicos (ambos solubles) para formar complejos insolubles visibles (precipitado). Si existe un exceso de anticuerpo con relación al antígeno o un exceso de antígeno con respecto al anticuerpo no se observa precipitado. De este modo, el ensayo se lleva a cabo colocando cantidades constantes de anticuerpo (antisuero) a cantidades crecientes de antígeno. Como la reacción se lleva a cabo en tubos capilares, es posible medir con una escala lineal la cantidad de precipitado presente estimándose el total en forma semicuantitativa. Así, expresando la cantidad de precipitado en milímetros sobre el eje de las ordenadas y la cantidad de antígeno utilizado en el eje de las abscisas se obtiene una curva que puede dividirse en tres zonas: zona de exceso de anticuerpo (sin precipitado), zona de equivalencia (unión máxima del antígeno con el anticuerpo) y zona de exceso de antígeno (sin precipitado), manifestándose la cantidad de antígeno que es capaz de reconocer el anticuerpo (4).

MATERIAL Y MÉTODOS

1) OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE CONEJO Y BORREGO.

Para la obtención de las gammaglobulinas que se utilizaron como antígenos para inmunizar a los burros, se tomaron 8 ml de sangre de borrego mediante punción yugular y 8 ml de sangre de conejo al sacrificio, usando tubos de vidrio sin anticoagulante. Las muestras de sangre se almacenaron a 4°C durante 24 h y una vez formado el coágulo, se centrifugaron a 3500 rpm durante cinco minutos para separar el suero. Con el objeto de eliminar contaminantes, el suero se filtró a través de una membrana de Nitrato de Celulosa de 0.45 µm (Whatman), que se conectó a una bomba de vacío para facilitar el proceso. Una vez filtrado, el suero fue identificado y dividido en alicuotas, manteniéndolo a -20 °C hasta su procesamiento.

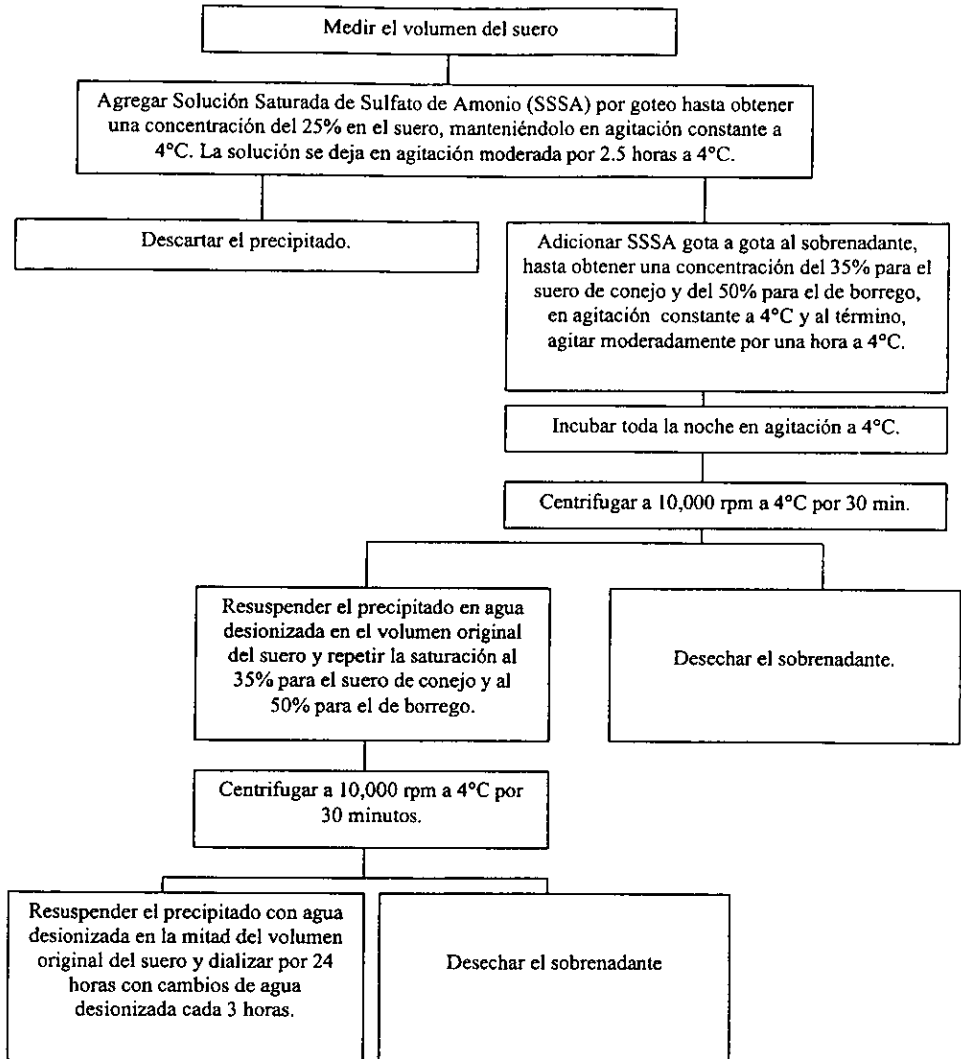
A) Aislamiento de inmunoglobulinas

Para lograr un adecuado aislamiento de las IgG fue necesario utilizar un procedimiento escalonado utilizando dos técnicas diferentes:

- Precipitación por Sulfato de Amonio.

El suero previamente filtrado se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio (SSSA), siguiendo el método descrito por Garvey *et al.* (12) y explicado en el Esquema 1.

Esquema 1. Metodología para la purificación de los anticuerpos por precipitación con Solución de Sulfato de Amonio.



-Cromatografía de afinidad

Una vez obtenido el precipitado final, las IgG fueron purificadas mediante una columna de cromatografía de afinidad de proteína G, específica para inmunoglobulinas G.

El protocolo que se siguió fue el descrito por Coligan *et al.* (15) y sintetizado a continuación:

I.- Inicialmente la columna se equilibró a un pH de 8, mediante un lavado con amortiguador de fosfato salino (PBS: 2.35 g NaH_2PO_4 , 11.60 g Na_2HPO_4 , 8.80 g NaCl , 1000 ml H_2O desionizada) utilizando cinco veces el volumen de la columna.

II.- La solución de anticuerpos (2 ml de suero de conejo o borrego) se pasó a través de la columna, dejándola recircular gota a gota hasta que la solución pasara cinco veces, para asegurarse de que las IgG quedaran fijas al gel.

III.- La columna se lavó nuevamente con 15 ml de PBS, con el objeto de eliminar a todas las proteínas que no se hubieran fijado al gel.

IV.- El volumen obtenido del lavado se colectó en 10 tubos de vidrio (1.5 ml por tubo) para posteriormente pasarlo de nuevo por la columna y leerlo en el espectrofotómetro, verificando así la ausencia de IgG libre.

V.- Las IgG unidas al gel se liberaron mediante un cambio en el pH, al eluir la columna con glicina al 0.1 M (pH 2.9-3), colectándose en fracciones de 1.5 ml en un total de 10 tubos de vidrio, los cuales contenían 100 microlitros de hidroximetil-aminometano (Tris) al 1 M para evitar que el pH ácido desnaturalizara a las IgG.

VII.- Finalmente, para que pudiera ser almacenada en refrigeración, la columna se lavó con PBS a un pH de 8, hasta lograr un equilibrio entre la solución de lavado y la solución colectada y se le agregó 1 ml de ázida de sodio al 0.2% como conservador.

B) Determinación de proteínas totales.

La concentración de IgG en cada una de las fracciones colectadas a partir de la columna de cromatografía, se determinó utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. Las fracciones cuyas lecturas fueron mayores a 1 de absorbancia (A), fueron seleccionadas para la inmunización, ya que se ha señalado que cuando la lectura es de alrededor de 1.4 A la solución contiene aproximadamente 1mg /ml de IgG (16).

C) Liofilización.

Con la finalidad de lograr una mayor concentración de antígeno en un menor volumen, las fracciones seleccionadas se congelaron utilizando acetona (J.T.Baker) y hielo seco y se colocaron en una liofilizadora (Labconco Co.), a una temperatura de -40°C y un vacío de 133×10^{-3} mBAR, hasta lograr la desecación (aproximadamente 24 hrs). Una vez secas, las fracciones de IgG fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización para la preparación del inmunógeno.

2) PRODUCCIÓN DEL SEGUNDO ANTICUERPO

A) Preparación del inmunógeno

La preparación del inmunógeno se realizó siguiendo la técnica descrita por Vaitukaitis *et al.* (17), donde 12 mg de inmunoglobulina de conejo o de borrego se resuspendieron en 1.5 ml de agua bidestilada y se mezclaron con el adyuvante completo de Freund (ACF) en una proporción 1:1 (v/v). Para lograr la emulsificación se utilizó un homogeneizador de alta velocidad durante 10 min, manteniendo el recipiente en hielo para evitar la desnaturalización de la proteína por el calor. Una vez preparado, el inmunógeno se

conservó en refrigeración hasta el momento de ser administrado. A partir de la segunda inmunización, la preparación fue preparada con adyuvante incompleto de Freund (AIF).

B) Inmunización:

La preparación antigénica se le administró a cuatro burros (tres hembras y un macho), con un peso promedio de 80 kg y una edad aproximada de un año. Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos, al primero de los cuales se le aplicó IgG de conejo (Grupo A, n=2) y al segundo IgG de borrego (Grupo B, n=2).

El esquema de inmunización se apegó al descrito por Schalch *et al.* (18), en donde las inyecciones se aplicaron a intervalos de un mes, hasta completar un total de siete inmunizaciones. En cada ocasión se utilizaron 6 mg de IgG por animal, que se administraron por vía subcutánea en la tabla del cuello en 6 puntos diferentes, de acuerdo a lo recomendado por Vaitukaitis *et al.* (17).

C) Titulación de anticuerpos

Para la titulación de los anticuerpos se tomaron 8 ml de sangre de cada burro por punción yugular, 8 días después de cada inmunización, separándose y almacenándose el suero a -20°C hasta que fue procesado. Se utilizó el método de inmunoprecipitación, según la técnica descrita por Garvey *et al.* (12), en donde la cantidad de anticuerpos producidos se mide en forma semicuantitativa y se expresa en mm lineales.

La titulación de los anticuerpos se dividió en dos partes: en la primera, la técnica se modificó para verificar que los títulos aumentaran al avanzar el esquema de inmunización, mezclando al antígeno con el anticuerpo en una proporción de 1:1 (v/v) con una concentración constante del antígeno. Para ello, se utilizaron tubos capilares de vidrio de

7.5 cm sin heparina, con un diámetro interior de 1.1 mm (Corning), se agregaron 2.5 μ l del anticuerpo (contenido en el suero) por capilaridad y se invirtió al tubo capilar hasta que el fluido alcanzara el extremo opuesto. Después se añadieron, nuevamente por capilaridad, 2.5 μ l del antígeno (IgG utilizada para inmunizar) a una concentración de 2.1 mg/ml. Para tener controles de referencia, se prepararon dos tubos, a uno de los cuales se le agregó solución salina fisiológica (SSF) con el antígeno y al otro SSF con el anticuerpo, guardándose la misma proporción que la de los capilares destinados para la titulación. Después de incorporar las soluciones mediante rotación del tubo capilar durante 1 minuto, los tubos se sellaron y se colocaron en posición vertical en una gradilla de plastilina, dejándose incubar 72 horas a temperatura ambiente para permitir que se formara el precipitado. Finalmente, el precipitado se midió en cada muestra mediante una regla milimétrica y se graficaron los resultados.

En la segunda parte, con la finalidad de conocer la sensibilidad del anticuerpo, se hizo la titulación exclusivamente en la última muestra de cada animal, siguiendo la técnica original (12). Para este ensayo se utilizaron diluciones dobles seriadas del antígeno (IgG), iniciando con una concentración de 5 μ g/ml hasta obtener una concentración final de 39 ng/ml. Se considera que el anticuerpo es capaz de reconocer al antígeno cuando existe una precipitación evidente mayor a 3mm.

3) VALIDACION DEL SEGUNDO ANTICUERPO COMO METODO DE SEPARACION EN UN RIA DE FASE LIQUIDA.

Para corroborar que el segundo anticuerpo obtenido se comportara eficientemente como método de separación en un radioinmunoensayo bien establecido, se utilizó un RIA para medir hormona luteinizante (LH) de rata. En este RIA, el primer anticuerpo fue IgG de conejo anti-LH de rata a una dilución final de 1:200,000 en 200 μ l, probándose 100 μ l del segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo) en diluciones (1:5; 1:10 y 1:20) para establecer la dilución máxima en la que era capaz de precipitar el primer anticuerpo en su totalidad. Después de añadir el segundo anticuerpo, se le agregó polietilenglicol al 8% y el ensayo se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 3500 rpm durante 45 minutos a 4°C, y la cantidad de radioactividad fue determinada en un contador gamma.

RESULTADOS

A) Aislamiento de Inmunoglobulinas

En el cuadro 1 se muestra el patrón típico de elución de IgG después de su adsorción a una columna de proteína G, y la absorbancia (A) determinada por espectrofotometría a 280 nm. Puede apreciarse que el aislamiento y purificación de IgG fueron exitosos, ya que después de cambiar el buffer de la columna a un pH de 2.9, la proteína se eluyó y recuperó en un solo pico entre los tubos 2 y 5, discriminándose fácilmente por mostrar absorbancia mayor a 1 (cuadro 1). La proteína comienza a detectarse a partir del segundo tubo, ya que es necesario que pase cierta cantidad de amortiguador a un pH de 2.9 a través de la columna para que se disocie la proteína del gel. Así mismo, al volver a pasar por la columna los desechos del primer lavado y someterlos a una nueva lectura en el espectrofotómetro, no se observó ningún indicio de la presencia de IgG (lecturas: $A < 1$), certificándose que la purificación se llevó a cabo de manera adecuada.

B) Inmunización

Después de la primera y segunda inmunizaciones, todos los burros mostraron la formación de al menos un absceso en la zona de inmunización. Sin embargo, esto no sucedió en ninguna de las inmunizaciones subsecuentes.

C) Titulación de anticuerpos

Como puede apreciarse en la figura 1 los títulos de anticuerpos en el suero de los burros aumentaron con el avance del calendario de inmunización, llegando a su mayor nivel después del tercer refuerzo. Sin embargo, la respuesta en los animales del grupo B fue

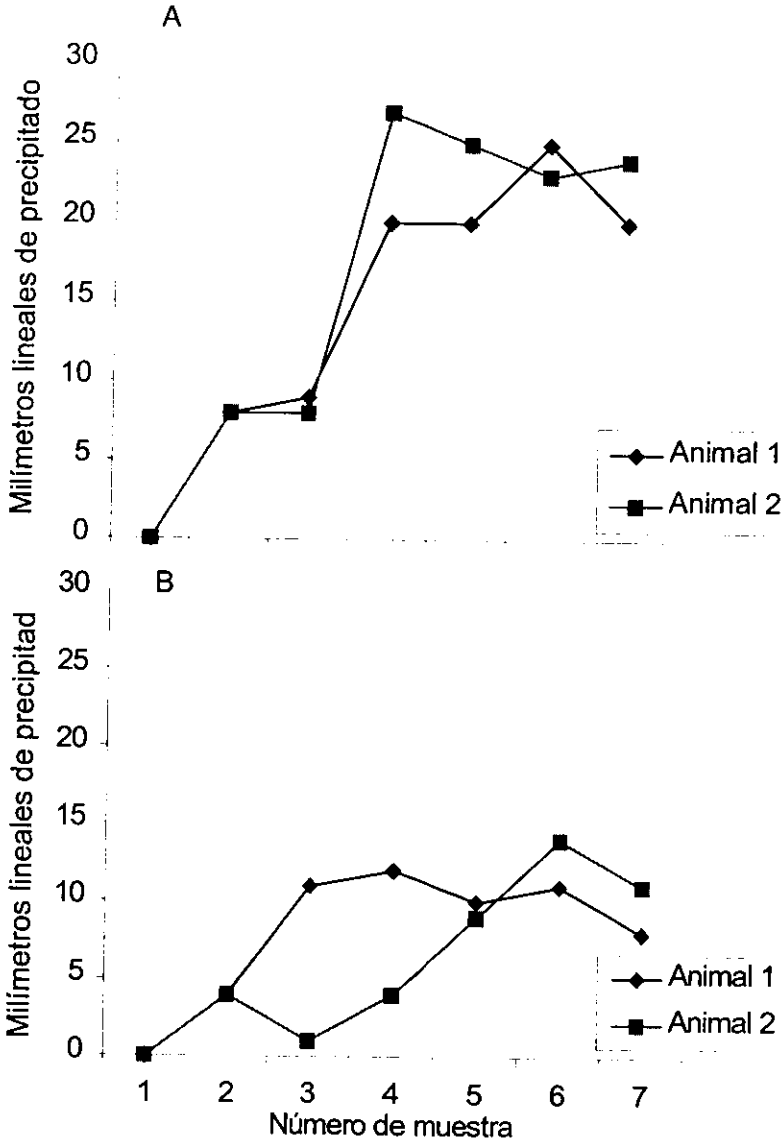
menor, obteniéndose un precipitado máximo de 14 mm, comparándolo con el del grupo A que fue de 27 mm

Cuadro 1. Absorbancia de las fracciones aisladas mediante precipitación por sulfato de amonio y eluidas en la cromatografía de afinidad con glicina a un pH de 2.9. La longitud de onda utilizada fue de 280 nm.

FRACCION OBTENIDA	ABSORBANCIA	
	SUERO DE CONEJO	SUERO DE BORREGO
1	0.230	0.325
2	0.736	3.166*
3	3.665*	2.26*
4	3.142*	0.354
5	1.874*	0.125
6	0.376	0.077
7	0.444	0.071
8	0.384	0.070
9	0.380	0.051
10	0.225	0.051

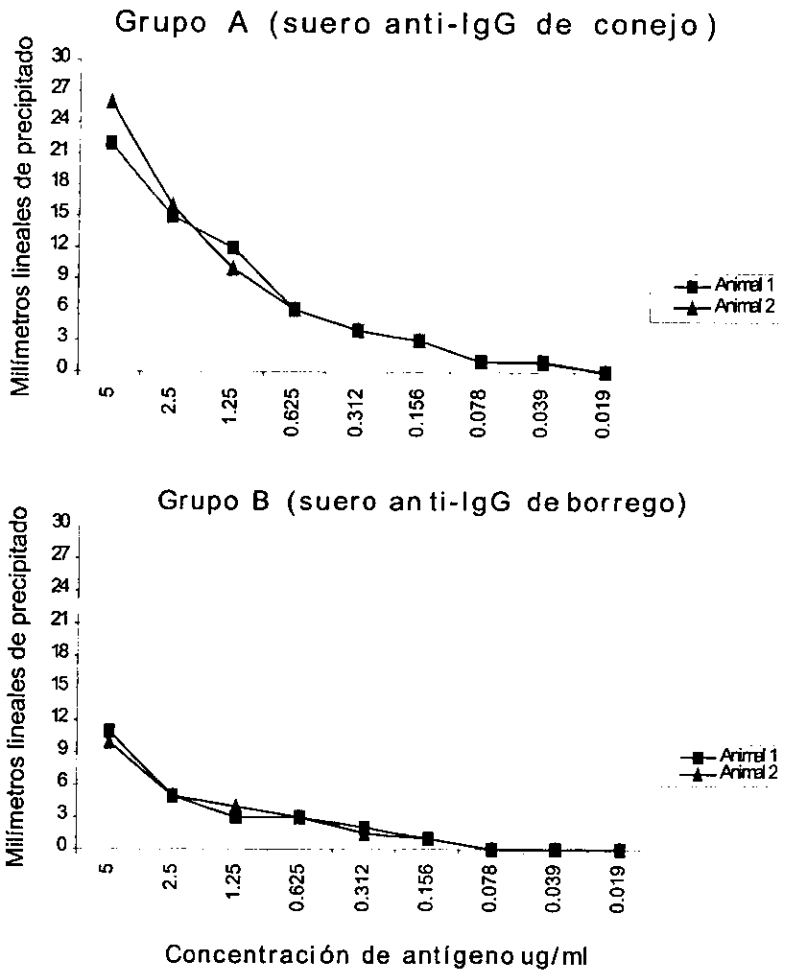
*Fracciones seleccionadas para la inmunización.

Fig 1. Titulación de anticuerpos contra IgG de conejo (A) e IgG de ovino (B) en los sueros obtenidos a lo largo del calendario de inmunización, utilizando el método de inmunoprecipitación.



Así mismo, los anticuerpos obtenidos contra IgG de conejo mostraron mayor afinidad por el antígeno, detectándolo en una concentración de 156 ng/ml, mientras que en el grupo B se observó precipitación a una concentración de 625 ng/ml (Fig 2).

Figura 2. Sensibilidad del segundo anticuerpo en un ensayo de inmunoprecipitación para la detección de IgG.



D) Validación del anticuerpo anti-IgG de conejo en RIA de fase líquida.

En el RIA para medir LH de rata se logró precipitar el 100% del primer anticuerpo con las diluciones usadas. Por lo tanto, la dilución de trabajo del segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo) recomendada para este ensayo fue de 1:20, ya que se logra utilizar la dilución más alta y se optimiza el rendimiento del mismo.

DISCUSIÓN

La inmunización de los burros con IgG de conejo o borrego permitió obtener un segundo anticuerpo capaz de precipitar a la IgG, para su utilización como método de separación en sistemas de RIA de fase líquida.

La respuesta a la inmunización fue evaluada mensualmente, en forma sencilla, económica y rápida, mediante la titulación del antisuero por la técnica de inmunoprecipitación. Este método permitió obtener una medición semicuantitativa del incremento de los títulos conforme al número de inmunizaciones aplicadas. El mayor título de anticuerpos se obtuvo después de la cuarta inmunización. Sin embargo, se observaron diferencias individuales en la respuesta inmune ya que el burro 2 del grupo B no mostró títulos satisfactorios de antisuero hasta después de la sexta inmunización. Esta variabilidad en la respuesta ha sido observada por otros investigadores (12, 17). Por otro lado, se ha observado que a mayor distancia filogenética entre la especie de la cual se obtiene el inmunógeno y la especie receptora, mayor será la reacción inmunológica. Por ejemplo, Russel, (19) (citado por Svendsen et al.) señala que las aves son buenas productoras de anticuerpos contra proteínas de mamíferos, debido a que están muy alejadas filogenéticamente de ellos. En el presente trabajo, los antisueros obtenidos contra IgG de conejo, fueron capaces de identificar al antígeno a una concentración de 156 ng/ml, mientras que aquellos desarrollados contra IgG de borrego lo hicieron a concentraciones mayores de 625 ng/ml (Fig. 2). Esta variación en la sensibilidad de los anticuerpos denota diferencias en la inmunogenicidad de la IgG de las dos especies utilizadas, debido a que la relación filogenética de los equinos es mayor con los ovinos que con los lepóridos (20).

En el RIA de fase líquida existen diversos métodos para la separación de trazador unido y libre. Algunos se consideran inespecíficos porque interactúan con las moléculas de acuerdo a su tamaño, mientras que otros son específicos porque se unen exclusivamente a la partícula contra la que fueron creados. Dentro del primer grupo se encuentra el carbón activado que se utiliza para la adsorción de moléculas menores a 7 kDa, por lo que se une a la fracción libre dejando en la fase líquida la fracción unida al anticuerpo. Su desventaja radica en que puede adsorber parte de la fracción unida, además de que requiere un control estricto del tiempo de incubación (3). En contraste, el polietilenglicol, también método inespecífico, precipita complejos de alto peso molecular (antígeno-anticuerpo). Sin embargo, tiene la desventaja de precipitar fracción libre unida a proteínas del amortiguador, aumentando la unión no específica. La proteína A por el contrario une específicamente a la IgG, teniendo como principal desventaja el alto costo. Al igual que la anterior, el segundo anticuerpo dirigido contra IgG se une al complejo antígeno-anticuerpo creando un compuesto aun más grande que precipita a la centrifugación (3). El segundo anticuerpo puede usarse en conjunto con polietilenglicol disminuyendo la concentración de éste y por tanto siendo casi nula la unión no específica (21). Además, el segundo anticuerpo puede ser utilizado en métodos de RIA destinados a mediciones de diversos antígenos, siempre y cuando utilicen primer anticuerpo de la misma especie. En este estudio, el suero contra IgG de conejo logró precipitar el 100% de la radioactividad (fracción unida) utilizándolo en una dilución 1:20 cuando el primer anticuerpo se encontraba a una dilución final de 1:200.000. Estos resultados son mejores que los obtenidos por Nordfang *et al.* (22) y Hales *et al.* (23) quienes utilizaron el segundo anticuerpo a una dilución de 1:16, mientras que Schalch *et al.* (18) lo usaban a una dilución final de 1:6. Por otro lado, la dilución alcanzada

en este trabajo concuerda con las diluciones de trabajo (1:20-1:50) para ensayos de múltiples hormonas (24)

El segundo anticuerpo puede además aplicarse en otras técnicas inmunológicas. Como ejemplo de estas están los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) usados para la detección de antígenos. En el ELISA indirecto, el segundo anticuerpo ligado a una enzima se usa para cuantificar la cantidad de primer anticuerpo unido al antígeno (6, 25). Además, el segundo anticuerpo marcado con enzimas, también puede utilizarse en la técnica de Western Blot para la identificación de antígenos en un gel de electroforesis (7, 25). Otra aplicación del segundo anticuerpo, es en las pruebas de inmunohistoquímica, donde la anti-globulina se une a enzimas o a colorantes fluorescentes, tales como la fluoresceína y la rodamina, para visualizar sitios específicos en un corte de tejido o preparado celular, demostrándose la distribución del antígeno en el tejido y dentro de las células (6). Además, el segundo anticuerpo puede ser utilizado para el aislamiento del primer anticuerpo por cromatografía de afinidad, de manera similar a lo realizado en este estudio. En resumen, además de su utilización en el RIA el segundo anticuerpo tiene la ventaja de poderse aplicar a otras técnicas para la determinación de antígenos y anticuerpos.

La pureza del antígeno es de gran importancia en la obtención de un segundo anticuerpo. Kakabakos *et al.* (26) recomiendan la utilización de la cromatografía de afinidad como método para el aislamiento de IgG de conejo, ya que en su estudio obtuvieron anticuerpos con una alta afinidad y especificidad después del aislamiento de IgG por ese método. La obtención de IgG mediante el proceso de purificación escalonado, utilizando SSSA y cromatografía de afinidad, permitió el aislamiento eficiente de IgG de ratón con una pureza

del 95% (27). En el presente estudio, se utilizó el método escalonado para la obtención de IgG, obteniéndose una adecuada purificación del antígeno reflejada en un solo pico al eluirse de la columna de afinidad.

La producción de anticuerpos depende también de la estructura y tamaño del antígeno, así como de la capacidad de no ser eliminados rápidamente del organismo para lograr una respuesta inmunológica satisfactoria. En ocasiones las moléculas menores a 1000 daltons necesitan unirse a proteínas acarreadoras, Vaitukaitis *et al.* (17) obtuvieron anticuerpos anti-testosterona en conejos utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína acarreadora unida a la testosterona. Igualmente, Rangel (28) inmunizó gallinas contra cortisol unida a BSA obteniendo títulos satisfactorios en el suero. En el presente estudio, no fue necesaria la adición de proteínas acarreadoras a la IgG ya que por su peso molecular (160 kDa) resulta ser suficientemente inmunogénica al ser inyectada a una especie diferente de la de procedencia. Esto concuerda con lo informado por Nordfang *et al.* (22) y Hales *et al.* (23) quienes obtuvieron anticuerpos anti-IgG de borrego y de cerdo respectivamente, cuando inmunizaron conejos contra IgG por sí sola.

En la producción de anticuerpos, es común el uso de adyuvantes, que adicionados al antígeno, tienen la capacidad de promover la respuesta inmune. Se han investigado diferentes tipos de adyuvantes, encontrándose que el adyuvante de Freund es el más potente para la estimulación de producción de anticuerpos en animales experimentales (29). Como algunos autores informan (17,18,22), el uso del adyuvante de Freund estimula la respuesta inflamatoria crónica de tipo local intensificando la inmunidad y liberando al antígeno lentamente de la fase acuosa para fomentar la producción de anticuerpos durante un mayor tiempo. Se ha observado que el adyuvante completo de Freund (ACF) produce una mayor respuesta en comparación con el adyuvante incompleto de Freund (AIF) (30). En este

trabajo el antígeno se emulsificó en el ACF en las primeras dos inmunizaciones y posteriormente en AIF, para aminorar los abscesos en los sitios de inoculación, de acuerdo a lo recomendado por Edelman *et al.* (29).

El segundo anticuerpo suele producirse en grandes especies, ya que se necesitan lotes abundantes de antisuero para la estandarización de los ensayos (3). En este estudio, la inmunización de burros permitió obtener abundantes cantidades de antisuero con características homogéneas. De acuerdo con la dilución de trabajo necesaria (1:20 en 100 μ l) para el RIA de LH realizado, se puede concluir que el segundo anticuerpo obtenido (2 litros por animal) sirve para el procesamiento de aproximadamente 800,000 muestras. Tomando en cuenta, que los títulos de anticuerpos alcanzan su máximo nivel a partir del cuarto mes de iniciada la inmunización, se calculó que el costo para la obtención del segundo anticuerpo en burros fue de aproximadamente \$5,000 por animal. Cabe mencionar que en el laboratorio de endocrinología (FMVZ, UNAM) se procesan por RIA cerca de 8,000 muestras anualmente, gastándose por este concepto \$6,000 en reactivos para la separación del trazador unido y libre. Por lo tanto, la cantidad de anticuerpo lograda en este estudio abastecería las necesidades de segundo anticuerpo por 10 años, si la demanda se mantuviera constante, significando un ahorro anual de \$5000.

CONCLUSIONES

La inmunización contra IgG de conejo y borrego en burros permitió la obtención de lotes abundantes de segundo anticuerpo. Estos antisueros demostraron tener afinidad por IgG y ser capaces de precipitarla en inmunoensayos (inmunoprecipitación en tubo capilar y RIA).

LITERATURA CITADA

1. Yalow R, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960; 39: 1157-1175.
2. Turgeon ML. Immunology and serology in laboratory Medicine. 3rd ed. St Louis Missouri: The C.V. Mosby Company, 1990.
3. Libertun C. Radioinmunoanálisis, Fundamentos y aplicaciones. 1^a ed. Buenos Aires: López Libreros Editores, 1980.
4. Ortiz L. Inmunología. 1^a ed. Distrito Federal: Interamericana, 1987.
5. Carpenter P. Inmunología y serología. 2^a ed. Distrito Federal: Prensa Médica Mexicana, 1982.
6. Roitt I. Inmunología fundamentos. 7^a ed. Madrid: Médica Panamericana, 1997.
7. Tizzard I. Inmunología Veterinaria. 4^a ed. Distrito Federal: Interamericana, 1992.
8. Skelley DS, Brown LP, Besch PK. Radioimmunoassay. *Clin Chem* 1973; 19: 146-174.
9. Campbell DH, Luescher E, Lerman LS. Immunogenic Adsorbents, I. Isolation of antibody by means of cellulose protein antigen. *Proc Nat Acad Sci* 1951; 37: 575-600.
10. Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfisen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Nat Acad Sci* 1968; 61: 636-640.
11. Cuatrecasas P, Anfisen CB. Affinity chromatography. *Ann Rev Biochem* 1971; 40: 259-264.
12. Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. Methods in immunology. 3rd ed. Massachusetts: W.A Benjamin Inc, 1977.
13. Playfair JHL, Hurn BAL, Schulster D. Production of antibodies and binding reagents in radioimmunoassay and saturation analysis. *Br Med Bull* 1974; 30: 26-28.

14. Pikler GM. El radioinmunoensayo. *Rev Invest Clin* 1973; 25: 51-66.
15. Coligan J, Kruispeek AM, Margulies DH, Sevrach EM, Trober WS. Purification and fragmentation of antibodies. *Current Protocols in Immunology* 1991; (3): 2.7-2.9.
16. Campbell DH. *Methods in immunology*. 2nd ed. New York: W.A. Benjamin, 1970.
17. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocr* 1971; 33: 988-991.
18. Schalch SD, Parker ML. A sensitive double antibody immunoassay for human growth hormone in plasma. *Nat* 1964; 203: 1141 - 1142.
19. Svendsen L, Crowley A, Ostergard H, Stodulski G, Hau J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Lab Anim Sci* 1995; 45: 89-93.
20. Arora MP. *Organic evolution*. 1st ed. New Delhi: Himalaya Publishing House, 1991.
21. Segre GV, Brown EN. Measurements of hormones. In: De Groot LJ, editor. *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 1993. 43- 65.
22. Nordfang O, Höier-Madsen M, Halberg P, Liebergkind J. A new radioimmunoassay for IgM and IgG rheumatoid factors, based on a double antibody method. *J Immunol Meth* 1981; 47: 87-97.
23. Hales CN, Randle PJ. Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate. *Biochem J* 1963; 88: 137-143.
24. Gutierrez CG. The effect of nutrition and metabolic hormones on follicular development in cattle (Tesis de doctorado). Edimburgo Escocia: Univ Edimburgo, 1997.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

25. Dutta SK, Mattingly BL, Shankarappa B. Antibody response to *Ehrlichia risticii* and antibody reactivity to the component antigens in horses with induced Potomac horse fever. *Infec Immunol* 1989; 57: 2959-2962.
26. Kakabakos SE, Evangelatos GP, Ithakissios DS. Immunoabsorption of IgG onto second antibody covalently attached to amino-dylark beads for radioimmunoassays. *Clin Chem* 1990; 36: 497-500.
27. Svatsi J, Milstein C. The disulfide bridges of a mouse Immunoglobulin G1 protein. *Biochem J* 1972; 126: 837-850.
28. Rangel LE, Perera G, Lassala A, Zarco LA. Desarrollo de un método de radioinmunoanálisis para cortisol, utilizando anticuerpos obtenidos y purificados de la yema de huevo de gallinas inmunizadas. *Vet Méx* 1999; 30: 289-295.
29. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Infec Disease* 1980; 2: 370-383.
30. Fulginti VA. Immunization in clinical practice. 2nd ed. Washington: JB Lippincott. Co, 1982.