



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CONJUGACION DE
ANTICUERPOS PARA USO TERAPEUTICO EN CABALLOS
Y EN SISTEMAS DE DIAGNOSTICO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
OMAR ASAF RUIZ CAZARES

DIRECTOR: DR. ANDRES ROMERO ROJAS
COORDIRECTOR: M.V.Z. Cert. ANA MARIA RIOS MENA
ASESOR: QFB CARLOS PONCE HERNANDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: RUIZ CAZARES
QUAR ASAF

FECHA: 27/09/2005

FIRMA: [Signature]



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Aislamiento, purificación y conjugación de anticuerpos
para uso terapéutico en caballos y en
sistemas de diagnóstico.

que presenta el pasante: Omar Asaf Ruíz Cázares
con número de cuenta: 09715519-7 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Agosto de 2005

PRESIDENTE Dra. Susana E. Mendoza Elvira
VOCAL Dr. Andrés Romero Rojas
SECRETARIO MVZ. Angel G. Martínez Sosa
PRIMER SUPLENTE QFB. Gabriela Escalante Reynoso
SEGUNDO SUPLENTE QFB. Olimpia R. Ponce Crippa

Susana E. Mendoza Elvira
Andrés Romero Rojas
Angel G. Martínez Sosa
Gabriela Escalante Reynoso
Olimpia R. Ponce Crippa

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se la dedico:

A mis Padres:

Por el apoyo incondicional otorgado durante todo lo que llevo de vida, demostrarme que la vida no es fácil, por esa subversión a seguir adelante aunque conciendan conmigo y por haberme e mostrado el camino que asciende el orgullo por mi y les aseguro, lo seguirán sintiendo.

A mis hermanos:

Isaac

Dante

Aline

A mis amigos:

En su ser conocen cómo es que se atan conmigo , los nombres no son importantes para agradecerles como no lo fueron para conocerlos. Por esos momentos de su vida que me obsequiaron, dándome desinteresadamente felicidad y cubrir cierto vacío que alberga en mi ser y por demostrar que puedo contar con ustedes, les digo, cuenten también conmigo

A mis asesores:

Dr. Andrés Romero

MVZ. Ana María Ríos

QFB. Carlos Ponce

A Dios:

Por las fuerzas, el espíritu y las ganas e seguir adelante. Por no haberme dejado morir dentro de la mayor expresión del sentimiento mortal.

Al Laboratorio de Biología Molecular

Al módulo de Equinos

**Al Centro de investigación, Docencia y Tecnología
para la Salud Equina (CIDTSE)**

A la UNAM

Citas

"Hay hombres que luchan un día
y son buenos.
Hay otros que luchan un año
y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos.
Pero hay los que luchan toda la vida:
Esos son los imprescindibles".

Bertolt Brecht

"Sólo le pido a Dios que el dolor no me sea indiferente,
que la reseca muerte no me encuentre
vacío y solo y sin haber hecho
lo suficiente"

León Gieco

"Lo más terrible se aprende enseguida
y lo más valioso nos cuesta la vida"

Silvio Rodríguez



ÍNDICE

I ABREVIATURAS.....	
II ÍNDICE DE FIGURAS.....	
III ÍNDICE DE TABLAS.....	
IV RESUMEN.....	
1 INTRODUCCIÓN.....	
1.1 INMUNOLOGÍA ESPECÍFICA DEL CABALLO.....	
1.1.1 CÉLULAS INMUNES Y ANTÍGENOS DE SUPERFICIE.....	
1.1.2 ANTICUERPOS.....	
1.1.3 CITOCINAS.....	
1.2 PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS.....	
1.2.1 POR DIFERENCIA DE SOLUBILIDAD.....	
1.2.1.1 Sales Inorgánicas.....	
1.2.1.2 Variación del pH o temperatura.....	
1.2.1.3 Disolventes orgánicos.....	
1.2.1.4 Precipitación con proteínas básicas.....	
1.2.1.5 Polietilén glicol.....	
1.2.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	
1.2.3 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	
1.2.4 ELECTROFORESIS.....	
1.2.4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.....	
1.2.4.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	



	Pág.
1.2.5 DIÁLISIS.....	25
1.3. CONSERVACIÓN DE LOS ANTICUERPOS.....	26
1.3.1 LIOFILIZACIÓN.....	26
1.3.2 TEMPERATURA.....	28
1.4. CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS.....	28
1.4.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO WARBURG-CHRISTIAN.....	29
1.4.2 MÉTODO DE BRADFORD CON AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE.....	30
1.4.3 MÉTODO DE BIURET.....	30
1.4.4 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO.....	30
1.5 USOS DE LOS ANTICUERPOS.....	31
1.5.1 UTILIZACIÓN DE LA INMUNIDAD PASIVA.....	32
1.5.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MARCADOS (CONJUGADOS).....	36
1.5.2.1 Anticuerpos marcados con fluorocromos.....	38
1.5.2.2 Anticuerpos marcados con biotina.....	38
1.5.2.3 Anticuerpos marcados con enzimas.....	39
1.5.2.3.1 ELISA.....	39
1.5.2.4 Anticuerpos marcados con yodo.....	40
1.5.2.5 Anticuerpos monoclonales marcados por biosíntesis.....	42
1.6 JUSTIFICACIÓN.....	43
2 HIPÓTESIS.....	45
3 OBJETIVO GENERAL.....	46



	Pág.
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	46
4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	47
4.2 MUESTRA.....	47
4.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE IgG.....	48
4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	48
4.5 OBTENCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE CONTRA ANTICUERPOS DE CABALLO (INMUNIZACIÓN).....	49
4.6 ELABORACIÓN DEL ANTISUERO ANTICABALLO CONJUGADO CON PEROXIDASA (AACP).....	49
4.7 TITULACIÓN DEL CONJUGADO.....	50
4.8 LIOFILIZACIÓN DE IgG DE CABALLO.....	50
4.9 PREPARACIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE PARA LA INMUNIZACIÓN PASIVA.....	50
4.10 INMUNIZACIÓN PASIVA EN CABALLOS.....	50
4.11 EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS INOCULADOS.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 OBTENCIÓN DE IgG PURIFICADA.....	52
5.2 ANTICUERPOS DE CABRA ANTI IgG DE CABALLO.....	54
5.3 LIOFILIZACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS.....	55
5.4 INMUNIZACIÓN PASIVA EN CABALLOS.....	57
6 DISCUSIÓN.....	61
7 CONCLUSIONES.....	65



ÍNDICE

Pág.

8 REFERENCIAS.....66

ANEXO.....76



I ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
a.a.	aminoácido
AACP	anticuerpos anticaballo conjugados con peroxidasa
Ac	Anticuerpo
ACF	Adyuvante completo de Freund
ADN	Ácido desoxiribonucleico
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of Differentiation)
Cél.	célula
CK.MB	Creatinin cinasa isómero MB
EGP	electroforesis en gel de poliacrilamida
ELAW	Congreso Internacional de antígenos Leucocitarios de Equinos.
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EqBCR	Receptor de Células B Equinas
EqCD	Grupo de diferenciación Equina (Cluster of Differentiation Antigen)
EqTCR	Receptor de Células T Equinas
Fab	fracción de unión al antígeno
Fc	fracción cristalizable
g	gravedad
GM-CSF	Factor Estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
GPA	gel de poliacrilamida
gr	gramos
Ig	inmunoglobulina
IgA	inmunoglobulina A
IgD	inmunoglobulina D
IgG	inmunoglobulina G
IgE	inmunoglobulina E
IgM	inmunoglobulina M
IL	interleucina



IM, I.m.	intramuscular
INF	interferón
i.o.	intraoral
IV, I.v.	intravenoso
KD	kilo Daltones
Linf. B	linfocitos B
Linf. T	linfocitos T
mAbs	anticuerpos monoclonales
mcg	microgramos
mcm	micrómetros
MCP-1	Proteína quimiotáctica monocitaria 1;
mg	miligramos
ml	mililitros
nm	nanómetros
P/V	Peso Volumen
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PEG	polietilén glicol
pH	potencial de iones H ⁺
PT	presión-temperatura
rpm	revoluciones por minuto
SI	sistema inmune
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSF	solución salina fisiológica
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamino
TGF-β1	Factor Transformante de Crecimiento β1
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
UV	ultravioleta
um	micrómetros (micras)
μg	microgramos
μl	microlitros



II ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.2.1.1** Solubilidad de algunas proteínas en soluciones de sulfato de amonio
- Figura 1.2.3** Cromatografía de exclusión molecular
- Figura 1.2.4.1** Vista molecular de las redes formadas por la poliacrilamida
- Figura 1.3.1** Diagrama P-T del agua
- Figura 1.4.1** Estructura química del triptófano y tirosina
- Figura 1.5** Estructura de una IgG y funciones generales de los anticuerpos
- Figura 1.5.2** Producción de anticuerpos monoclonales
- Figura 4.4** Curva Estándar de proteína por la técnica de Bradford
- Figura 5.1** GPA-SDS durante la purificación.
- Figura 5.2** Título de IgG anti IgG de caballo durante la inmunización en cabra.
- Figura 5.3** Comparación de los títulos obtenidos en el liofilizado con diferentes tratamientos.
- Figura 5.4A** Pruebas de Dot-ELISA para las muestras de suero
- Figura 5.4B** Cinética de anticuerpos
- Figura 5.4C** Regresión lineal que muestra el decaimiento de anticuerpos



III ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.1.1** Antígenos encontrados con mAbs en células del SI equinas
- Tabla 1.1.2** Anticuerpos equinos
- Tabla 1.1.3** Citocina Equinas
- Tabla 1.2.4.1** Efecto de la concentración Bis (acrilamida) sobre el tamaño de poro
- Tabla 1.5.2** Sistemas más comunes para anticuerpos marcados
- Tabla 4.5** Protocolo de inoculación de IgG de caballo.
- Tabla 5.1** Resultados de las diferentes precipitaciones de IgG de caballo utilizando distintas concentraciones de Sulfato de amonio y sus rendimientos.
- Tabla 5.3A** Resultados de las diferentes precipitaciones de IgG de cabra (anti IgG de caballo)
- Tabla 5.3B** Efecto del proceso de liofilizado en muestras de IgG con diferentes tratamientos.



IV RESUMEN

La inmunización pasiva es una manera de apoyar al sistema inmune en donde hay transferencia de anticuerpos, o algún otro componente del sistema inmune, de forma natural o artificial, encaminados a individuos que presentan cuadros agudos de algún padecimiento y/o cuando la vacunación está contraindicada.

El objetivo de éste trabajo fue estandarizar un método para la inmunización, el aislamiento y purificación de anticuerpos a partir de sueros hiperinmunes, su conservación liofilizada y su uso terapéutico en caballos. Estos anticuerpos al ser administrados por vía intramuscular, provocaron en estos animales un incremento en los niveles basales de Inmunoglobulina G desde el primer día de inoculación y se mantuvo elevado durante 35 días aproximadamente con una vida media de 20 días. Los antisueros en una forma liofilizada pueden ser altamente específicos para algunas enfermedades comunes como: Influenza Equina, Encefalitis Equinas, Virus del herpes Equino tipo 1 y 4, Salmonelosis o Virus del este del Nilo. Además se preparó un conjugado de cabra anti IgG de caballo que podrá ser utilizado en sistemas de diagnóstico.



1 INTRODUCCIÓN

1.1 INMUNOLOGÍA ESPECÍFICA DEL CABALLO.

Es importante conocer el funcionamiento del SI de los equinos, ya que históricamente han sido de importancia para el hombre, como animal de carga, en deportes, mascota, etc; ahora contribuyen como modelos de enfermedades y producción de algunos antisueros. (Bailey, 2004; Steinbach, 2002; Fernández, 1997)

1.1.1 CÉLULAS INMUNES Y ANTÍGENOS DE SUPERFICIE

Como todos los vertebrados, los caballos tienen células de SI inmunes como macrófagos, granulocitos, dendríticas, linfocitos, etc. La diferencia entre estas células se establece por su tamaño, forma y color de gránulos, pero actualmente con el uso de anticuerpos monoclonales (mAc) es posible determinar la diversidad de antígenos existentes en la membrana de éstas células y así poder caracterizarlas (Wagner, 2005).

Hace algunas décadas este tipo de diferenciación no estaba claro, y no fue hasta que el ELAW II (Second International Workshop on Equine Leucocyte Antigens) (Lunn, 1998) determinó la nomenclatura de citocinas, antígenos y anticuerpos del orden equino (Tabla 1.1.1); sin embargo, todavía hay discrepancias entre las formas existentes de moléculas.

La clasificación de células y citocinas, así como de sus receptores se ha hecho posible por a la producción de anticuerpos monoclonales para algún tipo de antígeno celular (Capítulo 1.5.2). El estudio de las células del sistema inmune en caballos es indispensable estos para la investigación de enfermedades de estos animales, porque el caballo continúa contribuyendo a la investigación de enfermedades del SI (Marti, 2003).

Tabla 1.1.1 Antígenos encontrados con mAbs en células del SI equinas^{*}.

Antígeno	Linf. T	Granulocitos	Timocitos	Linf. B	PM (kD)	Ortólogo humano
EqCD2	+	-	+	-	58	CD2 linf. T
EqCD3	+	-	+	-	25	CD3
EqCD4	+	-	+	-	58	CD4
EqCD5	+	-	+	-	69	nd
EqCD8	-	-	+	-	68	CD8
EqCD11a/18	+	+	+	+	280	nd
EqCD13	-	+	-	-	150	CD13
EqCD44	+	+	+	+	76	CD44
EqMHC I	+	+	+	+	56-57	nd
EqMHC II	+	-	+	+	34	nd
EqWC 1	+	+	+	-	26	nd
EqWC 2	+	+	+	-	170	CD45, CD49
EqWC4 (EqCD28)	-	-	-	-	46	CD28
Cél. B	-	-	-	+	46	CD19, CD21
EqTCR	nd	nd	nd	nd	nd	nd
EqBCR	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd no determinado. ^{*}Pastoret 1998; Lunn 1998 ^{**}Mayal 2001



1.1.2 ANTICUERPOS

Los anticuerpos del caballo son muy parecidos al los del humano incluyendo la presencia de varios isotipos. Con los conocimientos de biología molecular se han podido establecer los loci o locus de los anticuerpos el genoma equino y por consiguiente su clasificación. Las cadenas pesadas están codificadas por los genes: gen μ , seis γ uno ϵ y uno α (Marti, 2003); las inmunoglobulinas están caracterizadas, entonces, como IgM, IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T), IgE, e IgA (Tabla 1.1.2), aunque actualmente la denominación de las subclases de IgG son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, donde el isotipo IgG3 e IgG5 forman la denominada IgG(T) (Steinbach, 2002).

Tabla 1.1.2 Anticuerpos equinos. (Steinbach, 2002)

Nomenclatura previa	Nueva designación	Gen de la cadena pesada*	Peso molecular Total (kD)**
IgM	IgM	5' IGHM 3'	900
IgGa	IgG1	5' IGHG1 3'	178
	IgG2	5' IGHG2 3'	-
IgG(T)	IgG3	5' IGHG3 3'	188
IgGb	IgG4	5' IGHG4 3'	166
IgG(T)	IgG5	5' IGHG5 3'	188
IgGc***	IgG6	5' IGHG6 3'	169
IgE	IgE	5' IGHE 3'	-
IgA	IgA	5' IGHA 3'	150-700
	IgG7***	IGHG7***	
IgD***	IgD***	IGHD***	

*El peso total refiere la cadena pesada y la ligera en condiciones no reductivas

**Lunn, 1998.

***Wagner, 2005

A la fecha no se han reportado datos para pensar en una IgD como en los humanos, pero reciente mente se ha reportado el loci para esta inmunoglobulina. Todavía existe discrepancia en la asignación de las subclases de IgG (Wagner 2005, Lunn, 1998; Steinbach, 2002).



1.1.3 CITOCINAS

Las citocinas tienen un importante nivel en la regulación de la respuesta inmune (Pastoret, 1998). La identificación en la actualidad de varias citocinas se ha logrado gracias a la homología de éstas con las humanas y otros animales bien estudiados (Tabla 1.1.3).

Tabla 1.1.3 Citocinas Equinas^{ab}

Citocina	Homología (%) [Identidad (%)] ^c		
	Contra humano	Contra ratón	Humano contra ratón
IL-1 α	82 (71)	75 (61)	76 (60)
IL-1 β	80 (65)	78 (63)	79 (68)
IL-2	82 (70)	65 (50)	70 (56)
IL-4	65 (54)	55 (38)	52 (37)
IL-5	79 (73)	76 (64)	80 (69)
IL-6	77 (61)	60 (41)	60 (41)
IL-9	81 (70)	n.d.	n.d.
IL-10	90 (84)	85 (75)	85 (73)
IL-11	95 (92)	90 (86)	91 (87)
IL-12p35	88 (82)	71 (58)	73 (58)
IL-12p40	91 (86)	78 (66)	77 (66)
IL-18	85 (79)	72 (64)	74 (62)
GM-CSF	76 (71)	64 (55)	65 (54)
IFN- α 1	78 (70)	71 (56)	77 (60)
IFN- β	71 (60)	59 (48)	62 (49)
IFN- γ	78 (68)	57 (43)	54 (38)
TNF- α	90 (86)	85 (78)	89 (78)
TGF- β 1	95 (92)	91 (88)	93 (89)
Eotaxina	79 (71)	73 (53)	76 (58)
MCP-1	90 (77)	n.d.	n.d.

^aSteinbach 2002

^bAbreviaturas; ; n.d., No determinado.

^cEl dato fue comparado con las dadas por el GenBank para citocinas humanas y de ratón (no están en lista). El porcentaje de homología fue calculado por la alineación en la secuencia de aminoácidos, usando el Paquete MacVector (GCG).

Note que las reacciones cruzadas de las proteínas o anticuerpos anti-citocinas no pueden ser predecidas con la comparación de secuencias y deben ser determinada experimentalmente para cada citocina.



También con el proyecto del genoma equino es posible identificar las diferentes citocinas por tecnología del ADN recombinante y existen bancos de genes disponibles en varios sitios web (Bailey, 2004; Wagner, 2005; Marti, 2003).

Además de las secuenciaciones, estas citocinas se han clasificado según la respuesta que producen: las llamadas citocinas tipo 1 o Th1 incluyen la IL-2, INF- γ y TNF- α e IL-12. Las citocinas Tipo 2 o Th2 contemplan las IL-4, IL-5, IL-13 e IL-1 β . La citocina Th3, el factor de crecimiento transformantes (TGF)-13, regula la producción de citocinas tipo Th1 ó Th2 a través de la modulación de la respuesta inmune (Horohov, 2003).

1.2 PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS

Existen muchas técnicas para la purificación de proteínas en general, y el uso de ellas depende de la cantidad de inmunoglobulina a purificar, resolución y el costo. Sin embargo lo anterior puede ser muy relativo y aunque hay técnicas novedosas, los principios continúan siendo los mismos (Mulvey, 2002; Liddell, 2002).

De manera general, los métodos para purificación de Inmunoglobulinas incluyen:

- a) Por diferencia de solubilidad
- b) Cromatografía de intercambio iónico
- c) Cromatografía de absorción
- d) Electroforesis



1.2.1 POR DIFERENCIA DE SOLUBILIDAD

Una proteína está disuelta en un medio acuoso gracias a interacciones –cargas, grupos polares, hidrofiliidad- entre el disolvente y la superficie cargada de la molécula. Si estas interacciones son cambiadas, la proteína alterará su comportamiento molecular hacia el disolvente en forma de un agregado que precipitará. La dificultad o facilidad para rotar estas interacciones depende principalmente de los residuos de su superficie (aminoácidos). Para la precipitación de proteínas se usa comúnmente sales inorgánicas, variación de temperatura o pH, disolventes orgánicos, proteínas básicas y polietilen glicol (Roby 1987).

1.2.1.1 Sales Inorgánicas

Este procedimiento es uno de los más utilizados y es útil para el aislamiento de grandes cantidades de inmunoglobulinas (Ito 2003). Las sales comúnmente empleadas son sulfato de amonio y fosfato de potasio por su alta hidrosolubilidad (Figura 1.2.1.1). Aunque la técnica es sencilla -involucrando centrifugaciones, diálisis y cromatografía- es importante tomar en cuenta las concentraciones de estas sales, velocidad en que se agrega la sal, la temperatura y el pH. Muchos métodos se han estandarizado y reportado pero es preferible optimizar alguno para su propia muestra. (Liddell, 2003; Sugiura, 1998).

Al agregar el sulfato de amonio lentamente a la solución, gran cantidad de agua se une a cada molécula de la sal. Mientras que el total de sulfato de amonio aumenta, el agua que está disponible para interactuar con la superficie de la proteína va disminuyendo. Así llega un punto en que la cantidad de agua no es suficiente para que la inmunoglobulina se solvate y precipita (Roby, 1987). Este proceso se llama "salting out" aunque es una simple deshidratación como se puede ver. Éste método es muy



la inmunoglobulina se solvate y precipita (Robyt, 1987). Este proceso se llama "salting out" aunque es una simple deshidratación como se puede ver. Éste método es muy

eficiente para la separación de albúmina que representa más del 50 % de la proteína total del suero (Jiang, 2004).

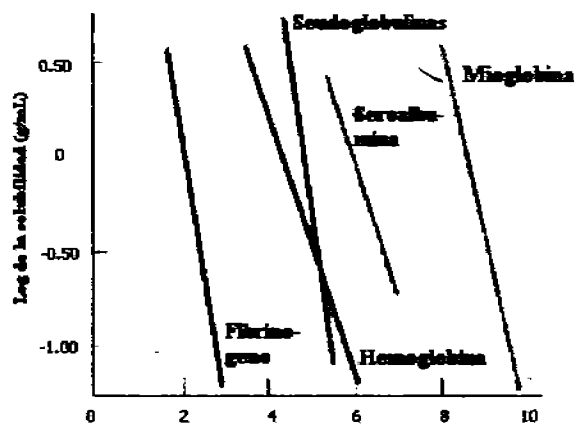


Figura 1.2.1.1. Solubilidad de algunas proteínas en disoluciones de sulfato de amonio (Voet 1990).

Las ventajas que presenta este método son: 1) poder obtener alrededor del 75% de la proteína nativa, 2) no requiere equipo muy especializado, 3) el producto obtenido puede ser convenientemente concentrado y 4) se pueden tratar grandes volúmenes de muestra (Redwan, 2005; Jiang, 2004). Las desventajas incluyen gran gasto de reactivos (sulfato de amonio), no tiene muy buena resolución, es decir, no queda 100 % purificada la proteína, es necesario eliminar posteriormente el sulfato de amonio agregado, aunque algunos reportan que éste podría ayudar a la conservación de las mismas proteínas (Montoya, 1987).



1.2.1.2 Variación del pH o temperatura

Las proteínas se cargan positiva o negativamente si el pH está por encima o debajo de su punto isoeléctrico (pI). Estas formas cargadas son mucho más solubles que las moléculas eléctricamente neutras y por consiguiente si cambia el pH de una solución que contiene moléculas polipeptídicas puede que alguna de ellas precipiten por alcanzar su pI. Aunque el punto isoeléctrico se puede utilizar para una buena separación por isoelectroenfoque, no es muy utilizado como técnica de aislamiento. (Garvey, 1977).

En el caso de la temperatura, se requiere elevar bastante por corto tiempo y mantenerla a una temperatura moderada por largo tiempo. Dentro de éstas técnicas no es necesario conocer el punto isoeléctrico de la inmunoglobulina que se requiere aislar, sin embargo son inespecíficas. Normalmente se usa cuando no da resultado la separación por técnicas de electroforesis; no se recomienda para cantidades grandes además de que son técnicas muy difíciles.

1.2.1.3 Disolventes orgánicos

Los disolventes orgánicos disminuyen en gran medida la solubilidad proteica por disminución de la constante dieléctrica del medio y deshidratación. En el procedimiento se deben considerar la fuerza iónica del medio proteico, el disolvente orgánico usado y la temperatura (Robyt 1987).

Los compuestos orgánicos empleados para este método incluyen etanol, metanol y acetona, también es eficiente el uso de ácido tetracloroacético y cloroformo (Jiang, 2004). Se debe considerar que la cantidad de disolvente orgánico disminuye si la precipitación se realiza a bajas temperaturas.



El método es simple pero muchas de las proteínas purificadas pueden perder su actividad, puede existir interferencia con lípidos, es un proceso limitado para algunas proteínas y es mayormente empleado cuando el objetivo es eliminar proteínas de una mezcla.

En ocasiones es recomendable la precipitación con disolventes orgánicos que la utilización de sales ya que se ha observado que existe mayor rendimiento y en el caso de las enzimas, este procedimiento no interviene en su actividad de forma significativa (Michail, 2005).

1.2.1.4 Precipitación con proteínas básicas

Algunas proteínas son neutralizadas en una gran proporción cuando se unen a compuestos cargados negativamente. Compuestos policatiónicos como la protamina o estreptomycin se unen irreversiblemente a la molécula proteica neutralizándolas y precipitándola.

Se utilizan cantidades considerables de proteína precipitante y la inmunoglobulina queda con la proteína añadida unida. Es poco utilizada ya que el uso está limitado a algunas proteínas (Robyt, 1987).

1.2.1.5 Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) como agente precipitante es bastante empleado al combinarse con técnicas de cromatografía. El método tiene que ser optimizado para cada tipo de proteína tomando en cuenta el pH, fuerza iónica y concentración proteica. Con el PEG se han podido caracterizar las inmunoglobulinas del huevo de la víbora (Hassl, 2005). Una de las ventajas que presenta el PEG es posibilidad de



conservar las proteínas por un tiempo sin que pierdan sus propiedades (Montoya, 1987).

1.2.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

En esta técnica la proteína sufre un cambio reversible de iones en una solución con aniones o cationes eléctricamente unidos a la muestra dentro de un medio de soporte insoluble. El soporte puede contener carga negativa o positiva. En este procedimiento es importante el pH utilizado ya que la carga eléctrica de la proteína está íntimamente relacionada con él.

En la técnica también es necesario tomar en cuenta muchos factores, desde la elección del agente intercambiador de iones hasta la longitud de la columna y velocidad de elusión (Freifelder, 1991)

Esta técnica utilizada correctamente puede dar gran resolución pero una de sus principales desventajas es un largo periodo de tiempo por los largos periodos de elusión.

En la actualidad es posible unir anticuerpos antígenos-específicos en el soporte, que permitan la separación específica de especies proteicas, estos métodos se les ha llamados bioespecíficos y es una herramienta esencial en la ingeniería bioquímica. (Cooper, 1977; Chase 1984)



1.2.3 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Esta técnica es más bien complementaria a las anteriores, se basa en la separación de moléculas por su tamaño molecular en un medio sólido insoluble. Los medios de separación pueden ser agarosa, dextrano o poliácridamida.

Las fases estacionarias son matrices de partículas esponjadas que en su conjunto forman pequeños poros por donde moléculas con un tamaño mayor que el de los poros se moverán sólo en el espacio que queda entre las partículas, y por lo tanto no sufrirán retraso en su recorrido a través de la columna (Figura 1.2.3). Sin embargo las moléculas de tamaño menor al de los poros difunden hacia el interior y el exterior de las partículas con una probabilidad de aumentar a medida que disminuye el tamaño molecular, debido a esto su movimiento en la columna se hace más lento (Freifelder, 1991).

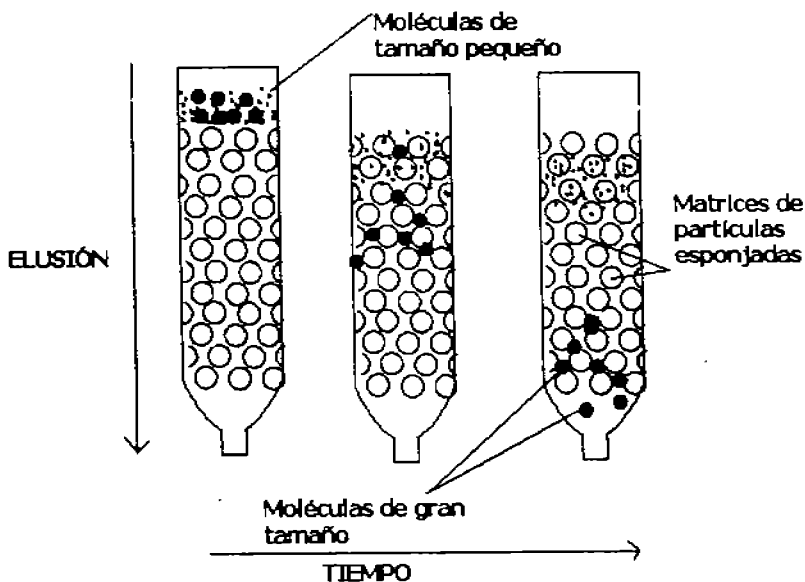


Figura 1.2.3. Cromatografía de exclusión molecular. La separación de las moléculas se da por el efecto de tamiz, las moléculas pequeñas al tener más espacio libre tardan más en separarse.



Es usada principalmente para separar subfracciones de un aislamiento previo de inmunoglobulinas (Garvey, 1977).

Hoy en día existen geles cuyo tamaño de poro está bien definido para la separación de ciertas moléculas. En este caso es importante a considerar la altitud con que la fase móvil es proveída además de todos los parámetros cromatográficos (Robyt, 1987).

La ventaja es una buena resolución si el proceso se repite varias veces, además el método requiere ser acoplado a otro de identificación para la recolección de fracciones y una de sus desventajas es que la muestra se queda en gran cantidad de solución (se diluye). Muchas sustancias lábiles no son afectadas ya que no hay prácticamente adsorción en la fase sólida.

1.2.4 ELECTROFORESIS

Es un método instrumental de separación, identificación y cuantificación de moléculas basado en la carga y masa de ellas. Su ventaja de éste método instrumental es que tiene alta resolución para la separación analítica de mezclas complejas de proteínas (Delves, 1998; Mulvey, 2003). Existen muchas variantes de esta técnica por lo que sólo se mencionará la más utilizada en la inmunología: electroforesis en gel de poliacrilamida y agarosa



1.2.4.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS

Método más empleado en el área de biología molecular para estudios especializados de inmunoglobulinas y otras proteínas. El principio usado es la separación de proteínas en base a sus pesos moleculares, a partir de una muestra que previamente fue desnaturalizada y cargada negativamente con SDS. Las moléculas más pequeñas migran más rápidamente en una matriz formada por redes (Figura 1.2.4.1) de acrilamida mientras que las grandes tienen mayor dificultad para migrar (Robyt, 1987).

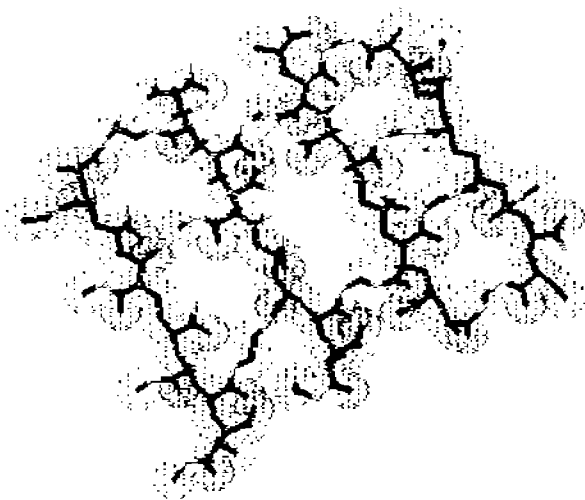


Figura 1.2.4.1. Vista molecular de las redes formadas por la poliacrilamida. Según la proporción de los monómeros el tamaño de poro será más o menos amplio.

El monómero manejado es el N,N'-metilen-bis(acrilamida) que al reaccionar con la acrilamida forma una molécula cuya configuración similar a una red sirve para la separación. El persulfato de sodio empleado proporciona radicales libres para iniciar la reacción. La cantidad de acrilamida utilizada se debe tomar en cuenta para obtener el tamaño del poro (Tabla 1.2.4.1).



Tabla 1.2.4.1 Efecto de la concentración Bis (acrilamida) sobre el tamaño poro*

Acrilamida total (%)	Radio (Å)			
	1%	5%	15%	25%
6.5	24	19	28	-
8.0	23	16	24	36
10.0	19	14	20	30
12.0	17	9	-	-
15.0	14	7	-	-

*Cooper 1977

1.2.4.2 Electroforesis en gel de agarosa

Utiliza el mismo principio que la poliacrilamida sólo que el soporte es agarosa y se recomienda para moléculas de más de 200 kD. La agarosa es un polisacárido natural lineal el cual se calienta a ebullición y al enfriarlo se mezcla con acrilamida para formar el gel. Este tipo de electroforesis es empleado para la separación de ácidos nucleicos principalmente.

Al final de cada corrida electroforética se necesitan identificar las moléculas separadas y para eso se requiere revelar con colorantes como azul de coomassie, compuestos coloridos como flourosemida o alguna enzima que contenga el gel. También se puede transferir la proteína del gel a un papel de nitrocelulosa y detectar la proteína específicamente con anticuerpos conjugados en una técnica llamada Western Blot (Cooper 1977).



1.2.5 DIÁLISIS

En la precipitación con sales se requiere la eliminación de estas mismas postpurificación y en métodos de intercambio iónico es necesario una fuerza iónica baja que ciertas sales modifican. Uno de los procedimientos más utilizados y antiguos para remover las sales es el conocido como diálisis

Esta técnica involucra colocar la solución de proteínas en una bolsa de celulosa amarrada en los extremos. La bolsa tiene pequeños poros que permiten el paso de pequeñas moléculas como sales inorgánicas pero no macromoléculas como son las inmunoglobulinas. El proceso consiste en el equilibrio de iones dentro y fuera de la bolsa el cual puede durar unas 6 horas. Si la cantidad de sales al final del periodo todavía sigue siendo alto se puede colocar solución amortiguadora fresca para repetir la operación.

Muchas de las veces las bolsas comerciales para diálisis están contaminadas con metales pesados, nucleasas o proteasas que deben ser eliminados con un tratamiento previo de la membrana (Cooper 1977).

Si se requiere de separación de sales y otras moléculas de manera más estricta, la cromatografía de exclusión molecular que tiene un principio similar a la de la diálisis, es la más adecuada (Robyt 1987).



1.3 CONSERVACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

1.3.1 LIOFILIZACIÓN

También llamado **secado por congelación**, es un proceso de deshidratación en el cual el agua es sublimada de un material previamente congelado (Fernández B, 1998). El fundamento es simple: el agua de la muestra es sublimada (paso del sólido al vapor) por la acción de bajas temperaturas y bajas presiones y se da por debajo del punto triple del agua en un diagrama de fases PT (Figura 1.3.1).

La liofilización se sugiere para la concentración de un producto que no permite otro método, se usa para sustancias termolábiles e inestables.

El producto liofilizado tiene muchas ventajas ya que se puede almacenar por largo periodo de tiempo en refrigeración sin perder sus propiedades, además al eliminar el agua y quedar al vacío se evita el crecimiento de microorganismos. Las desventajas incluyen que el título de anticuerpos después de la liofilización disminuye drásticamente (baja hasta un 50% de actividad), pero el efecto se puede contrarrestar con algún agente protector (Fernández B, 1998; Montoya, 1987). El proceso es largo y requiere equipo especializado.

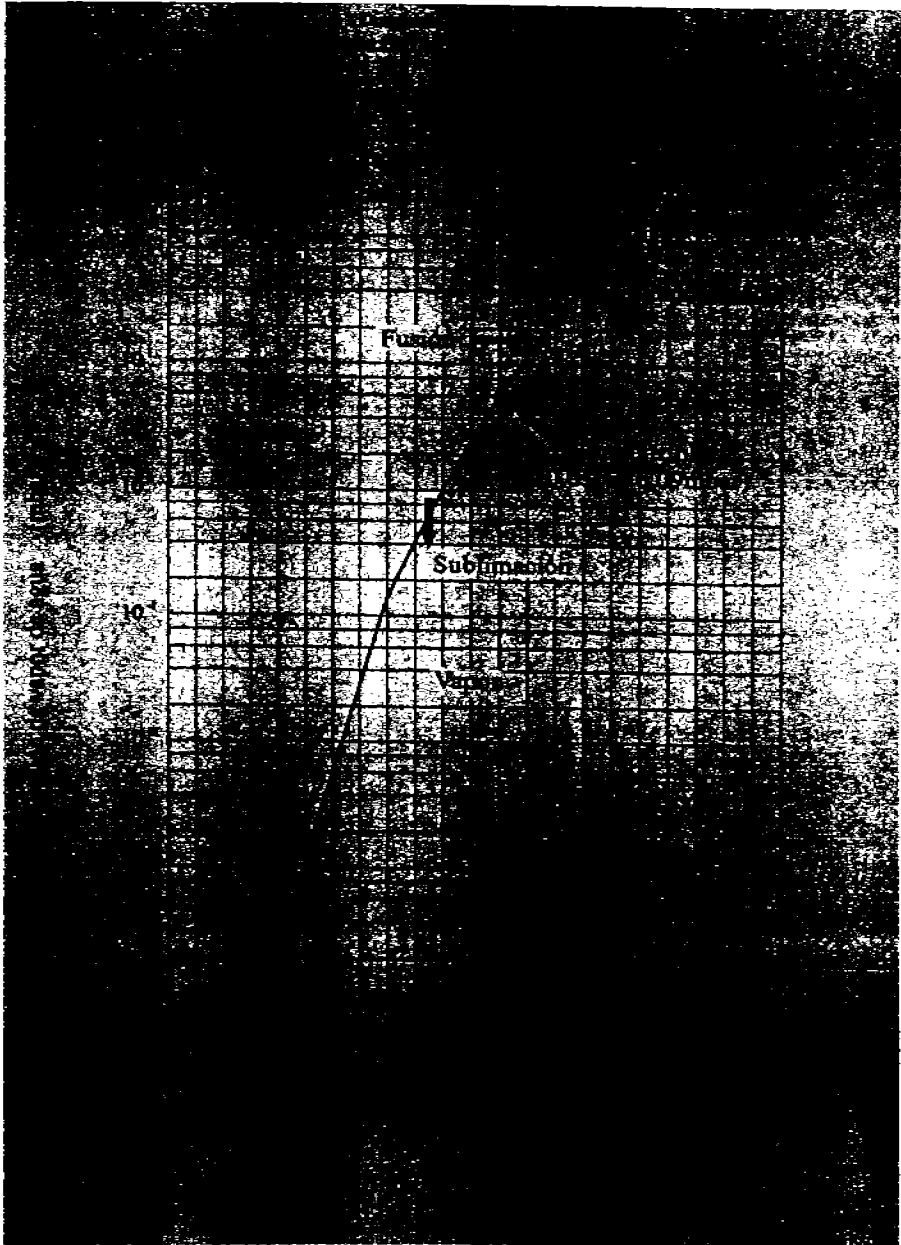


Figura 1.3.1. Diagrama P-T del agua. La transición del estado sólido al vapor (sublimación) se da a bajas presiones y temperaturas (Fernández B, 1998).



1.3.2 TEMPERATURA

A bajas temperaturas los anticuerpos permanecen inactivos y pueden durar algún tiempo sin perder su actividad. Dependiendo del el tiempo en que se requieran se pueden almacenar a 4, -20 ó -70 °C (Harlow 1999). Es sabido que los anticuerpos guardados a 4°C pueden durar algunos meses sin perder su acción, pero muchos reportan que a menores temperaturas, si existe cierta pérdida de actividad (Montoya, 1987; Flores, 1997).

Al almacenar los anticuerpos a bajas temperaturas, en ocasiones es necesario el uso de agentes que los estabilizarán durante el almacenaje y el tipo de éstos dependerá de la finalidad de las inmunoglobulinas (Montoya, 1987; Harlow, 1999) Las sustancias pueden ser: PBS, Tween pH= 8.0, azida de sodio, Glicerol, Metanol, BSA 1%, sulfato de amonio.

1.4. CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Ya aisladas las inmunoglobulinas es importante cuantificarlas para futuros estudios. Se utilizan técnicas para la determinación de proteínas o específicas para el tipo de inmunoglobulina.



1.4.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO WARBURG-CHRISTIAN

El método se basa en la absorción de luz UV de residuos de tirosina y triptófano a longitud de onda de 280 nm (Figura 1.4.1). Sin embargo, dado que los ácidos nucleicos absorben ampliamente a 260 nm puede darse cierta interferencia al existir contaminación de ellos. En sí el método es fácil, sensible y se requiere poco tiempo para la cuantificación.

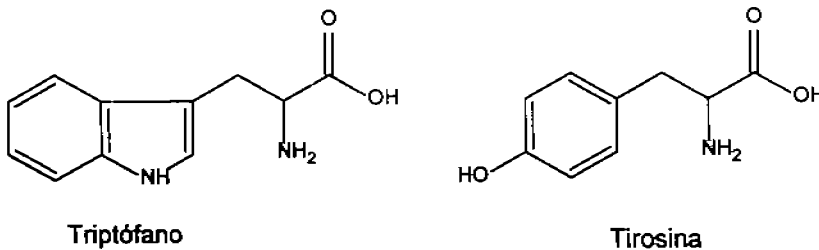


Figura 1.4.1. Estructura química del triptófano y tirosina. Su identificación en el Espectro UV se debe a las estructuras en resonancia de los grupos amino e hidroxilo en los anillos aromáticos.

Si la muestra está contaminada con ácidos nucleicos se puede utilizar la siguiente corrección:

$$\begin{aligned}\text{Conc. de proteína (mg/ml)} &= (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260}) \\ \text{Conc. de proteína (mg/ml)} &= A_{205} / (27 + 120 A_{280} / A_{205}) \text{ (Harlow 1999 451)}\end{aligned}$$



1.5 USOS DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos son macromoléculas glucoproteicas del grupo de las globulinas y al ser producidas como respuesta inmune se les llama también inmunoglobulinas. Existen diferentes tipos de anticuerpos según su isotipo e idiotipo, sin embargo todos ellos constan de una estructura básica de dos dímeros: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (Figura 1.5).

Todos los anticuerpos son secretadas por células plasmáticas después de la activación antígeno-específica de los linfocitos B (Abbas, 1999). Cuando un linfocito B entra en contacto con un antígeno por primera vez, prolifera produciendo células plasmáticas (productoras de IgM, posteriormente IgG) y células de memoria. Estas últimas aumentarán aún más su afinidad por el antígeno al remodelar su idiotipo y cambiar de isotipo. Cuando el antígeno entre de nuevo (por ejemplo en una segunda infección) habrá anticuerpos altamente específicos contra él.

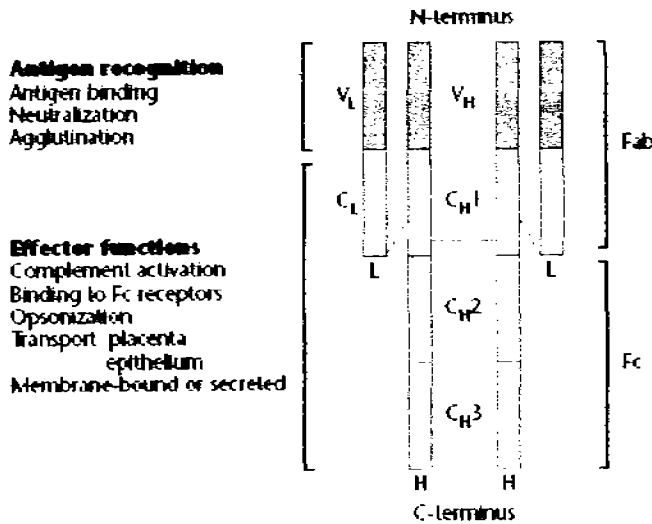


Figura 1.5. Estructura de una IgG y funciones generales de los anticuerpos. Regiones: V variable, C constante; Cadenas: H pesada, L ligera. (Lucas, 2003).



1.4.2 MÉTODO DE BRADFORD CON AZUL BRILLANTE DE COMMASSIE.

Es una técnica altamente sensible para casos donde la cantidad de proteína es muy baja. La sensibilidad alcanza los 5 mcg de proteína por ml. El colorante se une a la proteína originando una solución de color azul cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de proteína. La muestra se lee a 590 nm y el complejo es estable por 2 horas (Bradford, 1965). Esta técnica es sencilla y rápida aunque el costo del reactivo es una de sus limitantes. El reactivo se conjuga con residuos de a.a. aromáticos y básicos por lo que la cantidad de proteína determinada depende de la proporción de éstos residuos y no a la proteína en sí.

1.4.3 MÉTODO DE BIURET

Es el primero en emplearse ampliamente para cuantificación de proteínas. El principio consiste de una primera desnaturalización de la inmunoglobulina en medio básico seguida de la formación de un complejo colorido de enlaces peptídicos con el Cobre que contiene el reactivo de Biuret. El método es inexacto y la presencia de sulfato de amonio interfiere en el resultado, es una alternativa como método económico en determinaciones preliminares, aunque ya no sea su uso en laboratorios modernos.

1.4.4 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO

Hay técnicas para determinar el nitrógeno de una muestra proteica, como el método de Kjeldahl y la reacción de Nessler. Ambas técnicas utilizan la digestión de la proteína seguida de la formación de complejos coloridos de los productos oxidados (Garvey, 1977). Existen muchas interferencias y no son muy reproducibles además que la cantidad de nitrógeno varía según los aminoácidos de la proteína.



1.5.1 UTILIZACIÓN DE LA INMUNIDAD PASIVA

En suero puede definirse como el componente no celular de la sangre (antisuero) que contiene una mezcla de anticuerpos (policlonales) y otras moléculas solubles, el donador usualmente presenta una reacción inmune un antígeno conocido. (Goodhall, 2003)

En la sangre existe una mezcla de anticuerpos diferentes, cada uno es producido por una clona específica de células B (de ahí deriva el término policlonal) (Abbas, 1999). Para que el antisuero sea asignado y usado en la inmunidad pasiva debe cumplir 3 características (Goodhall, 2003):

- 1) Tener alta especificidad que es la mínima reacción cruzada con moléculas de composición similar,
- 2) Alta afinidad, donde las uniones antígeno-anticuerpo no son separadas en futuros ensayos y
- 3) Un alto título que presenta la dilución mínima óptima para el efecto deseado.

Los antisueros fueron aplicados por primera vez por Kitazato y Behring en el siglo XIX para la neutralización de la toxina diftérica. En ese entonces no se conocían los mecanismos que observaban, por los cuales se producían a transferencia de esa inmunidad. Recientemente al proceso se le ha llamado inmunización pasiva y se utiliza de tal manera que es posible transferir inmunidad entre especies diferentes (Xu, 2002; Fernández F, 1998; Akari, 1997).



Aunque se presentan reacciones adversas, los beneficios predominan si los anticuerpos son preparados adecuadamente, por ejemplo se puede eliminar la región Fc del anticuerpo al tratarlas con pepsina –obteniéndose $F(ab')_2$ –, la región Fc está asociada a efectos no deseados en el receptor por tener una respuesta biológica con ellos como anafilaxia o sensibilización a estas proteínas (Allen, 1977; Dunman, 2003).

El procedimiento para la generación de antisueros es simple, a la especie donadora se le inocular un antígeno –el cual se quiere eliminar del receptor- y éste producirá una respuesta con anticuerpos; el antígeno puede ser alguna biomolécula, vacuna o un microorganismo que con técnicas de DNA recombinante (rDNA) no causará la enfermedad pero sí respuesta inmune (Jones (ed.), 2004). A cierto tiempo el título de anticuerpos es lo suficiente alto para aislarlos de la especie donadora y administrarlos a la especie receptora (Tabla 1.5.1).

El suero al tener altos niveles de anticuerpos específicos para el antígeno en estudio se dice que es hiperinmune. De esta manera se pueden transferir inmunidad contra bacterias, micoplasmas, hongos y parásitos (Dunman, 2003). La transferencia ha llegado al punto que los anticuerpos han sido fraccionados o unidos a otras moléculas como citocinas (Pépin, 1996; Wagner, 2005).

Ahora es posible la terapia con anticuerpos monoclonales obtenidos en animales como el ratón. Sin embargo, éstos anticuerpos son potentes inmunógenos para el humano. La tecnología de humanización de los anticuerpos ha hecho posible remover la inmunogenicidad con el uso de anticuerpos de roedores en humanos y ser útiles en muchas terapias (Tsurushita, 2005).



Algunos anticuerpos pueden ser dirigidos a marcadores específicos de células nocivas como las cancerígenas; los anticuerpos localizan a la célula y se unen específicamente, después la célula introduce a la inmunoglobulina con la particularidad de que la inmunoglobulina está conjugada con una toxina bacteriana o de origen vegetal que matará a la célula. Esta maravilla de anticuerpos son las llamadas inmunotoxinas y se han aplicado a padecimientos como el cáncer (Krietman, 1998).



Tabla 1.5.1 Diferentes estudios sobre el uso de Inmunidad pasiva.

Especie donadora	Especie receptora	Producto	Antígeno	Duración de la protección	cantidad	Referencia
Humano	Monos (<i>Macaca fascicularis</i>)	plasma IgG	Virus de Leucemia de las células T Humano Tipo 1 (HTLV-1)	24 semanas	300, 75 mg/Kg, i.m.	Akari, 1997 Vacc.
Monoclonal Humano	Monos Rhesus	Acs monoclonales	Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV)	-----	10 mg/Kg, i.m. i.o.	Xu, 2002 Vacc.
Caballo	Cerdo	Suero	<i>S. suis</i>	29 días	6 ml, i.m.	Andresen, 2001 Vet. Micr.
Vaca Holstein	Becerro	IgG calostro	Rotavirus bovino (BRV)	30 días	21 ml i.o.	Fernández, FM 1998 Vacc.
Oveja	Cordero	calostro	Albúmina, <i>Brucella abortus</i>	40 días	100 ml (20 ml i.m., 80 ml i.p.)	Watson, DL 1992 Vet. Imm. ImmPath.
Caballo	Conejos	F(ab') ₂	Veneno de escorpión	3 días	9.57 mg/kg, i.m., i.v.	Pépin, CS 1996 Tox. and App. Pharm.
Conejo	Rata	IgG	nicotina	22.5 Hrs.	150 mg i.p.	Malin, DH 2001 Pharm. Biochem. and Beha.
Oveja	Carneros	Plasma	Hormona Productora de Gonadotropina (GnRH), Keyhole limpet hemocyanin (KLH)	40 días	300 ml alicuotado	Parthasarthy, V 2002 Anim. Rep. Sc.
-----	Ratones	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 monoclonales	<i>Cryptococcus neoformans</i>	20-160 días	0.1, 0.5 1.0 mg, i.p.	Taborda, CP 2003 The J Imm.

La duración puede ser el tiempo que duró el experimento. Algunos autores la reportan como el volumen del crudo purificado



1.5.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MARCADOS (CONJUGADOS)

Debido a la alta especificidad de los anticuerpos, son utilizados para sistemas de evaluación y diagnóstico. Los anticuerpos producen ciertas reacciones visibles al interaccionar con el antígeno, dando efectos estudiados en la serología. Si la cantidad de anticuerpos o antígeno no es suficiente, el anticuerpo se puede conjugar con un agente que permita la detección de la reacción.

Los procesos de unión al anticuerpo han sido bien estudiados (Lombardi, 2004; Lidell, 2002; Dhawan, 2002 I ; BurKot, 1985), así como las diferentes moléculas a las que se le pueden unir (Tabla 1.5.2).

Los anticuerpos policlonales se emplean conjugándolos a enzimas, radioisótopos, metales coloidales, colorantes, flourocromos, toxinas, etc. Debido a que el antígeno tiene diferentes epítopes, pueden existir varios anticuerpos contra un mismo antígeno, sin embargo, es posible tener anticuerpos exclusivos y más puros con los llamados anticuerpos monoclonales (Figura 1.5.2). El uso de estos mAc se en forma cotidiana para el diagnóstico de enfermedades (Marti 2003, Fuchs 2004)

Más aplicaciones de los anticuerpos incluyen el aislamiento de moléculas por medio de su afinidad por otras (cromatografía de afinidad o inmuoafinidad). El anticuerpo se une a una molécula específica que es aislada de una mezcla, por ejemplo, de otras proteínas (Botros, 1998; Harlow, 1999). Esto permite elevar la especificidad y la sensibilidad del método en donde se utilicen estos anticuerpos (Merlín, 2001) En análisis clínicos se usan para bloquear alguna molécula que interfiere en el diagnóstico, por ejemplo, en la determinación de la enzima creatinin cinasa isómero MB (CK-MB).

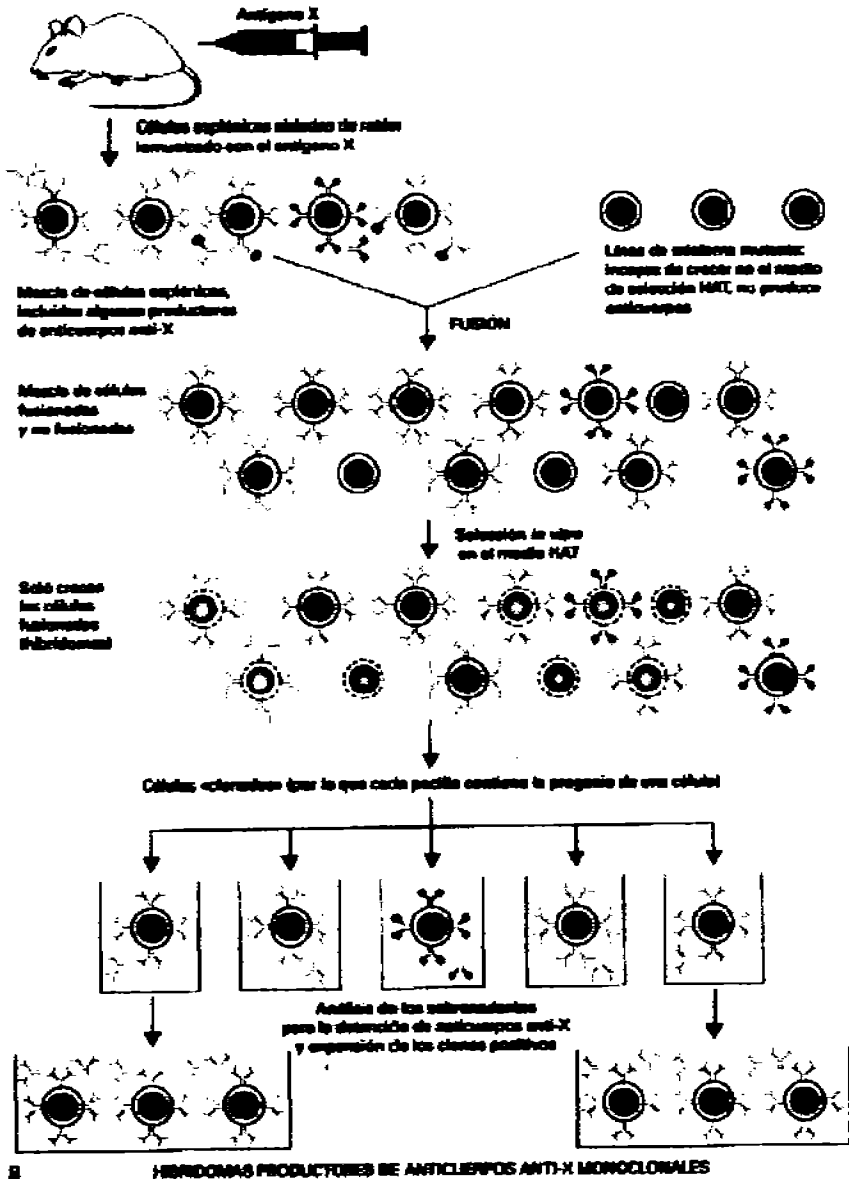


Figura 1.5.2. Producción de anticuerpos monoclonales. Se aíslan las células B de un animal inmunizado. Posteriormente se unen a una célula de mieloma produciendo un híbrido. Más adelante se selecciona la clona deseada que ahora producirá ella y sus progenitores un solo tipo de anticuerpos. (Abbas 1999, 42).



1.5.2.1 Anticuerpos marcados con fluorocromos

Un fluorocromo es una molécula que tiene la propiedad de que alguno de sus electrones es capaz de subir a un nivel de energía mayor aplicándole radiación electromagnética –energía de excitación- y después las especies se relajan lanzando energía en forma de fotones –energía de emisión- que es lo que se mide. Estos conjugados se emplean de manera cotidiana en investigación. La iluminación apropiada de los anticuerpos conjugados con un microscopio de fluorescencia hace que sean ampliamente usados para el estudio de estructuras celulares específicas. Desafortunadamente se pueden presentar problemas en el bloqueo del sitio de unión al antígeno por el fluorocromo (Harlow, 1999). Estos anticuerpos se manejan para marcaje molecular celular en estudios estructurales o de identificación de poblaciones celulares por citometría de flujo (Dahwan, 2002).

1.5.2.2 Anticuerpos marcados con biotina

La biotina es una vitamina cuyas características incluyen ser un ácido monocarboxílico, estable al calor, soluble en agua y alcohol y susceptible a la oxidación. Debido a esta última propiedad es factible unir biotina a residuos de a.a. con grupos como NH_2 , y SH formando hidroxisuccinimidas y maleimidas (Harlow, 1999).

Los conjugados con biotina también se han propuesto para su uso en radioinmunoterapia (Barter 2000). Barter y cols. evaluaron la unión de biotina a IgG anti-Tn (péptidos de fragmentos variables de anticuerpos) en comparación con la unión a avidina y estreptavidina – la avidina y estreptoavidina tienen afinidad con la biotina- (Tabla 1.5.2).



1.5.2.3 Anticuerpos marcados con enzimas

Estos anticuerpos son solicitados en pruebas directas o indirectas para la detección de antígenos o anticuerpos. Los sustratos usados para cada enzima son fluorocromos fácilmente detectados por métodos espectroscópicos, sin embargo, muchos de los sustratos presentan toxicidad por lo que su uso en ensayos *in vivo* no es recomendable.

La unión de anticuerpos a enzimas es realizada de forma covalente al reaccionar grupos amino de la enzima con grupos carboxilo de la proteína generando múltiples reacciones cruzadas (Lombardi 2004).

1.5.2.3.1 ELISA.

El Ensayo Inmunoabsorbente Unido a Enzimas, es una técnica que ha revolucionado la detección de antígenos y anticuerpos de manera más sensible. Hay muchas variantes de la técnica, pero su principio se basa en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo con la ayuda de un anticuerpo marcado con una enzima.

Es altamente sensible y específica aunque existe desventaja en cuanto a costo comparada con otro tipo de ensayos como la precipitación.



1.5.2.4 Anticuerpos marcados con yodo

El radioisótopo utilizado es el ^{125}I el cual tiene 60 días de vida media. El yodo se une por reacción de halogenación residuos de tirosina e histidina de la proteína por lo que la pérdida de actividad por impedimento estérico no es considerable (Harlow 1999).

PELIGRO: Al trabajar con este tipo de moléculas representa alto riesgo en la salud por la radiactividad del yodo, se debe trabajar en condiciones estrictas de seguridad.



Tabla 1.5.2. Sistemas más comunes para anticuerpos marcados.

MOLÉCULA UNIDA AL ANTICUERPO	EJEMPLOS	MÉTODO DE DETECCIÓN	NOMBRE DE LA TÉCNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Fluorocromos	DAPI Hoechst 33258 Fluoresceína Rojo Texas Alofococianina B-Ficoertrina R-Ficoertrina	Fluorescencia Microscopio	Immunostaining	Largo tiempo de almacenamiento, buena resolución Doble marcado	Autofluorescencia, Microscopio de fluorescencia
Biotina		Avidina o estreptavidina acopladas a varios marcadores	Immunostaining Inmunoensayo InmunoBlots	Largo tiempo de almacén, alta sensibilidad, detección universal, muchos métodos de detección.	Múltiple pasos, biotina endógena
Enzima	Peroxidasa de rábano picante Fosfatasa alcalina β -Galactosidasa	Substancias cromógenas (Espectroscopia)	Inmunoblots Immunostaining	Largo tiempo de almacén, alta sensibilidad Puede visualizarse a simple vista, permanente	Pasos múltiples, Enzimas endógenas, baja resolución, doble marcado difícil
Yodo	^{125}I	Contador gama Película de rayos x	Inmunoensayo	Fácil de cuantificar, alta sensibilidad	Corta vida media, potencial riesgo para la salud
Biosíntesis	^{35}S Metionina ^{35}S Cisteína	Contador beta Película de rayos x	Inmunoensayo Inmunoblot	No daña al anticuerpo, fácil	Requiere hibridomas. Baja sensibilidad, corta vida media.

Harlow 1999



1.5.2.5 ANTICUERPOS MONOCLONALES MARCADOS POR BIOSÍNTESIS

Es la técnica por excelencia cuando se requieren anticuerpos muy específicos y con poca pérdida de actividad. Los anticuerpos son marcados en la cadena peptídica cuando en el crecimiento de hibridomas (Figura 1.5.2) hay presencia de aminoácidos radiactivos. Cualquier a.a. se puede emplear, sin embargo los más comunes son metionina y cisteína marcada con ^{35}S (Harlow, 1999).

Otros usos de los anticuerpos incluyen la conjugación con toxinas para poder eliminar una célula blanco (Krietman, 1998), anticuerpos anti-idiotipo los cuales aún es cuestionable su uso como vacunas. El anticuerpo anti-idiotipo representa el epítipo del antígeno el cual fue dirigido el primer anticuerpo, el cual dará origen al anticuerpo anti-idiotipo (McCullough, 1985; Pincus 1992).

Otro tipo de Ac el cual tiene futuro para la biotecnología son los llamados Ac catalíticos o Abzimas encontrados al principio en pacientes con enfermedades autoinmunes, ahora son utilizados aprovechando su actividad catalítica (Fletcher, 1998)

Para la conjugación de estos anticuerpos se han propuesto numerosas técnicas las cuales dependen de la especie química a conjugar. En el Anexo V se muestra una de ellas.



1.6 JUSTIFICACIÓN

El sistema inmune es un conjunto de moléculas, células, tejidos y órganos que permiten el reconocimiento, neutralización y eliminación de agentes ajenos al cuerpo y al propio SI. Los mecanismos de protección son clasificados como inespecíficos y específicos o innatos y adquiridos, respectivamente (Rojas, 2001). Dentro de los específicos está la producción de anticuerpos; así cuando un sistema biológico entra en contacto con algún agente extraño llamado antígeno, éste puede desencadenar una respuesta de tipo humoral produciendo grandes cantidades de anticuerpos específicos contra ese inmunógeno. Esos anticuerpos ayudarán al individuo a liberarse del agente extraño; sin embargo, para que la actividad sea efectiva tiene que pasar un tiempo después de la entrada del antígeno para producirse la respuesta específica. Ahora es posible aislar estos anticuerpos de individuos que han pasado por esta fase obteniendo sueros hiperinmunes y administrándolos a otros que presentan el cuadro agudo de la enfermedad dándose un proceso conocido con el nombre de Inmunización Pasiva, cuyo efecto es inmediato (Rojas, 2001).

Los sueros hiperinmunes equinos han sido utilizados para tratamiento y profilaxis (Fernández, 1998), principalmente en la elaboración de antivenenos, anticuerpos conjugados y sueros para inmunidad pasiva en animales y humanos (Akari, 1997; Fernández, 1998; Fernández, 1997; Fuchs 2004; Rojas, 2001). De igual forma la purificación de proteínas de equinos puede ser empleada en la neutralización de sustancias tóxicas y/o alérgicos que afectan al hombre (Breiteneder 1998).

Ejemplo de lo anterior es la aplicación de antivenenos donde los anticuerpos purificados neutralizan el efecto tóxico del veneno (Fernández, 1998; Pepin, 1996).



Sin embargo, la mayoría de los estudios hechos en caballos son enfocados con fines académicos, no tienen alguna aplicación directa además, de que en México hay pocos estudios en ésta área.

Hoy en día el conocimiento en inmunología permite diseñar técnicas para beneficios clínicos como: anticuerpos monoclonales, anticuerpos conjugados, perfiles de citocina que en varios animales ya están determinados, el avance es tal en veterinaria, que se conocen en equinos nueve isotipos de inmunoglobulinas: IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T), 10S1, IgM, IgA, IgB e IgE (Rockey, 1967; Klinman, 1965; Rockey, 1964; McGuire, 1973; Steinbach, 2002).

Lo anterior puede ayudar a superar padecimientos agudos con terapias de inmunidad pasiva; los anticuerpos específicos se utilizan en forma concentrada, para disminuir y/o neutralizar el efecto del agente etiológico. En la naturaleza, este proceso es propio de mamíferos, cuando por medio del calostro pueden transferir anticuerpos tipo IgG e IgA, principalmente (Poul-Pierre, 1998; Rockey, 1967).

Para este tipo terapias es necesario la implementación de metodologías que permitan desde la inducción, obtención, purificación y caracterización de anticuerpos, hasta conocer la farmacocinética de los mismos dentro del sistema biológico.

Por lo tanto, este trabajo pretende utilizar técnicas inmunológicas y bioquímicas para el aislamiento, purificación de anticuerpos, su presentación liofilizada como método más viable de conservación, determinando la dosis y vía que ofrezca el mejor efecto terapéutico basado en su farmacocinética.

La purificación de inmunoglobulinas por precipitación con sulfato de amonio es un método muy utilizado y simple de la inmunología clásica y actualmente se utiliza el mismo principio acoplado a otro método bioquímico denominado como cromatografía de afinidad (Ito, 2000).



En estos estudios la producción de un conjugado está asociado con la evaluación del antisuero nuevo a elaborar. En la reacción de conjugación de anticuerpos con una enzima hay diferentes uniones entre los grupos carboxilos y amino libres de la enzima y del analito (en este caso los anticuerpos) formando grupos como carboimidias (Cooper, 1977). El conjugado, que a la vez ayuda a la evaluación del antisuero, servirá para montar un equipo de diagnóstico de alguna enfermedad infecciosa específica; además, de conocer la dosis, vía de inoculación y método de conservación (Piépin, 1996; Watson, 1992; Fernández, 1998; Montoya, 1987; Akari, 1997).

La generación de estos sueros hiperinmunes ayudará en pacientes que presenten padecimientos agudos donde se necesitan terapias eficaces y rápidas en forma de inmunidad pasiva.

2 HIPÓTESIS

Si un agente protector acompaña a los anticuerpos en el proceso de liofilización entonces el título de dichos anticuerpos se verá menos afectado que en ausencia del agente.

Y si los anticuerpos son inoculados por vía intramuscular éstos se mantendrán en circulación cuando menos una a dos semanas



3 OBJETIVO GENERAL.

Estandarizar el método de purificación de inmunoglobulinas y adaptarlo en una presentación liofilizada estable para ser utilizada en la inducción de inmunidad pasiva en caballos y en sistemas de diagnóstico.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- ❖ **Determinar la metodología óptima para la obtención de anticuerpos IgG puros.**

- ❖ **Analizar la estabilidad de los anticuerpos en forma liofilizada en presencia de un agente protector.**

- ❖ **Preparar un conjugado con peroxidasa de rábano anti-IgG de caballo que permita evaluar el nivel de anticuerpos.**

- ❖ **Estudiar la farmacocinética de los anticuerpos purificados inoculándolos intramuscularmente en caballos.**



4 MATERIAL Y MÉTODOS

- Tubo de membrana de poro mol. p/ diálisis Spectra/Por MWCO: 12-14,000
- Espectrofotómetro Thermo Spectronic 4001/4
- Ultracongelador PEVCO ULT1386-3-A35
- Filtros Milipore 0.22 μm
- Balanza digital OHAUS GT 4800

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Albúmina sérica bovina SIGMA Fraction V
- IgG humana (de este laboratorio)
- Cabra (Módulo de Caprino del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la FES Cuautitlán, UNAM, México).
- Anticuerpos conjugados con peroxidasa contra Ig de cabra Anti Goat RO 175 R2 8601 ELA Conj. Reagents NVS
- Equinos: (Módulo de Equinos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C), UNAM, México) Ver LISTA en el Anexo

4.2 MUESTRA

Se obtuvieron 500 ml de sangre venosa por punción en vena yugular a la yegua Olín del Módulo de Equinos, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. La sangre fue contenida en una bolsa de transferencia con solución aditiva Baxter PL-146; posteriormente se obtuvo el plasma centrifugando a $680 \times g$ durante 10 min. en una centrifuga refrigerada Hettich Rotina 35 R.



4.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE IgG

Se utilizó el método de precipitación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) descrito por NVSL Diagnostic Reagents Production Guide No. R-62, pero se modificaron las concentraciones del sulfato y se evitó el uso de cromatografía en columna (Ver Anexo). El seguimiento de la purificación fue realizado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (EGP) empleando una cámara Hoefer SE 250 y utilizando el procedimiento estandarizado por este laboratorio. Fue usada albúmina sérica bovina (SIGMA Fraction V) e IgG humana (de este laboratorio) como estándares de referencia.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se empleó el método microproteico de Bradford, utilizando Azul brillante de Comassie G-250 (Bradford, 1967) utilizando la siguiente curva estándar:

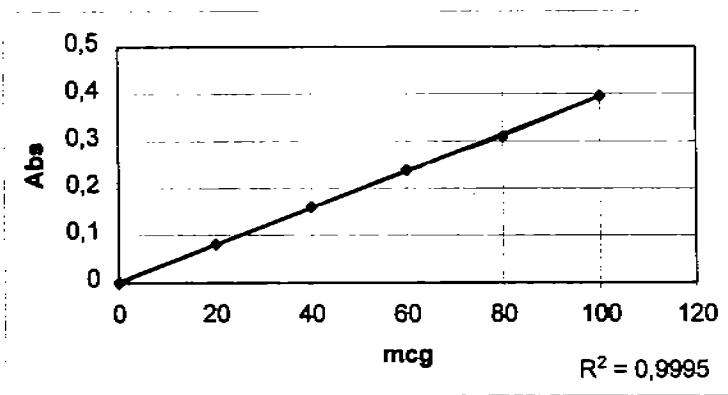


Figura 4.4. Curva Estándar de proteína por la técnica de Bradford



4.5 OBTENCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE CONTRA ANTICUERPOS DE CABALLO (INMUNIZACIÓN)

Se inoculó la cabra No. 109 del Módulo de Caprinos del Centro de Enseñanza Agropecuaria (FES Cuautitlán, UNAM), con el siguiente protocolo (Tabla 8.4):

Tabla 4.5 Protocolo de inoculación de IgG de caballo.

Día	Actividad
0	Toma de suero basal e inoculación de IgG de caballo (6.5mg) con ACF, IM (2 ml)
16	Inoculación de 10mg/ml de IgG de caballo, IV
24	Inoculación de 10mg/ml de IgG de caballo, IV
28	Inoculación de 10mg/ml de IgG de caballo, IV
31	Inoculación de 10mg/ml de IgG de caballo, IV

4.6 ELABORACIÓN DEL ANTISUERO ANTICABALLO CONJUGADO CON PEROXIDASA (AACP).

Se empleó la técnica descrita en NVSL Diagnostic Reagents Production Guide No. R-86, excluyendo la utilización de filtración (Ver Anexo V).

4.7 TITULACIÓN DEL CONJUGADO

Para obtener el título del AACP fueron hechas diluciones dobles sucesivas, y se utilizó una solución 1:100 de anticuerpos IgG de caballo (19 mg/ml) de manera constante (Se empleó el método de DOT-ELISA (Ver Anexo IV) anteriormente descrito.



4.8 LIOFILIZACIÓN DE IgG DE CABALLO.

Los anticuerpos aislados y purificados fueron cuantificados (46 mg/ml) y liofilizados. Se usaron en tres procedimientos: dilución 1:100 con PBS; dilución con albúmina de caballo 1:100; sin alteración. Las muestras se mantuvieron a -72°C , hasta antes de la liofilización con secador de bandejas con tapón Labconco durante 25 Hrs con un ciclo de 3 Hrs a -20°C y otro de 22 Hrs a 35°C .

4.9 PREPARACIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE PARA LA INMUNIZACIÓN PASIVA.

Se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22 μm (membrana de celulosa Milipore) y se liofilizaron 10 ml de IgG purificada, con un título de 1/16 000 ó 270 mg/ml con 1% de albúmina equina; el polvo fue resuspendido en 2 ml agua libre de pirógenos.

4.10 INMUNIZACIÓN PASIVA EN CABALLOS.

Inoculación de 2 ml I.M. del polvo resuspendido (2700 mg/ml aprox) a los caballos No. 106M, 144, 106H, 93, del Módulo de Equinos (FES-C, UNAM). Se tomaron muestras de sangre venosa los días 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14, 21, 25, 35, 43 después de inoculadas las inmunoglobulinas .



4.11 EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS INOCULADOS.

Obtenido el suero de las muestras de los días 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14, 21, 25, 35 y 45. Se determinó su título por medio de DOT-ELISA (Ver ANEXO IV).



5 RESULTADOS

5.1 OBTENCIÓN DE IgG PURIFICADA

Las cantidades de inmunoglobulinas purificadas son diferentes, según las concentraciones de sulfato utilizadas (Tabla 5.1 y 5.4).

Tabla 5.1 Resultados de las diferentes precipitaciones de IgG de caballo utilizando distintas concentraciones de Sulfato de amonio y sus rendimientos.* $r^2=0.9995$; ** Se obtuvo posteriormente cantidades de hasta 21.5 mg/ml;*** También se contaron los sobrenadantes obtenidos en cada precipitación.

Saturación de Sulfato de amonio (%)	Cantidad obtenida de IgG (mg/ml) *	Rendimiento de IgG purificado por cantidad de Plasma (mg/ml)	Rendimiento de IgG purificado por cantidad de sangre (mg/ml)
70 y 80	73.6 **	36.8	20.3
80	19.8	9.9	5.5
80 ***	46.11	23.1	12.7

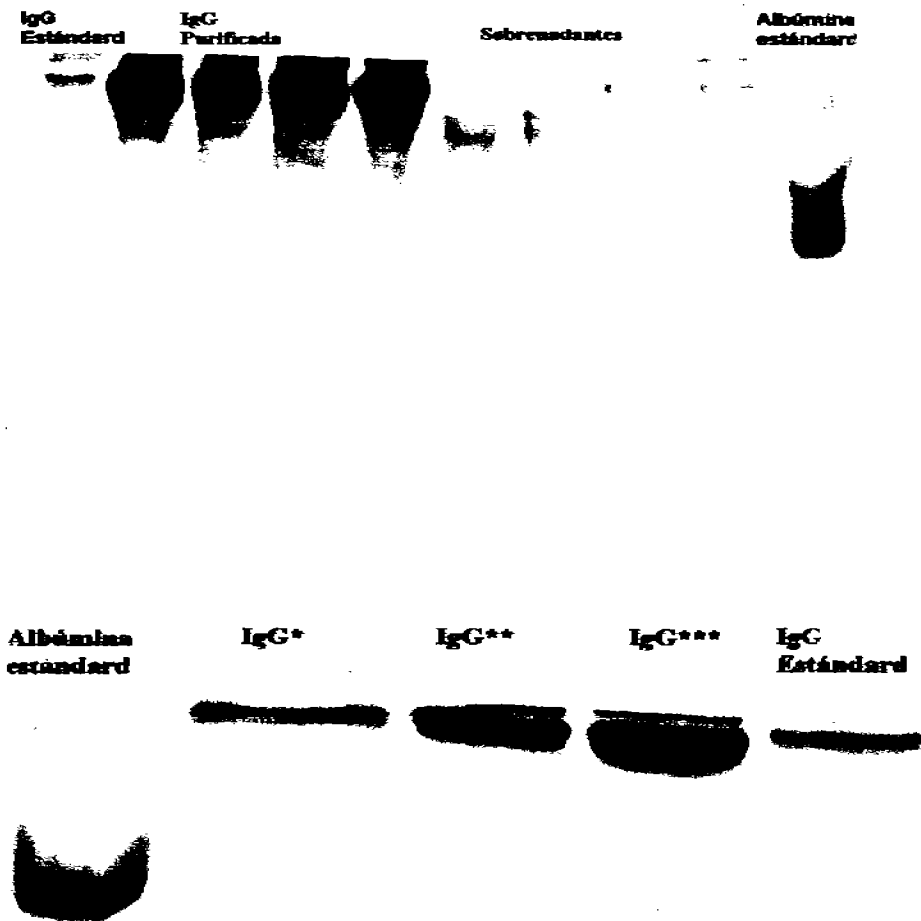


Figura 5.1. GPA-SDS durante la purificación. IgG* Purificación con sulfato de amonio al 75%; IgG** Purificación con sulfato de amonio al 80%; IgG*** Purificación con sulfato de amonio al 70 y 80 %.



5.2 ANTICUERPOS DE CABRA ANTI IgG DE CABALLO

En la inoculación en cabra, se empleó la solución de 2.03 mg/ml de IgG, apreciándose la respuesta de generación de anticuerpos anti-IgG de caballo por el día 40 (Figura 5.2), momento en que se sangra al animal ya que al tener gran cantidad de anticuerpos es factible la purificación.

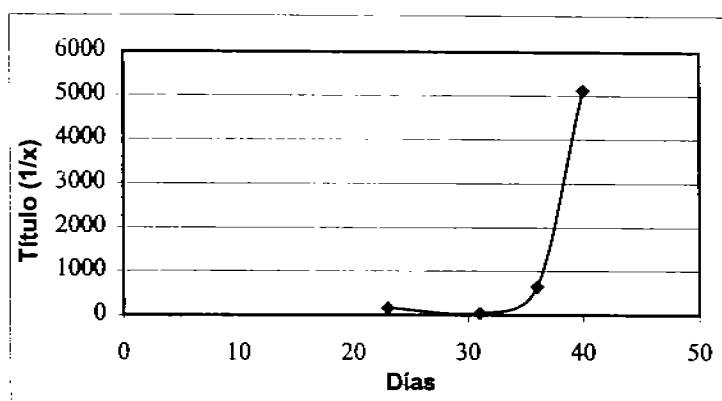


Figura 5.2 Título de IgG anti IgG de caballo durante la inmunización en cabra. En el día 0 fue inoculado el antígeno (IgG caballo) y se observa el aumento en el título antes del día 40.

El título de anticuerpos de cada día se calculó en suero, basándose en la técnica de DOT-ELISA (ver Anexo), en papel de nitrocelulosa y ocupando anticuerpos anticabra conjugados con peroxidasa (Anti Goat RO 175 R2 8601 ELA Conj. Reagents NVSL). El título se tomó como la máxima dilución de suero, donde se apreciaba reacción. Después de observar un título de anticuerpos de 1/5120, fue extraída una muestra de 350 ml de sangre venosa; se obtuvo el plasma y fueron separadas y purificadas las IgG anticaballo con base en el método empleado para aislamiento y purificación en plasma de caballos. La cantidad de inmunoglobulinas se cuantificó por el método de Bradford



5.3 LIOFILIZACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Al precipitar el suero hiperinmune, se buscó tener en la solución final, la máxima concentración de IgG (Tabla 5.3A), por lo que las proteínas fueron resuspendidas en solución menor de PBS pH= 7.2; de esta manera al liofilizar se contará con la menor cantidad de agua para eliminar.

Tabla 5.3A Resultados de las diferentes precipitaciones de inmunoglobulinas de cabra (anti IgG de caballo).

Concentración de Sulfato de Amonio (%)	Cantidad de IgG obtenida (mg/ml)
75	556.5
80 y 70	978.7

Después de la cuantificación se realizó el conjugado con peroxidasa que dio un título de 1/1500. La eficacia del conjugado se evaluó utilizando una nueva muestra de IgG de caballo, titulada a través de este conjugado, lográndose un buen resultado en cuanto al título; así mismo el conjugado se utilizó para evaluar la modificación del título de las IgGs, en la liofilización.

Nuevamente se precipitó IgG de caballo con el método ya descrito; alcanzando una solución de 214.5 mg / ml de anticuerpos. La muestra es tratada de tres formas y posteriormente se liofilizó (Tabla 5.3A).



Tabla 5.3B Efecto del proceso de liofilizado en muestras de IgG con diferentes tratamientos.

Muestra	Tratamiento	Título antes del liofilizado	Título después del liofilizado	Rendimiento (%)
1	Dilución 1:100 con PBS	1/12000	1/6000	50
2	Dilución 1:100 con Albúmina	1/12000	1/12000	100
3	Sin dilución	1/12000	1/4000	33.33

Los anticuerpos aislados y purificados como se ha descrito y con un título determinado por DOT-ELISA empleando el AACP, se usaron en tres procedimientos: el primero fue diluido 1:100 con PBS; el segundo diluido con albúmina (al 1%) de caballo 1:100; el tercero no sufrió alteración. Las muestras se mantuvieron a -72°C , hasta antes de la liofilización con secador de bandejas con tapón Labconco durante 25 hrs, después fue determinado el título de cada muestra con DOT-ELISA. La presencia de albúmina como agente protector, evita que el título de anticuerpos disminuya en la liofilización (Figura 5.3).

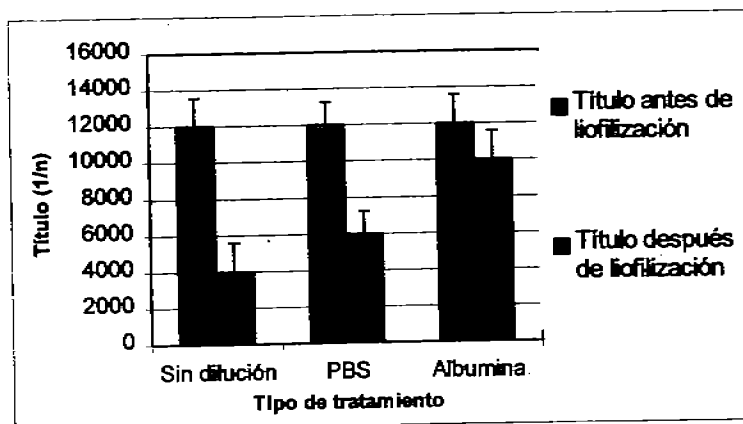


Figura 5.3. Comparación de los títulos obtenidos en el liofilizado con diferentes tratamientos.



5.4 INMUNIZACIÓN PASIVA EN CABALLOS

La muestra liofilizada fue administrada, vía I.M. a cuatro caballos criollos (1.5 ml con título de 1/16000 ó 2700 mg). Se tomaron muestras sanguíneas antes de la inoculación (día 0) y después (días 1, 2, 4, 7, 10, 14, 21, 25, 35, 43). El título se evaluó bajo la técnica de DOT -ELISA utilizando el AACP preparado en este trabajo (Figura 5.4A).

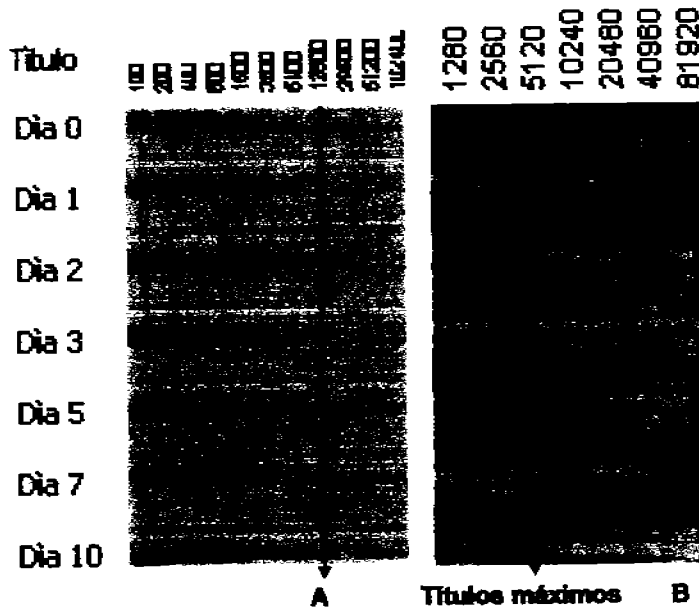


Figura 5.4A Pruebas de Dot-ELISA para las muestras de suero. A) caballo con administración de IgG. B) Caballo sin administración de IgG.

Como control se tomó el caballo No. 100 y sólo se le administró SSF (figura 5.4B). Posteriormente se le hicieron las mismas pruebas que los demás caballos.

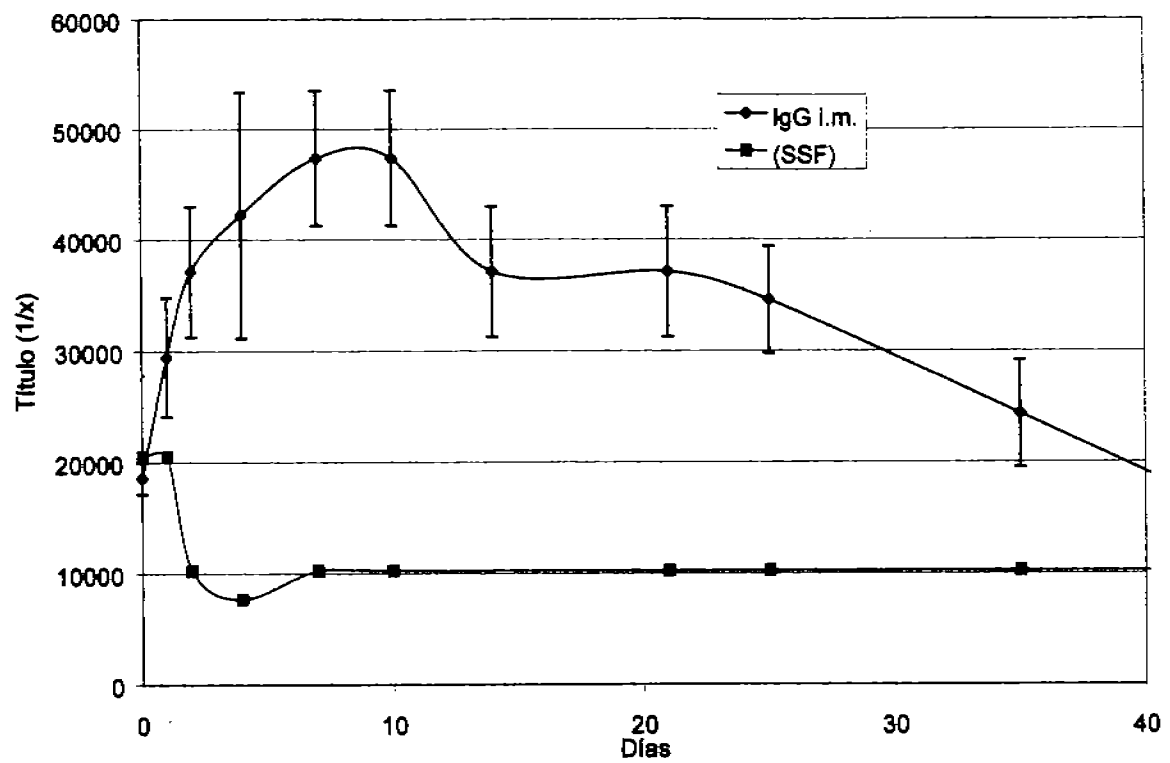


Figura 5.4B Cinética de anticuerpos. En la gráfica se observa que la cantidad de anticuerpos aumentan desde los primeros días a comparación del blanco (P<0.0001 con 95% intervalo de confianza, Graphad instant tm V2.03)



Fue medido el tiempo de vida media de los anticuerpos en caballo tomando en cuenta la máxima concentración obtenida y con logaritmo natural de las siguientes concentraciones (figura 5.4C).

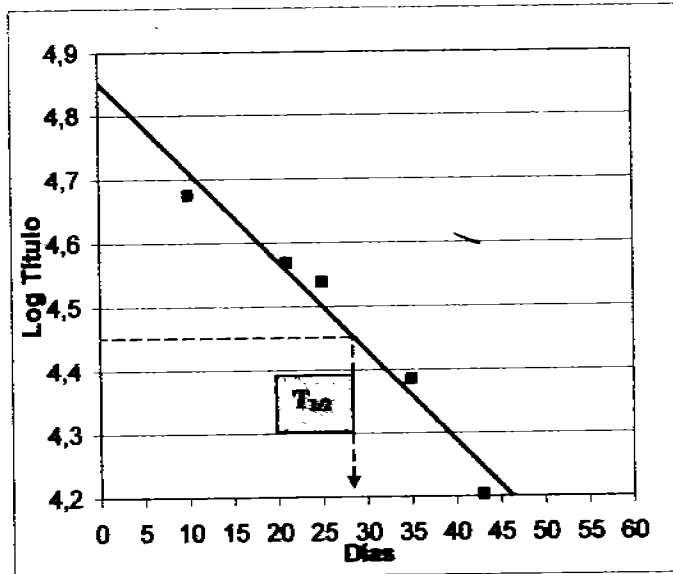


Figura 5.4C Regresión lineal que muestra el decaimiento de anticuerpos. La figura muestra la regresión lineal ($y = -0.0141x + 4.8526$, $R^2 = -0.9594$) utilizando el \log_{10} de los valores del título. El tiempo de vida media se extrapola con la mitad del título máximo alcanzado.



6 DISCUSIÓN

Muchos autores han dejado establecidos métodos para la precipitación de inmunoglobulinas (Breitenender, 1998; Brown, 1988; BurKot, 1985; Piépin, 1996); sin embargo, los resultados de este trabajo señalan que en la precipitación en donde las concentraciones de sal son variables (con 70 y 80% de saturación), se obtiene un mejor resultado en el rendimiento (Tabla 5.1 y 5.3A).

El conjugado elaborado es indispensable para evaluar el nivel de IgG del caballo por métodos inmunoenzimáticos; resultando de utilidad en la evaluación de tratamientos que involucren respuesta humoral del individuo o como sistema para el diagnóstico de las enfermedades (Lidell, 2002).

Es sabido que el proceso de liofilización es muy agresivo; así que debe considerarse un agente protector en este tipo de secado (Fernández, 1998; Montoya, 1987). Las Moléculas biológicas como inmunoglobulinas pueden ser afectadas (Brown, 1988; Cooper, 1977); por lo que se evaluó la liofilización considerando un agente protector con distintos tratamientos de la muestra (Fernandez B, 1998; Montoya, 1987). En este caso, el agente protector corresponde a albúmina extraída del plasma precipitado para la obtención de anticuerpos.

Aunque el título de anticuerpos pueda variar un poco con el secado por liofilización, el largo tiempo de almacenaje de estos productos supera esa inconveniencia dado que se pueden guardar hasta por años sin encontrar diferencia significativa en el título (Montoya, 1997)

Las discrepancias en diferentes concentraciones muestran la efectividad de diversos métodos. (Tabla 5.3A). Se observa que la albúmina es un buen agente protector en la liofilización de inmunoglobulinas (Tabla 5.3B) y al ser homólogas (de origen equino) no representará ningún tipo de reacción considerable al administrarse



en caballos, considerando que ésta fisiológicamente acompaña a las inmunoglobulinas en el torrente sanguíneo y llega a interaccionar con ellas

El congelar la muestra a -72°C asegura su estado sólido además de formarse pequeños cristales que exponen mayor superficie de sublimación en el secado aunque se formaran poros más pequeños entre los cristales (Fernández, 1998). El purificado fue tratado de tal manera que se obtuviera un mejor resultado agregando un agente protector.

La administración de anticuerpos de caballo han sido ampliamente utilizados como antídotos en personas picadas por un arácnido o mordidos por una víbora (Pepin, 1996, Fernandez, 1997).

La profilaxis con antisueros fue utilizada desde 1890 cuando Behering y Kitazato utilizaron sueros de cobayos inmunizados con difteria para neutralizar la toxina de dicha bacteria en otros pacientes. Hoy en día se utilizan como inmunoprofilaxis pasiva o en la post-infección de agentes virales, bacterianas, fúngicas, micoplásmicas y parasitarias (Dunman, 2003).

La evaluación de los anticuerpos inoculados fueron visualizados por medio de Dot-ELISA, que muestra el incremento del título de anticuerpos en los primeros días después de la administración (Figura 5.4A)

La administración por vía intramuscular del liofilizado resuspendido incrementa los anticuerpos desde el primer día a comparación del caballo control y se mantienen por 35 días aproximadamente (Figura 5.4B). Esta cinética se ha observado en otros tipos de trabajos con anticuerpos, donde la vía I.M. ha sido la mejor opción de administración de estas sustancias (Akari, 1997; Piépin, 1996; Andresen, 2001; Watson, 1992).



El uso terapéutico también se puede probar vía intravenosa para efectos totalmente inmediatos, aunque sólo por algunos días. La vía IV como vía para la acción inmediata es importante en la administración de antivenenos y antitoxinas (León 2001, Piépin, 1996).

Estas IgG concentradas se pueden utilizar en potros, los cuales presentan comúnmente cuadros de hipogamaglobulinemia al momento de nacer, en condiciones de sepsis, estrés (Koterba 1990)

El nivel de anticuerpos en este período de 40 días es comparable con el descrito en otros trabajos similares. No obstante, hay quienes observan la elevación de anticuerpos por inmunidad pasiva de hasta 24 semanas (Akari 1997). Esto es satisfactorio para el animal por el hecho de que durante todo este tiempo los anticuerpos están presentes, así el antígeno o agente patógeno es reconocido constantemente por el antisuero.

Hay algunos que reportan el aumento de anticuerpos por mucho más tiempo; Akari y cols. Reportan haber obtenido títulos de anticuerpo hasta por 24 semanas después de ser inoculados, pero existe muchos trabajos que difieren incluso reportando niveles por 3 días (Pepin 1996). Las diferencias posiblemente se deban a muchas variantes pero principalmente por el tipo de material transferido como anticuerpos monoclonales (Xu 2002), Ac's de calostro (Femández, 1998; Watson, 1992) y fracciones de anticuerpos como los F(ab')₂ (Pepin 1996) y otros tipos de anticuerpos alterados como los llamados quiméricos o humanizados (Tsurushita, 2005).

Para estar seguro del mantenimiento del nivel de anticuerpos en sangre se calculó el tiempo de vida media ($T_{1/2}$). La Figura 5.4C muestra la regresión lineal transformada por \log_{10} en donde el tiempo de vida media fue de 29.3 días. La Figura 5.4B muestra el decaimiento de los anticuerpos ya que son eliminados poco a poco por el organismo. Watson y cols. Inocularos anticuerpos en becerros y de manera similar observaron la



vida media de los anticuerpos estaba de alrededor 20 días. El tiempo de vida media nos da el tiempo en que tarda en eliminarse el 50% de la sustancia administrada y aunque se puede calcular matemáticamente, el método gráfico ofrece los mismos resultados. (Litter 1980)

El conjugado elaborado en esta trabajo ayudó a evaluar los anticuerpos totales del equino, sin embargo los usos de tal conjugado se puede extender a muchos sistemas de diagnóstico en donde se pueden detectar varas subclases de Ig contra diferentes antígenos (Dahwan 2002).

Este conjugado adecuado a métodos de ELISA indirectos es capaz de identificar anticuerpos específicos contra cualquier antígeno conocido, por lo que tiene alto valor en el diagnóstico de enfermedades (Goodall, 2001). Por ejemplo, en una ELISA, es posible colocar un antígeno viral a determinar (virus del herpes) en la placa, después el suero del supuesto y el conjugado revelará la presencia o no del antígeno.



7 CONCLUSIONES

1. Se estandarizó el método para la mejor obtención de sueros hiperinmunes.
2. Hubo elaboración del AACP para su evaluación de anticuerpos.
3. El liofilizado como método de conservación mejoró al emplear como agente protector a la propia albúmina del caballo.
4. Los anticuerpos administrados vía I.M. elevan el título en sangre de anticuerpos desde el primer día y se mantienen durante 35 días aproximadamente.
5. El tiempo de vida media fue de 29.3 días para el suero hiperinmune inoculado por vía IM. En caso de terapia con ellos habrá de considerarse, para que el nivel se mantenga constante.



8. REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman AH, Púber JS, Casabnova JM, Pozos de Provencs OC (1999). *Inmunología Celular y Molecular*. 2° Ed. Madrid; México: McGraw-Hill.
- Allen PZ, Dalton EJ, Khaleel SA, Kenney RM (1977). Studies on equine immunoglobulins—V Horse antibodies to donkey IgG_a. *Immunochem.*; 14:577-586.
- Akari Hirufimi, Torhu S, Kazuyo I, Hiroo H, Tzugikazu T, Takeshi M, Keiji HH, Yasuhiro Y (1997). Prophylaxis of experimental HTLV-I infection in cynomolgus monkeys by passive immunization. *Vaccine*; 15:1391-1395.
- Andresen LO, Tegtmeier C (2001). Passive immunization of pigs against experimental infection with *streptococcus suis* serotype 2. *Vet Immunol*; 81:331-344.
- Bailey E (2004). Fifth International Equine Gene Mapping Workshop. Meeting Report. *J. Of Equine Vet. Science*; 24 March.p.p 106-108.
- Balter H, Faivre-Chauvert A, Babino A, Robles A, Vusio P, Hintz I and Cols (2000). Radiofarmacia / Radioquímica 8.3 IgM y fragmentos VH Y SCFV anti-TN biotinilados para uso potencial en Radioinmunoterapia Abstracts XVII Alasbimn Congress of Nuclear Medicine and VIII Spmn October 2000, Porto Portugal. 8.
- Botros HG, Rabillon J, Grégoire C, David B, Dandeu JP (1998). Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ c2 and Equ c3, two horse allergens from horse sweat. *J. Chromatography B: Biomed. Sc. and Appli.*; 710:57-65.



Bradford MM (1967). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of protein-Dye Binding. *Analytical Biochem*; 2:248-254.

Breiteneder H, Goubran BH, Rabilon J, Grégoire C, David B, Dandeu JP (1998). Thiophilic adsorption chromatography: purification of Equ C2 and Equ C3, two horse allergens from horse sweat. *J of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*; 710:57-65.

Brown G. M.; Ranger C. R. (1988). NVSL Diagnostic Reagents Production Guide No. R-62. USDA, APHIS, National Veterinary Services Laboratories. Scientific Services Laboratory, Reagents Section.

Brow G. M.; Ranger C. R (1988). NVSL Diagnostic Reagents Production Guide No. R-86. USDA, APHIS, National Veterinary Services Laboratories. Scientific Services Laboratory, Reagents Section.

BurKot TR, Wirtz RA, Lyon J (1985). Use of Fluorodinitrobenzene to Identify Monoclonal Antibodies which are suitable for conjugation to Periodate-Oxidized Horseradish Peroxidase. *J of Immunol Meth*; 84:25-31.

Chase HA (1984). Affinity separations utilizing immobilized monoclonal antibodies—a new tool for the biochemical engineer. *Chemical Engineering Science* 39:1099-1125.

Cooper TG (1977). *The Tools of Biochemistry, Vol II*. Toronto: John Wiley & Sons,.

Delves PJ (1998) *Encyclopedia of Immunology*. 2° Ed. Vol IV. San Diego: Academic.



Dhawan S (2002). Design and construction of novel molecular conjugates for signal amplification (I): conjugation of multiple horseradish peroxidase molecules to immunoglobulin via primary amines on lysine peptide chains. *Peptides*; 23:2091-2098.

Dhawan S (2002). Design and construction of novel molecular conjugates for signal amplification (II): use of multivalent polystyrene microparticles and lysine peptide chains to generate immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugates. *Peptides*; 23:2099-2110.

Dunman PM, Nesin M (2003). Passive immunization as prophylaxis: when and wherewill this work? *Current Opinion in Pharmacol.*; 3:486-496.

Englund J A, Glezen WP (2001). Passive immunization for the prevention of otitis media. *Vacc.*;19:S116-S121.

Fernández FM, Comer ME, Hodgins D C, Parwani PR, Nielsen SE, Crawford, Estes MK, Saif LJ (1998). Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vacc*;16:517-516.

Fernández I, Takehara HA, Santos ACR, Cormont F, Latinne D, Bazin H, Mota I (1997). Neutralization of bothripic and crotalic venom toxic activities by IgG(T) and IgGa subclasses isolated from immune horse suerum. *Toxicon*; 6:931-936.

Fernández BA (1998). Liofilización de productos farmacéuticos. México DF: Noriega Editores,.



Flaminio MJB, Rush BR, Davis EG, Hennessy K, Shuman W, Wilkerson MJ (2000). Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. *Vet. Immunol. Immunopath.*; 73:267-285.

Fletcher MC, Kuderova A, Cygler M., Lee JS (1998). Creation of a ribonuclease abzyme through site-directed mutagenesis. *Nature Biotechnology* 16:1065-1067

Flores S JC, Hernandez E, Cruz R, Romero RA (1997). Estudio de estabilidad acelerada de tres diferentes anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano. *Memorias del XXX Congreso de la Asociación Farmacéutica Mexicana Cancún Quintana Roo, México Diciembre de 1997.*

Freifelder D (1991). *Técnicas de bioquímica y Biología Molecular*. Buenos Aires: Ed reverté p. 205-206

Fuchs H C, Radauer C, Mari A, Altmann F, M. Bublin, O (2004). Pru av 2, The major allergen from sweet cherry, possesses cross-reactive carbohydrate IgE-epitopes. *J Allergy Clin Immunol*;113: S153.

Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH (1977) *Methods In Immunology*. 3° Ed Massachussets: 1977

Goodall DM, Raycundalia C (2003) *Antiserum*. Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net.

Gans H, DeHovitz R, Forghani B, Beeler J, Maldonado Y., Arvin AM (2003). Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life. *Vacc.*; 21:3398-3405.



Hamlin MJ, Hopkins WG (2003) Retrospective Trainer-reported Incidence and Predictors of Health and Training-related Problems in Standardbred Racehorses. *J Equine Vet. Sc.*; 10:343-353.

Harlow E, David L (1999). *Using Antibodies*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hassl A (2005). Snake eggs immunoglobulins: Biochemical characteristics and adjusted isolation procedure. *J Imm. Meth.*; 297:253-257.

Horohov DW (2003). Equine cytokines: Past Present and Future. *J Equine Vet. Sc.*; 1:331-332.

Ito Y (2000). Centrifugal precipitation chromatography: principle, apparatus, and optimization of key parameters for protein fractionation by ammonium sulfate precipitation. *Analytical Biochem*; 277:143-153.

Ivo SJ, Galvao-Castro B, Mello DC, Pereira HG, Pereira MS (1987). Dot enzyme immunoassay. A simple, cheap and stable test for antibody to human immunodeficiency virus (HIV). *J of Immunol Meth*; 99:191-194.

Jiang L, He L, Fountoulakis M (2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Cromato. A*; 1023:317-320.

Jones WE. (2004). Miscellaneous. Recombinant DNA vaccine technology. *J. Equine Vet. Sc.*; 24:2 Feb. *Veterinary Review From Zweig Memorial Fund News Capsule*, No. 35, November 2003.

Klinman NR (1965). Equine antihapten antibody: II the G(7S) components and their specific interaction. *Int J Immunochem*; 2:51-60.



Koterba AM, Drommond WH, Kosch PC (1990). *Equine Clinical Neonatology*. Philadelphia.

Kreitman RJ, Pastan I (1998). Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 53–88.

Leon G, Monge M, Rojas E, Lomonte B, Gutiérrez JM (2001). Comparison between IgG and F(ab)₂ polyvalent antivenoms: neutralization of systemic effects induced by *Bothrops asper* venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon*; 39:793-801.

Liddell JE (2002). Antibody Purification by Ammonium Sulfate Precipitation. *Encyclopedia Of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net.

Liddell JE (2002). Enzyme Labeling of Antibodies. *Encyclopedia Of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net.

Liddell JE (2003). Antibody purification by ammonium sulfate Precipitation. *Encyclopedia Of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net.

Litter M (1980). *Farmacología Experimental Y Clínica*. 6° Ed. México: El ateneo.

Lombardi VC, David A (2004). Schooley a method for selective conjugation of an analyte to enzymes without unwanted enzyme–enzyme cross-linking. *Analytical Biochem*; 331:40–45.

Lunn DP, Holmes MA, Antczak DF, Agerwal N, Baker J, and Cols (1998). Report of the Second Equine Leukocyte Antigen Workshop, Squaw Valley, California, July 1995. *Vet. Immunol. Immunopath.*; 62:101-143.



- Lucas AH (2003). Antibody function. Encyclopedia Of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net.
- Lynch M (2001). Métodos de Laboratorio. 2° Ed. México DF: Interamericana.
- Maitta RW, Datta K, Pirofski L (2004). Efficacy of immune sera from human immunoglobulin transgenic mice immunized with a peptide mimotope of *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Vacc.*; 22:4062-4068.
- Malin DH, Lake JR, Lin A, Saldaña M, Balch L and Cols (2001). Passive immunization against nicotine prevents nicotine alleviation of nicotine abstinence syndrome. *Pharm., Biochem. Behavior*; 68:87-92.
- Marti E, Horohov DW, Antzak DF, Lazary S, Lunn DP (2003). Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fe, New Mexico, and Hortobagy, Hungary. *Vet. Immunol Immunopath.*; 91:233-243.
- Mayall S, Siedek E, Hamblin AS (2001). The Anti-human CD21 Antibody, BU33, Identifies Equine B Cells. *J. Comp. Path.*; 124:83-87.
- McCullough KC and Langley D (1985). Anti-idiotope vaccines: can they exist? *Vaccine* 3:59-64
- McGuire TC, Crawford TB, Henson JB (1973). The isolation, characterization, and functional properties of equine immunoglobulin classes and subclasses. *Proc. 3rd Int. Conf. Equine Infectious Diseases*, pp. 364-381.
- Merlín JC, Villaescusa BR, Guerreiro HA, González GJ, Arce HA (2001). Preparación de un conjugado peroxidasa-anti IgG humana (cadena) en conejo. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter*; 17:132-137.



- Michail M, Vesiliadou M, Zotos A (2004). Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdneri*) heads. *Food Chem.*; 23 mayo 2005.
- Montoya A, Castell J (1987). Long-term storage of peroxidase-labelled immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. *J of Immunol Meth*; 99:13-20.
- Mulvey C, Ohlendieck K (2003). Use of continuous-elution gel electrophoresis as a preparative tool for blot overlay analysis. *Anal. Biochem.*; 319:122-130.
- Pastoret PP (1998). *Handbook of Vertebrate Immunology*. USA: Academ. Press.
- Parthasarathy V, Price EO, Orihuela A , Dally MR, Adams TE (2002). Passive immunization of rams (*Ovis aries*) against GnRH: effects on antibody titer, serum concentrations of testosterone, and sexual behavior. *Animal Rep. Sc.*; 71:203-215.
- Paul-Pierre P, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (1998). *Handbook Of Vertebrate Immunology*. London: Academic Press,
- Pépin-Covatta S, Charles L, Grandgeorge MT, Lang J, Jean-Michel S (1996). Immunoreactivity and pharmacokinetics of Horse Anti-Scorpion venom F(ab')₂-scorpion venom interactions. *Toxicol And Applied Pharmacol*;141:272-277.
- Pincus SH and Carmack CE (1992). Variable regions of antibodies to synthetic polypeptides—III. Antibodies arising in response to administration of anti-idiotope *Molecular Immunology* 29: 811-819.
- Redwan EM, Khalil A, EL-Dardiri ZZ (2005). Production and purification of ovine anti-tetanus antibody. *Comp. Imm., Microbiol & Inf. Disease*; 28:167-176.



Robyt JF, White BJ (1987). *Biochemical Techniques. Theory and practice.* USA: Waveland Press, Inc.,

Rockey JH, Klinman NR, Karush F (1964). Equine antihapten antibody I 7S2A and 10SL-Globulin components of purified anti-lactoside antibody. *J Exp Med*;120:589-609.

Rockey JH (1967). Equine antihapten antibody. The subunits and fragments of anti-lactoside antibody. *J Exp Med*; 125:249-275.

Ruitenberga KM,. Loveb DN, Gifkersona JR,. Wellingtona JE, Whalleya JM (2000). Equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein D DNA inoculation in horses with pre-existing EHV-1/EHV-4 antibody. *Vet. Microbiol.*; 76:117-127.

Ruprecht RM, Ferrantelli F, Kitabwalla M, Xu W, McClure HM (2003). Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vacc.*; 21:3370-3373.

Rojas MW (2001). *Inmunología.* 12nd ed. Bogotá: Corp. para las Inv. Biol.

Steinbach F, Deeg C, Mauel C, Wagner B (2002). Equine immunology: offspring of the serum horse. *Trens in immunol*; 23:5.

Santos JI, Galvao-Castro B, Mello DC, Pareira HG, Pereira MS (1987). Dot enzyme immunoassay. *J. Imm. Meth.*; 99:191-194.

Taborda CP, Rivera J, Zaragoza O, Casadevall A (2003). More Is Not Necessarily Better: Prozone-Like Effects in Passive Immunization with IgG¹. *The J Imm.*; 170:3621-3630.



Tsurushita N, Hinton PR, Kumar S (2005). Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* 36: 69–83

Sugiura T, Kondo T, Imagawa H, Kamada M (1998). Production of monoclonal antibodies to six isotypes of horse immunoglobulin. *Vet. Imm. Immunopathol.*; 65:145-161.

Voet D, Voet JG, Geis II, Woolsey B (1990). *Biochemistry*. New York: J. Wiley.

Wagner, B (2005). Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse *Developmental and Comparative Immunology* xx 1–10

Wagner B, Robeson J, McCracken M, Watrang E, Antczak D (2005). Horse cytokine/IgG fusion protein – mammalian expression of biologically active cytokines and a system to verify antibody specificity to equine cytokines. *Vet. Immunol. Immunopath.*; 105:1-14.

Watson DL (1992). Biological half-life of bovine antibody in neonatal lambs and adult sheep following passive immunization. *Vet Immunol and Immunopatol.*;30:221-232.

Xu W, Hofmann-Lehmann R, McClure HM, Ruprecht RM (2002). Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies: correlates of protective immunity against HIV. *Vacc.*; 20:1956-1960.

Zouali M. *Natural Antibodies* (2001) *Encyclopedia Of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net.

<http://www.nutrar.com/detalle.asp?ID=127>



ANEXO



Animales usados en este trabajo

- Yegua Olin, raza Pura Sangre, edad 17 años, sexo hembra, 450 Kg de peso, 1.54 m de alzada.
- Caballo No. 106, raza criolla, edad 18 años , sexo macho, 450 Kg de peso, 1.50 m de alzada
- Caballo No. 93, Raza Warmblod, edad 20 años, sexo hembra, 500 Kg de peso, 1.57 de alzada.
- Yegua No. 106 Raza Criolla, edad 20 años, sexo hembra, 440 Kg de peso, 1.60 de alzada
- Caballo No. 144 Raza Criolla, edad 18 años, sexo macho, 450 Kg de peso, 1.53 de alzada
- Caballo No. 270. Raza Criolla, edad 20 años, sexo macho, 400 Kg de peso, 1.57 de alzada.
- Caballo No. 100. Raza Criolla, edad 20 años, sexo macho, 600 kg de peso, 1.67 de alzada.
- Cabra No. 109 Hembra de 3 años, 50 Kg, raza Alphina francesa

I. PRECIPITACIÓN DE IgG

Muestra: Suero o plasma. (se sugiere suero para tener menos interferencias)

Procedimiento

- 1) Colocar 100 ml de suero o plasma en un matraz Erlenmeyer que contenga una barra magnética.
- 2) Montar un baño de hielo y colocar el matraz con la muestra.
- 3) Agregar gota a gota y con agitación lenta 50 ml (1/2 del volumen del suero o plasma) de solución saturada de Sulfato de amonio al 80 % fría.
- 4) Guardar el precipitado formado a 4°C durante media hora.
- 5) Sedimentar el precipitado por centrifugación a 5000 x g a 4°C por 30 minutos.
- 6) Decantar y desechar totalmente el sobrenadante. Se puede quitar el exceso de líquido cuidadosamente con papel filtro.
- 7) Agregar a la globulina precipitada PBS pH = 7.2 empleando el mismo volumen usado con la solución saturada de Sulfato de amonio (50 ml).
- 8) Remover y disolver el precipitado con una varilla de vidrio y agitando suavemente.
- 9) A la resuspensión colocarle una barra magnética.
- 10) Precipitar la globulina por segunda vez agregando gota a gota y con agitación lenta 50 ml (1/2 del volumen original) de solución saturada de Sulfato de amonio al 70 % fría.
- 11) Sedimentar el precipitado por centrifugación a 5000 x g a 4°C por 30 minutos como en el paso 5.
- 12) Decantar y desechar totalmente el sobrenadante como en el paso 6.
- 13) Disolver el precipitado con 50 ml de PBS pH = 7.2 como en el paso 7 y 8.
- 14) Precipitar la globulina por tercera vez con 50 ml de solución saturada de Sulfato de amonio al 70 % fría como en el paso 10.



- 15) Sedimentar el precipitado por centrifugación a 5000 x g a 4°C por 30 minutos como en el paso 5.
- 16) Decantar y desechar totalmente el sobrenadante como en el paso 6.
- 17) Disolver el precipitado con 50 ml de PBS pH = 7.2 como en el paso 7 y 8.

Diálisis

- 18) Colocar la globulina en un tubo de diálisis preparado.
- 19) Dializar colocando el tubo de diálisis con la globulina en 2000 ml de SSF a 4°C con agitación lenta y constante. Cambiar el disolvente cada 6 Hrs. Sumando un total de 24 Hrs de diálisis.
- 20) Adicionar 1:1 en volumen una solución saturada de cloruro de bario, la presencia de precipitado indica que todavía hay sulfato de amonio.
- 21) Remover la globulina del tubo de diálisis y conservar en congelación.

II. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Método microproteico de Bradford

Curva estándar.

- 1) Usar una solución estandarizada de albúmina bovina al 0.1 % (1mg/ml).

El reactivo es una solución de azul de Coomassie G-250

Sustancias \ Sistema	Blanco	1	2	3	4	5
Estándar (μ l)	_____	20	40	60	80	100
PBS pH = 7.2 (μ l)	100	80	60	40	20	_____
Reactivo (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Cada sistema se hace por triplicado.



- 2) Agitar con vortex y dejar reposar 5 minutos.
- 3) Leer en un espectrofotómetro a 595 nm. El color es estable 2 horas.
- 4) Sacar promedio de la absorbancia de cada triplicado y construir la curva estándar.

Muestra.

- 1) Tomar 10 μ l de la globulina purificada y agregar 90 μ l de PBS pH = 7.2 (sol.A)
- 2) Tomar 10 μ l de la solución A y agregar 90 μ l PBS pH = 7.2 (sol. B)
- 3) Agregar 1ml de reactivo a la solución B mezclar con vortex y reposar 5 minutos.
- 4) Leer en un espectrofotómetro a 595 nm.
- 5) Si la absorbancia sobrepasa el de la curva estándar se debe realizar una nueva dilución.
- 6) Calcular la concentración de globulina por regresión lineal de la curva estándar y tomando en cuenta las diluciones.

III. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

I. Preparar un gel discontinuo de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio como se indica a continuación:

- 1) Preparar un gel tapón. Verterlo en la cámara y dejar polimerizar.
- 2) Preparar el gel de separación (la mezcla se vierte rápidamente a la cámara de electroforesis guardando una pequeña cantidad para observar el momento de polimerización), agregar alcohol isopropílico sobre el gel y retirarlo cuando haya ocurrido la polimerización, enjuagar con agua desionizada para quitar el exceso de alcohol y secar con papel filtro.



- 3) Preparar el gel de condensación (se adiciona sobre el gel de separación con cuidado y rapidez guardando una pequeña cantidad para observar el momento de polimerización, colocar el peine de separación para generar los pozos el cual se retira cuando el gel ha polimerizado.

	Gel tapón	Gel separador				Gel de condensación
Porcentaje del gel		12%	10%	7.5%	5.0%	
Agua destilada	-	3.35 ml	4.05 ml	4.85 ml	5.68 ml	6.1 ml
Tris-HCl, pH 8.8	1 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	-
Tris-HCl, pH 6.8	-	-	-	-	-	2.5 ml
SDS 10%	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
BIS/ Acrilamida 30 %	2 ml	4.00 ml	3.3 ml	2.5 ml	1.67 ml	1.3 ml
Persulfato de amonio 10 %	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	10 μ l

II Preparación de la muestra

- 1) Tomar 40 μ L de muestra y diluir agregando 160 μ L de solución digestora
- 2) Se ponen en baño María a 98 ° C durante 4 minutos.

III Corrimiento electroforético.

- 1) Colocar un volumen de muestra diluida en los pozos formados en el gel, en el volumen agregado debe haber 20 mg de proteínas. Además de las muestras se puede correr en un pozo en un pozo una muestra de proteína estándar o marcador de peso molecular.



- 2) Agregar la Solución amortiguadora de Corrimiento
- 3) La corriente por la cual se corre la electroforesis es de 100 V a temperatura ambiente, hasta que el colorante que sirve como referencia (de la solución digestora) llegue al final del gel de corrimiento.

IV Tinción de las proteínas en el gel de poliacrilamida-SDS

- 1) Se separa el gel del vidrio y placa que sirvieron como molde para formarlo y se sumerge en solución teñidora 2Hrs con agitación.

V Tratamiento para desteñir el gel.

- 1) Después de que el colorante se fijó en las proteínas el gel se desteñe sumergiéndolo en una mezcla de metanol: ácido acético: agua destilada (solución desteñidora I y II).
- 2) Primero 2 Hrs. En la solución desteñidora I con agitación constante.
- 3) Después dejar toda la noche con la solución desteñidora II.
- 4) Se elimina la solución desteñidora II dejada toda la noche y se agrega nueva de esta solución para que el gel se mantenga viable.

VI. Colocación del gel en un soporte permanente.

- 1) Cortar dos fragmentos de papel celofán-azúcar del tamaño del gel.
- 2) Sacar el gel de la solución desteñidora II y se enjuaga con agua destilada.
- 3) Colocar el gel encima de uno de los papeles y agregar un poco de agua.
- 4) Colocar el otro papel encima del gel de manera de sandwich evitando que se formen burbujas entre los papeles.
- 5) Pegar en una superficie fija y dejar secar el agua por un día.



IV. DOT-ELISA (semicuantitativo)

Muestra

- 1) Hacer diluciones dobles sucesivas del antígeno estudiado según la concentración preestimada.

Papel

- 2) Cortar tiras de papel o membrana de nitrocelulosa y marcarlas.
- 3) Colocar 5 μ l de cada una de las diluciones del antígeno a lo largo de la tira de papel
- 4) Dejar secar. Se puede colocar en una incubadora a 37°C para acelerar el proceso.
- 5) Repetir el paso 3 y 4 cuidando de colocar cada antígeno donde le corresponde.
- 6) Cada una de las tiras se colocan en 1 ml de solución bloqueadora de leche descremada cada una por separado en tubos de ensaye con tapón y colocarlos en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 7) Desechar la solución bloqueadora.
- 8) Agregar 1 ml PBS pH = 7.2 tapar y agitar durante 3 minutos desechar la solución y volver agregar nueva solución repitiendo el proceso 3 veces en total.
- 9) Sumergir las tiras en el antisuero conjugado con peroxidasa específico para el antígeno e incubar durante 1 Hr. A 37°C.
- 10) Desechar la solución antisuero y lavar como lo indica el paso 8.
- 11) Colocar 1 ml de sustrato para la enzima y esperar a que se desarrolle el color.
- 12) Lavar con agua destilada y dejar secar al aire.



V. ELABORACIÓN DEL CONJUGADO

I. Preparación de la solución de Peroxidasa-aldehído.

- 1) Colocar 5 mg de peroxidasa en un matraz que contenga una barra magnética.
- 2) Agregar lentamente y con agitación lenta 1 ml de NaHCO₃ 0.3 M a la peroxidasa.
- 3) Colocar la mezcla de reacción a 4°C y agregar lentamente y con agitación lenta 0.1 ml de Fluorodinitrobenceno 1%. (si la peroxidasa presenta impurezas puede que se forme un precipitado que puede ser removido con centrifugación).
- 4) Agregar con agitación lenta 1.0 ml de Periodato de sodio 0.08 M y seguir agitando lentamente por 30 minutos a 4°C.
- 5) Agregar 1.0 ml de Etilen glicol 0.16 M y seguir agitando lentamente por 1 hora a 4°C.

II. Dializado de la solución de Peroxidasa-Aldehído.

- 1) Colocar la solución de Peroxidasa-aldehído en una bolsa de diálisis evitando la formación de burbujas.
- 2) Colocar la bolsa de diálisis que contiene la solución de Peroxidasa-aldehído en un contenedor que tenga una Solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M pH = 9.5. La relación de volúmenes de la Solución amortiguadora a la solución de Peroxidasa-aldehído debe ser de 50 a 1. Dializar a 4° C realizando 5 cambios de solución amortiguadora como mínimo. Al final del periodo de diálisis, el dializado debe estar libre de color (NOTA: El dializado es muy tóxico y debe ser manejado con precaución).



- 3) Remover la solución de Peroxidasa-aldehído dializada de la bolsa de diálisis y almacenar a 4°C en un tubo con tapa o en un frasco. Esta solución es estable por un mes.

III. Diálisis de muestra (anticuerpo o globulina)

- 1) Colocar un volumen que sea equivalente a 10 mg de globulina en un tubo de diálisis preparado y sellar de tal forma que no queden burbujas de aire.
- 2) Colocar el saco de diálisis en una solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M pH = 9.5. La cantidad de solución amortiguadora es de 50 a 1 con respecto al volumen de la globulina.
- 3) Dializar a 4°C durante 24 hrs. Con 5 cambios de solución amortiguadora

IV. Unión al anticuerpo

- 1) Colocar 3 ml de la solución de Peroxidasa-aldehído dializado (paso II) en un frasco que contenga una barra magnética.
- 2) Agregar gota a gota y con agitación lenta un volumen de la solución de globulina equivalente a 10 mg de proteína que fue dializada con solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M (paso III).
- 3) Mezclar lentamente con una barra magnética a 4°C durante 3 horas.
- 4) Filtrar el conjugado a través de una membrana tipo HA 0.45 μ m Swinex en un contenedor estéril a 4°C.



VI. LIOFILIZADO DE INMUNOGLOBULINA

- 1) Colocar 1 ml de la solución de globulina previamente titulada (ver Dot-ELISA) en vial estéril con tapón de hule para liofilizado.
- 2) Congelar la solución primero a -4°C y posteriormente a -72°C .
- 3) Limpiar la superficie del desecador de bandejas "liofilizador" con agua destilada y posteriormente con alcohol al 70 %.
- 4) Colocar las muestras congeladas y seleccionar los diferentes tiempos y temperaturas de ciclos de congelación (-5 a -10°C , 30-60 min.), secado (presión máxima reducida, -15 a -25°C , 22-23 hrs.) y post-secado (4 a -5°C , 2-3 hrs. Máxima presión reducida).
- 5) Sellar los viales a baja presión (sellado al vacío), liberar presión de la cámara y extraer los viales liofilizados.
- 6) Tomar una muestra para verificar el título del anticuerpo.

VII. SOLUCIONES

Solución saturada de Sulfato de amonio al 80 %

- a) Colocar aproximadamente 550 gr de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) grado reactivo (J. T. Baker ACS) en un matraz que contenga 1 Lt. de agua destilada.
- b) Agitar vigorosamente por algunas horas hasta que ya no se disuelva más (si se disuelve completamente agregar más reactivo).
- c) Colocar en un frasco (sin filtrar) y mantenerlo a 4°C durante algunos días agitando constantemente.
- d) Decantar y medir 160 ml de la solución saturada de sulfato de amonio y agregar 40 ml de agua destilada.
- e) Guardar en refrigeración.



PBS (Phosphate Buffered Saline) pH = 7.2

- a) Preparar la solución A.
Disolver 1.4 gr de Na_2HPO_4 (Golden Bell) en un matraz aforado de 100 ml y llevar a 100 ml.
- b) Preparar la solución B.
Disolver 0.7 gr de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Técnica Química) en un matraz aforado de 50 ml y llevar a 50 ml.
- c) Colocar 8.5 gr. de NaCl (Productos Químicos Monterrey) en un matraz aforado de 1 Lt. Agregar 84.1 ml de la solución A y 15.9 ml de la solución B y disolver el NaCl.
- d) Confirmar el pH con un pH-metro y ajustar a $\text{pH}=7.2$ utilizando las soluciones A y B.
- e) Aforar la solución a 1Lt y refrigerar.

Solución saturada de Sulfato de amonio al 70 %

- a) Colocar aproximadamente 550 gr de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ grado reactivo (J. T. Baker ACS) en un matraz que contenga 1 Lt. de agua destilada.
- b) Agitar vigorosamente por algunas horas hasta que ya no se disuelva más (si se disuelve completamente agregar más reactivo).
- c) Colocar en un frasco (sin filtrar) y mantenerlo a 4°C durante algunos días agitando constantemente.
- d) Decantar y medir 140 ml de la solución saturada de sulfato de amonio y agregar 60 ml de agua destilada.
- e) Guardar en refrigeración.

Tubo de diálisis preparado.

- a) Cortar una tira de bolsa de diálisis (Spectra/Por, Spectrum) correspondiente a la cantidad de muestra.
- b) Colocar la bolsa en agua desionizada durante 30 minutos.
- c) Colocar la bolsa en una solución a 60°C de EDTA 1 mM- NaHCO₃ 2%:
EDTA.....75 mg
Bicarbonato de sodio (NaHCO₃).....4 g
Agua destilada.....200 ml
- d) Agitar constantemente en la solución durante 30 minutos
- e) Sacar y enjuagar con agua desionizada.

SSF (Solución Salina Fisiológica)

- a) Colocar 8.5 gr de cloruro de sodio (NaCl) en un matraz aforado de 1000 ml.
- b) Llevar hasta el aforo con agua destilada.

Tris-HCl, pH 8.8

- a) Disolver 18.75 g de Tris base (ICN Biomedics, Inc.) en 80 ml de agua desionizada.
- b) Ajustar a pH = 8.8 con HCl 1N
- c) Llevar a 150 ml con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C.

Tris-HCl, pH 6.8

- d) Disolver 6.0 g de Tris base en 60 ml de agua desionizada.
- e) Ajustar a pH = 6.8 con HCl 1N
- f) Llevar a 100 ml con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C.

SDS (Dodecil sulfato de sodio) 10%

Disolver 1 gr de Dodecil sulfato de sodio en 10 ml de agua desionizada.
Calentar un poco si no se disuelve.

BIS/ Acrilamida 30 % (solución stock).

- a) Agregar 29.2 Acrilamida (SIGMA) y 0.8 gr de Bis-Acrilamida -N-N'-metil-bis-acrilamida- (SIGMA) a 100 ml de agua desionizada
- b) Disolver, filtrar y almacenar a 4°C protegiendo de la oscuridad (30 días máximo)

Persulfato de amonio 10 %

Disolver 0.1 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (SIGMA) en 1 ml de agua desionizada.

TEMED

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamino (FISHER SCIENTIFIC COMPANY)



Azul de Comassie G-250

- a. Disolver 100 mg de Azul Brillante de Comassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%.
- b. Agregar 100 ml de ácido fosfórico 85% (P/V)
- c. Agregar cantidad suficiente de agua destilada para obtener 1 Lt de solución.

Solución digestora

Mezclar los siguientes reactivos:

- Tris 0.5 M pH8.6.....1.0 ml
 - Glicerol (Golden Bell).....0.8 ml
 - SDS al 10% (ver en esta sección).....1.6 ml
 - Azul de bromofenol.....0.2 ml
 - Agua desionizada..... 4.4 ml
- Almacenar a Temp. ambiente y proteger de la luz.

Solución amortiguadora de Corrimiento

Mezclar los siguientes reactivos en 300 ml de agua desionizada:

- Tris base.....4.5 gr
- Glicina (ICN Biomedicals, Inc.).....21.6 gr
- SDS.....1.5 gr

Almacenar a 4°C. Si ocurre precipitación, disolver calentando a 37°C. Antes de usarse en la electroforesis debe diluirse 1:5.



Solución teñidora.

Disolver 10 mg de Azul de Comassie en 4 ml de Metanol absoluto (BAKER ANALYZED). Agregar 1 ml de ácido acético glacial (BAKER ANALYZED) y 5 ml de agua destilada. Proteger de la luz y almacenar a Temp. ambiente.

Solución desteñidora I

Mezclar 50 ml de Metanol Absoluto con 10 ml de Ácido acético glacial y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Solución desteñidora II

Mezclar 5 ml de Metanol Absoluto con 7 ml de Ácido acético glacial y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Solución bloqueadora de leche descremada

Disolver 5.0 gr. de Leche descremada en polvo (DIFCO) en 100 ml de PBS (Ver en esta sección). Preparar al momento.

Sustrato para la enzima

a) Preparar la solución A

Disolver 30 mg de 1-4-Cloronaftol (SIGMA) en 10 ml de metanol



b) Preparar la solución B

Mezclar 0.025 ml de H_2O_2 (Productos Químicos Monterrey) con 25 ml de PBS (ver en esta sección).

c) Mezclar 10 ml de la solución A con 25 ml de la solución B todo en frío y usar al momento.

NaHCO₃ 0.3 M

Colocar 1.26 gr de Bicarbonato de sodio en una matraz aforado y llevar a 50 ml con agua destilada.

Fluorodinitrobenceno 1% (C₆H₃FN₂O₄)

Mezclar 0.5 ml de 2-4-Dinitrofluorobenceno (SIGMA) con 49.5 ml de etanol absoluto.

Periodato de sodio 0.08 M

Disolver 0.856 gr de Na(IO)₄(SIGMA) con agua destilada y aforar a 50 ml. Si el periodato no se disuelve calentar a 37°C y agitar suavemente.

Etilen glicol 0.16 M

Mezclar 0.45 ml de HOCH₂CH₂OH (SIGMA) con 49.55 ml de agua destilada.



Solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M pH = 9.5.

- a) Preparar la solución A
Disolver 10.6 gr de Na_2CO_3 en agua destilada y aforar a 1 litro.
- b) Preparar la solución B
Disolver 8.4 gr de NaHCO_3 en agua destilada y aforar a 1 litro.
- c) Mezclar 9 partes de A con 28 partes de B
- d) Diluir 1:10 con agua destilada.