

**UNIVERSIDAD MOTOLINIA**

**INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**Escuela de Química**



**Separación de las Inmunoglobulinas del Suero  
por Cromatografía en Columna.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de :  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**p r e s e n t a :**  
**MARIA ELENA SALAS LOPEZ**

---

México, D. F.

1969



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**A mis padres con inmenso amor y gratitud.**

**A mi hermano con mucho cariño.**

**A mis abuelitos con afecto y cariño.**

**A mis queridos tíos y tías.**

**A mis compañeras.**

**A los Sritos:**

**Ma. de Jesús Sotelo N.**

**Ma. Teresa González E.**

**Ma. Guadalupe Camarena T.  
con profunda estimación.**

A mis maestros con respeto y gratitud.

A la Srta. Q. F. B. Evangelina Lee B. y a la  
Srta. Q. F. B. Ma. de la Luz Mañón A.  
por su valiosa ayuda en la dirección de  
este trabajo.

**Agradezco sinceramente a los Sros. Dnos.:**

Luis M6ndez, Subdirector General M6dico del I.M.S.S.; Jos6 Torres Gallardo, Jefe de Enseñanza del I.M.S.S.; Luis Landa V., Jefe del Servicio de Gastroenterologfa del Hospital General del C.M.N. del I.M.S.S.; Roberto Kretschmer, Jefe de la Secci6n de Inmunologfa del C.M.N. del I.M.S.S.; a la Srta. Q.F.B. Martha L6pez y a todo el personal del Laboratorio del Servicio de Gastroenterologfa del Hospital General del C.M.N. del I.M.S.S. por su valiosa colaboraci6n en la realizaci6n de este trabajo.



Capítulo 1 ... Introducción.

Capítulo 2 ... Material y métodos.

Capítulo 3 ... Resultados.

Capítulo 4 ... Discusión.

Capítulo 5 ... Resumen.

Capítulo 6 ... Bibliografía.

## INTRODUCCION .

La localización de los anticuerpos en el suero humano ha sido difícil por carecer de las técnicas apropiadas, ya que no eran suficientemente sensibles para poder determinarlos; pero últimamente con el desarrollo de técnicas inmunoquímicas más específicas se puede hacer el estudio de los anticuerpos circulantes a pesar de que se encuentran en muy pequeña cantidad.

La capacidad de anticuerpo es característica de moléculas como las inmunoglobinas,  $\gamma$ -globulinas (1); el término "inmunoglobulinas" y el símbolo "Ig" se han sugerido para designar a las moléculas con esta propiedad; en el suero normal se han separado las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgD aún cuando también se incluyen las proteínas del mieloma, la proteína de Bence-Jones y los componentes urinares normales que no tienen capacidad de anticuerpo.

La nomenclatura de las inmunoglobulinas fue establecida por el Comité de la Organización Mundial de la Salud (2). Comúnmente se identifican tres clases de inmunoglobulinas humanas: IgG( $\gamma$ G), - -

IgA( $\gamma$ A) e IgM( $\gamma$ M) pero recientemente se descubrió una cuarta clase IgA( $\gamma$ D) la que se identificó y designó de acuerdo con el sistema de nomenclatura utilizado para las anteriores; estas cuatro clases pueden diferenciarse entre sí por medio del análisis inmunoelectroforético.

La IgG constituye la mayor parte de las inmunoglobulinas del suero normal humano (cerca del 75%) y muchos de los anticuerpos son moléculas de esta inmunoglobulina. Las moléculas de IgG pasan a través de la placenta para proveer al recién nacido de los anticuerpos de la madre durante los primeros meses mientras elabora los propios. Dentro del sistema de IgG se han identificado recientemente cuatro subclases  $\gamma_{1c}$ ,  $\gamma_{1m}$ ,  $\gamma_{2c}$  y  $\gamma_{2m}$  (3-9).

La IgA constituye cerca del 21% del total de las inmunoglobulinas del suero normal humano. En la IgA se han detectado anticuerpos contra la insulina en la diabetes mellitus (10), contra la tiroglobulina en la tiroiditis crónica (11) y contra otros antígenos aún cuando contra los dos últimos mencionados también se encontraron en la IgG y frecuentemente en la IgM.

La IgM comprende el 7% aproximadamente del total de las inmunoglobulinas del suero normal humano. Generalmente los anticuerpos detectados después de la administración de antígeno son moléculas de esta inmunoglobulina.

La IgD fué descubierta recientemente (2, 4-5, 12-13), sus niveles en suero varían ampliamente pero su promedio es de aproximada

mente 0.2% del total de las inmunoglobulinas del suero normal humano.

Las moléculas de inmunoglobulina están constituidas por una proteína y por un carbohidrato; la posición exacta y la función del polisacárido aún no han sido determinadas.

Edelman (14-15), Porter (16-18) y sus colaboradores identificaron dos tipos de cadenas de polipéptidos: la cadena ligera (peso molecular cercano a 22 000 y la cadena pesada (peso molecular cercano a 55 000); de estos dos tipos de cadenas se han encontrado cuatro en cada molécula de inmunoglobulina, dos ligeras y dos pesadas (16) - las cuales están unidas por ligaduras disulfuro y por ligaduras no covalentes. Hasta la fecha no se ha podido determinar la posición exacta de la cadena de polipéptidos de una molécula en relación a la otra molécula de inmunoglobulina.

La secuencia variable V determina la especificidad del anticuerpo; y la secuencia constante C determina la característica de especie, la clase de inmunoglobulina así como el polimorfismo dentro de las clases (19-21). La observación de que las cadenas ligeras y las pesadas tienen una secuencia variable proporciona una gran ayuda en vista de que ambas contribuyen a la especificidad (15) aunque podrían esperarse situaciones en las que ya sea las cadenas ligeras (22-23), las pesadas (24) ó ambas (25) mostraran actividad dependiendo del antígeno. Figura 1.

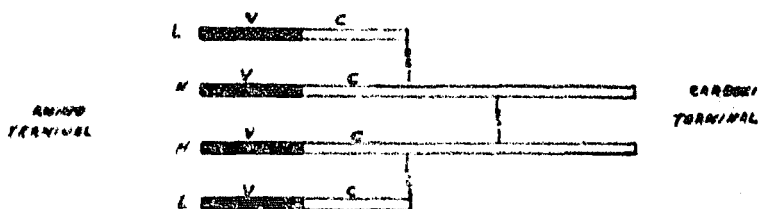


Figura 1. - Representación esquemática de una molécula de inmunoglobulina. Las porciones variables y constante son señaladas V y C respectivamente. Aún no se sabe en donde la porción V es de la misma longitud en las cadenas H y L.

La cadena pesada parece tener dos componentes funcionales pero solo una parte se necesita para la capacidad de anticuerpo, la otra parte es responsable de muchas características y funciones de la molécula de inmunoglobulina. En esta cadena se han identificado cuatro formas principales:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\delta$  las cuales difieren en propiedades inmunológicas y en la composición de los péptidos esto lo demostraron por medio de reacciones serológicas (26); la estructura de la cadena pesada determina que la molécula sea IgG, IgA, IgM ó IgD.

Las diferencias antigénicas en la cadena pesada de la globulina IgG humana se han detectado por medio de antisuero de mono contra globulina IgG humana (4) y antisuero de conejo contra proteínas del mieloma (5) y han demostrado que la fracción de IgG humana contiene moléculas con cuatro tipos diferentes de cadena pesada.

Dentro de la cadena ligera se pueden reconocer dos formas antigénicas (27-29) que se designan  $\kappa$  y  $\lambda$  las cuales recientemente se ha demostrado que tienen estructuras primarias distintas y se identifican por sus propiedades inmunológicas diferentes y por la composición del péptido, esta clase de cadenas se localiza en la mayor parte de las inmunoglobulinas. La presencia de la forma antigénica  $\kappa$  en la cadena ligera le confiere propiedades del tipo K así como la presencia de la forma antigénica  $\lambda$  le confiere propiedades del tipo L. La capacidad de anticuerpo se ha encontrado en los dos tipos K y L de las clases IgG, IgA e IgM (30-31).

La IgG puede ser purificada (32) del suero humano y de otras especies por cromatografía en columna con DEAE celulosa; pero en algunas especies no es fácil obtenerla por este método (33). En la técnica cromatográfica descrita por Levy y Sober (34) usaron solución amortiguadora de bajo pH y DEAE celulosa de absorbencia excelente para la obtención de IgG humana.

La IgM se puede purificar por una combinación de la electroforesis de zona (seleccionando las fracciones de migración lenta para reducir la contaminación de otras globulinas) y filtración en gel de Sephadex G-200.

La IgA puede purificarse parcialmente combinando la electroforesis de zona con la cromatografía en Sephadex G-200 colectando las fracciones eluidas después de haber recogido la IgM y antes de recoger la IgG.

La IgD (35) ha sido purificada de sueros con D-mieloma ó sueros con abundancia en esta globulina y poca IgG ó IgA obtenidos de pacientes con deficiencias de inmunoglobulina selectiva.

Los procedimientos cromatográficos (36) se han aplicado en la separación de la  $\gamma$ -globulina del suero, para la separación de otras proteínas del suero y para la preparación de inmunoglobulinas.

Los primeros materiales de intercambio iónico utilizados fueron los silicatos (37), actualmente se emplean resinas de intercambio iónico que están formadas por polímeros con grupos químicos que al ionizarse permiten el intercambio por otros iones de la solución.

El intercambio iónico es por lo tanto un intercambio reversible de los iones de una solución por los iones lábiles de una substancia insoluble polimérica con la cual está en contacto sin que se encuentren otras cargas (38). Hasta la mitad del siglo XIX se reconoció este proceso en las resinas. Los estudios posteriores fueron encaminados a usar intercambiadores de cationes para la purificación y reblandecimiento del agua.

Se distinguen dos tipos de intercambiadores de iones: los catiónicos que tienen grupos ácidos los cuales resultan mas activos mientras mas fácilmente pierden el  $H^+$  el cual se cambia con otro catión, y los aniónicos que tienen grupos amonio cuaternarios ó grupos amino terciarios que actúan cambiando los aniones.

Las proteínas y los aminoácidos frecuentemente pueden purificar

se por cromatografía en columna con resinas de intercambio iónico. Las resinas hidrofílicas son las más satisfactorias para este propósito (19).

Entre los materiales más usados para la purificación de las proteínas se encuentran la DEAE celulosa que es una resina de intercambio aniónico y la CM celulosa que es una resina de intercambio catiónico.

La celulosa ya sea en polvo (40) ó en papel (41), se ha tratado con ácido cloroacético para dar cambiadores de cationes (carboximetil celulosa) ó con clorotrietilamina para dar cambiadores de aniones (dietilaminoetil celulosa (40)).

Estos materiales han sido probados especialmente en el fraccionamiento de proteínas y para la separación de  $\gamma$ -globulinas.

La dietilaminoetil celulosa (DEAE celulosa) es un derivado de la celulosa (40, 42-43) y se puede considerar como un producto de sustitución de la aminoetil celulosa; su grupo funcional es - - - - -  
 $-O-CH_2-CH_2-N(C_2H_5)_2$ . Como puede observarse la diferencia principal está en que es una amina terciaria y es fuertemente básica.

Empleadas apropiadamente estas columnas tienen un gran poder cambiador de iones y muchas sustancias pueden purificarse por este medio obteniendo resultados favorables.

La mayor parte de las inmunoglobulinas fueron descubiertas en un período de 30 años y con el desarrollo de varios sistemas de separación se les ha encontrado diversas aplicaciones.



Típicamente los protozoarios tienen mas variedad de características morfológicas para la diferenciación de especies que las bacterias ó los virus, no obstante, parásitos morfológicamente idénticos - causan efectos clínicos completamente diferentes. Varían también con el grado y el carácter de multiplicación en el huésped. Las infecciones individuales ó de importancia epidemiológica son frecuentemente difícil ó imposible de reconocerlas por el método usual de microscopía e inoculación en animales ó en cultivos; en esta situación - las posibles vías inmunológicas pueden dar lugar a la identificación - de formas patógenas y ayudar al diagnóstico de la infección, además tiene interés la posibilidad de una inmunización artificial contra las infecciones por protozoarios.

Principalmente la demostración de los anticuerpos contra los - protozoarios se ha hecho "in vitro" y también en forma indirecta. - Dentro del primer grupo encontramos las pruebas de modificación - morfológica, inmovilización, aglutinación y lisis; dentro del segundo grupo se incluyen pruebas como neutralización de la infección, - inhibición del metabolismo, aglutinación pasiva, fijación de complemento, precipitación e inmunoelectroforesis y cuantificación de inmunoglobulinas.

En la Leishmania el antisuero específico cambia la morfología de los organismos afectando el crecimiento flagelar, la movilidad y la división celular.

En el *Trypanosoma* el antisuero específico causa aglutinación, - cambio de formación e inmovilización en muchos, aunque no en todos los organismos.

Strannegård (44) usó la alteración del *Toxoplasma gondii* en - cultivos para estudiar el efecto de los anticuerpos específicos.

Lourie y O'Connor (45) revisaron la lisis de tripanosomas por - suero inmune y estudiaron esto en relación a *Trypanosoma brucei*, - encontrando que la lisis tiene lugar en ausencia de complemento; pe - ro para la lisis rápida es necesaria la presencia del complemento.

Teras (46) demostró anticuerpos en el suero humano infectado - por *Trichomonas vaginalis* preparando el antígeno por inoculación in - tra peritoneal de cultivos en ratones. Lumsden y colaboradores (47) desarrollaron el método para la titulación de la infección, con culti - vos frescos y material estable de *Trichomonas vaginalis* que tiene - aplicación en el procedimiento de neutralización.

Sabin y Ruchman (48) y Sabin (49) desarrollaron la neutraliza - ción de *Toxoplasma gondii* por suero inmune, observando la reacción producida en la piel de un conejo después de la inoculación intracu - tánea.

Gray (50) demostró la precipitación de anticuerpos de tripano - somas probando antígenos preparados en el laboratorio, contra el suero de animales naturalmente infectados. Weitz (51-52) usó la doble difusión en agar gel y la electroforesis en gel de almidón para

demostrar los anticuerpos de *Trypanosoma brucei*.

Goldman (53) lavó y leofilizó un cultivo de *Entamoeba histolytica*, extrayendo el producto con solución salina y obtuvo una precipitación al ponerlo contra suero preparado en conejos. Maddison (54) usó un reactivo preparado por ruptura ultrasónica, de un cultivo de *Entamoeba histolytica* contra suero de pacientes con amibiasis, se demostraron anticuerpos específicos de *Entamoeba histolytica* pero hay líneas de precipitación que se atribuyen a otros antígenos.

Boyd y colaboradores (55) hicieron varios intentos para desarrollar técnicas de precipitación para el *Plasmodium* pero no lo consideraron prometedor. Sin embargo, Zuckerman y colaboradores (56) demostraron anticuerpos de *Plasmodium* en el suero de ratas.

Noguchi (57) demostró la fijación de complemento en cultivos de *Leishmania* con antisuero homólogo preparado en conejos. No se han encontrado anticuerpos en *Leishmania tropica* ni en *Leishmania brasiliensis*, aunque sí fueron encontrados en *Leishmania donovani*, aún cuando no hay una relación constante entre el título de fijación de complemento y el contenido de  $\gamma$ -globulina del suero (58-59).

Coggeshal y Eaton (60) desarrollaron reacciones de fijación de complemento con *Plasmodium knowlesi* y exploraron la aplicación de la prueba con este organismo para el diagnóstico de *Plasmodium* en el hombre. Kligler y Yoeli (61) encontraron que el suero de pacientes con malaria fijaba el complemento con antígeno de *Plasmodium* -

Knowles y también con antígeno de *Plasmodium gallinaceum*

Como puede observarse con muchos los investigadores que han estudiado la posibilidad de usar reacciones antígeno-anticuerpo, como una vía para el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias, virus ó parásitos y gran variedad de pruebas relativamente específicas han llamado la atención para el diagnóstico de la infección por protozoarios. Estas pruebas parecen depender en parte del incremento de inmunoglobulinas en el suero de los huéspedes infectados, pero la localización y caracterización de estos anticuerpos ha sido difícil; el objeto del presente trabajo es el de seleccionar las técnicas que den una buena correlación y alto rendimiento para la localización de estas proteínas.

## MATERIALES Y METODOS. -

Los sueros utilizados para la separación de las inmunoglobulinas fueron obtenidos de la manera habitual de pacientes con absceso hepático amibiano, que fueron comprobados por pruebas de laboratorio y de gabinete (62). El diagnóstico para dos de los pacientes, - fué de absceso hepático amibiano, uno de ellos en el lóbulo derecho y el segundo presentaba dos abscesos en el lóbulo derecho y uno en el izquierdo, en el tercer enfermo existía además de absceso hepático amibiano, una rectocolitis amibiana.

La separación de las fracciones de inmunoglobulinas, se llevó a cabo mediante la utilización de la técnica de cromatografía en columna modificada de la original de Fahey (63).

a. - Preparación de la solución amortiguadora. -

Se prepara una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.4 M y una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 M. De la primera solución o solución A se toman 12 ml. y se colocan en un matraz aforado de 2 000 ml., de la segunda solución ó solución B se toman 5ml. y también se colocan en el

matraz, se alora con agua destilada y se mezcla. Después de mezclado se mide el pH de la solución que debe tener un valor de 6.3; en caso de no tener este pH se ajusta con la solución A ó con la B según sea necesario.

b. - Preparación del suero. -

El suero se pone en una membrana de colodiñ y se dializa durante 48 horas, las primeras 24 horas en agua destilada y las 24 horas restantes en solución amortiguadora a pH de 6.3; posteriormente el suero se saca de la membrana de colodiñ y se centrifuga en una centrifuga preparadora marca Sorvall Superspeed RC2-B Automatic - - Refrigerated Centrifuge durante 30 minutos a 10 000 r.p.m.

Preparación de la columna. -

Se pesan aproximadamente 100 gramos de DEAE celulosa y se coloca en un recipiente, se le agregan 2 000 ml. de cloruro de sodio 0.5 M, se mezcla bien con el agitador y se agregan 2 000 ml. de hidróxido de sodio 0.5 M; se mezcla y se filtra por vacío. El precipitado se vuelve a pasar al recipiente y se lava con agua destilada, se agita y se filtra por vacío, se sigue lavando hasta tener un pH de 7. Una vez alcanzado este pH se sigue lavando pero ahora con solución amortiguadora hasta alcanzar el pH de la solución buffer ó sea 6.3. Después de lo cual la DEAE celulosa se guarda en el refrigerador - en un frasco ambar con solución amortiguadora hasta el momento de usarla.

La columna de vidrio se empieza a lavar con solución amortiguadora para evitar que el filtro se tape. Una vez lavada la columna, en la parte superior se coloca un tapón con una horadación en la cual se introduce un embudo y en el interior del embudo se coloca el agitador, en la parte inferior se pone un tubo de hule con una pinza para graduar la salida del líquido y un vaso para recogerlo.

En el embudo se coloca la solución de DEAE celulosa, se conecta el agitador y se abre la pinza graduando el goteo para que la columna se vaya empacando lenta y homogéneamente, también se debe tener cuidado que no se seque la DEAE celulosa que está en el embudo, pues empacaría en forma dispareja.

Ya empacada la columna se reduce al máximo la cantidad de solución amortiguadora y se procede a poner el suero en la parte superior de la columna, procurando no rebotar la DEAE celulosa, se vuelve a agregar solución amortiguadora y se empiezan a recoger las fracciones de 100 ml. en 100 ml. Para determinar en cual de las fracciones se encontraban las inmunoglobulinas, se leyeron las fracciones en el espectrofotómetro PMQ II de la casa Zeiss a la longitud de onda de 280 milimicras.

Las fracciones que contienen la  $\gamma$ -globulina se pusieron a dializar en un tubo de colodión en agua destilada durante 48 horas haciendo varios cambios de agua para eliminar las sales, una vez dializadas las fracciones se leofilizaron y el contenido se diluyó 1:5 en solución

salina.

Para obtener las fracciones de IgA e IgM se pasó a través de la columna solución amortiguadora a la cual se le agregaron 9 gramos de cloruro de sodio por litro y se recogieron las fracciones de 200 ml. en 200 ml.; se leyeron en el espectrofotómetro para saber en cuales se encontraba la proteína.

Una vez obtenida la gamma globulina se comprobó su pureza por medio de inmunoelectroforesis, la cual se llevó a cabo con el equipo LKB 6800-A para microelectroforesis en portaobjetos de la casa LKB de Estocolmo, Suecia.

Para la inmunoelectroforesis se usó una mesa niveladora en la que se ponen las placas colocadas sobre charolas de plástico. En las placas se distribuyó gel de agar al 1% en solución amortiguadora de Aronson cuya fórmula es la siguiente:

Trishidroximetiliminometano (TRIS)	60.5 g/l.
Acido etilendiaminotetracético (EDTA)	6.0 g/l.
Acido bórico Q. P.	4.6 g/l.

pH 8.9.

Cada placa tiene dos horadaciones a ambos lados de un canal central y horizontal que se hicieron con el cortador del mismo equipo.

En las horadaciones se colocó la muestra y se pasó la corriente eléctrica para que pasara a través del gel; 10 mA por charola -



aproximadamente y se dejaron las charolas durante 4 horas, después de las cuales, se sacó el canal central en donde se pone el antisuero dejándolo difundir en cámara húmeda a temperatura ambiente por 24 a 48 horas.

Para teñir las preparaciones y poder observar mejor las líneas de precipitación antígeno-anticuerpo, se lavaron las charolas con solución salina y posteriormente con agua dejándolas durante 24 horas en cada solución, se les pone un papel filtro para secarlas y se deja hasta el día siguiente, cuando ya están secas se sumergen en una solución de amido negro al 1% en ácido acético al 7% durante 30 minutos, después de los cuales se lavan perfectamente y se secan.

#### Técnica de Biuret para proteínas. -

Se utilizó la técnica de Gornall y Bardwill (64) adaptada a micrométodo en el Laboratorio del Servicio de Gastroenterología.

Los reactivos que se emplean, son el reactivo de Biuret e hidróxido de sodio al 10%.

En un tubo de ensayo para micrométodo se coloca:

Reactivo de Biuret . . . . .	200 $\mu$ l.
Agua bidestilada . . . . .	30 $\mu$ l.
Muestra . . . . .	20 $\mu$ l.

Se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lee a 540 m $\mu$ .

**Blanco de reactivos. -**

Reactivo de Biuret . . . . .	200 $\mu$ l.
Agua bidestilada . . . . .	50 $\mu$ l.

Se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lee a 540 m $\mu$ .

**Testigo. -**

Hidróxido de sodio . . . . .	200 $\mu$ l.
Agua bidestilada . . . . .	30 $\mu$ l.
Muestra . . . . .	20 $\mu$ l.

Se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lee a 540 m $\mu$ .

**Cuantificación de inmunoglobulinas. -**

Esta determinación se llevó a cabo con el equipo para cuantificación de inmunoglobulinas de la casa Hyland.

El antígeno es colocado en una horadación de la placa de agar-gel que contiene anticuerpo difundido en el agar para formar un anillo de precipitación. El diámetro de este anillo está relacionado con la concentración del antígeno testigo. Cada placa de inmunodifusión tiene seis horadaciones, tres de las cuales se usan para preparar una curva standard con los sueros de referencia proporcionados junto con el equipo, y al mismo tiempo se puede hacer la prueba de tres sueros no conocidos.

Para realizar la prueba se abre la placa de inmunodifusión y se

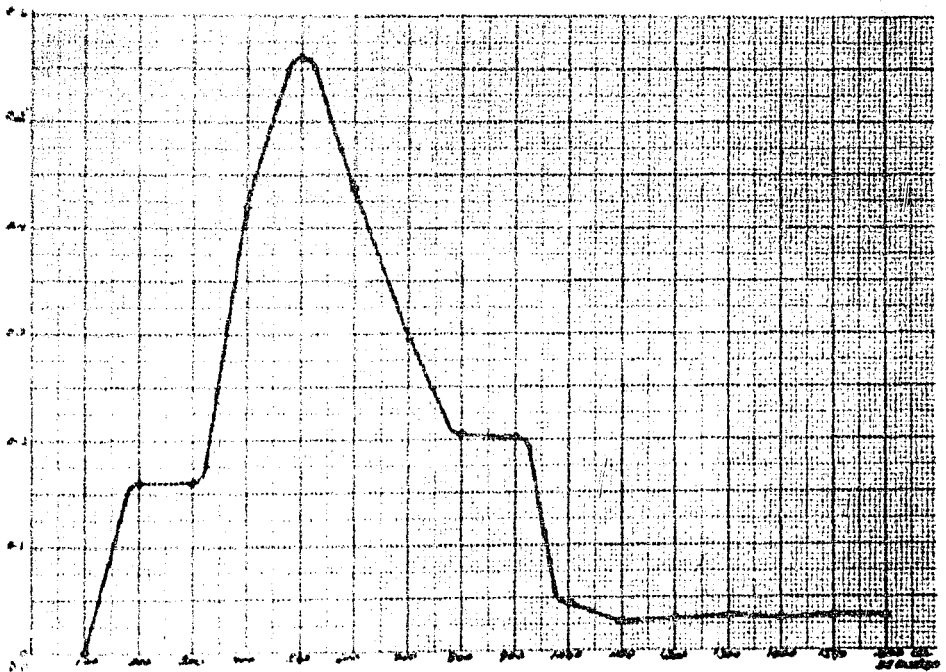
le quita la membrana de protección, se colocan en las horadaciones - las tres diluciones de los sueros de referencia y en las tres horada- ciones restantes los sueros que se van a probar teniendo cuidado que no salgan los sueros de la horadación. Se cubre la placa y se incu- ba 16 horas a la temperatura ambiente (20 a 25°C) en cámara húme- da para la cuantificación de IgA y de IgM. Para la cuantificación - de la IgG se incubaba a 40°C durante 4 horas en cámara húmeda. Des- pués de incubadas las placas, se mide el diámetro de cada uno de los anillos de precipitación usando el visor de la casa Hyland, colocando un lado del anillo en la marca cero. Se hace la curva standard con los tres sueros de referencia para después interpolar los sueros pro- blema (65).

Con el objeto de determinar en que fracción se encontraba la ca- pacidad de anticuerpo contra la Entamoeba histolytica, se hicieron - pruebas de inmunodifusión. Las tres fracciones aisladas se coloca- ron en cada una de las horadaciones de las inmunoplaacas, en la ho- radación central se colocó el antígeno de trofozoitos cultivados en - medio axénico.

Se utilizaron dos sueros controles, el del paciente antes de so- meterlo a cromatografía y el suero de una persona sin evidencia de haber sufrido amibiasis invasora, ó sea cuando la amiba invade los tejidos, ésto se hizo con cada uno de los sueros patológicos

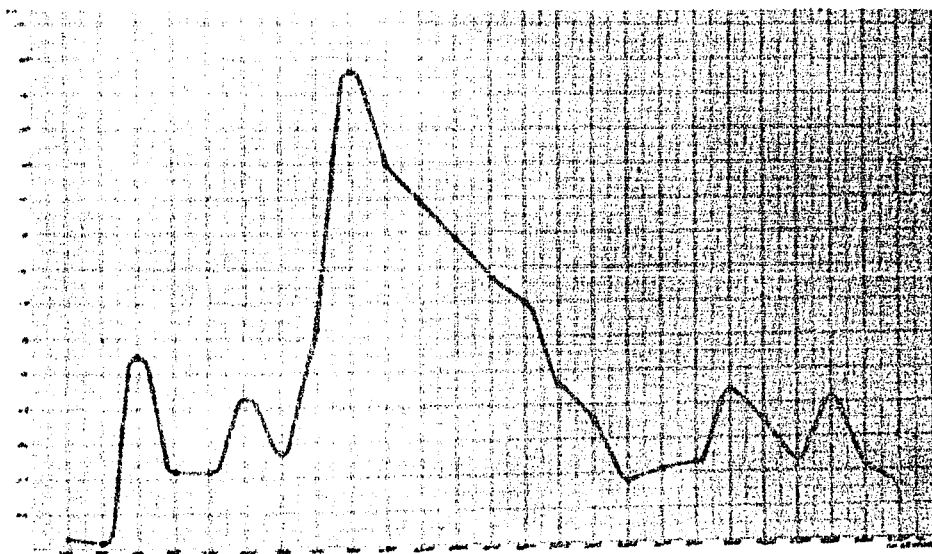
## RESULTADOS.

Las fracciones obtenidas de la columna de cromatografía se midieron en el espectrofotómetro para determinar en que fracción se encontraban las inmunoglobulinas. Los datos se presentan en la siguiente gráfica.



Se observó un solo pico, que hizo suponer correspondiera a la - IgG lo que se comprobó posteriormente.

Para obtener las otras inmunoglobulinas, se pasó a través de la columna cromatográfica solución amortiguadora con cloruro de sodio leyendo también en el espectrofotómetro y las lecturas dieron la siguiente gráfica.



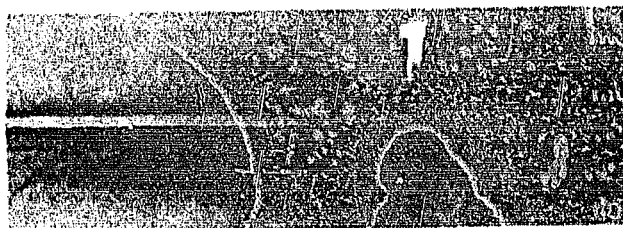
Las muestras obtenidas de la columna cromatográfica se liofilizaron y se hizo una dilución 1:5. A estas muestras se les determinó la cantidad de proteínas totales por la técnica de Biuret obteniéndose los siguientes resultados:

#### DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

Suero	Eluados obtenidos en la primera fracción	Eluados obtenidos en la segunda fracción y tercera fracción.
1	34.0 mg./ml.	28.25 mg./ml. -
2	25.5 mg./ml.	8.25 mg./ml. 34.0mg/ml
3	20.5 mg./ml.	21.75 mg./ml. -

Para comprobar si la primera fracción correspondía a la IgG se hicieron los siguientes estudios inmunolectroforéticos:

En la parte superior se colocó la fracción obtenida y en la parte inferior el suero completo del paciente, desarrollándose la reacción antígeno-anticuerpo con antisuero normal humano; en la parte superior se observa la presencia de una sola banda de precipitación con una movilidad correspondiente a la de la IgG.



En la siguiente prueba las muestras se colocaron en la misma forma que en la anterior y la reacción antígeno-anticuerpo se desarrolló con antisuero antiimmunoglobulina A, obteniéndose la reacción de precipitación únicamente en el suero completo del paciente y no en la fracción obtenida de la columna cromatográfica.



Del mismo modo se realizó una prueba con antisuero antiimmunoglobulina M obteniéndose idénticos resultados.



Además cuando la fracción se puso en presencia de anticuerpo an timunoglobulina G dió reacción antígeno-anticuerpo tanto en el su ero completo del paciente como en la fracción separada de la columna cr omatográfica.



En la segunda y tercera fracciones, se realizaron las mismas - pruebas y se observó que tenían una pequeña cantidad de la primera - fracción y además se encontraron todas las proteínas del suero com plete. Se obtuvieron los mismos resultados en los tres su eros sepa rados.

Se graficaron los diámetros de los anillos de precipitación de - los sueros testigo, obteniendo una curva standard en la que se inter polaron los diámetros de los anillos de precipitación de los proble mas, obteniéndose los miligramos de cada una de las proteínas.



DETERMINACION DE IgG.

	Suero	Primera fracción	Segunda Fracción	Tercera fracción
1	-	-	-	-
2	870 mg/ml	1185 mg/ml	592 mg/ml	631 mg/ml.
3	710 mg/ml	1160 mg/ml	863 mg/ml	-

DETERMINACION DE IgA.

	Suero	Primera fracción	Segunda fracción	Tercera fracción
1	-	-	-	-
2	457.7 mg/ml	-	137.5 mg/ml	-
3	457.0 mg/ml	-	495.0 mg/ml	-

DETERMINACION DE IgM

	Suero	Primera fracción	Segunda fracción	Tercera fracción
1	-	-	-	-
2	46 mg/ml	-	-	16.5 mg/ml
3	121 mg/ml	-	109 mg/ml	-

Se determinó el por ciento de recuperación de cada una de las fracciones con relación a la cantidad de miligramos en el suero completo.

POR CIENTO DE RECUPERACION

Primera fracción	Segunda fracción	Tercera fracción
POR CIENTO DE RECUPERACION DE IgG		
40.0%	18.95%	14.5%
POR CIENTO DE RECUPERACION DE IgA		
--	13.8%	--
POR CIENTO DE RECUPERACION DE IgM		
--	18.0%	0.2%

Quando las fracciones se pusieron en presencia del antígeno axéni-  
co, se observaron arcos de precipitación correspondientes a la reac-  
ción antígeno anticuerpo en la primera fracción, ó sea la que corres-  
ponde a la inmunoglobulina G además los sueros completos de los -  
pacientes también dieron los mismos resultados.

Los sueros provenientes de personas sin amibiasis invasora y  
las fracciones 2 y 3 de la columna de cromatografía no mostraron -  
la presencia de arcos de precipitación.

## DISCUSION .

En la selección de un método de laboratorio el factor decisivo es el propósito para lo que va a ser utilizado

En este caso, dicho propósito fué obtener un método fácil y rápido para el estudio de las proteínas del suero que diera como resultado la obtención de la fracción de IgG humana completamente pura, ya que en esta fracción se sospechaba la presencia de los anticuerpos por estudiar.

Con el método de Fahey modificado ésto se realizó satisfactoriamente, aunque en detrimento del rendimiento que ha sido bajo, ya que se obtuvo una recuperación del 40% en la fracción pura y un 73.4% con la suma de todas las fracciones en donde se localizó la IgG humana

Como se puede apreciar en los resultados, la primera fracción se obtuvo de la columna cromatográfica libre de otras fracciones proteicas. Con la técnica de inmunolectroforesis al utilizar antisuecos específicos anti IgA y anti IgM los resultados fueron negativos, es decir, no se observó la presencia de arcos de precipitación debido a estas inmunoglobulinas, además cuando se reveló la reacción

antígeno-anticuerpo en presencia de antisuero normal humano sólo se observó el arco de precipitación en la zona correspondiente a la IgG, en la misma forma cuando se puso en contacto con antisuero específico para IgG; ésto no sucedió en la segunda y tercera fracciones ya que al ponerlas en presencia de antisuero normal humano se observaron arcos de precipitación correspondientes a las demás proteínas del suero.

Los informes de la literatura indican la existencia de anticuerpos circulantes en el suero de los pacientes con amibiasis invasora. ésto los han demostrado por técnicas de inmunodifusión, inmunoelectroforesis y hemaglutinación, sin embargo la localización del anticuerpo en las globulinas del suero todavía no ha sido demostrado. Los datos obtenidos en el presente trabajo ofrecen la posibilidad de separar cantidades suficientes de inmunoglobulinas por cromatografía en columna en DEAE celulosa para futuras investigaciones a este respecto, ya que los resultados son excelentes al obtener la inmunoglobulina G en forma pura y además de no afectar la capacidad de anticuerpo como se demostró al ponerla en presencia del antígeno amibiano.

La localización del anticuerpo en éstas fracciones será objeto de una comunicación posterior por lo que únicamente se discuten los resultados obtenidos en relación a la técnica cromatográfica utilizada.

## RESUMEN .

Se separaron las inmunoglobulinas del suero de tres pacientes con amibiasis invasora, por medio de la técnica de cromatografía en columna de intercambio aniónico.

A cada una de las fracciones se les determinó la concentración de proteínas así como la de inmunoglobulina, obteniéndose resultados satisfactorios.

Por medio de inmunoelectroforesis se identificaron las inmunoglobulinas en las fracciones obtenidas de la columna de cromatografía. Se obtuvo la IgG en forma pura y se localizó en ésta proteína la actividad de anticuerpo contra la *Entamoeba histolytica*.

Se discuten los resultados obtenidos y la ventaja de la técnica

## BIBLIOGRAFIA .

1. - Fahey, J. L.: Antibodies and immunoglobulins. *Jama* 194:183, 1965.
2. - Ceppellini, R., et. al.: Nomenclature of human immunoglobulins. *Bulletin World Health Organization* 30:447, 1964.
3. - Dray, S.: Three  $\gamma$ -globulins in normal human serum revealed by monkey precipitins. *Science* 132:1313, 1960.
4. - Terry, W. L., and Fahey, J. L.: Subclasses of human  $\gamma$ -globulin based on differences in heavy polypeptide chains. *Science* 146:400, 1964.
5. - Grey, H. M., and Kunkel, H. G.: H chains subgroups of myeloma proteins and normal 7S  $\gamma$ -globulin. *Journal of Experimental Medicine* 120:253, 1964.
6. - Kunkel, H. G.: in *Harvey Lectures Ser.* 59:219, 1963-1964.
7. - Kunkel, H. G., and Prendergast, R. A.: Subgroups of  $\gamma$ A-immunoglobulins. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 122:910, 1966.
8. - Terry, W. L., and Roberts, M. S.: Antigenic Heterogeneity of human immunoglobulin A proteins. *Science* 153:1007, 1966.
9. - Vaerman, J. P., and Heremans, J. F.: Subclasses of human immunoglobulin A based on differences in the alpha polypeptide chains. *Science* 153:647, 1966.
10. - Yagi, Y., et. al.: Multiplicity of insulin binding antibodies in human sera: Presence of antibody activity in  $\gamma$ B<sub>2</sub>A- and B<sub>2</sub>M- Globulins. *Journal of Immunology* 90:760, 1963.

11. - Goodman, H. C., Exum, E. D., and Robbins, J.: Radio - immunoelectrophoresis of thyroid antigens and antithyroglobulin antibodies in clinical and experimental thyroiditis. - *Journal of Immunology* 92:843, 1964.
12. - Rowe, D. S., and Fahey, J. L.: A new class of human immunoglobulins I. - A unique myeloma protein. *Journal of Experimental Medicine* 121:121, 1965.
13. - Kunkel, H. G., et al.: Relationship between H chain groups of 7S  $\gamma$ -globulins and Gm system. *Nature* 203:413, 1964.
14. - Edelman, G. M., and Poulik, M. D.: Studies on structural units of  $\gamma$ -globulins. *Journal of Experimental Medicine* 113:561, 1961.
15. - Edelman, G. M., and Benacerraf, B.: On structural proteins of gamma system. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 48:1035, 1962.
16. - Porter, R. R.: "Structure of Gamma Globulin and Antibodies" in Gelhorn, A., and Hirschberg, E. (eds): *Basic Problems in Neoplastic Disease*, New York: Columbia University Press. - 1962.
17. - Fleishman, J. B., Porter, R. R., and Press, E. M.: - - Arrangement of peptide chains in  $\gamma$ -globulin. *Biochemical Journal* 88:220, 1963.
18. - Cohen, S.: Properties of peptide chains of normal and pathological human  $\gamma$ -globulins. *Biochemical Journal* 89:334, - 1964.
19. - Fleishman, J. B.: *Annual Review of Biochemistry*. 35:835, 1966.
20. - Porter, R. R.: *Proceedings of the Royal Society (London) Series B* 166:113, 1966.
21. - Lennox, E. S., and Cohn, M.: Immunoglobulins. *Annual Review of Biochemistry* 36:365 Part 1, 1967.
22. - Goodman, J. W., and Donch, J. J.: *Immunochemistry* 2: 351, 1965.

23. - Mangalo, R. , Iscaki, S. , and Raynaud, M. : Présence - -  
d'activité anticorps dans des préparations de chaînes légères.  
Comptes Rendus Academy Sciences (D) (Paris) 263:204, 1966.
24. - Porter, R. R. , and Weir, R. C. : Subunits of immunoglobulins  
and their relationship to antibody specificity. Journal of - -  
Cellular and Comparative Physiology 67 Suppl. 1:51, 1966.
25. - Raholt, O. A. , Radzinski, G. , and Pressman, D. : Recovery  
of antibody activity from inactive hybrids of H and L. chains.  
Journal of Experimental Medicine 125:191, 1967.
26. - Neisewander, W. , and Benacerraf, B. : Presence of identical  
antigenic determinant in the Fd fragment of  $\gamma_1$ - and  $\gamma_2$ - guinea  
pig immunoglobulins. Journal of Immunology 97:171, 1966.
27. - Korngold, L. , and Lipari, R. : Multiple myeloma proteins. I.  
Immunological studies. Cancer 9:183, 1956.
28. - Mannik, M. , and Kunkel, H. G. : Two major types of 7S  $\gamma$ - glo-  
bulin. Journal of Experimental Medicine, 117:213, 1963.
29. - Fahey, J. L. : Structural basis of differences between type I  
and type II. Human gamma globulin molecules. Journal of  
Immunology 91:448, 1963.
30. - Mannik, M. , and Kunkel, H. G. : Localization of antibodies  
in group I and group II  $\gamma$ -globulins. Journal of Experimental -  
Medicine 118:817, 1963.
31. - Fahey, J. L. , and Goodman, H. : Antibody activity in six -  
classes of human immunoglobulins. Science 143:588, 1963.
32. - Handbook of Experimental Immunology. Edited by Weir, D.  
M. Blackwell Scientific Publications. First Published. City  
of Oxford. Great Britain. 1967.
33. - Fahey, J. L. : Chromatographic separations of immunoglobu-  
lins in Methods of Immunology. eds. Chase, M. , and William,  
C. A.
34. - Levy, H. B. , and Sober, H. A. : A simple chromatographic -  
method for preparation of gamma globulin. Proceedings of -  
the Society for Experimental Biology and Medicine 103:205,  
1960.



35. - Rowe, D. S., and Fahey, J. L.: A new class of human - - immunoglobulin II. - Normal serum IgD. *Journal of Experimental Medicine* 121:185, 1965.
36. - Smith, I.: *Chromatographic and electrophoretic techniques*. Vol I. Interscience Publishers, Inc. New York, U. S. A. 2nd Edition 1960.
37. - Laguna, J.: *Bioquímica*. 2a. Edición. La Prensa Médica Mexicana. México, 1967.
38. - Kabat, E. A., and Manfred, M. M.: *Experimental Immunochemistry*. 2nd Edition. Thomas, C. C. Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A. April 1964.
39. - Harper, and Row.: *Biological Chemistry*. New York, Evanston and London. 3rd. Edition. 1967.
40. - Peterson, E. A., and Sober, H. A.: Chromatograph of proteins. I. - Cellulose ion-exchange adsorbents. *Journal of the American Chemical Society* 78:751, 1956.
41. - Myhre, D. V. and Smith, F.: Ion-exchange papers chromatography. *Journal of Organic Chemistry* 23:1229, 1958.
42. - Sober, H. A., and Peterson, E. A.: Chromatography of - - proteins on cellulose ion-exchangers. *Journal of the American Chemical Society* 76:1711, 1954.
43. - Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckoff, M. M., and Peterson, E. A.: Chromatography of proteins. II. - Fractionation of - serum proteins on anion-exchange cellulose, *Journal of the - American Chemical Society* 78:756, 1956.
44. - Strannegård, O.: Kinetics of the in vitro inactivation of *Toxoplasma gondii* by specific antibodies. *Progress in Protozoology* p.p. 186. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, 1965.
45. - Lourie, E. M., and O'Connor, R. J.: Trypanolysis in vitro - by mouse immune serum. *Annals of Tropical Medicine and - Parasitology* 30:365, 1936.
46. - Teras, J., Jaakmees, H., Negeson, U., Roigas, E., and - Tompel, H.: Immunity due to infection with *Trichomonas vaginalis*. *Progress in Protozoology* p.p. 49. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation 1965.

47. - Lumaden, W. H. R., Robertson, D. H. H., and Mc -  
Nallage, G. I. C.: Isolation, cultivation, low temperature  
preservation and infectivity titration of *Trichomonas vagina-*  
*lis*. Donne 1837. *British Journal of Venereal Diseases* 42:  
145, 1966.
48. - Sabin, A., and Ruchman, I.: Characteristics of the Toxo -  
plasma neutralizing antibody. *Proceedings of the Society*  
*for Experimental Biology and Medicine* 51:1, 1942.
49. - Sabin, A.: Toxoplasma neutralizing antibody in human beings  
and morbid conditions associated with it. *Proceedings of the*  
*Society for Experimental Biology and Medicine* 51:6, 1942.
50. - Gray, A. B.: Precipitating antibody in trypanosomiasis in  
cattle and other animals. *Nature, Lond.* 186:1058, 1960.
51. - Watts, B. G. F.: A soluble protective antigen of *Trypanoso-*  
*ma brucei*. *Nature, Lond.* 185:788, 1960.
52. - Watts, B. G. F.: The properties of some antigens of *Trypa-*  
*nosoma brucei*. *Journal of General Microbiology* 23:589, -  
1960.
53. - Goldman, M.: Cytochemical differentiation of *Entamoeba*  
*histolytica* and *Entamoeba coli* by means of fluorescent -  
antibody. *American Journal of Hygiene* 58:319, 1953.
54. - Maddison, S. E.: Characterization of *Entamoeba histolytica*  
antigen-antibody reaction by gel diffusion. *Experimental -*  
*Parasitology* 16:224, 1965.
55. - Boyd, M. F., Christophers Str, R., and Coggeshall, L. T.:  
Laboratory diagnosis of malaria infections. In *Malariaology*.  
ed Boyd, M. F. London, W. B. Saunders, Co. 1949.
56. - Zuckerman, A., Hamiburger, Y., and Spira, D.: Active  
immunization of rats against rodent malaria with anon-living  
plasmodial product. *Progress in Protozoology* p.p. 50  
Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, 1965.
57. - Noguchi, H.: Comparative studies of herpetomonads and  
leishmanias. II. - Differentiation of the organisms by -  
serological reactions and fermentation test. *Journal of*  
*Experimental Medicine* 44:327, 1926.

58. - Adler, S.: Immune phenomena in leishmaniasis. In *Immunity to Protozoa*, ed. Garham, P. C. C., Pierce, A. E., and Reiff, L. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1963.
59. - Adler, S.: *Leishmania*. *Advances in Parasitology* 2:35. - London: Academic Press, 1964.
60. - Coggeshall, L. T., and Eaton, M. D.: The complement-fixation reaction in monkey malaria. *Journal of Experimental Medicine* 67:671, 1938.
61. - Kligger, I. J., and Yoeli, M.: The diagnosis and epidemiological significance of the complement fixation test in human malaria. *American Journal of Tropical Medicine* 21:531, 1941.
62. - Lee, E., y Kretschmer, R.: Estudios sobre inmunoglobulinas en relación con el anticuerpo amibiano. Seminario sobre avances recientes en el estudio de la amibiasis. 1969.
63. - Fahey, J. L., and Hobett, A. P.: Human gamma globulin-fractionation on ion-exchange cellulose columns. *The Journal of Biological Chemistry* 234:2645, 1959.
64. - Gornall, A. G., Bardwill, C. J., and David, M. M.: Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 177:751, 1949.
65. - Zawadski, Z. A., and Edwards, G. A.: Dysimmuno-globulinemia in the absence of clinical features of multiple myeloma and macroglobulinemia. *The American Journal of Medicine* 42:67, (Jan) 1967.