

234
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LA VIDA MEDIA DE LA
INMUNOGLOBULINA G DE CERDO ANTIVENENO
DE ALACRAN EN RATONES MEDIANTE LA
TECNICA DE ELISA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A I

FRANCISCO JAVIER VENOSA PEÑA

ASESORES: M EN C HECTOR BARBOSA NAJERA
M EN C JOAQUIN BECERRIL ANGELES



MEXICO, D. F.

1988



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO:	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	23
DISCUSION Y CONCLUSION	42
LITERATURA CITADA	45

RESUMEN:

Se plantea la posibilidad de utilizar a cerdos destinados al consumo humano, como donadores de suero específico en grandes volúmenes para su utilización tanto en medicina veterinaria como humana; demostrando que el cerdo es un animal con mayores ventajas que otras especies donadoras. Para estudiar la permanencia y eliminación de la IgG de cerdo, se utilizó al ratón como animal experimental. En este animal se inyectaron diferentes concentraciones de IgG y su Fab porcina, realizando sangrías cada tercer día cuantificándose los niveles de inmunoglobulina heteróloga en el suero empleando la técnica de ELISA. Se observó un fenómeno semejante al de un antígeno al ser administrado a una especie heteróloga, mostrando una permanencia de 18 y 8 días para la IgG completa y su Fab respectivamente. Se determinó una vida media de 9.38 días para la IgG y 3.83 días para el Fab. De esta experiencia se puede considerar la posibilidad de los cerdos para servir como donadores de suero específico, además aunque se observó una permanencia en el organismo receptor mayor de la IgG que de su Fab, la duración de varios días, permite sugerir su posibilidad de actuar terapéuticamente en seroterapia heteróloga en medicina veterinaria y humana.

INTRODUCCION.

A partir del descubrimiento por Berhing y Kitasato, de la capacidad terapéutica del suero de animales hiperinmunizados (22), se inició la investigación sobre el uso de los anticuerpos contra enfermedades infecciosas y contra intoxicaciones por toxinas bacterianas y venenos de animales. Básicamente la seroterapia se encamina al tratamiento, ocasionalmente a la profilaxis, y en la actualidad se utiliza para el tratamiento de sujetos inmunodeficientes o con enfermedades inmunológicas (2, 9, 14, 25, 26,). La utilidad de la seroterapia en la producción animal ha sido reconocida desde hace mucho tiempo, cuando de manera empírica se inició la administración del suero ó la sangre de los animales adultos destinados al sacrificio, a los animales lactantes de la granja o hato (17). Recientemente se realizó un estudio destinado a valorar esta práctica; al analizar los resultados encontrados en diferentes granjas porcinas donde se realizó dicho experimento, se observó una reducción de 52 % en el número de camadas con diarrea en los lotes experimentales, y una disminución de 43 % en la frecuencia de diarrea en los lechones tratados en comparación con los lotes testigos, observándose además un incremento en el vigor de los lechones (17).

En otro estudio realizado con cerdos lactantes a los que se les administró por vía oral, suero porcino específico contra Salmonella choleraesuis obtenido de cerdos en etapa de engorda de la misma granja, los cuales fueron inmunizados ex-profeso con

anterioridad; al retar los lechones con dosis infectantes de la bacteria, se encontró una diferencia significativa comparativamente al grupo de lechones que no recibieron Igs específicas, (27, 40) una investigación similar se realizó para valorar la capacidad del suero de animales adultos inmunizados con Botavírus, administrado por vía oral a lechones, para conferir protección contra un reto con el virus; los resultados mostraron una eliminación del virus en el 100% de las heces de los animales testigos frente a un 21% en los animales experimentales, por lo que se concluye que el suero interfiere con la colonización del epitelio intestinal por el virus (11, 36).

Con respecto al uso de la seroterapia en medicina humana, de gran importancia resulta mencionar que el tratamiento específico del Botulismo con la antitoxina botulínica homóloga o heteróloga equina resulta en la producción de reacciones adversas en el 21 % de los casos tratados con suero equino (32). Otra prueba de la utilidad de la seroterapia, es la que reporta la influencia en la recuperación de niños con cuadro clínico de meningitis neumocócica al administrarles inmunoglobulinas específicas, frente a aquellos niños que no las recibieron, los que mostraron severas secuelas o murieron (39). De esta manera se comprobó la gran utilidad de los anticuerpos como agentes terapéuticos, aprovechando a la vez, la capacidad potencial de los cerdos como donadores de grandes volúmenes de suero; así como la enorme ventaja económica que representa utilizar el suero de los animales destinados al consumo humano como un importante agente auxiliar en la prevención y control de algunas las

enfermedades infecciosas (4,5,33).

Es de gran importancia destacar la investigación encaminada a evaluar la posibilidad de producción de suero antitoxina tetànica en cerdos, misma que demostrò que los cerdos responden al 2o o 3er estímulo antigénico, con niveles similares de anticuerpos a los que produce el caballo, sin que se observe disminución en la ganancia de peso al final de las inauinizaciones (42). De esta manera quedò demostrado el gran potencial de los cerdos como productores de biológicos y con ello la posibilidad de ampliar la seroterapia en medicina veterinaria y humana (5).

Es de gran importancia destacar la necesidad de investigaciones en seroterapia con la finalidad de reducir o eliminar los efectos adversos observados con el uso de sueros heterólogos en humanos, buscando especies donadoras distintas a las ya tradicionales, o bien; nuevas vías o formas de seroterapia, tal como se demostrò con el uso del suero antitetànico equino administrado por vía intratecal, lo cual redujo el porcentaje de mortalidad hasta un 5%, comparado con el 15% observado al utilizar la vía intramuscular (44). Esta falta de investigación sobre la seroterapia ha propiciado incluso el que algunos centros de atención médica sugieran no utilizar un suero heterólogo específico como tratamiento contra el envenenamiento causado por picaduras de alacrán(19), puesto que no existe una valoración sistematizada y objetiva sobre el uso del mismo, aunque existen reportes de la dramática recuperación de pacientes al ser tratados con suero antitoxina producido en cabras comparado con el tratamiento conservador con fenobarbital en la que la recuperación fuè más lenta (34, 41, 43).

La posibilidad de atenuar agentes infecciosos o alterar las toxinas bacterianas permite su uso para la inmunización de humanos y la obtención de esta manera de sueros homólogos. El uso de sueros heterólogos queda limitado prácticamente a los países en los que las condiciones socioeconómicas y culturales impiden la producción de sueros homólogos, y las condiciones ambientales propician una alta incidencia de enfermedades en las que la seroterapia ha demostrado su valor sin lugar a dudas, lo cual eleva la demanda de inmunoglobulinas a cantidades imposibles de producción en humanos (3, 5). De esta manera se forma un círculo vicioso entre las condiciones que favorecen la presencia de enfermedades infecciosas y tóxicas y la necesidad de grandes volúmenes de sueros específicos contra estas, por lo que; ni se erradican las enfermedades ni se logra satisfacer la demanda de suero.

Tradicionalmente los sueros para uso en humanos han sido producidos en caballos, tal es el caso de México, por lo que su uso continuo incrementa las posibilidades de reacciones de hipersensibilidad en los pacientes (22, 47). Es clara pues la enorme ventaja que tiene el uso de inmunoglobulinas para el tratamiento de muchos padecimientos, aunque exista el riesgo de reacciones de anafilaxia por el uso de sueros heterólogos, tanto en la medicina humana como en veterinaria. El uso de sueros homólogos o heterólogos en medicina veterinaria será benéfico económicamente, aun considerando las reacciones adversas, puesto que se puede ligar la producción de sueros y su utilización en medicina preventiva (20), en los diferentes sistemas de producción animal, con la consiguiente ventaja en la disminución de costos

de producción (5, 17,20, 42).

Investigaciones recientes encaminadas a la producción de grandes volúmenes de suero, llevaron a considerar a los cerdos como posible fuente, ya que su explotación es intensa, y su sangre es desechada o subaprovechada en casi todos los rastros del País (1, 23). El siguiente paso consistió en probar la capacidad de respuesta de los cerdos en diferentes esquemas de inmunización destinados a elevar el título de anticuerpos específicos, resultando que los cerdos respondieron adecuadamente a la estimulación antigénica de toxoide tetánico, veneno de alacrán y veneno de serpientes, produciendo títulos de anticuerpos neutralizantes similares a los obtenidos en caballos (5, 42). Se han utilizado otros antígenos como *Salmonella choleraesuis*, *Botavírus* e inmunoglobulinas, a los que los cerdos respondieron adecuadamente (4, 11, 27, 40). La estimulación antigénica se practicó en cerdos en etapa de engorda, de manera que se ajustó la fecha de la sangría para la obtención del suero con la fecha de sacrificio de los mismos . Las estimulaciones antigénicas no produjeron alteraciones que mermaran la calidad de los animales en pie o de sus canales, por lo que se puede prever una ganancia adicional del productor por la venta de sueros específicos (42).

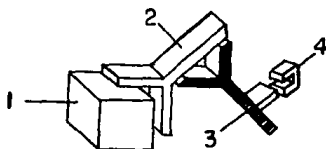
Una vez que se conoció la capacidad de los cerdos para la producción de grandes volúmenes de antisueros, se procedió a evaluar que tan inmunogénico podría resultar el uso del suero porcino en humanos. Para ello, en 1983 se realizó un estudio encaminado a identificar posibles similitudes inmunológicas entre la IgG porcina y la IgG humana (37), este estudio consistió en el análisis de los componentes de cada molécula utilizando la prueba

de inmunolectroforesis, demostrándose la gran similitud inmunológica que existe entre ambas inmunoglobulinas; además se reportó que la inmunización de cerdos con IgG humana resulta en la producción de anticuerpos solo hasta el 4o y 5o estímulo antigénico, por lo que es necesario estudiar el comportamiento de la IgG porcina en el humano para pensar utilizarla en seroterapia heteróloga. Estos datos permiten suponer que el suero porcino constituye la mejor opción como sustituto del suero equino en la seroterapia por intoxicaciones en humanos. La posibilidad de utilizar el suero porcino como segunda opción en el tratamiento de enfermedades infecciosas o intoxicaciones, requiere estudios sobre el comportamiento metabólico de la IgG porcina en la especie receptora, con el fin de determinar el tiempo de permanencia en los receptores, y poder hacer una estimación de las dosis e intervalos en los cuales el producto puede o debe ser administrado como agente terapéutico, para lograr en un momento dado el establecimiento y mantenimiento de un nivel terapéutico adecuado en la sangre (2, 14,25).

Las técnicas actuales para cuantificar la síntesis y eliminación inmunológica de los anticuerpos en un organismo, incluyen técnicas tales como el marcaje de la molécula del anticuerpo con isótopos radiactivos (I-135, I-125, C-14, S-35, H-3) para su seguimiento en el organismo, esta técnica posee una gran especificidad en cuanto a la cuantificación del anticuerpo marcado, sin embargo; requiere de un equipo altamente costoso y el empleo de personal altamente capacitado para trabajar con radiactividad. Para el presente trabajo se seleccionó el uso de una técnica con menor riesgo en su implementación, sencilla, de

gran sensibilidad y económica. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), es una técnica cualitativa que sin embargo permite realizar ensayos cuantitativos cuando se estandariza adecuadamente. La técnica de ELISA se fundamenta básicamente en la especificidad que tienen los anticuerpos de reconocer un antígeno y formar complejos inmunes que pueden ser revelados por un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La enzima al reaccionar con el sustrato forma un producto colorido; la intensidad del color se relaciona directamente con la cantidad de complejos inmunes formados. Se puede dar valor al color obtenido, usando un espectrofotómetro, el principio en el que se basa esta técnica es similar a la utilizada en la inmunofluorescencia (15, 16, 28, 46, 48). Esquemáticamente la técnica se describe así:

- 1) Ag pegado en una fase sólida
- 2) Ac específico vs. Ag
- 3) Anti-inmunoglobulina marcada con enzima
- 4) Sustrato



Esta técnica posee una sensibilidad y especificidad muy elevada, además de una gran reproducibilidad y simplicidad para la detección de anticuerpos o antígenos, lo que le ha permitido ser empleada como una técnica de diagnóstico en medicina

veterinaria (48, 46). En medicina humana la técnica de ELISA es de un gran valor para la identificación de enfermedades en donde el diagnóstico oportuno y específico tiene una importancia vital, como lo es el caso del diagnóstico de la cisticercosis. El desarrollo de la técnica se describe en la sección de material y métodos. La investigación desarrollada en México sobre producción de sueros a partir de cerdos, permitió reconocer que esta especie presenta grandes ventajas para la producción de éstos, que superan incluso a las que brinda el caballo (5). Sin embargo, es necesario continuar y concluir los estudios sobre farmacodinamia, toxicidad y especificidad en otra especie, antes de considerar su posible utilización en humanos. El presente estudio pretende cubrir un aspecto del metabolismo de la IgG en un sistema biológico, para lo cual se planteó el siguiente objetivo:

OBJETIVO

Determinar la vida media de la inmunoglobulina G porcina antiveneno de alacrán en el ratón mediante la utilización de la técnica de ELISA.

MATERIAL Y METODOS.

Para la titulación del veneno de alacrán polivalente (*Centruroides sulfusus* Pocok, *C. noxius* Hoffman, *C. limpidus* limpidus y *C. limpidus tecomanus*), donados por la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud; se realizaron ocho diluciones con el factor de dilución 1:1.2 en solución salina fisiológica a partir de una dilución 1:10 del veneno puro. Grupos de cinco ratones por dilución, se inyectaron con 0.5 ml por la vena caudal. Para realizar el cálculo de la DL50 del veneno, se registró el número de animales vivos y muertos dentro de las primeras 24 horas y se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (31).

Obtención del suero antiveneno de alacrán.

Para la obtención de las inmunoglobulinas específicas contra veneno de alacrán, se utilizaron diez cerdos híbridos convencionales en la etapa de engorda de 3 meses de edad en promedio de la Granja Experimental Porcina de Zapotitlán de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, estos fueron inyectados cada 15 días según el protocolo de inmunización anteriormente establecido por Barbosa et al. (6). A los 6 meses de edad en promedio, los cerdos fueron sacrificados en el rastro y la sangre se colectó en recipientes estériles directamente del cuello. La sangre colectada se trasladó al laboratorio de Infectología de la

Subdivisión de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Posteriormente se fragmentó el coágulo y se dejó retraer, dejándolo a 4 C para posteriormente centrifugarlo a 2500 rpm durante 15 minutos para eliminar las células. El suero obtenido se almacenó a 4 C hasta su uso.

Titulación de los sueros de cerdo antiveneno de alacrán.

La capacidad neutralizante de los sueros porcinos se determinó haciendo diluciones 1:2 y 1:3 de cada suero. Cada dilución de suero se mezcló con un volumen igual de veneno conteniendo 12 DL50 ratón (31) y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente para después inyectar 0.5 ml I.V. a cada ratón siendo 5 por cada dilución. Se registró el número de animales vivos y muertos durante las primeras 24 hrs. y se calculó el IN 50% ratón (cantidad mínima de suero requerida para neutralizar 12 DL50 ratón del veneno) de acuerdo al método de Reed y Muench (12).

Obtención de los fragmentos Fab y Fc de la IgG porcina.

Se tomaron 40 ml de una solución de IgG porcina pura conteniendo 10 mg/ml y se mezclaron con 60 mg de EDTA, 4 mg de papaína y 0.56 ml de 2-mercaptoetanol 0.1 M en un matraz y se dejó incubando por 3 hrs. en baño maría a 37 C para que se realizara la digestión de las moléculas de IgG. Al finalizar la

digestión, la solución se dializó contra un amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.4 toda la noche. Para reducir el volumen se dializó contra glicerol toda una noche, al finalizar la concentración se dializó contra amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 8 durante dos horas (24, 30). Se montó una columna de intercambio iónico de 2.5 x 45 cm con DEAE-Celulosa en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 8 para separar ambas fracciones. Se colectaron fracciones de 5 ml. La velocidad de flujo fue de 60 ml/h, cada muestra se leyó en un espectrofotómetro Carl Zeiss M4 QIII 38993 a 280 nm para localizar la proteína. Se reunieron los tubos de cada fracción en bolsas para diálisis, una para cada fracción y se cubrieron con glicerol durante toda la noche para reducir su volumen al máximo. Para eliminar el glicerol remanente, se dializó contra amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.4 (24) y se procedió a cuantificar la cantidad de proteína de cada fracción por el método de Lowry (35).

Preparación del suero anti-inmunoglobulina G porcina.

Para la preparación del suero se utilizaron dos conejos que fueron inmunizados bajo el siguiente esquema:

Conejo	Immunización con Fab.		
estímulo	dosis	adyuvante	vía
1	500 ug	Completo de Freund§	sc. dorso
2	500 ug	Completo de Freund	sc. dorso
3	500 ug	sin adyuvante	sc. plantar
4	500 ug	sin adyuvante	intramuscular

§ (21)

Conejo B: Inmunización con el fragmento Fc.

estímulo	dosis	adyuvante	via
1	900 ug	Completo de Freund	subcutánea
2	900 ug	Completo de Freund	sc. plantar
3	900 ug	Sin adyuvante	intramuscular
4	900 ug	Sin adyuvante	sc. plantar
5	900 ug	Sin adyuvante	intraperitoneal

Los estímulos fueron aplicados con intervalos de 7 días. La titulación del suero de los conejos se realizó mediante una prueba de doble inmunodifusión 7 días después de cada estímulo antigénico (24). Las diferencias entre los esquemas de inmunización se deben a las diferentes respuestas de los conejos a los estímulos, por lo que se buscó la mejor manera de estimularlos. Se sacrificó a los conejos cuando presentaron títulos iguales o mayores a 1:32.

La sangre obtenida se dejó coagular a temperatura ambiente para fragmentar el coágulo dejándolo retraer 12 hrs a 4 C y posteriormente centrifugarlo a 2500 rpm durante 15 min. en una centrifuga Beeckman TJ-6 para eliminar las células (24).

Precipitación de las anti-IgG porcinas del suero de conejo.

Las inmunoglobulinas del suero de los conejos fueron

precipitadas con una solución saturada de sulfato de amonio a volúmenes iguales. Se emplearon 40 ml de cada suero y 40 ml de la solución saturada de sulfato de amonio. Se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugaron a 6000 rpm x 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió al volumen inicial con solución salina fisiológica y se agregaron 20 ml de la solución saturada de sulfato de amonio. Esto se repitió hasta que el sobrenadante resultó claro. Después de la última centrifugación, el precipitado se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos y se puso a dializar durante 4 días a 4 C con la misma solución para eliminar el sulfato de amonio de las muestras haciendo cambios de solución cada día. Al quinto día se dializó contra solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.4 (24). Finalmente se determinó la cantidad de proteína de cada anti-IgG por el método de Lowry realizando diluciones 1:100, 1:200 y 1:400 (24, 30, 35).

Purificación de los anticuerpos.

Para purificar las inmunoglobulinas de conejo y proceder a marcarlas con peroxidasa, se preparó una columna para cromatografía de intercambio iónico con dimensiones de 2.5 cm de diámetro x 45 cm de longitud. Se utilizó DEAE-Celulosa en buffer de fosfatos 0.01 M pH 8. Se tomaron 5 ml de cada anticuerpo y se dializaron contra amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 8. Se corrió la columna con una velocidad de flujo de 60 ml por hora. Se colectaron fracciones de 5 ml. Se leyó la densidad óptica a 280 nm. Se colectaron las fracciones donde se detectó

proteína y se colocaron en bolsas para diálisis, tomando previamente una muestra para hacer la determinación de proteína y colocando el resto a concentrar en glicerol a 4 C para tener una concentración final de 10 mg/ml. Al finalizar la purificación de un primer anticuerpo se procedió a lavar la columna de DEAE-celulosa con una solución de NaCl 0.5 M que se hizo pasar a través de la columna para después lavarla con 4 volúmenes de agua. Se ajustó el pH de la columna para purificar el segundo anticuerpo. Se realizó el mismo procedimiento que con el anticuerpo anterior, para tener al final una concentración de 10 mg/ml de cada anticuerpo en solución de carbonatos 0.01 M pH 9.5 (24, 30, 35).

Conjugación de los Anticuerpos

Se pesaron 8 mg de peroxidasa (Sigma No P-8375) y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Después se preparó una solución de Periodato de Sodio 0.1 M para añadir 0.2 ml a la solución de la peroxidasa y se dejó en agitación suave por 20 min. Después de la agitación se puso a dializar contra amortiguador de acetato de sodio 1 mM pH 4.4 a 4 C durante toda la noche. Al día siguiente se elevó el pH de la solución agregándole 0.02 ml de amortiguador de carbonatos 0.2 M pH 9.5, inmediatamente después se adicionaron 10 mg del anticuerpo en amortiguador de carbonatos pH 9.5 0.01 M y se dejó en agitación suave a temperatura ambiente por 2 horas. Después de la agitación se le adicionó 0.1 ml de una solución de Borohidruro de sodio conteniendo 4 mg/ml en agua y se dejó reaccionar durante 2

horas a 4 C. Posteriormente se dializó contra boratos 0.1 M pH 7.4 durante toda la noche. Para eliminar la peroxidasa libre del anticuerpo peroxidado se utilizó una columna de Sephadex G-200 de 1.6 cm de diámetro x 35 cm de longitud. Se usó un amortiguador de boratos 0.1 M ph 7.4 y se corrió con un flujo de 5 ml/h, colectando fracciones de 3 ml por tubo. Posteriormente se leyó cada tubo en el espectrofotómetro a 280 nm para localizar la proteína y proceder a reunir los tubos y reducir el volumen en el que se encontraban los anticuerpos peroxidados. Finalmente para conservarlos y almacenarlos se dializaron contra glicerol para tener una relación al 50 por ciento de glicerol y buffer de boratos(10).

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA.

Montaje de la técnica y estudio de la sensibilidad.

Para determinar la cantidad de antígeno que la técnica puede detectar, se realizaron diluciones de las preparaciones de Fab y de la IgG de cerdo de manera que las concentraciones utilizadas fueron: IgG porcina: 0.0565, 0.00565 y 0.00113 mg/ml, Fab de IgG porcina: 0.150, 0.015 y 0.0015 mg/ml. Todas las diluciones se realizaron con amortiguador de carbonatos 0.0M ph 9.6. Se acopló 0.1 ml de cada dilución a 3 pozos y 3 pozos con 0.1 ml de suero normal de ratón se usaron como testigos (todos los pozos empleados para la realización de la técnica de ELISA son de poliestireno y se fijan en un soporte para pozos, estos pozos son desechables). Se dejaron en incubación a 4 C durante toda la noche en cámara

húmeda y al día siguiente se lavaron todos los pozos con PBS tween 20 poniendo a cada pozo 0.2 ml dejándolos tres minutos para después vaciarlos y secarlos golpeándolos invertidos sobre una gasa limpia. El lavado se repitió tres veces. Posteriormente se bloquearon los posibles espacios libres adicionando a cada pozo 0.2 ml de una solución de albúmina sérica bovina al 1 % y se dejó incubar a 37 C durante dos horas en cámara húmeda. Se repitió la técnica del lavado de pozos para continuar con el paso siguiente. Se incubó el anticuerpo peroxidado de conejo (anti Fab porcino), diluido 1:10, 1:20 y 1:50 en PBS tween 20 adicionando 0.1 ml de cada dilución a cada una de las diferentes concentraciones del antígeno pegado a los pozos. Se dejó incubar a 4 C toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente se procedió a lavar los pozos. Para revelar los pozos se preparó 10 ml de amortiguador de citrato de sodio pH 5.6 y se le adicionaron 5 mg del sustrato OPD (ortofenilendiamina) y 0.083 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % inmediatamente después de preparado se aplicó 0.1 ml por pozo y se dejó reaccionar por 10 min. Para detener la reacción se usó 0.025 ml/pozo de HCl 3N conteniendo 0.5 % de sulfato de sodio (10, 15, 30, 48). Se procedió a la lectura de las densidades ópticas de cada pozo en el lector de ELISA Minireader II Dynatech Product a 490 nm.

Valoración de la prueba completa.

Para conocer la sensibilidad de la prueba para detectar el antígeno, se usaron diferentes concentraciones de anticuerpo de captación pegado a los pozos, frente a concentraciones distintas

del antígeno, revelando con anti-Fab porcina peroxidada diluida 1:20. Del anticuerpo de captación diluido en amortiguador de carbonatos 0.5 M pH 9.6, se pegaron 0.1 ml por pozo, siendo en total 48 pozos. Se dejó incubar a 4 C en cámara húmeda toda la noche. Al día siguiente se lavaron los pozos y se bloqueó con 0.2 ml de albúmina sérica bovina al 1 % incubando a 37 C durante dos horas. Se lavaron los pozos y se pegó el anticuerpo poniendo a 24 pozos 0.1 ml de cada concentración. Se dejó en incubación en cámara húmeda a 4 C toda la noche. Al día siguiente se lavó y se aplicó el sustrato de la misma manera que en la prueba anterior para después leer (10, 30).

Determinación de la vida media de la inmunoglobulina B del cerdo.

Diseño experimental.

Se utilizaron dos preparaciones: la molécula completa de IgB y el Fab de la IgG porcina, las cuales se concentraron a 200 mg/ml en una celdilla AMICON utilizando una membrana XM-50 para el Fab y una Xm-100 para la IgG. Se utilizaron 90 ratones de un peso entre 18 y 20 g con una edad de 6 semanas de la línea Taco formando 6 lotes conforme al cuadro siguiente:

Grupo	No. ratones	mg/ratón	vol. inyectado	via
A IgG	45	100, 50, 20	0.5 ml	IV
B Fab	45	100, 50, 20	0.5 ml	IV

En cada grupo se formaron subgrupos de 15 ratones, uno para cada concentración. Los ratones fueron inyectados en la vena caudal. Cada tercer día durante un mes, se obtuvieron dos muestras de suero de cada subgrupo, se realizó la primera sangría 15 min. después de haber inyectado las inmunoglobulinas. Las sangrías se practicaron en el seno ocular obteniéndose 0.8 ml de sangre por ratón. El suero se obtuvo mediante centrifugación a 2500 rpm/15 min y se almacenó en frascos identificándolos con el número de sangría y lote de ratón hasta su utilización en el ELISA. Se practicaron 15 sangrías por subgrupo cubriendo un total de 29 días. Cuando se tuvieron todas las muestras de suero se procedió a la cuantificación de la IgG porcina y su Fab.

Determinación de las diluciones de los sueros a utilizar,

Se realizaron mezclas de ciertas cantidades de la IgG porcina en suero normal de ratón, así como diluciones de una muestra de suero de los ratones experimentales para determinar así la dilución necesaria para tener lecturas dentro de la curva estandar, bajo el siguiente esquema:

Anticuerpo de captación: 0.150 mg/ml

Suero de ratón inyectado con 100 mg de IgG: dilución 1:10, 1:100 y 1:1000.

IgG porcina diluida en suero normal de ratón: 1, 10 y 50 ug/ml.

Anticuerpo peroxidado: diluido 1:20

Se emplearon 6 pozos correspondiendo un pozo para cada dilución empleada del suero de ratón y de las distintas concentraciones de IgG porcina, además de dos pozos control. La técnica fué la misma que se describió anteriormente en el sistema de emparedado.

Obtención de la curva estandar.

Para la cuantificación de la IgG y su Fab se hizo una curva patrón con las densidades ópticas obtenidas al aplicar concentraciones conocidas de IgG porcina pura y Fab con el siguiente esquema:

	concentración mg/ml
Anticuerpo de captación: (1)	0.150
IgG porcina y su Fab: (2)	0.050, 0.040, 0.030, 0.020, 0.010, 0.008, 0.006, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0005 y 0.000025
Anticuerpo peroxidado:	dilución 1:20

(1) se aplicaron 0.1 ml de esta concentración/pozo.

(2) se aplicaron 0.1 ml de cada concentración/pozo.

ELISA para determinar el tiempo de eliminación del antígeno.

El esquema utilizado para la valoración de las concentraciones de la IgG y su Fab en el suero de los ratones se realizó como sigue: El anticuerpo de captación se utilizó con una concentración de 0.150 mg/ml. Esquema de diluciones del suero de ratón aplicada a cada pozo de acuerdo al número de sangría y grupo experimental:

Diluciones de los sueros de ratón con IgG y con Fab†.

Día	No. sangría	100 mg	50 mg	20 mg
1	1	1:1000	1:100	1/10
3	2	1:1000	1:100	1/10
5	3	1:1000	1:100	1/10
7	4	1:1000	1:100	1/10
9	5	1:10	s/d	s/d
11	6	1:10	s/d	s/d
13	7	1:10	s/d	s/d
15	8	1:10	s/d	s/d
17	9	s/d	s/d	s/d
19	10	s/d	s/d	s/d
21	11	s/d	s/d	s/d
23	12	s/d	s/d	s/d
25	13	s/d	s/d	s/d
27	14	s/d	s/d	s/d
29	15	s/d	s/d	s/d

† las diluciones realizados con los sueros fueron iguales

para ambos grupos.

El anticuerpo peroxidado se utilizó diluido 1:20. El procedimiento para realizar el ELISA es igual al descrito anteriormente. Los volúmenes utilizados para cada reactivo fueron: 0.1 ml/pozo del anticuerpo de captación, 0.2 ml/pozo de albúmina sérica bovina, 0.1 ml/pozo de suero de ratón diluido y 0.1 ml/pozo de anticuerpo peroxidado. Se revela con 0.1ml/pozo de sustrato y se detiene la reacción con 0.025 ml/pozo de HCl.

Análisis estadístico.

A partir de las densidades ópticas obtenidas se calculó la curva patrón de concentración de IgG y su Fab. Al traspolar las densidades ópticas obtenidas en el ELISA con los sueros de los ratones experimentales, se obtuvo la cantidad de IgG y su Fab circulante en mg y su equivalente en porcentaje para cada uno de los subgrupos. Con estos datos se obtuvieron además las gráficas de la curva de eliminación de IgG y su Fab para cada subgrupo de ratones.

Finalmente se realizó un ajuste por regresión lineal (13) de los porcentajes obtenidos para determinar el día en el que se eliminó la totalidad de la IgG o su Fab del suero de los ratones considerando todos los valores de cada grupo y de cada subgrupo de manera independiente para después determinar la vida media de la IgG.

RESULTADOS:

Producción de los reactivos necesarios para el desarrollo de la prueba.

Los sueros obtenidos de los cerdos inmunizados con veneno de alacrán fueron procesados para la obtención de IgG pura, Fab y Fc los cuales mostraron estar puros de acuerdo a los resultados de las pruebas de Inmunolectroforesis, Cromatografía de filtración y Electroforesis en geles de acrilamida; al finalizar la digestión, separación, concentración y determinación de proteína de los fragmentos de la IgG porcina se obtuvieron 45 ml de solución del Fab con una concentración de 1 mg/ml y 50 ml de solución del Fc con una concentración de 1.8 mg/ml, con los que se inmunizaron dos conejos. El conejo inmunizado con Fab respondió con un título de 1:32 al cuarto estímulo antigénico, mientras que el conejo inmunizado con el fragmento Fc, respondió con el mismo título hasta la quinta inmunización. Los conejos fueron sangrados a blanco y de la precipitación del suero se obtuvieron 35 ml de cada anti-IgG específica con una concentración de 56 mg/ml para la anti Fab porcina y de 34 mg/ml para la anti Fc porcina. El resultado de la columna de cromatografía de intercambio iónico fué la obtención de 10.6 mg de anticuerpos anti Fab y 11.4 del anti Fc. Dichos anticuerpos se marcaron con peroxidasa y al final del marcaje de cada anticuerpo, se obtuvo un volumen de 4 ml de anticuerpo peroxidado al 50 % con glicerol, con una relación enzima anticuerpo 1:3.

Estandarización de la técnica de ELISA.

Se hicieron los ensayos necesarios para determinar las condiciones óptimas de trabajo y conocer la dilución del anticuerpo peroxidado a utilizar y la concentración del anticuerpo de captación (cuadros 1 y 2), la sensibilidad y especificidad de la prueba (cuadro 3) y las diluciones de los sueros de los ratones (cuadro 4).

Cuadro 1: Densidades ópticas obtenidas al utilizar diferentes concentraciones de antígeno de captación y revelado con diferentes diluciones de anticuerpo peroxidado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12*
A	1.99	1.61	1.36	0.04	0.95	0.59	0.46	0.01	0.18	0.17	0.00	0.01
B	over	over	over	0.04	over	1.83	1.27	0.00	1.15	0.86	0.51	0.00

* = número de pozo
 1 al 4 son los pozos que se revelaron con una dilución del anticuerpo peroxidado de 1:10.
 5 al 8 son los pozos que se revelaron con una dilución del anticuerpo peroxidado de 1:20.
 9 al 12 son los pozos que se revelaron con una dilución del anticuerpo peroxidado de 1:50.
 A = La concentración de Fab utilizada fue de 56 ug/ml (pozos 1,5,9), 5.65 ug/ml (pozos 2,6,10) y 1.13 ug/ml (pozos 3,7,11).
 B = La concentración de IgG utilizada fue de 150 ug/ml (pozos 1,5,9), 15ug/ml (pozos 2,6,10) y 1.5 ug/ml (pozos 3,7, y 11).
 Los pozos 4,8 y 12 tienen suero de raton normal.

Cuadro 2: Densidades ópticas obtenidas al hacer reaccionar diferentes concentraciones de anticuerpo de captación con dos diferentes concentraciones de antígeno revelados con anticuerpo peroxidado diluido 1:20

	1500		150		5		1.5		150		15 *	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 **
A	0.47	0.30	0.59	0.61	0.54	0.20	0.12	0.13	0.05	0.05	0.02	0.02
B	0.35	0.29	0.61	0.63	0.48	0.49	0.11	0.12	0.05	0.05	0.02	0.02
C	0.37	0.31	0.73	0.76	0.55	0.58	0.14	0.15	0.04	0.04	0.01	0.02
D	0.31	0.24	0.70	0.66	0.57	0.53	0.14	0.14	0.04	0.04	0.02	0.02

* = concentraciones usadas en ug/ml del anticuerpo de captación.
 ** = número de pozo
 A = 0.010 mg/ml de Fab
 B = 0.002 mg/ml de Fab
 C = 0.010 mg/ml de IgG
 D = 0.002 mg/ml de IgG

Densidades ópticas obtenidas al acoplar diferentes concentraciones de anticuerpo de captación a los pozos, usando

dos diferentes concentraciones de IgG y Fab de IgG porcina y revelado con el anticuerpo peroxidado a dilución de 1:20. Los pozos 9,10,11 y 12 son testigos negativos en los que se utilizó suero de ratón normal como antígeno. Se seleccionó una concentración de anticuerpo de captación de 150 ug/ml (pozos 3 y 4).

Cuadro 3: Sensibilidad obtenida en el sistema de ELISA desarrollado.

(mg/ml)	IgG porcina			Fab de IgG		
	A	B	X	C	D	X
0.050	0.39	0.47	0.43	0.32	0.41	0.36
0.040	0.47	0.51	0.49	0.33	0.40	0.36
0.030	0.44	0.52	0.48	0.36	0.40	0.38
0.020	0.47	0.52	0.49	0.41	0.50	0.45
0.010	0.52	0.54	0.53	0.41	0.56	0.48
0.008	0.53	0.46	0.49	0.40	0.46	0.43
0.006	0.38	0.43	0.40	0.34	0.38	0.36
0.004	0.28	0.42	0.35	0.31	0.40	0.35
0.002	0.33	0.40	0.36	0.34	0.36	0.35
0.001	0.33	0.38	0.35	0.35	0.38	0.36
0.0005	0.35	0.41	0.38	0.30	0.34	0.32
0.00025	0.32	0.24	0.28	0.22	0.22	0.22
0.00000	0.00	0.03	0.01	0.00	0.03	0.01

Densidades ópticas obtenidas con el sistema completo, se pegaron 150 ug/ml en los pozos, se colocaron diferentes concentraciones de antígeno (columna 1) y se revelaron con anticuerpos peroxidados en dilución 1:20. El ensayo se hizo por duplicado (lecturas señaladas como A y B) el promedio se señala como X. Los promedios obtenidos con estas lecturas fueron usados para la elaboración de la curva estándar (Figura 1 y 2). Se puede observar que la sensibilidad alcanzada en este sistema puede detectar 25 ng de antígeno (IgG ó Fab).

Cuadro 4: Valoración de las diluciones de los sueros de los ratones experimentales a emplear en el sistema.

1:10 *	1.35	5 **	0.15
1:100	1.08	10	0.76
1:1000	0.90	50	0.83

* = diluciones del suero de ratón experimental del grupo inyectado con 100 mg de IgG porcina.

**= ug/ml de IgG porcina diluida en suero de ratón normal.

Para conocer las diluciones que se deberían de hacer de los sueros de los ratones experimentales, se hicieron las diluciones señaladas, se incluyeron testigos negativos (suero de ratón normal) cuyos valores fueron de cero.

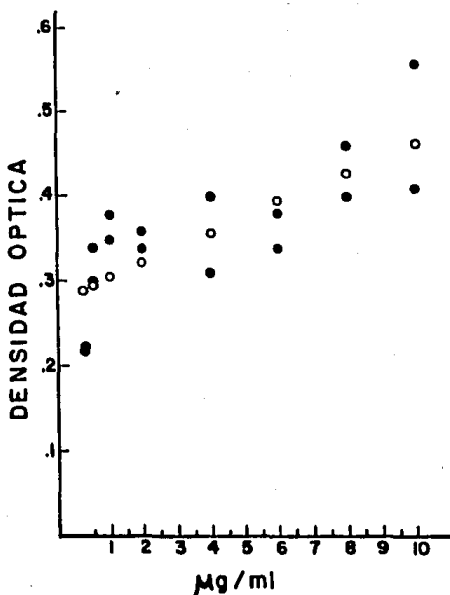


Figura 1

Curva estándar para la cuantificación de IgG porcina. (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos en una regresión lineal. El valor mínimo detectado con el sistema es de 250 ng/ml correspondiente al primer valor representado en la gráfica.

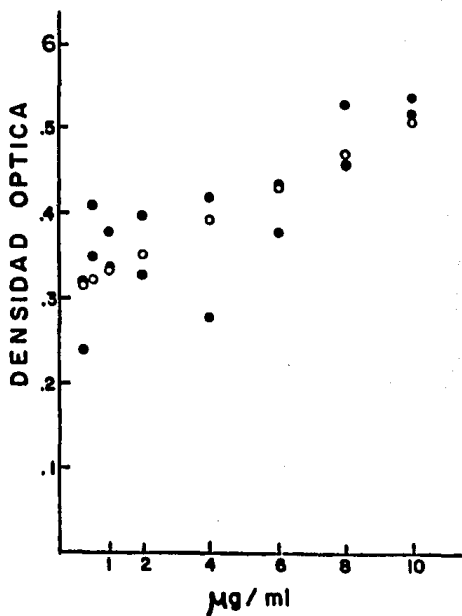


Figura 2

Curva estandard para la cuantificación del Fab porcino (● ●) valores experimentales, (o o) valores teóricos en una regresión lineal. El valor mínimo detectado con el sistema es de 250 ng/ml correspondiente al primer valor representado en la gráfica.

Determinación de la vida media de la IgG porcina.

Cuadro 5: Densidades ópticas obtenidas en el ELISA de la totalidad de sueros de ratón experimentales, mostrando el grupo experimental y día de sangría.

Día	Grupos con IgG porcina						Grupos con Fab porcina					
	100	50	20*	100	50	20*	100	50	20*	100	50	20*
1	0.56	0.57	0.61	0.65	0.71	0.79	0.49	0.46	0.46	0.47	0.44	0.44
3	0.47	0.49	0.53	0.50	0.57	0.56	0.39	0.35	0.50	0.44	0.39	0.44
5	0.44	0.44	0.52	0.58	0.57	0.41	0.24	0.18	0.28	0.37	0.36	0.31
7	0.33	0.40	0.50	0.53	0.61	0.58	0.06	0.06	0.34	0.26	0.34	0.38
9	0.47	0.61	0.58	0.61	0.56	0.58	0.30	0.28	0.43	0.43	0.33	0.37
11	0.45	0.52	0.70	0.53	0.52	0.08	0.14	0.08	0.29	0.17	0.23	0.30
13	0.50	0.51	0.53	0.46	0.44	0.08	0.14	0.10	0.19	0.19	0.11	0.15
15	0.42	0.36	0.43	0.39	0.42	0.48	0.08	0.06	0.10	0.12	0.08	0.10
17	0.53	0.44	0.52	0.59	0.56	0.63	0.19	0.18	0.12	0.05	0.02	0.05
19	0.94	0.41	0.47	0.55	0.38	0.57	0.10	0.12	0.07	0.02	0.09	0.02
21	0.21	0.58	0.22	0.06	0.06	0.58	0.47	0.05	0.47	0.06	0.04	0.06
23	0.35	0.14	0.80	0.41	0.49	0.54	0.19	0.05	0.04	0.00	0.13	0.05
25	0.35	0.29	0.71	0.39	0.44	0.21	0.12	0.07	0.02	0.02	0.00	0.00
27	0.24	0.21	0.61	0.47	0.09	0.45	0.03	0.03	0.05	0.03	0.01	0.02
29	0.19	0.15	0.33	0.35	0.07	0.08	0.02	0.04	0.00	0.00	0.01	0.00

* = concentraciones en mg/ratón inyectadas a los animales experimentales.

Cada lectura corresponde a un suero de ratón distinto, siendo dos ratones de cada subgrupo sangrados en el día correspondiente. Los valores obtenidos en este ensayo, se interpolaron en la curva estandar, se calcularon las concentraciones de antígeno de acuerdo a la dilución realizada de cada suero y se expresan como porcentajes en los cuadros 6,7,8,9,10 y 11. Gráficamente los valores están representados en las figuras 9 y 10.

Cuadro 6: Interpolación de la Densidad óptica a mg/ml y % de IgG en el suero de los ratones experimentales del subgrupo 100 mg IgG. Indicándose por día de sangría.

Día	D.O.		concentración correspondiente en mg/ml		%§§	
	a	b	a	b	a	b
1	0.56	0.57	12.42	12.92	12.42	12.92
3	0.47	0.49	7.88	8.89	7.88	8.89
5	0.44	0.44	6.36	6.36	6.36	6.36
7	0.33	0.40	0.814	4.34	0.814	4.34
9	0.47	0.61	0.078	0.149	0.078	0.149
11	0.45	0.52	0.068	0.104	0.068	0.104
13	0.50	0.51	0.093	0.098	0.093	0.098
15	0.42	0.36	0.053	0.023	0.053	0.023
17	0.53	0.44	0.010	0.006	0.010	0.006
19	0.94	0.41	0.031	0.004	0.031	0.004
21	0.21	0.58	0.0	0.013	0.0	0.03
23	0.35	0.14	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.35	0.29	0.0	0.0	0.0	0.0
27	0.24	0.21	0.0	0.0	0.0	0.0
29	0.19	0.15	0.0	0.0	0.0	0.0

a b = columnas correspondientes a las dos muestras de suero obtenidas por sangría, § = Los sueros del día 1 al 7 fueron diluidos 1:1000. Los sueros del día 8 al 15 fueron diluidos 1:10. Los sueros del día 16 al 29 se leyeron directamente sin diluir. §§ = El porcentaje se calculó considerando los 100 mg de IgG inyectados como el 100 %. Figura 3.

Cuadro 7: Interpolación de la densidad óptica a mg/ml y % de IgG en el suero de los ratones experimentales del subgrupo 50 mg de IgG, indicándose por día de sangría.

Día	D.O.		concentración correspondiente en mg/ml		% §§	
	a	b	a	b	a	b
1§	0.61	0.65	1.49	1.69	2.98	3.38
3	0.53	0.50	1.09	0.939	2.18	1.86
5	0.52	0.58	1.04	1.34	2.08	2.68
7	0.50	0.53	0.939	1.09	1.86	2.18
9	0.58	0.61	0.013	0.014	0.026	0.028
11	0.70	0.53	0.019	0.010	0.038	0.02
13	0.53	0.46	0.010	0.007	0.02	0.014
15	0.43	0.39	0.005	0.003	0.01	0.006
17	0.52	0.59	0.010	0.013	0.02	0.026
19	0.47	0.55	0.007	0.011	0.014	0.022
21	0.22	0.06	0.0	0.0	0.0	0.0
23	0.80	0.41	0.024	0.004	0.048	0.008
25	0.71	0.39	0.019	0.003	0.038	0.006
27	0.61	0.47	0.014	0.007	0.028	0.014
29	0.33	0.35	0.0	0.001	0.0	0.002

a b = columnas correspondientes a las dos muestras de suero obtenidas por sangría § = Los sueros del día 1 al 7 fueron diluidos 1:100. Los sueros del 8 al 29 se leyeron directamente sin diluir. §§ = El porcentaje se calculó considerando los 50 mg de IgG inyectados como el 100 %. Figura 4.

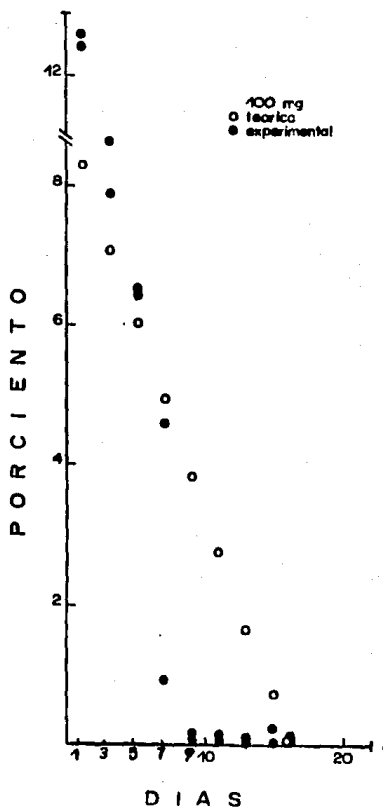


Figura 3

Cinética de la eliminación de la IgG porcina por el ratón. (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado para la eliminación total de la IgG es de 16.04 días.

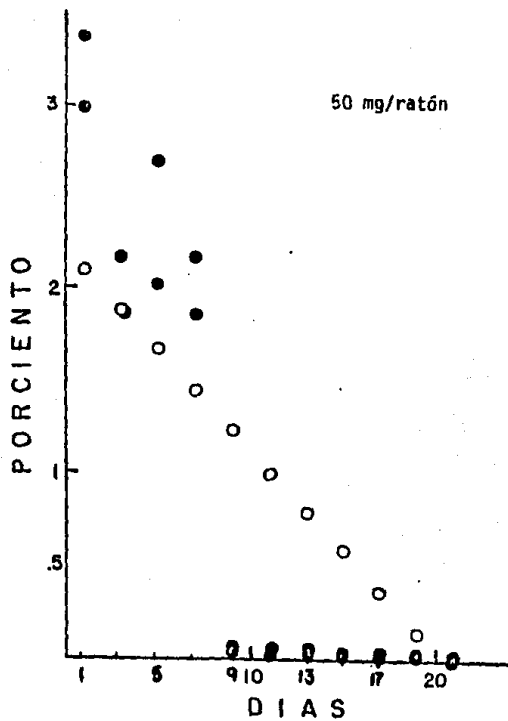


Figura 4

Cinética de la eliminación de la IgG porcina por el ratón. (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado para la eliminación total de la IgG es de 20.4 días.

Cuadro 8: Interpolación de la densidad óptica a mg/ml y % de IgG en el suero de los ratones experimentales del subgrupo 20 mg de IgG.

Día	concentración correspondiente					
	D.O.		en mg/ml		% **	
	a	b	a	b	a	b
1*	0.71	0.79	0.19	0.24	0.99	1.2
3	0.57	0.56	0.129	0.124	0.64	0.62
5	0.57	0.41	0.129	0.048	0.64	0.24
7	0.61	0.58	0.149	0.134	0.74	0.67
9	0.56	0.58	0.012	0.13	0.06	0.06
11	0.52	0.08	0.010	0.0	0.05	0.0
13	0.44	0.08	0.006	0.0	0.03	0.0
15	0.42	0.48	0.005	0.008	0.02	0.04
17	0.56	0.63	0.012	0.015	0.06	0.07
19	0.38	0.57	0.003	0.012	0.01	0.06
21	0.06	0.58	0.0	0.013	0.0	0.06
23	0.49	0.54	0.008	0.011	0.04	0.05
25	0.44	0.21	0.006	0.0	0.03	0.0
27	0.09	0.45	0.0	0.0	0.0	0.0
29	0.07	0.08	0.0	0.0	0.0	0.0

a b = columnas correspondientes a las dos muestras de suero obtenidas por sangría, * = Los sueros del día 1 a 7 fueron diluidos 1:10. Los sueros del día 8 al 29 se leyeron directamente sin diluir. ** = El porcentaje se calculó considerando los 20 mg de IgG inyectados como el 100 %. Figura 5.

Cuadro 9: Interpolación de la densidad óptica a mg/ml y % de Fab en el suero de los ratones experimentales. Se indica por día de sangría

Día	concentración correspondiente					
	D.O.		en mg/ml		% **	
	a	b	a	b	a	b
1*	0.49	0.46	11.39	9.69	11.39	9.69
3	0.39	0.35	5.73	3.47	5.73	3.47
5	0.24	0.18	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.06	0.06	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.30	0.28	0.006	0.0	0.006	0.0
11	0.14	0.08	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.14	0.10	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.08	0.06	0.0	0.0	0.0	0.0
17	0.19	0.18	0.0	0.0	0.0	0.0
19	0.10	0.12	0.0	0.0	0.0	0.0
21	0.47	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
23	0.19	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.12	0.07	0.0	0.0	0.0	0.0
27	0.03	0.03	0.0	0.0	0.0	0.0
29	0.02	0.04	0.0	0.0	0.0	0.0

a b = columnas correspondientes a las dos muestras de suero

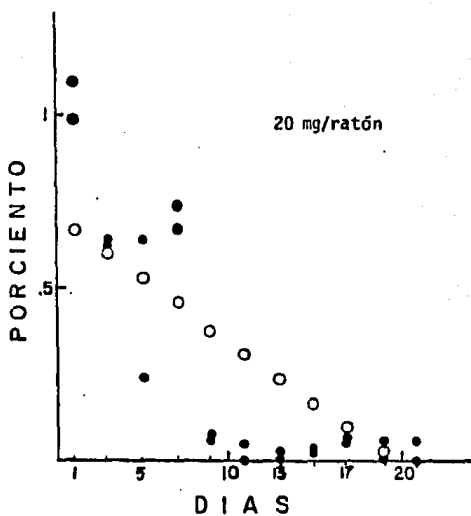


Figura 5

Cinética de la eliminación de IgG porcina en el ratón.
 (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado de la eliminación total de IgG es de 18.7.

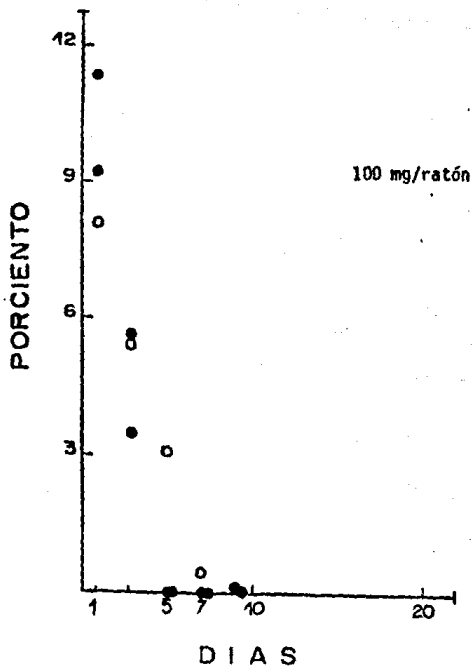


Figura 6

Cinética de la eliminación del Fab de IgG porcina en el ratón. (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado para la eliminación total del Fab es de 7.3 días.

obtenidas por sangría, § = Los sueros del día 1 al 7 fueron diluidos 1:1000. Los sueros del día 9 al 15 fueron diluidos 1:10. Los sueros del día 16 al 29 se leyeron directamente sin diluir. §§ = El porcentaje se calculó considerando los 100 mg de Fab como el 100 %. Figura 6.

Cuadro 10: Interpolación de la densidad óptica obtenida a mg/ml y % de Fab en el suero de los ratones experimentales, indicándose por día de sangría.

Día	D.O.		concentración correspondiente en mg/ml		% §§	
	a	b	a	b	a	b
1 §	0.46	0.47	0.969	1.026	1.93	2.05
3	0.50	0.44	1.195	0.856	2.39	1.31
5	0.28	0.37	0.0	0.46	0.0	0.92
7	0.34	0.26	0.29	0.0	0.58	0.0
9	0.43	0.43	0.007	0.007	0.015	0.015
11	0.29	0.17	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.19	0.19	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.12	0.10	0.0	0.0	0.0	0.0
17	0.12	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
19	0.07	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0
21	0.47	0.06	0.0	0.0	0.0	0.0
23	0.04	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.02	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
27	0.05	0.03	0.0	0.0	0.0	0.0
29	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

a b = columnas correspondientes a las dos muestras de suero obtenidas por sangría, § = Los sueros del día 1 al 7 fueron diluidos 1:100. Los sueros del día 8 al 29 se leyeron directamente sin diluir. §§ = El porcentaje se calculó considerando los 50 mg de Fab inyectados como el 100 %. Figura 7.

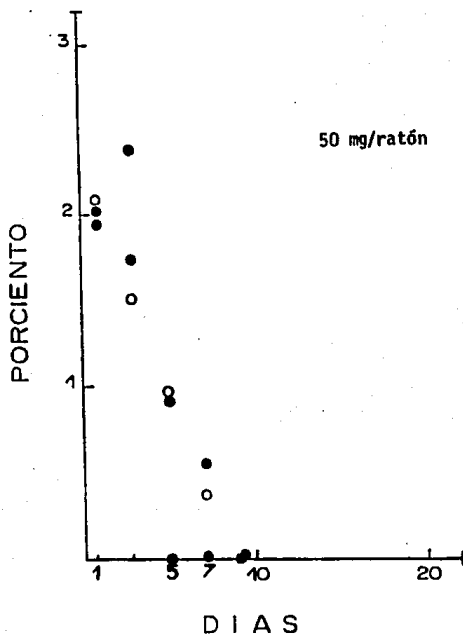


Figura 7

Cinética de la eliminación del Fab de IgG porcina en el ratón. (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado para la eliminación total del Fab es de 8,3 días

Cuadro 11 : Interpolación de la densidad óptica a mg/ml y % de Fab en el suero de los ratones experimentales, indicándose por día de sangría.

Día	D.O.		concentración correspondiente en mg/ml		% **	
	a	b	a	b	a	b
	18	0.44	0.44	0.085	0.085	0.428
3	0.39	0.44	0.057	0.085	0.286	0.428
5	0.36	0.31	0.040	0.02	0.201	0.060
7	0.34	0.38	0.029	0.051	0.14	0.23
9	0.33	0.37	0.002	0.004	0.011	0.023
11	0.23	0.30	0.0	0.0006	0.0	0.003
13	0.11	0.15	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.08	0.10	0.0	0.0	0.0	0.0
17	0.02	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
19	0.09	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0
21	0.04	0.06	0.0	0.0	0.0	0.0
23	0.13	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
27	0.01	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0
29	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

a b = columnas correspondientes a las dos muestras de suero obtenidas por sangría, * = Los sueros del día 8 al 7 fueron diluidos 1:10. Los sueros del día 8 al 29 se leyeron directamente sin diluir. ** = El porcentaje se calculó considerando los 20 mg de Fab inyectados como el 100 %. Figura 8.

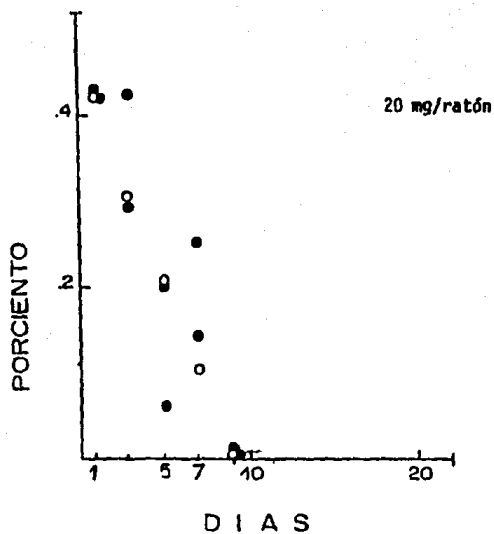


Figura 8

Cinética de la eliminación del Fab de la IgG porcina en el ratón. (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado para la eliminación total del Fab es de 9.6 días

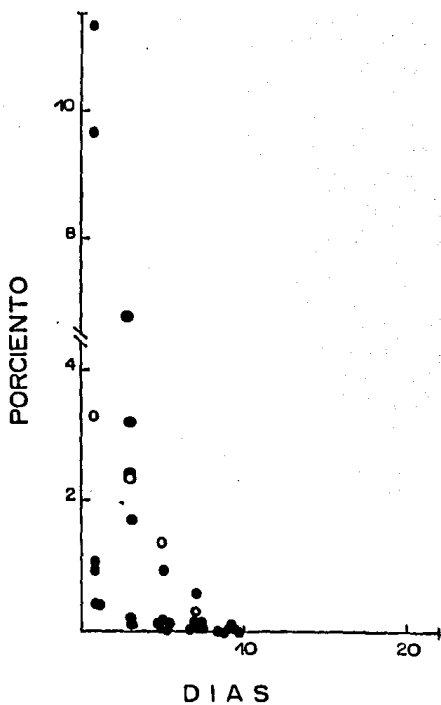


Figura 9

Cinética de eliminación del Fab de la IgG porcina valores de 45 ratones (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado para la eliminación total del Fab es de 7.6 días.

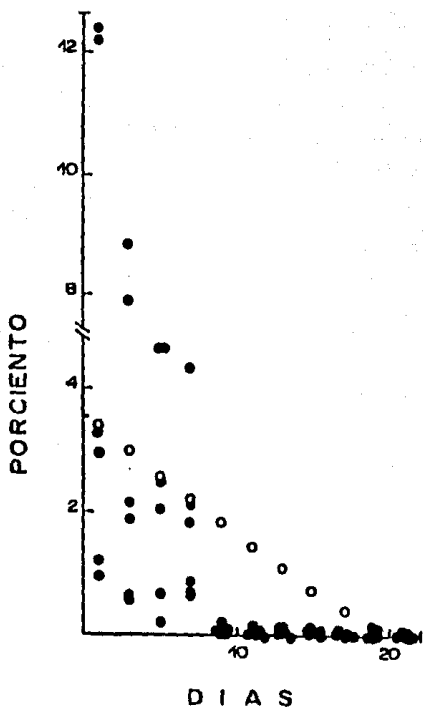


Figura 10

Cinética de la eliminación de IgG porcina valores de 45 ratones (● ●) valores experimentales, (○ ○) valores teóricos. El valor calculado para la eliminación total de la IgG es de 18.7 dfas.

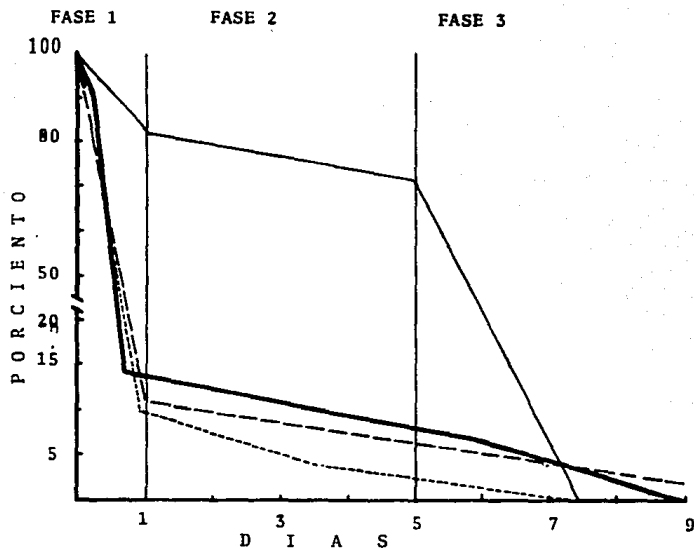


FIGURA 11 : Curvas de eliminación de antígenos.

- Eliminación de gamaglobulina equina en el hombre(8).
- Curva típica de eliminación de un antígeno(7).
- - - Curva de eliminación de la IgG porcina en el ratón.
- · - Curva de eliminación del Fab de la IgG porcina en el ratón.

DISCUSION :

La producción de sueros antivenenos de alacranes o serpientes reviste algunas características especiales; una de ellas es que el protocolo de inmunización debe iniciarse con dosis bajas del antígeno para eliminar el riesgo de accidentes por intoxicaciones en los animales donadores de anticuerpos. En este caso los animales no presentaron datos de envenenamiento. Los sueros colectados fueron procesados en el Instituto Nacional de Higiene para la eliminación del Fc con el uso de pepsina. Por otra parte, en el sistema de producción, se trata de alcanzar capacidades de neutralización mayores a 12 DL50 ratón con la finalidad de que la presentación final del producto contenga las dosis neutralizantes necesarias en la menor concentración de proteína.

Tiene gran importancia la separación del fragmento Fc de la IgG en la presentación final del producto en el sentido de que se ha comprobado que la frecuencia de enfermedad por suero que se registra en las personas tratadas con inmunoglobulinas de caballo, disminuye de manera significativa cuando se compara con grupos de personas que reciben la inmunoglobulina completa.

El uso en humanos de inmunoglobulinas heterólogas, debe de satisfacer los requisitos de productos biológicos exigidos por la Organización Mundial de la Salud. Inicialmente se debe comprobar su capacidad terapéutica y en ese sentido, la utilización de inmunoglobulinas heterólogas deben mostrar además de su capacidad de neutralización, capacidad de permanecer en el sistema heterólogo el tiempo adecuado para llevar a cabo su función terapéutica. En el caso específico del envenenamiento por

picadura de alacrán, el cuadro clínico con el uso del suero se resuelve en 24 h.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, muestran que la IgG de cerdo se comporta cuando es inyectada en un sistema heterólogo como cualquier otra inmunoglobulina administrada en una especie distinta (18, 49) Se observó un comportamiento similar a la curva de eliminación de antígenos, que reporta tres fases, ver Figura 11 (7, 8, 50), la primera corresponde a una fase de distribución y eliminación rápida debida a la difusión intra y extra-vascular teniendo una duración aproximada de 20 minutos a un día, en ambos grupos se observó una disminución muy acentuada ya que desde el primer día se registró un porcentaje de 12% para el grupo de IgG y de 11.39 para el grupo inyectado con Fab. Con respecto a la segunda fase o de eliminación metabólica cuya duración va del día 1 al día 7 se observó que correspondió del día 1 al 7 para la IgG y del día 1 al 5 para el fragmento Fab de la IgG de cerdo. Se observó la tercera fase correspondiente a la eliminación inmunológica y que tuvo una duración hasta el día 21 y 7-8 días para la IgG y Fab respectivamente.

Con respecto a la eliminación total de la IgG tomando en conjunto los valores obtenidos en los tres grupos experimentales, se obtuvo un valor teórico de 18.76 días (ver figura 10), calculado por una regresión lineal. Considerando el valor inicial experimental encontrado en los ratones, la vida media considerada como el tiempo en el que la proteína disminuye a la mitad de su valor inicial es de 5 días. Al integrar los datos de los tres grupos experimentales en una regresión lineal, para el Fab, se obtiene un valor de 7.66 días. para la eliminación total (ver

Figura 9). De esta manera se puede considerar que los valores encontrados en los grupos de manera independiente, son muy similares a los encontrados cuando se toman las cifras en conjunto. En este caso la vida media de acuerdo a los valores experimentales es de 3 días.

Los valores teóricos no corresponden pues con los experimentales dado que por regresión lineal, la media de la molécula completa sería de 9.38 días y de 3.83 para el Fab. Las diferencias pueden deberse a que en el caso de la regresión lineal se realiza de hecho un promedio de los valores de los tres grupos experimentales por lo que la variabilidad se incrementó al introducir 3 concentraciones distintas y en el cálculo se eliminan los valores extremos.

Las diferencias en los tiempos de eliminación de la molécula completa y el fragmento Fab pueden tener algunas explicaciones como es el hecho de que el tamaño de la molécula influya en su distribución y asimismo la ausencia del Fc facilita su metabolismo(29, 38, 45).

CONCLUSIONES:

Mediante la utilización de la técnica de ELISA, se determinó una permanencia de la IgG porcina en el modelo biológico del ratón, de 18.76 días bajo las condiciones establecidas en este estudio. Con esto se concluye que la vida media de la IgG porcina en el ratón es de 9.38 días.

LITERATURA CITADA:

- 1.- Aluja de, Aline S.: Aspectos económicos y de salud pública en relación al sacrificio de los cerdos. Memorias del curso "Inspección sanitaria de la carne de cerdo", México, D.F. 1982. 2-17. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1982)
- 2.- Anónimo: Usos apropiados de la inmunoglobulina humana en la práctica clínica. *Bol. of Sanit. Panam.*, 95(1):74-80 (1983).
- 3.- Bach, J.F.: Inmunología. *Liguera*. México, D.F., 1984.
- 4.- Barbosa, N.H., Ravines, J., Garza, R.J. y Larralde, C.: Producción masiva de anticuerpos comerciales en cerdos. *Int. Pac. Mex.*, 41:45-52 (1981).
- 5.- Barbosa, N.H.: El cerdo en la investigación biomédica: inmunidad pasiva y producción de antisueros. En avances del cerdo. Editado por: Morilla, A., Correa, P. y Stephano, A., 59-61, *Á. N. V. E. C.*, México, D.F., 1985.
- 6.- Barbosa, N.H. et al.: Specific antibodies produced in conventional animals. *J. Á. V. M. Á.*, (en prensa)
- 7.- Barret, I.T.: Inmunología. 4a ed. *Intercamericana*. México, D.F., 1985.

- 8.- Bellanti, J.A. and Robbins, J.B.: *Inmunología*. 2a ed. Interamericana. México, D.F., 1981.
- 9.- Bussel, J.B. and Hilgartne, M.W.: The use and mechanism of action of intravenous immunoglobulin in the treatment of immune haematology disease. *Br. J. Haematol.*, 56:1-17 (1984).
- 10.- Catty, D., Raykundalia, C. and Houba, V.: Bench manual of techniques for the preparation of immunological and immunodiagnostic reagents. Part I. World Health Organization. Switzerland, 1983.
- 11.- Cruz, S.J.: Tiempo de protección contra Rotavirus conferido por inmunoglobulinas séricas específicas administradas por vía oral en lechones. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1985.
- 12.- Chuc, E.: Aplicación del método de Reed y Muench a la titulación de sueros antiponzoñosos. Tesis de licenciatura. *E.N.C.Z.*, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., 1959.
- 13.- Daniel, W.W.: *Biostatística*. *Litmus*. México, D.F., 1982.
- 14.- Eddington, J.A. and Wingert, A.W.: Timing of the administration of antivenom. *Toxicol.*, 24(5):241-243 (1986).
- 15.- Engvall, E. and Carlsson, H.H.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. En First International Symposium on Immuno

Enzymatic Techniques. INSERM Symposium No. 2. Editors. Eideann
et al. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1976.

16.- Engvall,E. and Perlmann,P.: Enzyme-linked immunosorbent
assay,ELISA III. Quantitation of specific antibodies by
enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.
J.Immunol., 109(1):129-135 (1972).

17.- Estrada,C.A., Rios,P.J., Martinez,D.H., Rosales,O.C. y
Morilla, G.A.: Efecto de la administración oral de suero
sanguíneo sobre las diarreas de los lechones. Vet.Mex.,
16:191-199 (1985).

18.- Fahey, J.L. and Robinson,A.G.: Factors controlling serum
globulin concentration. J.Exptl.Med., 118:845-868 (1963).

19.- Findlay,E.R. and Minoos,B.M.: Introduction of the scorpion
Centruroides exilicauda into California its public health
significance. Toxicol., 22:658-664 (1984).

20.- Frank,S. and Robert,C.: Use of hyperimmune serum,
vaccination and certain management procedure for control of
pseudorabies in swine. J.Anat.Vet.Sci., 184(12):1463-1466 (1984).

21.- Freund, J.: Some aspects of active immunization.
Ann.Rev.Microbiol. 1:291-298 (1947).

22.- Fundeaberg,H., Stites,D., Cadwell,J. y Well,J.: Inmunología

Clinica. Manual Moderno. México, D.F., 1978.

23.- García, B.T.: Comercialización de la carne de cerdo en México. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1984.

24.- Garvey, J.B., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: Methods in Immunology. 3th edited by M.A. Benjamin INC. Massachusetts, U.S.A., 1977.

25.- Gómez, B.J., Villarreal, V.R. y Gómez, B.D.: Inmunizaciones. Rev. Fac. Med. Mex. 19(7):25-35 (1976).

26.- Gordon, D.S.: Intravenous immunoglobulin therapy. Am. J. Med. 83:52-56 (1987).

27.- Guevara, M.R.: Inmunidad a Salmonella choleraesuis en lechones protegidos con inmunoglobulinas séricas administradas por vía oral. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1983.

28.- Herbert, W.J., Wilkinson, P.C. and Stott, D.I.: Dictionary of Immunology. 3 ed. edited by Herbert, W.J., Wilkinson, P.C. and Stott, D.I. Osney Mead, Oxford, 1985.

29.- Holton, D.O., et al.: Biodistribution of monoclonal IgG1, F(ab')₂, and Fab' in mice after intravenous injection. J. Immunol. 139(9):3041-3059 (1987).

Clínica. Manual Moderno, México, D.F., 1978.

23.- García, S.T.: Comercialización de la carne de cerdo en México. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1984.

24.- Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: Methods in Immunology. 3th edited by W.A. Benjamin Inc., Massachusetts, U.S.A., 1977.

25.- Gómez, B.J., Villarreal, V.R. y Gómez, B.D.: Inmunizaciones. Rev. Fac. Med. Mex., 19(7):25-35 (1976).

26.- Gordon, D.S.: Intravenous immunoglobulin therapy. Am. J. Med., 83:52-56 (1987).

27.- Guevara, M.R.: Inmunidad a Salmonella choleraesuis en lechones protegidos con inmunoglobulinas séricas administradas por vía oral. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1983.

28.- Herbert, W.J., Wilkinson, P.C. and Stott, D.I.: Dictionary of Immunology. 3 ed. edited by Herbert, W.J., Wilkinson, P.C. and Stott, D.I. Osney Mead, Oxford, 1985.

29.- Holton, D.O., et al.: Biodistribution of monoclonal IgG1, F(ab')₂, and Fab' in mice after intravenous injection. J. Immunol., 139(9):3041-3059 (1987).

30.- Hudson, L. and Hay, F.C.: Practical Immunology. 2th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford., 1980.

31.- Instituto Politécnico Nacional: Manual de Laboratorio y Control de Biológicos. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, D.F., 1984.

32.- Lewis, G.E. and Metzger, J.F.: Botulism immune plasma (human). The Lancet, Sept. 16 : 634-635 (1978).

33.- Larralde, C., Barbosa, H., Molinari, J.L. y Arco del, R.: Aspectos inmunológicos en la producción industrial de antitoxinas. Cien. Vet. Mex., 1:41-45 (1976).

34.- Likes, K., Banner, W. and Chavez, M.: Centrucoides exilicauda envenomation in Arizona. West J. Med., 141:643-637 (1984).

35.- Lowry, H.O., Rosebrough, J.N., Farr, L.A. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275 (1951).

36.- Miranda, R.A.: Protección contra rotavirus conferida por inmunoglobulinas séricas específicas por vía oral en lechones. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1987.

37.- Montero Montoya Regina: Reactividad inmunológica entre la

IgG humana e IgG de cerdo. Tesis de licenciatura. Esc. de Cienc.
Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1983.

38.- Morell, A., et al: In vivo behaviour of gammaglobulin
preparations Vox Sang., 38:272-283 (1980).

39.- Noack, R.C., Szugs, C. and Sholz, H.: Immunoglobulins in the
treatment of bacterial meningitis in child hood. Infection.,
15(1):11-15 (1987). En Immunobst., 12(9):67 (1987).

40.- Parra, S.M.: Tratamiento de la salmonelosis en lechones con
inmunoglobulinas séricas administradas por vía oral y sistémica.
Tesis de licenciatura. Esc. de Med. Vet. y Zoot. Universidad
Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1985.

41.- Rachesky, I.J., Banner, W., Dansky, J. and Tong, T.: Treatments
for Centruroides exilicauda envenomation. Am. J. D. C., 138:1136-1139
(1984).

42.- Ravines, Z.J.E. Producción de antitoxina tetánica en cerdos.
Tesis de licenciatura. Esc. de Med. Vet. y Zoot. Universidad
Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1979.

43.- Riasza, M.E., Zimmerman, D.R. and Bergeson, P.S.: Scorpion
envenenation. Pediatrics., 66(2):298-302 (1980).

44.- Sanders, R.K., Reginald, J., Balraj, H. and Peacock, M.L.:
Intratecal antitetanus serum (horse) in the treatment of tetanus.

Lancet, 7:974-977 (1977).

45.- Spiegelberg, H.L. and Egle, W.O.: The catabolism of homogenous and heterologous 7S gamma globulin fragments. J. Exp. Med. 121:323 (1965).

46.- Theakston, R.D.G.: The application of the immunoassay techniques, including enzyme linked immunoassay (ELISA), to snake venom research. Toxicon, 21(3): 341-352 (1983).

47.- Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria. Iberoamericana. México, D.F., 1983.

48.- Varley, M.A., Rucklidge, G.J., Wilkinson, R.J. and Maitland, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of immunoglobulin G concentrations in porcine plasma and colostrum. Res. Vet. Sci., 38:279-281 (1985).

49.- Waldmann, T.A. and Strober, W.: Metabolism of immunoglobulins. Proc. Allergy, 13:1 (1969).

50.- Wagle, W.O.: En Perez, R., Larralde, C., Kretschmer, R.: Inmunopatología. Prensa Médica Mexicana. México, D.F., 1968.