



52
10/1/89

Universidad Nacional Autónoma de México

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“DESARROLLO Y OPTIMIZACION DE UN
METODO DE ELISA PARA LA DETECCION
DEL FACTOR REUMATOIDE”**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

MARIA CRISTINA NEGRETE GARCIA



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.

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JOSE LUIS GALVAN MADRID
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E :

ATM. LIC. JOSE LUIS CHAVEZ GARAY
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE EXAMENES
PROFESIONALES DE LA F.E.S.C.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "DESARROLLO Y OPTIMIZACION DE UN METODO DE ELISA PARA LA DETECCION DEL FACTOR REUMATOIDE", que presenta la pasante: MARIA CRISTINA NEGRETE GARCIA, con número de cuenta: 7926070-9 para obtener el título de QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA.
Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el examen profesional correspondiente, otorgamos NUESTRO VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, México a 6 de Mayo de 1985.

PRESIDENTE M.C. Carlos E. Salas Contreras
Vocal Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa
SECRETARIO Q.F.B. Diana Lezcano Meza
1er. SUPLENTE Q.F.B. Susana E. Mendoza Elvira
2do. SUPLENTE Q.F.B. Marina Morales Galicia

Jose Luis Galvan Madrid
Idalia Avila Miyazawa
Diana Lezcano Meza
Susana E. Mendoza Elvira
Marina Morales Galicia

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLAN



DEDICATORIAS :

A mis padres:

**Que con gran sacrificio y motivación
hicieron realidad uno de los objetivos
trazados en mi vida.**

A mis hermanos:

**Por el constante apoyo que me brindaron
para la culminación de este trabajo, que
fue lento pero seguro.**

A Teresa, Martha y Angélica:

Por estar presentes en los
momentos más difíciles e
impulsarme cuando más lo
necesité.

A todos mis maestros y compañeros de la FES-C.

Y un agradecimiento especial a:

**La Q.F.B. Emilia Martínez Miranda, de quien recibí los
primeros consejos para el buen inicio de mi vida como
profesional.**

I N D I C E

	HOJA
Abreviaturas	1
Resumén	2
1.0 Introducción	
1.1 Generalidades de la autoinmunidad	3
1.2 Valor del Factor Reumatoide en la autoinmunidad.	5
1.3 Características del FR y su producción	8
1.4 FR y anti-idiotipos	11
1.5 Fundamento de la técnica empleada	14
2.0 Justificación del trabajo	15
3.0 Objetivos	16
4.0 Hipótesis	17
5.0 Materiales y Métodos	
5.1 Material biológico	18
5.2 Métodos	18
5.2.1. Purificación de la IgG de conejo	20
5.2.2. Activación de la DEAE-C	21
5.2.3. Empaque de la columna	22
5.2.4. Caracterización de las IgG purificadas..	23
5.2.5. Activación de la sepharosa 4B	26
5.2.6. Preparación del sephadex G-200	27
5.2.7. Desarrollo práctico de cada uno de los métodos para la purificación del FR	28
5.2.8. Detección del FR purificado por el método de ELISA	34
5.2.9. Método de ELISA para cuantificar la cantidad de IgM presente en cada uno de los purifica- dos	35

6.0 Resultados	
6.1 Identificación y caracterización de las IgG	38
6.2 Purificación del FR	39
6.3 Eficiencia de los diferentes métodos de purificación	45
7.0 Discusión	56
8.0 Conclusiones	61
9.0 Anexo	65
10.0 Referencias	73

A B R E V I A T U R A S

AR	Artritis Reumatoide
°C	Grados centígrados
CMNSP	Células mononucleares de sangre periférica
D.O.	Densidad Óptica
Fc	Fracción cristalizable
FR	Factor Reumatoide
MN	Mononucleares
NF	Nefelometría
nm	nanómetros
PBS	Solución Fosfatos Salina
pH	Grado de Acidez
P.M.	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleares
rpm	revoluciones por minuto
SAS	Sulfato de amonio saturado
SDS	Dodecil sulfato de sodio
U.V.	Ultra violeta

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue purificar Factor Reumatoide (FR), y establecer un método inmunoenzimático - - - (ELISA) para su detección. Para ello se usaron cinco sueros prototipo provenientes de pacientes con Artritis Reumatoide (AR), con títulos altos de FR. Considerando la propiedad del FR para reconocer la porción Fc de la IgG homóloga o heteróloga, se diseñaron 3 métodos (I, II y III) de aislamiento -- basados en I - Captura del FR en una columna de afinidad en la que se acoplaron agregados de IgG de conejo, II - Precipitación de gama-globulinas con sulfato de amonio al 40% para en seguida efectuar la separación del FR por una columna de exclusión por peso molecular y III - Separación del FR - clase IgM mediante una segunda columna de afinidad con proteína A de S. aureus. La pureza del FR fue determinada a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida, identificando las cadenas pesadas y ligeras de acuerdo a marcadores de peso molecular conocidos. Para la detección del FR se estandarizó un método de ELISA, empleando como antígeno agregados de IgG humana y como anticuerpo una anti-IgM humana -- marcada con peroxidasa para finalmente revelar con Orto Fenil Diamino (OPD) como sustrato a la enzima empleada. Como - ELISA control negativo, se empleó un antígeno no relacionado como lo fue un extracto de M. tuberculosis. Para comparar la determinación del FR, se emplearon, la prueba de aglutinación con partículas de látex y Nefelometría (NF). Las fracciones - aisladas de FR obtenidas por los métodos I y III de purificación, mostraron lecturas positivas en el ELISA (D.O. > 0.70) con IgG agregada pero no con M. tuberculosis. Para las muestras manejadas como controles negativos, se obtuvieron lecturas menores de 0.20 de D.O. para FR. Solamente las fracciones obtenidas por el método I, fueron detectadas por la prueba de látex y NF, por contener una mayor concentración de proteínas. Por ello el método I fue seleccionado como el más útil para nuestros fines, y con él purificamos seis muestras más, - obteniendo la misma pureza que con los sueros prototipo.

1.0 INTRODUCCION

1.1 Generalidades de la Autoinmunidad

La autoinmunidad se define como un estado alterado en el cual existe una reacción exagerada en contra de componentes propios, lo que permite que haya una gran variedad de enfermedades de este tipo y cuyo origen preciso se desconoce.

La gran mayoría de estos padecimientos tienen características clínicas y sus fenómenos inmunológicos muy amplios, pero se ha dado una gran relevancia al diagnóstico temprano y aspectos terapéuticos en estos pacientes (1,2).

En cambio, los estudios experimentales sustentan la idea de que los procesos autoinmunitarios pueden ser una consecuencia de un amplio espectro de anormalidades genéticas e inmunológicas y que éstas difieren de un individuo a otro, pudiendo presentarse en diferentes lapsos durante el transcurso de la vida, dependiendo de la influencia de factores promotores tanto exógenos (agentes virales, bacterianos, químicos o ambientales), como endógenos (hormonal, actividad anormal de genes).

Dentro de los mecanismos inmunopatológicos que pueden mediar el daño tisular de las enfermedades autoinmunitarias se encuentran:

- La unión de autoanticuerpos sobre estructuras normales de las superficies celulares, seguida de una destrucción por complemento; lo que corresponde a una citotoxicidad celular autoinmune mediada por anticuerpos (3).

- La formación de complejos inmunes autoantígeno-autoantígeno-anticuerpo, en fluidos intercelulares o en la circulación en general, para finalmente mediar el daño tisular (4).

- Y donde el proceso patológico pueda ser causado por - linfocitos T sensibilizados inadecuadamente, ya que estas - células pueden producir lesiones tisulares por medio de mecanismos en los que intervienen la liberación de linfocitotoxinas, así como la atracción de otros tipos de células al sitio de la lesión.

En forma general existe una gran variedad de factores - que pueden explicar el origen de la autoinmunidad que se citan en seguida:

- Liberación de antígenos secuestrados.
- Disminución de la actividad de las células T supresoras.
- Incremento de la actividad de las células T cooperadoras.
- Defectos del timo o de sus productos solubles.
- Presencia de clones anormales o alteración en la inducción de tolerancia inmune.
- Activación policlonal de las células B.
- Actividad refractaria de las células B a los mensajes supresores.
- Defectos en los macrófagos
- Anormalidades de las células precursoras en médula osea.
- Alteración en la regulación de la red idiotipo-antiidiotipo.
- Actividad anormal de los genes que modulan la respuesta inmune.

- Factores virales.
- Influencia de las características hormonales.
- Influencia de factores ambientales.
- Alteraciones en el complejo principal de histocompatibilidad.

De aquí podemos derivar que en la autoinmunidad predomina la autoreactividad humoral, representada primordialmente por la generación de autoanticuerpos o la reactividad celular, mediada por citotoxicidad (1,2).

1.2 Valor del Factor Reumatoide en Autoinmunidad

En diferentes padecimientos autoinmunes una característica relevante es la producción de diversos autoanticuerpos, entre los que destacan anticuerpos contra epítopes en la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG 7s e IgM 7s y 19s conocidas también como factores reumatoides (FR) (4). Estos pueden encontrarse en suero u otros fluidos corporales como el líquido sinovial o saliva (1). Su presencia en estos compartimientos se ha explicado como consecuencia de que los linfocitos locales producen IgG que es reconocida como extraña y estimula una respuesta inmunitaria (1).

El FR más comunmente encontrado es el del tipo IgM en una proporción del 70 al 80% de pacientes con Artritis Reumatoide (AR), Síndrome de Sjögren y en porcentajes menores en lupus eritematoso, esclerodermia y dermatomiositis (5). Además se han llegado a encontrar FR de la clase IgG, IgA e IgE en una proporción más baja en estos padecimientos (6).

La importancia que tiene la presencia de agregados de IgG formando complejos inmunes con el FR de la clase IgG, IgM u otros isotipos es que el resultado final es la activación del sistema del complemento por la vía clásica, tanto a nivel circulante como en algunos tejidos. En este proceso los productos de demolición del complemento se acumulan y activan la vía alterna del complemento. Todo ello da por resultado la producción de numerosos fenómenos de inflamación incluyendo la liberación de histamina, la producción de factores quimiotácticos para los leucocitos PMN y MN, incluyendo al C3a y C5a; todo lo cual facilita el daño tisular (7,8,9).

Hay un flujo notorio de leucocitos al sitio de proceso inflamatorio y se piensa que las prostaglandinas y los leucotrienos, producidos por las células inflamatorias, tienen un papel importante en la amplificación de este proceso. Además los lisosomas activados por los leucocitos incrementan aún más la respuesta proliferativa e inflamatoria en los tejidos dañados. El infiltrado mononuclear que se observa de manera característica en fenómenos autoinmunes incluye la interacción de la fibronectina producida por los leucocitos PMN con los fibroblastos que pueden tener un papel importante en el proceso de daño tisular (1). También ocurre una reunión de linfocitos pequeños, células plasmáticas y macrófagos en las áreas perivasculares. El infiltrado de linfocitos generalmente está integrado por células T y B. La acción inmunológica recíproca de estas células conduce a la liberación de linco-

cinas responsables de la acumulación de macrolípidos en el interior del tejido dañado y a una síntesis continua de inmunoglobulinas o de FR que tienden a perpetuar el proceso patológico (1). Adicionalmente el antígeno y el anticuerpo constituido por FR pueden interactuar en diversos tejidos resultando una enfermedad extravascular causada por complejos inmunes. Estos reactantes activan el sistema del complemento generando fragmentos con actividad biológica (C3a - C5a) capaces de aumentar la permeabilidad vascular que permiten así el flujo de proteínas y elementos celulares del espacio vascular al sitio donde residen los inmunocomplejos (9,10). Una de las células sanguíneas ligadas a la destrucción tisular en autoinmunidad es el leucocito PMN, esta célula puede atrapar los complejos por poseer en su superficie receptores para la porción Fc de la IgG o bien receptores para el fragmento C3b del complemento. La fagocitosis subsecuente estimula por un lado la liberación de proteasas lisosomales que tienen el potencial de digerir colágena, matriz cartilaginosa y fibras elásticas y por otro lado se producen radicales libres de oxígeno y superóxido que causan daño celular directamente. La oxidación del ácido araquidónico con generación de prostaglandinas y otros productos inflamatorios por la vía de la lipooxigenasa, intensifican también la lesión tisular (11,12).

1.3 Características Físicoquímicas del FR y su Producción.

En base a los datos anteriores debemos destacar que se han detectado FR de la clase IgM, IgG e IgA y más raramente IgE y en vista de que todos actúan como autoanticuerpos dirigidos en contra de la porción Fc de la IgG, se han implementado diversos métodos de identificación.

Las técnicas rutinarias para detectar el FR en el laboratorio son reacciones de aglutinación tales como fijación a látex sensibilizados con IgG humana o con eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina (prueba de Waaier-Rose), en la cual las porciones Fc se exponen en la superficie (6, 13). Estas técnicas tienen la ventaja de ser sencillas pero determinan el nivel de FR como un título discontinuo el cual difícilmente puede ser relacionado a su concentración real. Además solo el FR de la clase IgM puede ser medido por métodos de aglutinación mientras que hay evidencias de que el FR de la clase IgG u otros isotipos más que el propio FR de la clase IgM puede estar implicado en algunos mecanismos patogénicos como la vasculitis (14).

Es por ello que a través del tiempo se han implementado nuevos métodos cada vez más útiles con los cuales, se ha logrado establecer que la estructura básica del FR de la clase IgM no parece diferir de la IgM 19s pentamérica sin esta actividad de autoanticuerpo.

La valencia esperada para el pentámero del FR de la clase IgM debería ser teóricamente de 10, pero con estudios de ultracentrifugación analítica se ha determinado que la valen-

cia actual para este pentámero es de cinco, y se ha visto -- que por impedimento estérico solo un sitio de combinación en cada subunidad puede unirse con la IgG.

La constante de asociación para la reacción "in vitro" -- entre el FR de la clase IgM y la IgG humana es baja variando alrededor de 10^{-4} a 10^{-5} mol/lit (15).

El acceso a pruebas de laboratorio más sofisticadas ha -- permitido estudiar los epitopes de la IgG humana que han sido reportados como sitios de unión potenciales para el FR de la clase IgM. Estos incluyen 1) Determinantes sobre la IgG humana nativa, tales como las subclases específicas o antígenos -- genéticamente definidos (Gm). 2) Determinantes presentes sobre la IgG agregada que solo se expresan mediante el uso de métodos fisicoquímicos (56°C 10^4) y no sobre epitopes en la -- IgG nativa y 3) Determinantes ocultos en la IgG nativa que -- son "expuestos" solamente a las enzimas proteolíticas.

De acuerdo con investigaciones previas se ha llegado a -- concluir también que residuos de tirosina así como de lisina que pertenecen a las porciones determinadas genéticamente --- (Gm) de la IgG humana, están involucrados en el sitio de reagr tividad antigénica de la IgG humana (15,16).

En años recientes varios grupos de investigadores han -- intentado definir los factores genéticos y/o moleculares que controlan la síntesis de FR, con el propósito de saber porqué los autoanticuerpos anti-IgG son producidos selectivamente en enfermedades autoinmunes sistémicas y en alteraciones linfo -- proliferativas. Las bases genéticas para el desarrollo del FR clase IgM no es conocido, pero se ha propuesto que está ligado

al marcador genético HLA-DR4, el cual se encuentra incrementado en la AR (17,18,19).

Sin embargo, también existen estudios donde demuestran que no hay relación entre el FR clase IgM y el HLA-DR4 (14, 15). Además se ha demostrado que en mujeres sanas con altos títulos de FR clase IgM sérica no muestran incremento en el gen HLA-DR4 (20). El mecanismo real que nos explique estos hechos no es conocido, más las evidencias disponibles sugieren que la región HLA-DR4 puede influenciar en la regulación de la respuesta inmune (21).

La primera demostración clara de síntesis espontánea de FR por células mononucleares de sangre periférica (CMNSP), fue reportada por Vaughan y cols. (22). Posteriormente se logró definir que el mejor activador policlonal para producir "in vitro" el FR es la fitolaca americana, y esto ha facilitado el estudio de los mecanismos de control de los linfocitos T sobre el FR (23). Además se ha visto que cultivos de CMNSP de algunos pacientes con AR que no producen FR en forma espontánea son capaces de sintetizarlo bajo el estímulo de este activador policlonal (24), diferencia que parece obedecer a que la síntesis espontánea es tipo independiente y que la fitolaca americana induce producción de FR dependiente de las células T (25).

Otros activadores policlonales de células B que han sido usados para estudiar la síntesis "in vitro" de FR, son el virus Epstein Barr, diversos lipopolisacáridos (26), y péptido glicanos bacterianos (27,28). Algunos cultivos de células de

individuos normales también sea capaces de producir FR "in vivo", aunque en concentraciones menores a la que sucede con células provenientes de pacientes con enfermedades autoinmunes (21).

1.4 Factor Reumatoide y Anti-Idiotipos

Los factores responsables que inducen la síntesis de FR en los padecimientos autoinmunes son hasta la fecha desconocidos, sin embargo, la manera por la cual puede llegarse a regular la producción de autoanticuerpos ha sido motivo de amplias investigaciones.

Una de las teorías que se ha postulado es la interacción de idiotipos con anti-idiotipos, que parece explicar la modulación de la producción de estos autoanticuerpos (29,30).

El mecanismo por el cual los anticuerpos antiidiotipo regulan la respuesta inmune permanece en duda, sin embargo se ha reportado que las células T y B expresan determinantes idiotípicos, y que los anticuerpos anti-idiotipo, pueden modular la producción de los autoanticuerpos iniciales (31). Además se cree que estos anticuerpos anti-idiotipo pueden influir en la inmunoregulación "in vivo" (32,33,34).

Todo esto se ha basado en la teoría de Jerne (35), que nos indica que por cada determinante antigénico encontrado por el sistema inmune, existe un idiotipo que almacena la imagen interna del antígeno precursor, cuya expresión puede tener papel inmunoregulador.

Existen hechos que soportan esta hipótesis, las cuales han sido derivadas de los estudios realizados en reacciones de anti-idiotipos con los receptores hormonales (36,37).

Específicamente se ha reportado que cuando se inmunizan conejos con FR humano policlonal se induce la producción de anticuerpos antiidiotipo que almacenan la imagen interna de el fragmento Fc de la IgG a la que va dirigida. Este anti-idiotipo ha demostrado que puede reaccionar tanto con moléculas de FR y con receptores para el FR que existen sobre los linfocitos B (29,38).

Las condiciones en las que ocurre todo lo anteriormente expuesto no ha sido esclarecido hasta la fecha en su totalidad (39), sin embargo, algunos detalles importantes que si se han podido comprobar, incluyen el hecho de que cuando se inmunizan conejos con un péptido correspondiente a la segunda región complementaria de un FR monoclonal no se induce la producción de anticuerpos antiidiotipo (32,39). Otro de los datos interesantes que se ha descubierto es que los anticuerpos antiidiotipo sólo son factibles de producirse "in vitro" en conejos (30), por lo que es importante tomarlo en cuenta en estudios experimentales, ya que se cree que los anticuerpos anti-idiotipo podrían representar los reactivos ideales para la regulación de la producción de autoanticuerpos y especialmente del FR (30,33),

Como ejemplo existen trabajos en los que se ha logrado purificar anticuerpos antiidiotipos en contra de FR, a partir de muestras de suero con FR positivo (29), siendo capaces de inhibir la actividad del suero de sus familiares en un rango del 40 al 60%, pero en cambio no inhibieron la actividad del FR de cinco sujetos con otros padecimientos au-

inmunes que no tenían esta relación familiar (29,38,40).

Estos datos pueden explicarse en base a que existen anti cuerpos antiidiotipo de reacción cruzada de 2 clases:

- 1) Los antiidiotipos que reaccionan con determinantes antigénicos asociados a la secuencia de aminoácidos en las cadenas ligeras y pesadas de la región variable y,
- 2) Los que poseen la imagen interna del antígeno, o sea que se unen a los anticuerpos con la misma especificidad que el antígeno primario (38,41).

1.2 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA EMPLEADA (ELISA)

Uno de los métodos estandarizados para la detección y cuantificación del PR es el radioinmunoanálisis, que cuenta con un alto grado de sensibilidad pero también con un gran riesgo de contaminación por el uso de reactivos radioactivos siendo el problema principal de hacer uso esta técnica de forma regular. Es por esto que se ha preferido estandarizar métodos inmunoenzimáticos (ELISA), que han mostrado tener la misma sensibilidad sin hacer uso de un indicador radioactivo.

El fundamento de esta técnica es usar un inmunoreactivo unido a una fase sólida por medio de una absorción hidrofóbica o por unión covalente, influenciada por el uso de una solución amortiguadora que mantenga el pH óptimo para que asegure las fuerzas de unión para la reacción Ag-Ac. En seguida se hace uso de un detergente para lavar los excesos de reactivos (Tween 20), y una proteína (BSA o gelatina) para saturar los sitios sin unir sobre la fase sólida, y así disminuir el porcentaje de absorción no específica de los inmunoreactivos. En seguida se incuba el espécimen clínico por el tiempo necesario, para después añadir el anticuerpo ligado a la enzima. La cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida es determinada por la adición del sustrato específico a la enzima empleada. La reacción subsecuente entre la enzima-sustrato es medida por la cantidad de color desarrollado en un espectrofotómetro o por visualización directa, siendo proporcional a la cantidad de enzima unida a la fase sólida en las reacciones previas (42).

2.0 JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El estudio del FR y sus mecanismos de control, incluyendo la producción de anticuerpos antidiotipo, sigue siendo un punto relevante para el conocimiento de la Artritis Reumatoide. Por esto el interés de este trabajo fue el de establecer un método idóneo para la purificación del FR y lograr así un ensayo de detección con alta sensibilidad y especificidad como es el de ELISA. Estas técnicas nos permitirán contar con un patrón de referencia del FR, y abordar la caracterización de idiotipos y anticuerpos antidiotipo en futuros estudios.

Además el ELISA facilitará la detección de FR en otros fluidos corporales y sobrenadantes de cultivo celular en donde este autoanticuerpo se encuentra a muy bajas concentraciones.

3.0 O B J E T I V O S

- 1.- Purificar Factor Reumatoide a partir de sueros de pa
cientes con Artritis Reumatoide, para contar con una
fuente de referencia en su detección en varios flui-
dos corporales en donde se encuentra a muy bajas con-
centraciones.
- 2.- Establecer un método inmunoenzimático (ELISA), sufi-
cientemente sensible y específico en base a la deteg-
ción de Factor Reumatoide purificado a partir de sue
ros de pacientes con Artritis Reumatoide.

4.0 HIPOTESIS

Una de las características del FR involucra una reacción específica de este autoanticuerpo con epítopes ubicados en la porción FC de las inmunoglobulinas. Por ello será posible contar con una técnica de alta eficiencia, para purificar este anticuerpo mediante una columna de afinidad, que nos permitirá establecer simultáneamente un método de alta sensibilidad y especificidad como es el ELISA para su detección.

3.0 MATERIALES Y METODOS

5.1 Material Biológico

Se trabajaron con 11 sueros de pacientes con AR, que -- cumplieron con los criterios internacionales para integrar -- los dentro de este tipo de enfermedad (43).

Todos presentaron FR positivo, detectado con la prueba de aglutinación con látex (Rapi-Tex RF Behring).

Además se manejaron 5 sueros de sujetos normales a los cuales se les realizó previamente la prueba de aglutinación con látex, resultando negativa.

5.2 METODOS

El trabajo se dividió fundamentalmente en 2 partes:

- I.- Purificación del FR por cada muestra.
- II.- Detección del FR purificado por el método de ELISA.

PARTE I

Se programaron 3 diferentes métodos, para lograr la purificación del FR, y para ello se decidió trabajar inicialmente con 5 muestras representativas para poner a prueba los 3 métodos y elegir el óptimo para los fines de este trabajo.

El diagrama de flujo que se muestra en seguida (fig.1), nos muestra los pasos que se siguieron para cada uno de los ensayos.

Como se observa en la fig. 1, un paso fundamental fue -- la columna de afinidad para capturar FR. Para esto fue necesario purificar previamente IgG de conejo, que fue la que -- nos sirvió como "antígeno" principal para acoplarla a sepharosa 4B y lograr la purificación de lo que en este caso co --

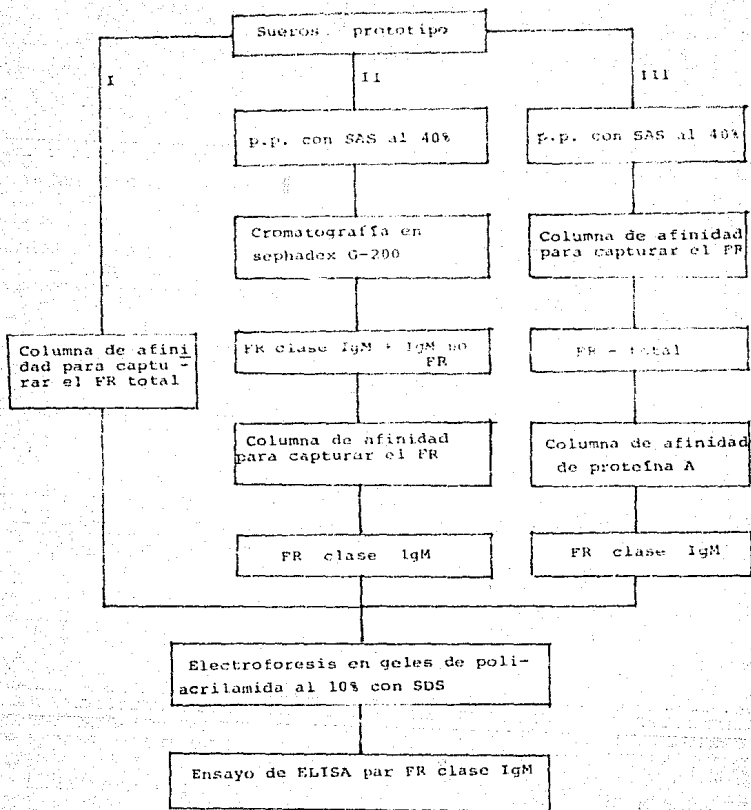


Fig. 1 Diagrama de flujo para la purificación y caracterización del FR. (Método I, II y III)

responde a nuestro anticuerpo (FR).

5.2.1. Purificación de la IgG de conejo

Los métodos de aislamiento y purificación de anticuerpos, se dividen en específicos y no específicos. Los métodos específicos, generalmente dan bajo rendimiento pero con alta pureza, y los inespecíficos se basan en las propiedades físicas del anticuerpo. En el presente trabajo se empleó este último método para el aislamiento de la IgG de conejo (44,45), siguiendo los pasos que se describen en seguida:

Precipitación con SAS al 3%

Se obtuvieron 50 ml de suero fresco de conejo sin inmunizaciones previas y se colocaron en un vaso de precipitados.

En baño de hielo y con agitación constante se le agregó gota a gota 25 ml de SAS. Este preparado se dejó agitando por un tiempo mínimo de 2 a 3 hr., con el fin de evitar el atrapamiento o arrastre mecánico de otros componentes del suero como lo es la albumina. Una vez pasado este tiempo se centrifugó a 3000 rpm 15' a 4°C (Centrifuga Beckman Modelo TJ-6); en seguida se decantó el sobrenadante con bomba de vacío y el precipitado se resuspendió en 25 ml de agua destilada.

Una vez hecho esto, se volvió a reprecipitar en la misma forma por 2 ocasiones más y finalmente el último precipitado se resuspendió con agua destilada usando un tercio del volumen original del suero. A continuación se dializó una primera vez en agua destilada y en otros 4 cambios en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 8, realizando los cambios

necesarios hasta la eliminación total de los iones sulfato - (45).

En este momento se contaba ya con las inmunoglobulinas totales del conejo, y para hacer la separación de la IgG solo fue necesario montar una columna de intercambio iónico, ya que la separación de sustancias con este tipo de resinas son de gran efectividad y confiabilidad en cuanto a su pureza (44,45).

5.2.2 Activación de la DEAE-Celulosa

Para cumplir con este procedimiento se pesaron 10 g de DEAE-Celulosa (Whatman DE-23) y se hidrató con agua desionizada, agitando ocasionalmente para excluir los fragmentos finos. En seguida, se filtró el exceso de agua y se le adicionaron 15 volúmenes de HCl 0.5N pH 2, dejando agitar lentamente con vacío para desgasificar durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se lavó con agua desionizada hasta que el filtrado registró un pH intermedio de 4. Justo en este momento se le agregaron a la resina 450 ml de NaOH 0.5N pH 11, agitando durante 30 minutos lentamente y bajo condiciones de vacío para desgasificar.

Este preparado se filtró y se reuspendió de nueva cuenta en 450 ml de NaOH 0.5N pH 11, bajo agitación y vacío, durante 30 minutos. En seguida se lavó con agua desionizada hasta que el filtrado presentará un pH de 7.

Para que la celulosa adquiriera el pH requerido se filtraron 250 ml de solución amortiguadora de fosfatos diez veces más concentrado al deseado. En este caso fue de pH 8 y

a una concentración 0.1M. En seguida se continuó lavando con solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 8 hasta que el filtrado registró el mismo pH de entrada que de salida. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada (45).

5.2.3. Empaque de la Columna

Para empacar la resina se usó una columna de vidrio de 50 cm de largo por 3 cm de diámetro interno. Inicialmente se dejó recircular por la columna la solución amortiguadora de equilibrio (fosfatos 0.01M pH 8).

Se empacó la columna teniendo la resina perfectamente resuspendida en la solución de equilibrio y haciendo la adición por partes, permitiendo así su perfecto empaque. Una vez que el total de la resina fue adicionada, se dejó recircular la solución de equilibrio hasta que se obtuvo el mismo pH de entrada que de salida.

Adición de la muestra a la columna de DEAE-Celulosa

Al procesar la muestra se tomó en cuenta que por cada gramo de resina se separan aproximadamente 100 mg de proteína (según especificación del fabricante Whatman De-24). Se dejó que la solución de separación (fosfatos 0.01M pH 8), alcanzara el borde superior de la resina y se le adicionó la cantidad precisa de la muestra (cuantificada por el método de Lowry), por las paredes de la columna. En este caso debido a que solo nos interesaba purificar la IgG de las demás globulinas, no hubo necesidad de hacer un gradiente de concentración ó variación de pH de la solución.

Durante el procedimiento se estuvieron recibiendo fracciones de 3 ml, a las cuales se les hizo la detección de proteínas en un espectrofotómetro (Beckman) a 280 nm con luz -- U.V.

El pico de eluado que nos señaló la presencia de proteínas fue recolectado y dializado en solución amortiguadora de fosfatos pH 8 con los cambios necesarios. Todo el proceso de montaje y corrimiento de la columna, previamente descrito, -- fue realizado a 4°C.

La purificación de la IgG humana se realizó, empleando la misma metodología descrita para la IgG de conejo; y su -- agregación solo requirió de someter la muestra pura, a 63°C por 10 minutos (46).

5.2.4. Caracterización de las IgG Purificadas

La determinación de la pureza de las inmunoglobulinas -- aisladas se llevó a cabo mediante una prueba de Ouchterlony, y se corroboró con una electroforesis en geles de poliacrilmida en presencia de SDS, ya que esta técnica representa un método analítico de muy alta resolución, y puede proporcionar informes acerca del tamaño, conformación y carga de -- las moléculas separadas (47).

Para este método se ensamblaron las paredes de los vidrios, del aparato de electroforesis (Protean II Slab Cell -- Bio-Rad), y utilizando separadores de 1.5 mm de grosor se -- formó un sandwich con dimensiones de 16 X 20 cm.

Por repetición con un volumen de 31.5 ml de la siguiente manera:

Solución stock de acrilamida	11.7 ml
Solución amortiguadora de TRIS-HCl	14.8 ml
1.5M pH 8.8	4.8 ml
SDS al 10%	0.3 ml
Agua destilada	0.5 ml
Persulfato de amonio	0.5 ml
TEMED	0.01 ml

Para obtener una mejor polimerización, se eliminó el aire presente utilizando vacío y agitación. En seguida se tomaron 31.5 ml de la mezcla anterior y se vertió entre las placas de vidrio evitando la formación de burbujas. Después de transcurridos 30 minutos se eliminó el exceso de agua de la superficie una vez que el gel estaba ya formado, y se colocó un peine de teflón de 1 cm por encima del mismo.

Para la preparación del gel concentrado se mezclaron en un matraz kitazato las siguientes soluciones:

Solución stock de acrilamida	1.3 ml
Sol. amortiguadora de TRIS-HCl pH 8.8	2.3 ml
SDS al 10%	0.1 ml
Agua destilada	0.1 ml
Persulfato de amonio	0.05 ml
TEMED	0.01 ml

Nuevamente se eliminó el aire de la mezcla con vacío y agitación durante 1 minuto, y el preparado se vertió entre las placas de vidrio sobre el gel separador evitando la formación de burbujas.

Se permitió la polimerización durante 30 minutos y se eliminó el agua excedente procurando dejar perfectamente secos los pozos formados con el peine, donde se colocan las muestras para ser separadas electroforéticamente.

Las muestras fueron preparadas antes de someterlas al corrimiento electroforético con solución amortiguadora de TRIS-HCl 0.125M pH 6.8, SDS al 4%, Glicerol al 20%, 2 mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0.01% y calentando a 92 °C en un baño de agua durante 5 minutos.

El volúmen de esta preparación dependió de la concentración de proteínas a la que se ajustó cada muestra.

La separación electroforética de las muestras se realizó a una corriente constante de 30 mA por gel con incremento gradual del voltaje de 100 a 400 volts, durante aproximadamente 4 horas y en presencia de una solución amortiguadora de TRIS 0.025M, Glicina 0.192M, SDS 0.1% pH 8.3. La temperatura se reguló con un sistema de refrigeración a una cifra constante de 4°C.

Tinción con Azul de Coomassie

Al terminar la electroforesis los geles fueron separados de las placas de vidrio y fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie al 0.125% con metanol al 50% y ácido acético al 10% la cual se dejó agitando toda la noche.

El exceso de colorante se eliminó con cambios sucesivos de solución amortiguadora decoloradora de metanol al 50% con ácido acético al 10%.

En este trabajo se empleó esta técnica con la finalidad de caracterizar y checar la pureza de las fracciones que se obtuvieron, por lo que fue necesario correr al mismo tiempo que las muestras purificadas, proteínas puras de peso molecular conocido como marcadores de peso.

Una vez que se comprobó la pureza de la IgG de conejo, se procedió al acoplamiento de esta inmunoglobulina a la sepharosa 4B, para obtener lo que nosotros denominaremos en lo subsecuente como "Columna de Afinidad para FR". Como primer paso fue necesario activar la sepharosa 4B de la siguiente manera:

5.2.5. Activación de la Sepharosa 4B

Se pesaron 20 g de la sepharosa 4B húmeda (Farmacia), y se lavó perfectamente con agua destilada fría. En una campana de extracción se le adicionaron 2g de Bromuro de Cianógeno (CNBr - Farmacia), con agitación lenta. Una vez disuelto el CNBr, se llevó a un pH de 11 con una solución de NaOH 2N, manteniéndolo constante durante 8 minutos. En seguida se filtró y se lavó varias veces con agua destilada fría y una última vez con NaHCO_3 0.1M.

Para el acoplamiento del antígeno se separó el gel de la sepharosa activada por filtración y se añadió un volumen igual de solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos - 0.1M pH 8.3 NaCl 0.5M que contenía de 5 a 10 mg de proteína a fijar por cada ml de gel. En seguida se mezcló por inversión durante 2 hr a temperatura ambiente, siendo importante mencionar que nunca se debe de usar barra magnética para las

agitaciones, ya que se pueden romper las esferas de la sepharosa 4B. El exceso de ligando se lavó con el tampón de acoplamiento y se bloquearon los grupos activos con amortiguador de TRIS-HCl 0.1M pH 8.0 durante 2 horas a temperatura ambiente. Este preparado se filtró y lavó con la solución amortiguadora de fijación, en seguida con una de acetatos 0.1M NaCl 0.5M - y finalmente con la solución amortiguadora de fijación de carbonatos-bicarbonatos (45).

Para determinar la cantidad óptima de proteína que se fijaba al adsorbente, se hicieron ensayos piloto usando alícuotas de sepharosa 4B-activada con cantidades variables del antígeno (16).

Para lograr los objetivos de purificación del FR por el método II, fue necesario preparar una columna de exclusión - por peso molecular; y por ello se seleccionó el uso de sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals), tomando en cuenta los límites de exclusión que nos permiten separar con mayor eficiencia las inmunoglobulinas séricas y de éstas la IgM, que es a la clase que corresponde el FR.

5.2.6. Preparación del Sephadex G-200

Para la preparación del gel se pesaron 3g de sephadex - G-200 (Pharmacia Fine Chemicals), y se le añadieron 200 ml - de solución amortiguadora de filtración de acetatos 0.1M - pH 5; se agitó suavemente con una varilla de vidrio y se dejó reposar durante treinta minutos en un baño de agua hir - viente por 2 horas.

Para llevar a cabo una reconstitución correcta del gel, se decantó y se volvió a reemplazar la solución amortiguadora, pero en esta ocasión a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el aire presente en el gel mediante la aplicación de vacío y una vez que el preparado estuvo perfectamente deaerado se vertió dentro de una columna de vidrio de 70 cm de largo por 2 cm de diámetro interno. El vaciado en este contenedor se hizo de un solo paso para evitar posibles estratificaciones o formación de burbujas. Finalmente se dejó correr la solución amortiguadora (acetatos 0.1M pH 5) hasta obtener un flujo constante (45).

5.2.7. Desarrollo Práctico de cada uno de los métodos para la purificación del Factor Reumatoide

METODO I

En esta técnica se partió de 3 ml de suero por paciente, y se prosiguió de la siguiente manera. La columna de afinidad para FR se lavó perfectamente con PBS hasta que se registró una lectura de ceros a 280 nm en luz U.V. En seguida se colocaron 3 ml de suero sobre la columna dejándolos recircular durante 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente dejarlos incubar durante 24 hr a 4°C (46,48).

Después de este paso, se lavó la columna en forma exhaustiva con PBS (aproximadamente 150 ml), hasta que no se registrara la presencia de proteínas a 280 nm en U.V.

La separación del anticuerpo adsorbido se realizó con una solución de glicina-HCl 0.2M pH 2.8.

La separación del anticuerpo adsorbido se realizó con una solución de glicina-HCl 0.2M pH 2.9.

Al colectar las fracciones (2ml c/u), se recibieron sobre 100 μ l de TRIS 0.2M pH 8.8.

Finalmente se neutralizó la columna con PBS y se siguió lavando hasta que no se detectaron proteínas (12, 19, 20).

La concentración de proteínas de las fracciones recolectadas se leyeron a 280 nm en U.V., reuniendo las que contenían el pico de elusión, para dializarlas después, durante 48 horas en contra de PBS. La concentración de estas muestras se realizó con membranas de Amicón de 30 000 de peso molecular, para llevar a un volumen final de 3 ml. Con el objeto de probar la especificidad de la columna se recirculó el suero de cuatro sujetos sanos, observando que no había captura de anticuerpos.

METODO II

En esta técnica se partió de 10 ml de suero por paciente y se prosiguió de la siguiente manera: Inicialmente se precipitaron las globulinas totales con SAS al 40%, concentración que fue seleccionada con base a estudios previos de purificación del FR (40,48). El precipitado final se dializó con 3 diferentes cambios; el primero contra agua destilada; el segundo en PBS y el tercero en contra de solución amortiguadora de acetatos pH 5. Estas gamaglobulinas precipitadas fueron separadas en un segundo paso en una columna de sephadex G-200.

La adición de las muestras a estudiar en la columna de peso molecular se hizo con mucho cuidado para no remover la superficie y evitar interferir en la elución de las inmunoglobulinas a lo largo del corrimiento. La recolección de fracciones se inició con un volumen de 3 ml cada una, sobre una base de TRIS 0.1M pH 8.8 . Con este método se recolectaron 70 -- fracciones en total, las cuales fueron leídas a 280 nm en luz U.V. Al final las fracciones correspondientes al primer pico de elución representaron la IgM sin actividad de FR, así como también al FR de la clase IgM (45).

En un segundo paso se debería adsorber el dializado por la columna de afinidad para FR, con la finalidad de separar el FR de la clase M de la IgM no FR (48). Sin embargo, debido a que la resolución en la separación de las globulinas totales por la columna de Sephadex G-200, fue muy pobre entonces se descartó en lo subsecuente este método para la purificación del FR.

METODO III

En este método se partió de 10 ml de suero por cada paciente y se prosigió de la siguiente manera; se precipitaron las gamaglobulinas totales de cada muestra con SAS al 10% (49), de la manera descrita. Al obtener el último precipitado este fue resuspendido en 5 ml de PBS, y en seguida se adsorbió por una columna de afinidad con sepharosa 4B la cual tenía acoplada protefina A de S. aureus (Sigma Co.). El procedimiento por el cual se hizo la adsorción por esta columna fue similar al empleado en la columna de afinidad para FR.

Este procedimiento se realizó con el objeto de separar el FR de la clase IgG del FR de la clase IgM de una manera más rápida y eficaz (40,48), ya que el primer anticuerpo se capturó directamente con la proteína A y el FR de la clase IgM se obtuvo en la porción que no se fijó a la columna.

La identificación y caracterización del FR obtenido por los diferentes métodos, se realizó mediante una prueba de Ouchterlony y una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, la cual ya ha sido previamente descrita con detalle. En este estudio se corrieron en forma análoga 4 proteínas puras de peso molecular conocido que se emplearon como marcadores de peso. Estas referencias y los FR estudiados fueron teñidos con azul de Coomassie al mismo tiempo. Las proteínas puras que se emplearon fueron las siguientes:

PROTEINA	PESO MOLECULAR Kd
Lactoalbúmina	20 000
Albúmina de huevo	43 000
Albúmina bovina	67 000
Fructuosa 6 P cinasa	94 000

Para obtener el valor de Rf de cada uno de los experimentos, se midió la distancia del recorrido de cada uno de los geles teñidos, así como la distancia del recorrido de los marcadores y, estos resultados se graficaron contra el logaritmo del peso molecular conocido.

De esta forma se obtuvo el valor de Rf aplicando la fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la proteína pura}}{\text{Distancia total recorrida}}$$

La gráfica linearizada que se obtuvo para los marcadores mencionados es la que se muestra en la fig. 2.

Para obtener el peso molecular de cada una de las bandas problema, correspondiente a cada uno de los FR purificados, - se calculó el valor del Rf y se interpoló en la gráfica correspondiente.

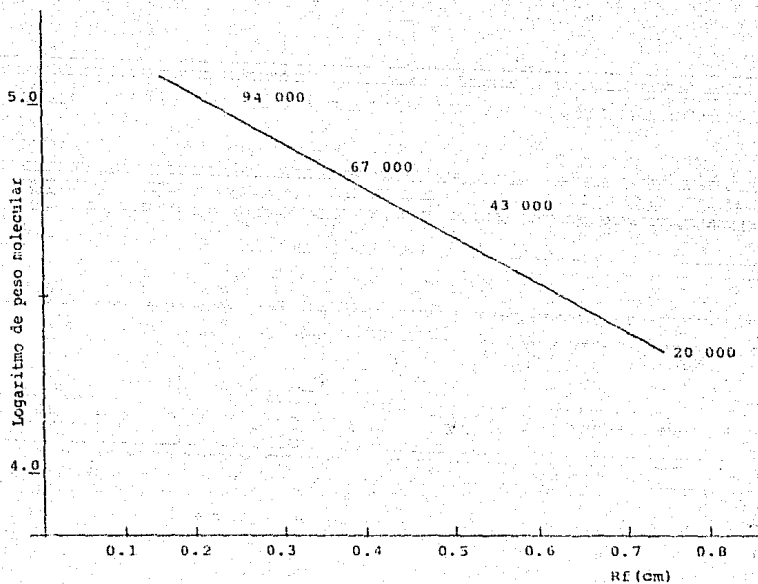


Fig. 2 Curva estandar linearizada para los marcadores de peso molecular.

PARTE II

5.2.8. Detección del FR purificado por el Método de ELISA

Para detectar el FR purificado que se obtuvo a partir de los métodos descritos se empleó el método de ELISA de acuerdo a los siguientes pasos:

La concentración de proteínas de cada muestra purificada de FR, previamente se ajustó a una concentración de $6 \mu\text{g/ml}$ - usando el método de Lowry (ver anexo).

Para sensibilizar las placas de poliestireno (Nunc-Inter-med U.S.A), se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de IgG humana agregada por calor, a una concentración de $60 \mu\text{g/ml}$ en solución amortiguadora de carbonatos 0.05M pH 9.6 y se incubaron durante 24 horas a 4°C (38). A continuación se lavaron las placas 5 veces con $200 \mu\text{l}$ de PBS-Tween 20 (Sigma Co.) al 0.05% y se procedió a bloquear los sitios de unión con $100 \mu\text{l}$ de PBS-Tween 20 con teniendo albumina bovina (Sigma Co.) a una concentración de 10mg/ml durante 2 hr a 37°C ó 24 hr a 4°C . Las placas se lavaron nuevamente con PBS-Tween 20 al 0.05% y se colocaron $100 \mu\text{l}$ de cada muestra problema a la concentración ajustada de $6 \mu\text{g/ml}$, diluidas en PBS-Tween y se incubaron durante 1 hora a 37°C . En seguida, se lavaron 5 veces más y se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de anti-IgM humana marcada con peroxidasa a una dilución de 1:1000 (Sigma Co.), que fue la dilución seleccionada como la óptima para este ensayo. Esta inculación se realizó durante 1 hr a 37°C . Por última vez se lavaron las placas y se les adicionaron $100 \mu\text{l}$ del sustrato para peroxidasa; consistente en 4mg de orto-fenilendiamina (OPD) con $5 \mu\text{l}$ de

peróxido de hidrógeno en 10 ml de solución amortiguadora - - de citratos-fosfatos 0.1M pH 5. La reacción enzimática se de - tuvo a los 10 minutos con la adición de 50 μ l de H_2SO_4 2.5 M y el desarrollo de color se registró a 490 nm en un lector de placas de ELISA (Dynatech).

A cada uno de los purificados se les realizó las pruebas de látex y nefelometría (NF) para FR con el objeto de hacer - una comparación de estos métodos.

5.2.9. Método de ELISA para cuantificar la cantidad de

IgM presente en cada uno de los purificados

Para establecer la concentración total de IgM en las --- muestras estudiadas se estableció un método de ELISA, siguiendo los siguientes pasos:

Se sensibilizaron placas de poliestireno (Nunc-Intermed-U.S.A.) con 100 μ l de las muestras a estudiar a una concentración fija de 6 μ g/ml (cuantificadas por el método de Lowry), - en solución amortiguadora de carbonatos 0.05M pH 9.6 durante 24 horas a 4°C. Después se lavaron las placas 5 veces con - - 200 μ l de PBS-Tween al 0.05% y se bloquearon con 100 μ l de -- PBS-Tween conteniendo albúmina bovina a una concentración de 10 mg/ml, durante 2 hr a 37°C o 24 hr a 4°C. Las placas se -- lavaron igual que en el paso anterior y se colocaron 100 μ l de anti-IgM humana marcada con peroxidasa a una dilución de - - - 1:1000 (Sigma Co.) en PBS-Tween durante 1 hr a 37°C. Posteriormente se lavaron estas placas 5 veces y la reacción antígeno - anticuerpo se reveló con 4 mg de OFD y 5 μ l de peróxido de hidrógeno en 10 ml de solución amortiguadora de citratos-fosfatos 0.1 M pH 5.

La reacción enzimática se detuvo a los 3 minutos con --
50 μ l de H_2SO_4 2.5M y se realizó la lectura de ELISA a 490 nm.

Como estándar se incluyó una IgM humana semipurificada -
de concentración conocida, usando diferentes diluciones para
establecer una curva de D.O. contra concentración.

Para corroborar la especificidad del ensayo de detección
de FR se diseñó un ELISA control que se realizó de la siguiente
manera:

Las placas de poliestireno (Nunc-Intermed U.S.A.), se --
sensibilizaron con 100 μ l de extracto de M. tuberculosis (do-
nado por el departamento de Microbiología-INER), a una concen-
tración de 10 μ g/ml en solución amortiguadora de carbonatos -
0.05M pH 9.6 durante 24 hr a 4°C (51). Posteriormente se la -
varon las placas 5 veces con 200 μ l de PBS-Tween 20 al 0.05%,
para en seguida bloquearlas con 100 μ l de PBS-Tween albúmina
bovina a una concentración de 10 mg/ml durante 2 hr a 37°C o
por espacio de 24 hr a 4°C. Las placas se lavaron nuevamente
de la misma manera y se le adicionaron 100 μ l de los FR pu-
rificados a una concentración de 6 μ g/ml dejándolos incubar
durante 1 hr a 37°C. En seguida la placa se lavó 5 veces más
y se incubaron 100 μ l de anti-IgM humana marcada con peroxidasa
(Sigma Co.) a una dilución de 1:1000 durante 1 hr a 37°C.

Finalmente las placas se lavaron por última vez y se -
les adicionó el revelador de la enzima, consistente en 4 mg
de orto-fenilendiamina (OFD) con 5 μ l de peróxido de hidrógeno
en 10 ml de solución amortiguadora de citratos-fosfatos
0.1M pH 5.

La reacción se detuvo a los 15 minutos con 50 μ l de --
 H_2SO_4 2.5 M y la lectura se realizó a 490 nm.

En los 3 métodos de ELISA anteriormente descritos , se estuvo trabajando en forma analoga con 4 sueros de sujetos sanos, así como con una IgM normal semipurificada que fun -
gían como nuestros controles negativos. La dilución de los sueros normales para dichos ensayos fue de 1:250 y la IgM semipurificada se ajustó a una concentración de 6 g/ml.

6.0 RESULTADOS

6.1 Identificación y Caracterización de las IgG

Una vez obtenida la IgG de conejo y humana se realizaron pruebas de Ouchterlony con los antisueros respectivos, obteniendo una sola banda de precipitación, después del lavado -- con citrato de sodio 0.17 M, que eliminó las bandas de precipitación inespecífica. Además la caracterización de la muestra purificada de IgG de conejo que se empleó para preparar la columna de afinidad para capturar FR, se realizó por electroforesis y sus resultados se muestran en la fig. 3; En esta imagen se encuentra también el patrón de corrimiento electroforético de la IgG humana purificada que se empleó en el método de ELISA.

Como podemos apreciar tanto la IgG de conejo como humana, tuvieron 2 bandas de corrimiento correspondientes a las cadenas ligeras y pesadas de estas inmunoglobulinas.

6.2 Purificación del Factor Reumatoide

Los procedimientos de aislamiento del FR fueron realizados en 5 diferentes muestras de suero denominadas en los subsecuente como sueros prototipos, con el objeto de seleccionar el método óptimo de purificación de este autoanticuerpo.

En general por los 3 métodos (I, II y III), se obtuvieron resultados similares en cuanto a la actividad del FR, pero cada uno difiere en cuanto a su facilidad técnica, grado de pureza y rendimiento.

La columna de afinidad para FR en el método I operaba como lo muestra la fig.4. El pice de mayor absorbancia que apa-

reci6 entre las fracciones 6 a 8 es el que nos indic6 la presencia del FR capturado en cada una de las muestras prototipo.

El comportamiento de cada ensayo fue ligeramente diferente dependiendo de la concentraci6n del FR en la muestra original, que vari6 entre 1 a 2 mg/ml por muestra purificada, detectada por el m6todo de Lowry.

La primera fase de identificaci6n de estos purificados se realiz6 con una prueba de Ouchterlony, empleando como antisue- ros una anti-IgM humana (Sigma Co.) y una anti-IgG humana (Sigma Co.).

El corrimiento electrofor6tico de los FR prototipo que se obtuvieron en cada muestra, una vez que fueron adsorbidos por la columna de afinidad, se aprecia en la fig. 5.

En el m6todo II, se obtuvo una gr6fica de menor definici6n que en el m6todo I, para cada una de las muestras prototipo uno de cuyos ejemplos se se6ala en la fig. 6. La tendencia fue la misma para todas las muestras prototipo y como podemos apreciar se obtuvieron diferentes picos tal y como se espera en una cromatograf6a de peso molecular. Adem6s la concentraci6n de prote6nas fue mucho menor al obtenido por el m6todo I.

El corrimiento electrofor6tico del FR que se obtuvo al final de este m6todo se muestra en la fig. 7, destacando en ella una gran diversidad de bandas, debidas a que desde el inicio no se obtuvo una buena resoluci6n en los picos del eluado por la columna de sephadex G-200.

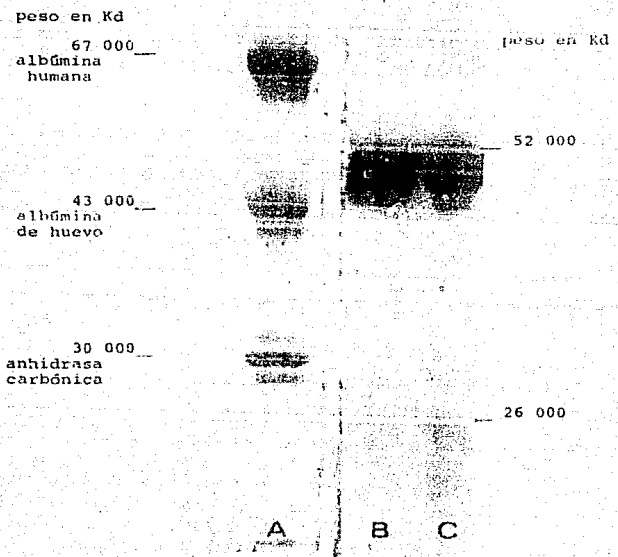


Fig. 3 Patrón de corrimiento electroforético de
 A) marcadores de P.M. conocido. B) IgG de conejo purificada con SAS al 33%. C) IgG humana purificada con SAS al 33%.

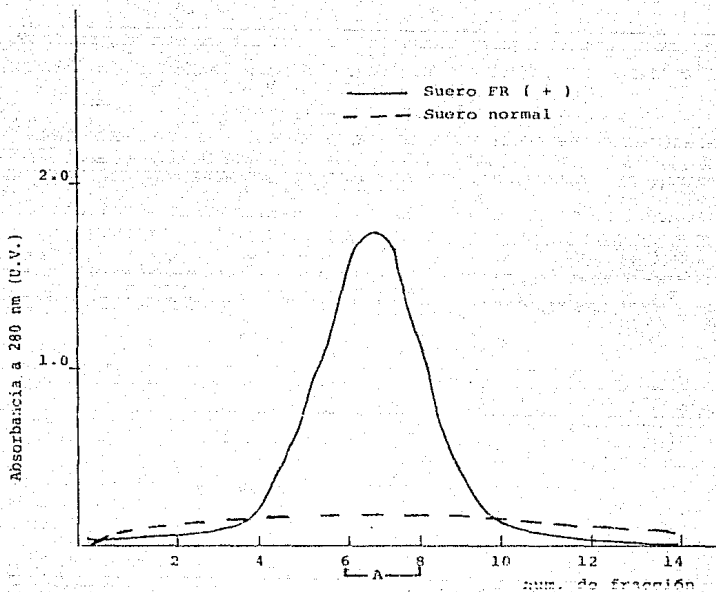


Fig. 4 Comportamiento gráfico del FR, sobre la columna de afinidad sepharosa 4B.
 A) Fracciones recolectadas (FR-total) para electroforesis.

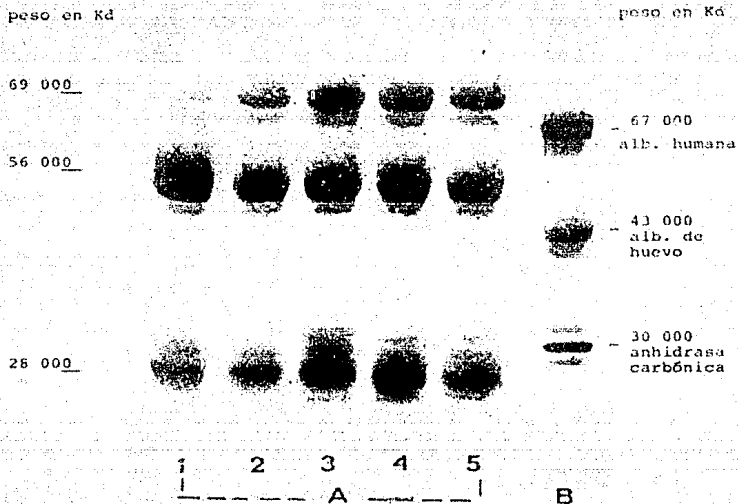


Fig. 5 A) Corrimiento electroforético del FR capturado en las muestras de suero prototipo, por el método I de purificación. B) Marcadores de P.M. conocido.

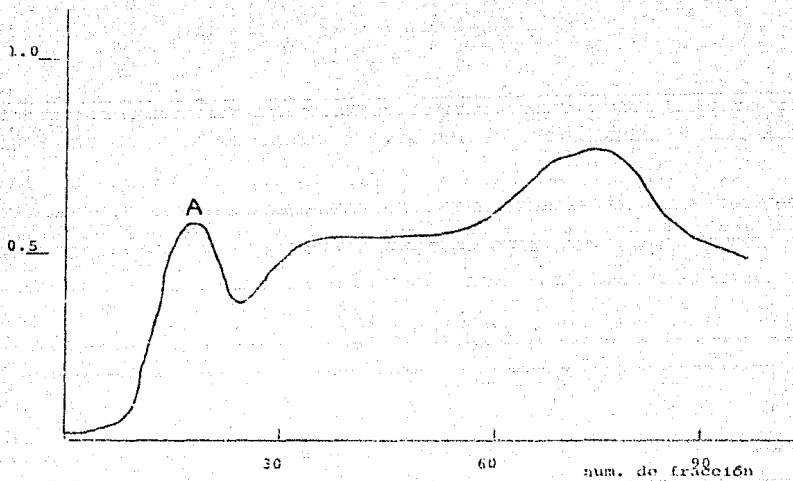


Fig. 6 Perfil del eluido de gamaglobulinas totales de una muestra FR positivo por la columna de sephadex G-200. El pico A teóricamente contiene al FR clase M y a la IgM no FR.

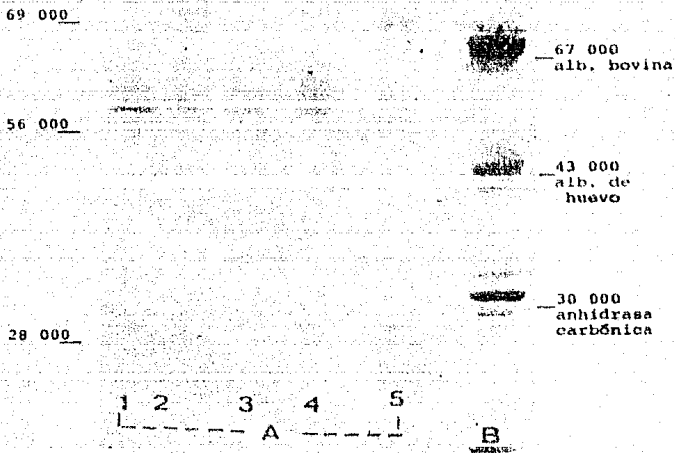


Fig. 7 A) Corrimiento electroforético del primer pico de elución, obtenido de las muestras prototipo para purificar el FR clase M por columna de sephadex G-200 (método II). B) Marcadores de P.M. conocido.

Tanto por el bajo rendimiento, como por la falta de pureza de este FR descartamos este método de purificación, en los experimentos subsecuentes.

Con el método III el tipo de gráfica representativa que se obtuvo con las muestras prototipo adsorbidas por la columna de proteína A (Sigma Co.) acoplada a sepharosa 4B, se muestra en la fig. 8; debiendo hacer notar que aquí el pico de mayor absorbancia nos marca la presencia de FR de la clase IgG, mientras que la fracción que no se logró capturar correspondió al FR de la clase IgM. Un ejemplo de los resultados de la electroforesis para la caracterización del FR de la clase IgM se encuentra en la fig. 9, donde se evidencia claramente un buen grado de purificación, ya que sólo hay 2 bandas correspondientes, según los marcadores de peso molecular, a las cadenas pesadas y ligeras de esta inmunoglobulina.

6.3 Eficiencia de los Diferentes Métodos de Purificación.

Al comparar la concentración de proteínas totales como un parámetro de la eficiencia de la purificación para cada una de las fracciones obtenidas al final de los métodos I y III que fueron los más útiles, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla num. 1. Las cifras dadas en esta tabla están dadas para un volumen final de 3 ml para cada una de las muestras y revela una mayor capacidad para obtener FR, al emplear la columna de afinidad directamente (método I).

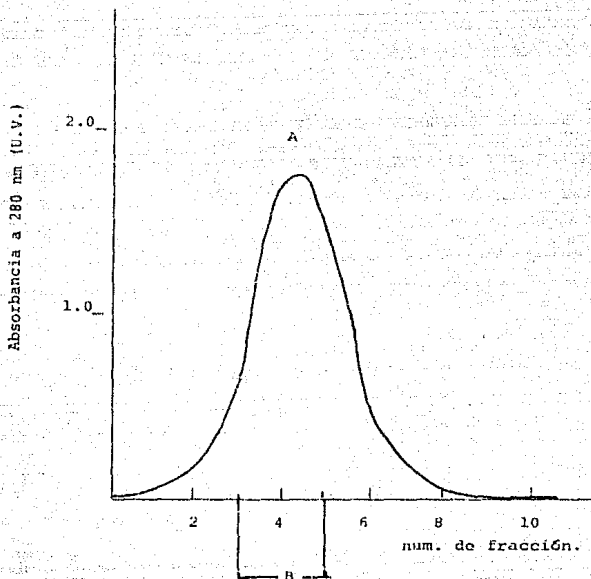


Fig. 8 Funcionamiento gráfico de la columna de afinidad de proteína A de S. aureus.

A) Pico de mayor absorbancia

B) Fracciones recolectadas

peso en
Kd

peso en Kd

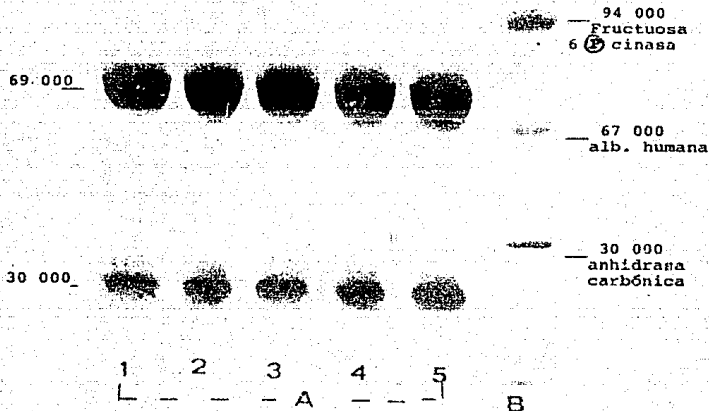


Fig. 9 Corrimiento electroforetico de los FR clase IgM, purificados por el método III en el cual se emplearon 2 columnas de afinidad. B) Marcadores de P.M.

Una vez obtenidos los purificados del FR se procedió a realizar su determinación mediante los diferentes métodos accesibles al laboratorio clínico, como lo es el de aglutinación con partículas de látex y nefelometría (NF), para posteriormente hacer una comparación con los datos obtenidos en el ELISA estandarizado.

En la tabla 2, se muestran los resultados de la detección del FR por los 3 diferentes métodos empleados a las muestras prototipo obtenidas por los métodos I y III; apreciando que solo dieron lecturas positivas por látex y NF las muestras del método I, que fueron las que contenían una mayor concentración de proteínas y eran accesibles de estudiarlas por estas técnicas.

De los datos obtenidos en la tabla 2, se deriva claramente que los resultados obtenidos por ELISA, fueron mayores en las muestras purificadas por el método I, que como mencionamos, fue el que dio una mayor eficiencia para su purificación.

Además de los sueros prototipos, estudiamos 6 muestras adicionales, que fueron purificadas por el método I, una vez que fue seleccionado como el más útil. A estas muestras también se les determinó FR por nefelometría (NF), aglutinación con látex y ELISA. Los resultados correspondientes se muestran en la tabla 3. De esta manera se observa que existió una relación entre la positividad de los diferentes ensayos y en algunos casos donde la prueba de látex tuvo una pobre sensibilidad, el FR fue positivo por NF y ELISA.

**TABLA 1 - CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES PARA
CADA UNA DE LAS FRACCIONES AISLADAS**

Muestra ^a	Método I ^b	Método III ^c concentración ^d
1	1.92	1.2
2	1.44	0.98
3	2.83	1.10
4	1.32	0.94
5	1.06	0.76

- a - Fracción de FR aislado a partir de sueros de pacientes con AR.
- b - Empleo de una sola columna de afinidad (sepharosa 4B-IgG de conejo).
- c - Empleo de 2 columnas de afinidad, la del método I y además sepharosa 4B-proteína A.
- d - Valores dados en mg/ml

Tabla 2 - Determinación de la eficiencia de los métodos de purificación (I y III), detectando el FR por diferentes métodos.

Mta.	METODO I			METODO III		
	FR ** (látex)	FR IgM ** (NF U.I.)	FR *** (ELISA D.O.)	FR ** (látex)	FR IgM ** (NF U.I.)	FR *** (ELISA D.O.)
1	positivo	538	0.92	neg.	neg.	0.76
2	negativo	841	1.0	neg.	neg.	0.78
3	negativo	404	0.88	neg.	neg.	0.66
4	negativo	201	0.72	neg.	neg.	0.64
5	positivo	733	0.98	neg.	neg.	0.72

* Fracción de FR aislada a partir de los sueros prototipo

** La detección se realizó con 10 l de la fracción sin diluir.

*** La detección se realizó ajustando cada una de las fracciones de 60 g/ml.

TABLA 3 Determinación de FR a las fracciones purificadas en forma adicional, por el método I.

Muestra	FR (látex) **	FR (NF) **	FR (ELISA) ***
		U. I.	clase M D.O.
6	positivo	insuf.	0.86
7	negativo	231	0.91
8	negativo	138	0.85
9	negativo	insuf.	0.70
10	negativo	75	0.68
11	positivo	251	0.90

* Fracción de Fr aislada a partir de los sueros adicionales, una vez que se seleccionó el método I, como el óptimo para nuestros objetivos.

** La detección se realizó con 10 μ l de la fracción.

*** La detección se realizó ajustando cada una de las fracciones a una concentración de 60 μ g/ml

Como un control de los ensayos se incluyeron 4 sueros - de sujetos sanos en forma paralela, los cuales fueron negativos en la prueba de FR por látex y NF. Estos 4 sueros y la - IgM normal semipurificada fueron los que fungieron como muestros controles negativos, en los ensayos de ELISA.

Los resultados de ELISA de los sueros positivos y los - controles se aprecian en la tabla 4. Estos datos hacen clara una diferencia entre ambos tipos de muestras con una lectura menor de 0.12 de D.O. en los sueros negativos y superior a - 0.60 de D.O. en los sueros positivos. Las lecturas menores de 0.20 de D.O. coincide con los criterios de pruebas negativas por ELISA en otros sistemas de antígeno-anticuerpo (42,52).

El ELISA CONTROL realizado en el total de las muestras - apoya el hecho de que el FR detectado (anticuerpo), se unfa - de forma específica a el antígeno sensibilizado (IgG humana - agregada), ya que cuando las placas fueron sensibilizadas con un antígeno diferente (extracto de M. tuberculosis), las muestras de FR no reaccionaron, haciendo evidente por las D.O. -- obtenidas (menores de 0.10) en todos los casos.

Un último parámetro determinado por ELISA fue la concen - tración de IgM total presente en cada muestra, usando como -- estándar una IgM semipurificada de concentración conocida.

La curva linearizada para las D.O. obtenidas en las di - ferentes diluciones de este estándar se presenta en la fig. - 10. La interpolación de las D.O. con la concentración conoci - da de IgM nos permitió determinar la concentración de IgM en cada una de las muestras problema con FR positivo.

TABLA 4 - Resultados globales de los ensayos evaluados en los sueros originales en las fracciones de FR aisladas por el Método I de purificación.

Muestra	Título de FR por látex (suero original)	Prueba de látex a la fracción purificada	NF a la fracción purificada. (U.I.)	FR clase M a la fracción purificada (D.O.)
1	1:640	positivo	538	0.92
2	1:1280	positivo	841	1.0
3	1:640	negativo	404	0.88
4	1:320	negativo	201	0.72
5	1:1280	positivo	733	0.98
6	1:640	positivo	*	0.86
7	1:640	negativo	231	0.91
8	1:1280	negativo	133	0.85
9	1:640	negativo	*	0.70
10	1:640	negativo	75	0.68
11	1:2560	positivo	251	0.90
12	negativo	negativo**	negativo**	0.20
13	negativo	negativo**	negativo**	0.14
14	negativo	negativo**	negativo**	0.12
15	negativo	negativo**	negativo**	0.13

Las muestras del 1 a 10 corresponden a pacientes con AP

Las muestras del 12 a 14 corresponden a sujetos sanos

La muestra 15 pertenece a la IgM humana semipurificada

* muestra insuficiente

** muestra original

TABLA 5 Determinación de IgM por ELISA en los FR aislados por el Método I de purificación.

Muestra*	D.O.	IgM total	µg/ml.
1	1.03		7.47
2	0.80		5.50
3	0.95		6.79
4	0.88		6.19
5	1.12		8.25
6	1.02		7.39
7	1.2		8.93
8	1.1		8.0
9	0.92		6.53
10	0.95		6.79
11	0.99		7.13

* FR aislado a partir de sueros de pacientes con AR.

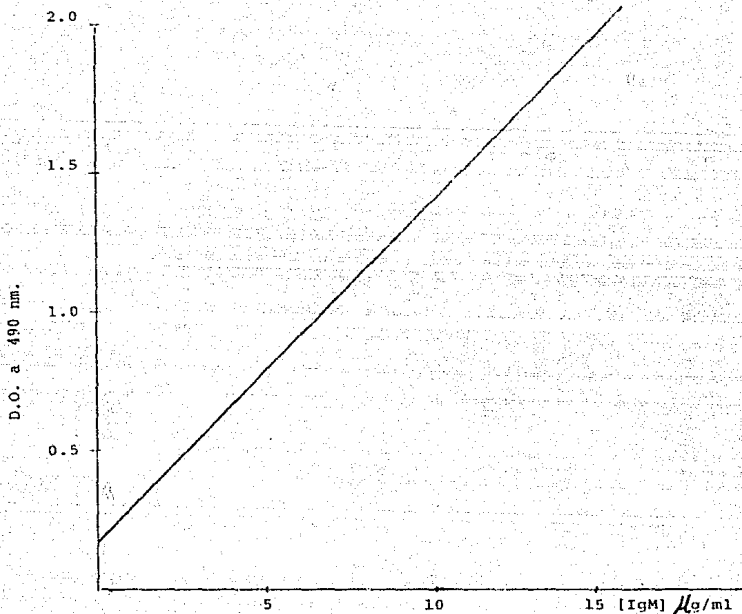


Fig. 10 Curva linealizada para cuantificación de cantidad de IgM total presente en cada muestra (1-0.99).

7.0 D I S C U S I O N

El FR fue identificado originalmente por Cecil, Nichols y Stainsby en 1931, en forma incidental al encontrar que sueros de pacientes con AR, tenían títulos altos en la prueba de aglutinación para estreptococo (53). Desde esta descripción - su detección se ha basado principalmente en pruebas de aglutinación, empleando como elementos blanco a eritrocitos de -- carnero sensibilizados con hemolisina; denominada también -- prueba de Waaler Rose, o también partículas de látex y bentonita (54), que son técnicas que detectan principalmente el FR de la clase IgM. Con estos métodos se relacionó al FR como -- una prueba particularmente positiva en la AR (53,55), pero a través de su estudio se logró establecer que también se encuentra presente en un gran número de padecimientos inflamatorios crónicos o autoinmunes como el Lupus Eritematoso Generalizado, el Síndrome de Sjögren, y la macroglubulinemia de Waldstrom, en los que los títulos de este autoanticuerpo son comparables a los de la AR.

Otras enfermedades en las que los títulos del FR son bajos incluyen a la leishmaniasis, sarcoidosis, sífilis y neumonitis por hipersensibilidad (16). Además este autoanticuerpo es también positivo en individuos sanos, especialmente de -- edad avanzada (mayores de 50 años).

Un descubrimiento relevante fue que el FR podría ser -- también de la clase IgG (54), y se logró gracias a las modificaciones en los métodos de detección como fueron el empleo de un sustrato heterólogo, y el empleo de anti-F(ab)' marcado

con algun tipo de enzima como lo es la peroxidasa y en seguida poderlo emplear en muestras previamente tratadas con pepsina (4,6). Esto permiti6 extender el estudio del FR encontrandose positivo en otras enfermedades como la vasculitis, la Artritis Reumatoide Juvenil y aun en algunos casos en los que previamente se demostr6 solo FR de la clase IgM (14). En estudios recientes se han detectado tambien FR de las clases IgA e IgE (6,55), y aun el denominado FR oculto 7s IgG o 19s IgM (56). Para ello fue necesario contar con metodos de purificacion del FR, asi como con ensayos de deteccion con una mayor sensibilidad y especificidad como la inmunofluorescencia indirecta (57), la prueba hemolitica (58), el RIA y el ELISA entre otros (6,59).

El acceso al FR purificado ha permitido tambien conocer algunas caracteristicas fisicoquimicas, como su afinidad a el antigeno original, su posibilidad de reaccion cruzada con otros epitopes, y lograr tambien su clasificacion en cuanto al isotipo que corresponde (5,33). Adicionalmente hay estudios recientes en los que mediante el empleo de FR puro se puede lograr identificar sus idiotipos, idiotopos y los paratopos, constituyendo una forma trascendental para definir su origen a nivel de las lineas germinales que dan origen a estos autoanticuerpos (39).

otros trabajos en los que se combina la obtencion de FR puro y el desarrollo de metodos sensibles y especificos de deteccion han permitido establecer que en su produccion participan alteraciones en la regulacion inmune como la disminucion -

de la función supresora, la activación de clones de células B con el fenotipo CD5, CD21 y CD22 (34,60,61).

Estos mismos métodos han permitido analizar la influencia de activadores policlonales que pueden incrementar la producción del FR como lo es el virus Epstein Barr, el micoplasma y otros productos bacterianos como peptido-glucanos y lipopolisacáridos (62,63).

En este trabajo de tesis se implementaron tres métodos de purificación para FR, que de acuerdo a datos previos de la literatura se fundamentan en el conocimiento de sus características físicoquímicas y su afinidad por el antígeno en la porción Fc de la inmunoglobulina IgG homóloga o heteróloga (53).

Tanto en el método I como en el método III, empleamos columnas de afinidad para purificar el FR (fig. 1), mientras que para el método II, usamos una columna de exclusión por peso molecular (sephadex G-200). Sin embargo como las fracciones obtenidas en este intento de aislamiento no contaron con una pureza importante al estudiarlas por electroforesis (fig. 7) se descartó tal método. Una posible explicación que justifica este hecho fue tal vez a que en las muestras de suero de FR positivo existe un alto contenido de complejos inmunes que forman agregados y pueden de tal modo modificar el patrón de separación por la columna, por lo cual se trató de evitar empleando un tampón ácido (acetatos pH 5), para que se incrementaran las cargas positivas de la IgG y así aumentar las fuerzas repulsivas entre esta molécula y el FR (45), pero con todo y esto los resultados no fueron satisfactorios.

Las ventajas del método I, fueron el uso de un menor volumen de suero y su empleo sobre la columna en forma directa que reduce el tiempo de purificación. También se logró la -- obtención de una mayor concentración de FR en cuanto a la -- concentración de proteínas totales (tabla 1). No obstante - con este procedimiento no fue posible separar las subclases IgG o IgM existentes en cada una de las muestras originales.

El método III tuvo la ventaja de que se obtuvo al FR con un alto grado de pureza en la prueba de electroforesis (fig - 9), demostrando la separación del FR de la clase IgM del IgG, al emplear la columna de afinidad con proteína A, una vez que se había capturado este autoanticuerpo en la columna con IgG de conejo. Además la precipitación inicial de gamaglobulinas, facilitó la eliminación de proteínas contaminantes.

Las únicas desventajas de este método fueron que se requería de un mayor volumen del suero original, un mayor tiempo en la purificación del FR para cada uno de los pasos y que la eficiencia en la adsorción del FR sobre la columna fue ligeramente menor que en el método I. Esto puede explicarse en base a el número de pasos implicado en cada uno de los métodos y a el uso de dos columnas de afinidad para un sólo método, haciendo que el contenido inicial de FR en la muestra original descendiera por desnaturalización a el tratamiento con la solución ácida de elución (glicina HCL pH 2.8), además de que una pequeña cantidad de FR de baja afinidad podría haber se perdido durante la precipitación con sulfato de amonio -

así como también la unión a la columna de IgG de conejo pudo ser menor al responder el FR en una solución amortiguadora en vez de usar suero total, como en el método I (6).

Una vez concluidos y evaluados los métodos de purificación podemos sostener que efectivamente obtuvimos FR por los siguientes hechos:

Solamente los sueros con FR y no los controles, fueron adsorbidos en la columna de afinidad preparada con agregados de IgG de conejo (fig.4).

El FR en el suero original y la fracción aislada fue positivo en al menos dos de las pruebas efectuadas para detectar este anticuerpo.

En el sistema de ELISA en el que se empleó un antígeno no relacionado al FR como fue un extracto de M. tuberculosis; no se obtuvieron resultados positivos (para todas las muestras probadas la D.O. fue menor a 0.12); aunque este antígeno si funcionó con sueros de pacientes con diagnóstico de tuberculosis (51).

La electroforesis de proteínas de los FR purificados revelaron claramente las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de IgM a la que corresponde el FR.

Por lo que se refiere a la estandarización del ensayo -- de ELISA, para la detección de los FR purificados, se sabe que en la literatura ya existen varios reportes, pero con diversas modificaciones de acuerdo al objetivo principal que se persiga, en nuestro caso solo detectamos el FR de la clase

IgM; y es por esto que se emplearon agregados de IgG de con-
ejo como antígeno acoplado a la fase sólida, puesto que se ha
reportado que esta inmunoglobulina, da una mayor susceptibi-
lidad que la IgG humana (6,48), especialmente en cuanto a lo
que se refiere al FR de la clase IgM, además se ha comproba-
do que la lectura de fondo (background) por unión inespecifi-
ca del conjugado marcado (anti-IgM peroxidasa) es mucho menor.

Todas las soluciones amortiguadoras, concentraciones y
diluciones de las muestras y reactivos empleados, fueron pre-
viamente establecidos con diferentes ensayos realizados, para
estandarizar dichas variables.

En este trabajo se prefirió expresar los resultados de -
ELISA para FR en D.O. y no en unidades de concentración, ya -
que por una parte se requería de un FR monoclonal de concen-
tración conocida para que los resultados fueran válidos; por
otro lado el objetivo principal de este estudio fue lograr -
hacer una detección y no cuantificación del FR en cada una de
las fracciones aisladas, con la finalidad de establecer el --
método óptimo de purificación y así emplear el que más nos -
favorezca según lo que se requiera en futuros estudios; son
estos los principios en los que nos basamos para determinar
que el total de las muestras se purificaran únicamente por -
el método I y no con el método III como se realizó para las
cinco primeras muestras, apoyándonos también en los resulta-
dos obtenidos en la tabla num 1 que nos hace una comparación
de resultados de ELISA para las mismas muestras, pero con -
diferentes métodos de purificación; además en esta misma

tabla se observa que tanto la técnica de látex como la de NF fue más eficiente para los purificados obtenidos por el método I. Esto se debió a una pérdida de la concentración de FR en cada uno de los pasos realizados para el método III, según nos muestran las lecturas de proteínas totales por el método de Lowry, que ya ha sido discutido anteriormente.

Las técnicas de NF y aglutinación con partículas de látex fueron también seleccionadas en este trabajo, ya que estas miden principalmente el FR de la clase IgM, y porque eran factibles de usarlas como parámetros de comparación con el ELISA, comprobando posteriormente que nuestro ELISA fue de más alta sensibilidad que las pruebas anteriormente señaladas (tabla 2).

Además de los agregados de la IgG de conejo, fue necesario emplear un antígeno no relacionado al FR, con el objeto de descartar la unión inespecífica que pudiera existir entre el FR aislado y la placa de poliestireno y confirmar aún más la especificidad del ensayo. El antígeno empleado fue un extracto de *M. tuberculosis*, que previamente ha sido utilizado para estandarizar una prueba de rutina para la determinación de anticuerpos contra esta bacteria, en pacientes con diagnóstico de tuberculosis (51), y debido a que las lecturas para dicha prueba en todas las muestras fueron menores a 0.20 de D.O., se consideró que el ensayo realizado para FR fue suficientemente específico.

También podemos agregar que para todos los ensayos de ELISA realizados, los valores obtenidos para el total de las pruebas realizadas en los sueros de los sujetos normales y la IgM normal humana semipurificada fueron menores de 0.20 de -- D.O. (tabla 4).

Algunos de los puntos por lo que fue importante purificar el FR así como lograr la estandarización del ELISA para su detección son:

Con el FR puro podremos producir anticuerpos antiidiotipo de forma individual, ya sea policlonales o monoclonales, que puedan reconocer el idiotype tanto en el propio anticuerpo, -- como en las células B productoras de FR (33,64,65).

Se puede ampliar el método de ELISA, para establecer ensayos de inhibición que definan la afinidad del FR sobre antígenos propios o de reacción cruzada (heterólogos), dependiendo de la enfermedad de que se trate (33,64 65).

Nos permitirá indagar, si los anticuerpos producidos en contra del FR (antiidiotipo), tienen propiedades inmunoregulatorias, al usar el ELISA que evalúa la interacción tridimensional y no solo bidimensional como es el caso de técnicas de -- reacción simple entre un antígeno y un anticuerpo, como lo es la inmunotransferencia (66).

Y finalmente otra de las razones por las que se realizó -- este trabajo es que se podrá detectar el FR y antiidiotipos en líquidos corporales o sobrenadantes de cultivo de células mono nucleares productoras de FR, donde la concentración de este -- autoanticuerpo es muy baja (67).

8.0 CONCLUSIONES

- 1.- Se logró purificar FR total y FR de la clase IgM aprovechando la propiedad que tiene de unirse a la fracción cristalizante (Fc) de las IgG humana y de conejo.
- 2.- El método de ELISA estandarizado para detectar el FR total en los purificados de cada muestra, fue satisfactorio, aún sin requerir de una separación de las diferentes subclases de FR.
- 3.- Mediante la metodología propuesta, la purificación del FR de la clase IgM, permitirá aislar los idiotipos de cada muestra estudiada, para futuros estudios de regulación inmune.

9.0 A N N E X O

METODO GENERAL PARA CUANTIFICACION
DE PROTEINAS

METODO DE LOWRY

Este método se fundamenta en 2 reacciones

- 1.- Interacción inicial de la proteína y los iones Cu^{++} en medio alcalino (en semejanza al método de Biuret).
- 2.- Una reducción de los ácidos fosfotungstíco y fosfomolibdico a azul de molibdeno y azul de tungsteno respectivamente, esta reducción se debe a la acción del complejo Cu^{++} - proteína, a la tirosina y el triptofano contenidos en las proteínas.

Sol. A - 50 ml de una solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N, más 0.5ml de tártrato de sodio al 2%, más 0.5 ml de CuSO_4 al 1%.

Sol. B - Reactivo de Folin-Ciocalteus diluido 1:2

Sol. estándar - BSA a concentración de 0.1 mg/ml.

Seguir el proceso descrito en el siguiente cuadro.

Procedimiento a seguir para cuantificar proteínas por el método de Lowry.

TUBO	1	2	3	4	5	6	problema
BSA (0.1mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	- - -
mcg de proteína	0	20	40	60	80	100	- - -
agua dest. ml	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.00	- - -
sol. problema	-	-	-	-	-	-	1 ml de la dilución
sol. A ml	3	3	3	3	3	3	3
AGITAR E INCUBAR DURANTE 10 MIN.							
sol. B ml	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
AGITAR E INCUBAR DE 30 A 180 MIN.							
LEER a 500 nm							

1.- Solución Amortiguadora Fosfatos - Salina (PBS)

(pH 7.1 - 7.3; 0.01M)

Solución A - Fosfato de sodio monobásico 0.2M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - - - - - 27.5 g/l

Solución B - Fosfato de sodio dibásico 0.2M

Na_2HPO_4 (anhidro) - - - - - 28.4 g/l

Mezclar 165 ml de A + 335 ml de B + 74 g de NaCl

llevar a 1 lt con agua destilada, para preparar PBS

0.01M hacer dilución 1:10 ajustando a pH 7.2

2.- Solución saturada de sulfato de amonio (SAS)

NH_4SO_4 - - - - - 800 g/l

ajustar el pH a 7.2 con NaOH 2N.

3.- Hidróxido de sodio 0.2N

NaOH - - - - - 80 g/l

4.- Solución amortiguadora de acetatos (0.1M pH 3.6 a 5.6)

Sol. A - - - - - Acido acético - - - - - 11.5 ml/l

Sol. B - - - - - Acetato de sodio - - - - - 27.2 g/l

Sol A	Sol B	Agua dest.	pH
-------	-------	------------	----

(ml)	(ml)	(ml)	
------	------	------	--

410	90	500	4
-----	----	-----	---

148	352	500	5
-----	-----	-----	---

5.- Bicarbonato de sodio 0.1M, NaCl 0.5M pH 8.3

NaHCO_3 - - - - - 8.4 g/l

NaCl - - - - - 29.2 g/l

ajustar a el pH deseado con HCl concentrado.

6.- Solución amortiguadora de fosfatos (fosfatos 0.1M,

pH 7.4 y 8.0)

NaH ₂ PO ₄	- - - - - Sol A	- - - - -	- - - - -	27.6 g/l
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	- - - - - Sol B	- - - - -	- - - - -	53.65 g/l
Sol A	Sol B	Aqua dest.	pH	
(ml)	(ml)	(ml)		
95	405	500	7.4	
26.5	473.5	500	8.0	

7.- Solución de Acido Clorhídrico 0.5N pH 2

Colocar 15.38 ml de HCl concentrado en un matraz y aforar lo a un litro. Ajustar al pH necesario.

8.- Solución de hidróxido de sodio 0.5N

NaOH - - - - - 20 g/l

9.- Monomero de acrilamida sol.stock: 30% acrilamida

0.8% bis-acrilamida.

Acrilamida - - - - - 30g

Bis acrilamida - - - - - 0.8 g

llevar a 100ml con agua destilada, aforar hasta que la solución este a temperatura ambiente, filtrar usando membrana Millipore 0.42 micras, conservar a 4°C.

10.- Dodecil Sulfato de Sodio al 10%

SDS - - - - - 10 g

llevar a 100 ml con agua dest., filtrar y guardar a temperatura ambiente.

11.- Solución amortiguadora de TRIS-HCl 1.5M pH 8.3

TRIS - - - - - 18.17 g/100ml

filtrar y conservar a 4°C.

12.- Solución amortiguadora TRIS-HCl 0.5M pH 6.8

TRIS - - - - - 6.07 g/100 ml

13.- Solución amortiguadora de corrida de electroforesis

TRIS 0.025M, Glicina 0.19 mM, SDS 0.1%

TRIS - - - - - 12g

Glicina - - - - - 57.6 g

SDS - - - - - 40 ml al 10%

aforar a 4 litros, ajustar pH a 8.3 y filtrar

14.- Solución tratamiento de la muestra (coctail)

TRIS 0.125M, SDS 4%, Glicerol 20%, 2 mercaptoetanol 1%
azul de bromofenol 0.1%

Glicerol - - - - - 2ml

TRIS - - - - - 2ml de sol num. 12

SDS - - - - - 2ml al 10%

2-mercaptoetanol - - - - - 100 μ l

Azul de bromofenol - - - - - 1 ml al 1%

Agua destilada - - - - - 2.9 ml

Aforar a 10 ml, congelar a -20°C y centrifugar antes
de usar.

15.- Tinción con azul de Coomassie

Azul de coomassie 0.125%, Metanol 50%, Acido acético 10%

Sol I

Azul de Coomassie R-250 - - - - - 2.0 g

Agua destilada - - - - - 200 ml

Sol II

Azul de Coomassie - - - - - 62.5 ml de sol I

Metanol - - - - - 250 ml

Acido acético - - - - - 50 ml

aforo con agua dest a 500 ml - 70 -

- 16.- Solución decoloradora metanol 50%, ácido acético 10%
- | | | |
|-----------------------|-----------|----------|
| Metanol | - - - - - | -500ml |
| Acido acético | - - - - - | -100ml |
| Agua destilada c.b.p. | - - - - - | -1000 ml |
- 17.- Solución amortiguadora de TRIS-HCl 0.1M pH 8.0 con NaCl 0.5M
- | | | |
|------|-----------|--------------|
| TRIS | - - - - - | 3.0g / 250ml |
| NaCl | - - - - - | 7.3 g/ 250ml |
- ajustar pH antes de aforar.
- 18.- Solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 8.3 con NaCl 0.5M
- | | | |
|--------------------|-----------|--------------|
| NaHCO ₃ | - - - - - | 2.1 g/250 ml |
| NaCl | - - - - - | 7.3 g/250 ml |
- ajustar pH antes de aforar.
- 19.- Solución amortiguadora de glicina-HCl 0.2M pH 2.8
- | | | |
|---------|-----------|------------------|
| Glicina | - - - - - | -3.7535 g/250 ml |
|---------|-----------|------------------|
- ajustar el pH con HCl concentrado antes de aforar
- 20.- Solución amortiguadora de carbonatos 0.05M pH 9.6
- | | | |
|---------------------------------|-----------|----------|
| Na ₂ CO ₃ | - - - - - | 1.59 g/l |
| NaHCO ₃ | - - - - - | 2.93 g/l |
- ajustar el pH antes de aforar.
- 21.- PBS - Tween 20 al 0.05%
- | | | |
|----------|-----------|-----------------|
| Tween 20 | - - - - - | 0.05 ml |
| c.b.p. | - - - - - | 1 lt de PBS 7.2 |

22.- Solución amortiguadora de citratos - fosfato 0.1M pH 5

Citrato de sodio - - - - - 29.4 g/lit

ajustar a el pH deseado con H_3PO_4 antes de aforar

23.- Acido sulfúrico 2.5 M.

H_2SO_4 - - - - - 13.3 ml

agua destilada c.b.p. - - - - - 100 ml

24.- PBS-Tween, 20 con albumina bovina al 10%

Albumina bovina - - - - - 1g

PBS-Tween al 0.05 % c.b.p. - - - - - 100 ml

10.0 REFERENCIAS

- 1.- Argyrios N., Theofilopoulos D., 1985: "AUTOINMUNIDAD", Fudenber H.H. Inmunología Básica y Clínica, 5a. Ed., Edit. El Manual Moderno, México. 156-158.
- 2.- Talal Norman. (1978): Autoimmunity and the immunologic network. Arth. & Rheum. 21:7 813-861.
- 3.- Kenneth H., Kenneth E. Suck. (1985): "ENFERMEDADES - REUMATICAS", Fudenberg H.H. Inmunología Básica y Clínica, 5a. Ed. Editl El Manual Moderno., México D.F. 435-440.
- 4.- Moore L.T., Robert W., Zuckner J. (1985): 19s IgM Rheumatoid Factor - 7s IgG Rheumatoid Factor immune complexes isolated in patients with rheumatoid arthritis. J. Lab. Clin. Med. Mayo 465-470.
- 5.- Nelson Lee., Nardella A.F., (1985): Competition between antigen and anti-idiotypes for Rheumatoid Factors. J. Immun. 135:4.
- 6.- Faith A., Pontesilli O., Unger A. (1982): ELISA assays for IgM and IgG Rheumatoid Factors J. Immun. Meth. 55:169-177.
- 7.- Jackle C., Feigal W., Robbins (1985): Serum IgG and - IgM Rheumatoid factors and complement activation in extraarticular rheumatoid disease. J. of Rheum. 12:2.
- 8.- Sabharwal U., Vaughan J., Fong y cols. (1982): Activation of the classical pathway of complement by Rheumatoid Factors. Arth. & Rhoum. 25: 161 - 167.

- 9.- Dick L., Fregal W., Leek D., Shapiro R (1986): Complement activation by 19s IgM Rheumatoid Factor: Relationship to disease activity in Rheumatoid Arthritis. J. Rheum. 13:1.
- 10.- Hogben D.N., Maddeleine E., Devey (1986): Studies on Rheumatoid Factor: I The effect of Rheumatoid on the clearance of preformed immune complexes in mice. Clin. Exp. Immun. 66:648-653.
- 11.- Zusifler N. J: E (1979): Etiology and Pathogenesis of - Rheumatoid Arthritis, Arth and Allied Conditions. Mc Carthy D.J., Leu Feviger Philadelphia 1979 417.
- 12.- Zusifler N.J. (1983): Pathogenesis at the joint disease of Rheumatoid Arthritis. Am. J. Med. Dec. 39:3-8
- 13.- Terry L., Moore y Dorner W.R. (1987): IgM Rheumatoid Factor plaque-forming cells in Juvenile Rheumatoid Arthritis. Arth. & Rheum. 30:3 335:338.
- 14.- Floyd M., Tesar J. (1979): The role of IgM Rheumatoid Factor in Experimental Immune Vasculitis. Clin. Exp. Immunol. 36:165-174.
- 15.- Joshn P.M., Faulk N.P. (1976): Rheumatoid Factor: Its nature, specificity, and production in rheumatoid arthritis. Clin. Immun. Immunopath. 6:414.
- 16.- Margni A. (1982): Autoinmunidad . Inmunologia e Inmunologia 3era. Ed. Edit. Panamericana. Buenos Aires, 302-319.
- 17.- Mc Michael A.J., Sasayuki T., Mc Devitt H.O. (1977): Increased frequency of HLA-DW4 in Rheumatoid Arthritis. Arth & Rheumat. 20: 1037 - 1042.

- 18.- Kair R.W., Rodey G.E., (1980): Association of HLA DRW 4 with Rheumatoid Arthritis in black and white patients. *Arth. & Rheum.* 1980:23 1241-1245.
- 19.- Panay G.S., Woolley P. (1978): Genetic Basis of Rheumatoid disease HLA antigens, disease manifestations and toxic reactions to drugs. *Br. Med. J.* 2:1326-1328.
- 20.- Engleman E.G., Sponzilli E.E., (1978): Mixed lymphocyte reaction in healthy women with rheumatoid factor. Lack of association with HLA-DRW 4 *Arth. & Rheum.* 1978:21 690-694.
- 21.- Olsen J. Satsny y Jasia E. (1987): High levels of in vitro IgM rheumatoid factor synthesis correlate with HLA-DR4 in normal individuals. *Arth. & Rheumat.* 30:8.
- 22.- Vaughan J.H., Chichara T., Moore T.L. (1976): Rheumatoid factor-producing cells detected by direct hemolytic plaque assay. *J. Clin. Invest.* 58:933-991.
- 23.- Olsen J.N., Janin E.A. (1985): Synthesis of Rheumatoid Factor in vitro: Implications for the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Sem. in Arth. and Rheumat.* 15:2146-2156.
- 24.- Patel V., Panayi G.S., Unger A. (1983): Spontaneous and pokeweed mitogen-induced in vitro immunoglobulin and IgM rheumatoid factor production by peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *J. Rheum.* 10:364-372.
- 25.- Koopman W.J., Schroheloher. (1980): Enhanced in vitro synthesis of IgM-rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Arth. & Rheum.* 23:985-992.

- 26.- Izui S., R.A. Esenberg y Dixon F.J. (1979): IgM rheumatoid factors in mice injected with bacterial lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 122:2096-2102
- 27.- Dztarsky R. (1984): Anti-immunoglobulin autoantibodies are not preferentially induced in polyclonal activation of human and mouse lymphocytes, and more anti-DNA and anti-erythrocytes autoantibodies are induced in polyclonal activation of mouse than human lymphocytes. *J. Immun.* 133:2537-2544.
- 28.- Levinson A., Tar J.L. (1986): Staphylococcus aureus Cowan I, potent stimulus of immunoglobulin M Rheumatoid Factor production. *J. Clin. Invest.* 78:612-617.
- 29.- Fong S. Timothy A., Carson A. (1983). The internal image of IgG in cross-reactive anti-idiotypic antibodies against human rheumatoid factors. *J. Immun.* 131:2.
- 30.- Raif S., Getta (1982): Presence of autoanti-idiotypic antibody during the normal human immune response to tetanus toxoid antigen. *J. Immun.* 139:1.
- 31.- Raif S., Weisber P. (1978): Anti-idiotypic antisera in man. I Production and immunochemical characterization of anti-idiotypic antisera of human anti-tetanus antibodies. *J. Immun.* 121:4.
- 32.- Carson A. Fong Sherman (1983): A common idiotope on human rheumatoid factors identified by a hybridoma antibody. *Molec. Immunol* 20:10 1081-1087.
- 33.- Abe T., Takeuchi T., Kiyuto M. (1984): Anti-idiotypic antibodies in a patient with monoclonal rheumatoid factor after pneumococcal bacteremia. *J. Imm.* 132:5.

- 34.- Takeuchi T., Huson O. (1985): Supression of Rheumatoid factor. Synthesis by anti-idiotypic antibody in Rheumatoid Arthritis patients with cross-reactive idiotypes. Arth. & Rheumat. 28:8.
- 35.- Jerne K.N. (1974): Towards a network theory of the immune system. Ann. Immunol (Inst. Pasteur). 125c 373-383.
- 36.- Rees. ADM., Praputpittaya A. (1987): T cell activation by anti-idiotypic antibody: evidence for the internal image. Immunology 60:389-393.
- 37.- Smith R.L., Bost L.K. (1987): Generation of idiotypic and anti-idiotypic antibodies by immunization with peptides encoded by complementary RNA: A possible molecular bases for the network theory. J. Immun. 138:17-9.
- 38.- Fong Sherman, Timothy G., Vaughan H. (1984): Modulation of human rheumatoid factor-specific lymphocyte responses with a cross-reactive anti-idiotypic bearin the internal image of antigen. J. Immun. 132:3.
- 39.- Dennis A. Carson., Pojen Pl, Chen T. (1987): Idiotypic and genetic studies of human rheumatoid factors. Arth. & Rheumat. 30:12 1321-1325.
- 40.- Pasquali J.L., Fong S. (1980): Inheritance of immunoglobulin M rheumatoid - factor idyotypes. J. Clin. Invest. 66:863-866.
- 41.- Nisononoff A. Lamoyi E. (1981): Hypothesis. Implications of the presence of an internal image of the antigen in anti-idiotypic antibodies. Possible application to vaccine production. Clin. Immun. Immunopath. 21:397-406.

- 42.- Yalken Rober. (1982): Enzyme Immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids. Current limitations and future prospects. Review of Infectious Diseases. 4:1 35-68.
- 43.- Arnett F.C., Edwarthy S.M., Block D.A. y cols. (1988): The American Rheumatoid Association 1987 revised criteria for the clasification of rheumatoid arthritis. Arth. & Rheumat. 31:315-324.
- 44.- Stanworth y M.W. Tarne (1978): Immunoglobulins. Purification and characterization. Handbook of Experimental Immunology Wair. D.M. Blackwell Scientific Publications Ed. Jera.
- 45.- Hudson Leslie. "Isolation and structure of immunoglobulins" Practical Immunology, 2da. Ed. Scientific Publications. London England., 1980. 156-203.
- 46.- Kauffmann R.H. y Daha M.R. (1979): Aggregated human immunoglobulin G stabilized by albumin: a standard for immune complex detection J. Immun. Meth. 31:11-12.
- 47.- Reinhard, Rüchel y Feriglah y Harold 1984: Polyacrylamide gel electrophoresis: Principles, techniques and micro methods. Cap. 4 245-262.
- 48.- Pasqualy J.L., Urlacher A. (1983): A highly conserved determinant on human rheumatoid factor idiotype defined by a mouse monoclonal antibody. Eur. J. Immun. 13:197.

- 49.- Avrameas S. y Ternynck T. (1969): The cross linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparations of immunoadsorbents. *Immunochem.* Pergamon Press. 6:53-66.
- 50.- Cuatrecasas P. (1970): Protein purification by affinity Chromatography. *J. of Biol. Chem.* 245:12 3059-3066.
- 51.- Rodney G.R. Thomas M.C. 1982: Serodiagnostic of Tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) of Antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Resp. Dis.* 126:1013-1016.
- 52.- Kenny G., Dunsomor C. (1983): Principles, problems and strategies in the use of antigenic mixtures for the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microb.* 17:4 655-665.
- 53.- Davis S.J. (1979): Rheumatoid Factors Dietschy M.J. Rheumatology and Immunology Ed. Alan S. Cohen. Grune & Stratton, Inc. U.S.A. 77-80.
- 54.- Singer J.M., Plotz C.M. (1956). The latex fixation test: I Application to the serologic diagnostic of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 21:888.
- 55.- Linken B.J. Williams C. "Tests for Detection of Rheumatoid Factors" Rose R.N. Manual of Clinical Laboratory Immunology Ed. 3era. Am. Society Microb. Washington D.C. 1986. 759-765.
- 56.- Terry L, Moore., Dorner W.R. (1988): Enzyme Linked (ELISA) Immunoabsorbent Assay for Detection of hidden 19s IgM rheumatoid Factors in Juvenile Rheumatoid Arthritis. *J. OF Rheum.* 15:1

- 57.- Kallerop H.E., Graudal H. (1979): IgG, IgM and IgA rheumatoid factors in healthy adults and rheumatoid arthritis patients determined by an indirect immunofluorescence. Scand. J. Rheum. 8:1.
- 58.- Terry L. Moore., Najdawi E. (1987): IgM Rheumatoid Factor plaque-forming cells in Juvenile Rheumatoid Arth.&Rheum. 30:3.
- 59.- Wenick R. Lo Spalluto J., Zift M. (1981): Serum IgG and IgM Rheumatoid Factors by solid phase radioimmuno assay. Arth & Rheum 24:12.
- 60.- Nemazec D.A. (1983): Induction of Rheumatoid antibodies in the mouse: regulated production of auto-antibody in the secondary humoral response. J. Exp. Med. 158:529.
- 61.- Fong S., Chen PP., Fox RI (1986): Expression of three cross reactive idiotypic non-rheumatoid factor auto-antibodies from patients with autoimmune disease and seropositive adults. J. Immun. 137:122-128.
- 62.- Emery P., Punoyi G. (1985): Rheumatoid Factor and HLA-DR4. in RA. J. Rheumat. 12:2 217-222.
- 63.- Leadin Article (1988): Epstein-Barr Virus infection and autoimmunity in rheumatoid arthritis. Annals of Rheumatic Dis. 47:265-269.
- 64.- Birdsall H., Lidsky., Rossen R. (1983): Anti-F(ab') antibodies in rheumatoid arthritis. Arth. & Rheum. 26:12.

- 65.- Silvestre F., William C. (1984): Studies of anti-F(ab')₂ antibodies and possible immunologic control mechanisms in Systemic Lupus Erythematosus. Arth. and Rheumat. 27:12.
- 66.- Ezaky I., Otsuka E. (1987): Detection of low molecular weight IgM by immunoblot analysis in Rheumatoid Arth. J. of Rheumat. 14:4.