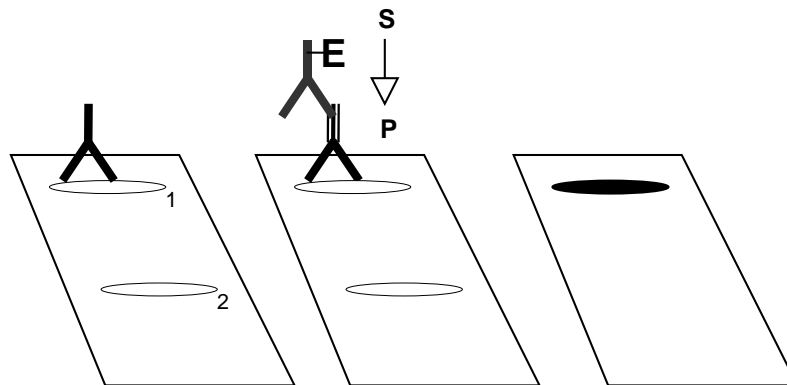


UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Facultad de Microbiología
Instituto Clodomiro Picado



Manual de
Métodos Inmunológicos



Bruno Lomonte Vigliotti, MQC, PhD

2007

Manual de Métodos Inmunológicos

Cuarta Edición, 2007

Este folleto puede descargarse gratuitamente por internet, en la siguiente dirección:

<http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>



Si requiere referirse a este manual como cita bibliográfica:

Lomonte, B. (2007) Manual de Métodos Inmunológicos, 138 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>

para comentarios o sugerencias, dirigirse a:

bruno.lomonte@ucr.ac.cr

Manual de Métodos Inmunológicos

INDICE

Cap. 1	Preparación de antisueros en animales de experimentación.....	p. 1
Cap. 2	Diluciones seriadas y pruebas serológicas de titulación	p. 18
Cap. 3	Purificación de inmunoglobulinas mediante técnicas de precipitación	p. 24
Cap. 4	Cromatografía de afinidad e inmunoafinidad	p. 29
Cap. 5	Preparación de geles de agarosa para técnicas inmunológicas	p. 37
Cap. 6	Doble inmunodifusión en gel	p. 42
Cap. 7	Inmunodifusión radial	p. 48
Cap. 8	Técnicas de aglutinación	p. 53
Cap. 9	Marcaje de proteínas con biotina	p. 61
Cap. 10	Métodos inmunoenzimáticos: ELISA	p. 63
Cap. 11	Electroforesis de proteínas en poliacetato de celulosa o en agarosa	p. 78
Cap. 12	Inmunoelectroforesis	p. 84
Cap. 13	Electroforesis en geles de poliacrilamida	p. 90
Cap. 14	Inmunoelectrotransferencia (<i>Western blotting</i>)	p. 100
Cap. 15	Hibridomas y anticuerpos monoclonales	p. 110
Cap. 16	Marcaje de anticuerpos con fluoresceína	p. 121
Referencias	p. 132

Prefacio a la Cuarta Edición

El presente *Manual* tiene como objetivo proporcionar al lector la información esencial para comprender, ejecutar e interpretar los principales tipos de técnicas inmunológicas básicas en el laboratorio. Las aplicaciones clínicas de estos métodos se mencionan ocasionalmente, solo a modo de ilustración, dado que son objeto de otra recopilación. En esta obra se presentan los métodos inmunológicos de laboratorio en una forma muy general, teniendo en cuenta que los mismos son aplicables a numerosos sistemas de interacción antígeno-anticuerpo, ya sea para el trabajo hospitalario, o de otra índole.

Siguiendo el formato de las versiones anteriores de este *Manual*, se presenta un breve fundamento teórico de cada técnica, seguido de una descripción de los procedimientos, reactivos, principales cuidados, lectura, e interpretación de los resultados. Las referencias bibliográficas incluyen, en la medida de lo posible, los trabajos clásicos que originaron cada método, y se complementan ocasionalmente con algunos ejemplos de experiencia propia, o de colegas cercanos.

Se espera que esta modesta obra didáctica, cuya primera edición se imprimió en 1989, continúe siendo de utilidad para estudiantes universitarios en formación profesional, y pueda eventualmente servir también de consulta posterior. Las valiosas observaciones y ayuda de los colegas del Instituto Clodomiro Picado constituyeron un elemento muy importante en la elaboración de este *Manual*, a todos gracias.

San José, julio de 2007

Bruno Lomonte Vigliotti

Capítulo 1

Preparación de Antisueros en Animales de Experimentación

Introducción

Los términos "**antisuero**" o "**suero inmune**" son utilizados comunmente para referirse a un suero que contiene altas concentraciones de anticuerpos contra un antígeno dado, obtenido generalmente mediante un proceso de inmunización. Los **anticuerpos** (Acs) pueden ser considerados como herramientas biológicas de gran utilidad para la detección y caracterización de diversas moléculas de interés diagnóstico o investigativo, gracias a su especificidad, la cual es explotada de muchas maneras en las técnicas inmunoquímicas. Aunque la mayoría de los antisueros de utilidad diagnóstica se pueden obtener comercialmente, en ocasiones pueden ser fácilmente preparados a un costo menor. Además, en el trabajo con enfoque investigativo, puede ser necesario preparar antisueros que no se encuentren disponibles a nivel comercial. En este capítulo se revisan los fundamentos y procedimientos generales para preparar antisueros en animales.

Contrario a lo que podría esperar quien se inicia en este campo, no existe un esquema de inmunización que sea idóneo para todos los inmunógenos. Más bien, la inmunización se caracteriza por su empirismo, y fundamentalmente está basada en las experiencias descritas por investigadores, tan variadas como contradictorias.

En primer lugar, es necesario recalcar que la **inmunogenicidad** de una molécula, definida como su capacidad de inducir una respuesta inmune específica, no es una propiedad intrínseca, ya que depende del sistema inmune al que se enfrente. La respuesta inmune hacia un inmunógeno (o **antígeno**¹; Ag), se encuentra bajo un complejo control genético y fisiológico, que implica variaciones no solo entre las especies, sino aún entre los individuos de una misma especie. Cuando se comparan distintos esquemas de inmunización en individuos alogénicos, esto es, genéticamente heterogéneos (por ejemplo conejos, carneros, caballos, etc.), es imposible determinar si las diferencias observadas en la respuesta son atribuibles al esquema utilizado, o a las diferencias genéticas entre los individuos, a menos de que se utilice un número considerablemente grande de ellos. El alto costo y esfuerzo que presupone esto, limita sensiblemente la posibilidad de realizar estudios comparativos para optimizar esquemas de inmunización. Esta es la principal razón por la cual los métodos de inmunización poseen un matiz fuertemente empírico. Se ha dicho que "existen tantos esquemas de inmunización como personas que los realicen", y hay una razonable tendencia a aferrarse a un método, cuando este

¹ En este Manual, se utiliza el término "antígeno" como sinónimo de "inmunógeno", aunque en sentido estricto el primero se refiere a la capacidad de una sustancia de ser reconocida por los productos de la respuesta inmune específica, independientemente de su capacidad para inducirla o no.

ha tenido éxito previamente. Aún con estas limitaciones, se puede partir de ciertos lineamientos que son comunes a la mayoría de esquemas de inmunización.

La preparación de un antisuero convencional, para la obtención de anticuerpos policlonales contra el (los) antígeno(s) de interés, comprende varias etapas o pasos generales (**Cuadro 1.1**). La purificación final de los anticuerpos obtenidos puede ser necesaria o no, dependiendo del uso que va a tener el antisuero. Algunas de las principales técnicas empleadas para la purificación de anticuerpos se describen en capítulos siguientes de este Manual.

Cuadro 1.1: Pasos para la obtención de un antisuero mediante inmunización.

1	2	3	4	5	6
Preparación del inmunógeno	Inmunización	Seguimiento y evaluación de la respuesta (sangrías de prueba)	Sangría final	Evaluación del antisuero	Purificación de los anticuerpos de interés

Preparación del inmunógeno

Un aspecto esencial en cualquier inmunización es la pureza (homogeneidad) del antígeno o inmunógeno. Si se pretende obtener un antisuero **monoespecífico**, es decir, que reconoce únicamente al antígeno de interés, la pureza del antígeno es crucial. El sistema inmune es capaz de detectar trazas de contaminantes que podrían pasar desapercibidas aún por métodos de análisis bastante sensibles. Si el inmunógeno disponible no tiene un alto grado de pureza, se puede intentar producir un antisuero monoespecífico reduciendo al mínimo las dosis (para minimizar la cantidad absoluta de contaminantes), el número de refuerzos, y el tiempo total de la inmunización. Lo que se persigue con esto es evitar el reconocimiento de los componentes contaminantes en la preparación del antígeno, aunque ello dependerá de su inmunogenicidad. Estas medidas pueden resultar eficaces, pero de no ser así, las opciones que quedan son: **(a)** purificar mejor el antígeno en cuestión, antes de inmunizar; **(b)** generar el antisuero con el antígeno disponible, y posteriormente tratar de eliminar los anticuerpos dirigidos contra los contaminantes, utilizando técnicas de **absorción** o de cromatografía de afinidad; o **(c)** recurrir a la tecnología de hibridomas (**Capítulo 15**) para obtener **anticuerpos monoclonales**. Esta última alternativa es la que ha tenido el mayor impacto para la obtención de anticuerpos contra sustancias que son de muy difícil purificación.

Adyuvantes

Por lo general, los antígenos se administran junto con un **adyuvante**, con el fin de inducir la mayor respuesta posible de anticuerpos. Un adyuvante se define como cualquier sustancia que aumenta la respuesta hacia un inmunógeno cuando se administra junto con él. Se han descrito

diversas sustancias que poseen actividad adyuvante y algunos de sus mecanismos inmunopotenciadores se conocen parcialmente (**Cuadro 1.2**).

Cuadro 1.2: Mecanismos de acción postulados para algunos adyuvantes de uso común *

Adyuvante	Prolonga la persistencia de antígeno	Induce la formación de granulomas	Estimula linfocitos en general	Potencia señales de co-estimulación
Adyuvante de Freund incompleto	+	+	-	+
Adyuvante de Freund completo	+	++	-	+
Sales insolubles de aluminio	+	+	-	?
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	+	-	?
<i>Bordetella pertussis</i>	-	-	+	?
Lipopolisacáridos bacterianos	-	-	+	+
Polinucleótidos (poli-IC/poli-AU)	-	-	+	?

* Ref: Goldsby et al. (2002).

Uno de los mejores adyuvantes que se conocen fue desarrollado en la década de 1940-50 por Jules Freund. El mismo puede obtenerse de dos formas: **(a)** adyuvante de Freund "incompleto", que consiste en una mezcla de aceite mineral y un emulsificador (ej. arlacel A, u otros), en la cual se dispersa la fase acuosa (con el inmunógeno) hasta lograr una emulsión estable; y **(b)** adyuvante de Freund "completo", que contiene los mismos componentes anteriores, junto con bacilos *Mycobacterium* muertos, en suspensión. Estos adyuvantes forman un depósito en el sitio de inyección, del cual se libera gradualmente el inmunógeno, dando así un estímulo prolongado y de dosis bajas, que es conveniente para inducir la producción de anticuerpos de alta afinidad (Herbert, 1978), según los principios teóricos de la selección clonal. La presencia de las micobacterias en el adyuvante completo activa a los macrófagos e induce la formación de granulomas locales. Esta última propiedad puede llegar a ser desventajosa, si los granulomas se extienden mucho y se ulceran, dando lugar a la formación de abscesos. Por esta razón, el adyuvante de Freund completo se utiliza generalmente para administrar la primera dosis de antígeno al animal (dosis **inicial**) y el adyuvante incompleto para las dosis siguientes (dosis de **refuerzo**). El compuesto inmunopotenciador de las micobacterias es un componente de su pared, de naturaleza glicolipídica, cuya actividad ha sido reproducida por un glicopéptido sintético denominado muramildipéptido (MDP).

Los inmunógenos insolubles o particulados (ej. bacterias, eritrocitos, proteínas "agregadas" o desnaturizadas por calor, etc.) tienden a ser más inmunogénicos que los solubles, por lo que generalmente se administran sin adyuvantes, con buenos resultados. Sin embargo, la respuesta contra antígenos particulados también puede potenciarse por la acción de adyuvantes, como se ilustra en el ejemplo de la **Fig.1.1**.

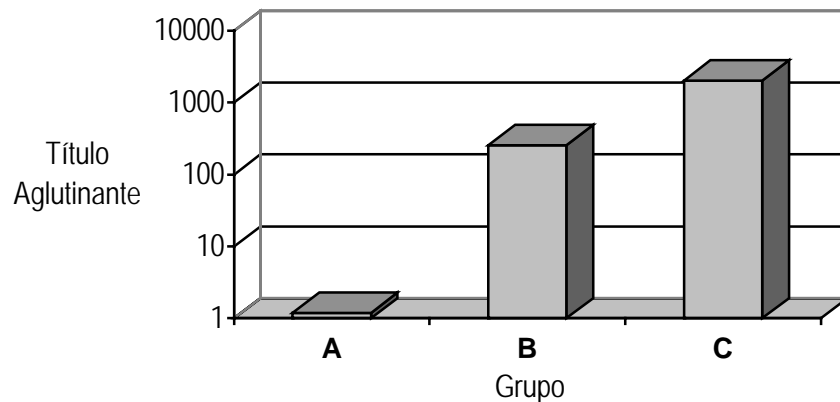


Figura 1.1: Efecto del adyuvante de Freund completo sobre la respuesta de anticuerpos contra eritrocitos humanos, en ratones BALB/c. Las barras representan el promedio del título de anticuerpos séricos después de la administración de 3 dosis del antígeno, por vía intraperitoneal. El grupo A corresponde a ratones no inmunizados, y muestra que estos carecían de anticuerpos pre-existentes contra los eritrocitos humanos. El grupo B recibió la primera dosis de eritrocitos sin el adyuvante. El grupo C recibió la primera dosis con adyuvante. Las 2 dosis de refuerzo posteriores se dieron sin adyuvante, para ambos grupos. Note que la respuesta final de anticuerpos es ~10 veces mayor en el grupo C que en el B.

Para la utilización del adyuvante de Freund (una emulsión agua/aceite) se mezcla un volumen del inmunógeno (en fase acuosa), con 1-2 volúmenes del adyuvante. A mayor proporción de adyuvante en la mezcla, mayor facilidad en lograr la emulsión. Para esto, se llena una jeringa de vidrio (con punta de metal con rosca) con la solución acuosa y otra jeringa con el adyuvante. Ambas se interconectan mediante una llave de tres vías (**Fig.1.2**) o mediante una aguja de doble conexión. Entonces, se expulsa con fuerza la solución acuosa hacia la jeringa con el adyuvante (no el revés). Luego se pasa la mezcla de una jeringa a otra, repetidamente, hasta que adquiera un aspecto blancuzco y de consistencia viscosa, que dificulta cada vez más el paso por la llave o la aguja. Una manera de probar la estabilidad de la emulsión, es dejar caer una gota en agua y ver si se mantiene íntegra, indicando que está lista para inyectarse. Por el contrario, si se dispersa rápidamente, la emulsión es aún inestable, y probablemente tendrá menor efecto adyuvante. Cabe aclarar que ciertos antígenos son demasiado valiosos o escasos para permitirnos realizar esta prueba.

Otra manera de preparar la emulsión es mediante el uso de un sonicador. Se coloca un volumen del antígeno (ej. 0,35 ml) con 1-2 volúmenes del adyuvante de Freund (ej. 0,65 ml) directamente en una jeringa de vidrio de 2 ml sin émbolo, que ha sido previamente sellada en el fondo con papel parafinado (Parafilm[®]) (**Fig.1.3**). La punta del sonicador se introduce en la mezcla y se aplica el ultrasonido en dos o tres pulsos intermitentes de unos pocos segundos, hasta formar la emulsión. La sonicación no debe ser excesiva, para evitar el calentamiento de la emulsión (por la posible desnaturalización del antígeno). Finalmente, con la jeringa hacia arriba, se inserta cuidadosamente el émbolo, desplazando el aire, hasta dejar la emulsión lista para inyectarse.

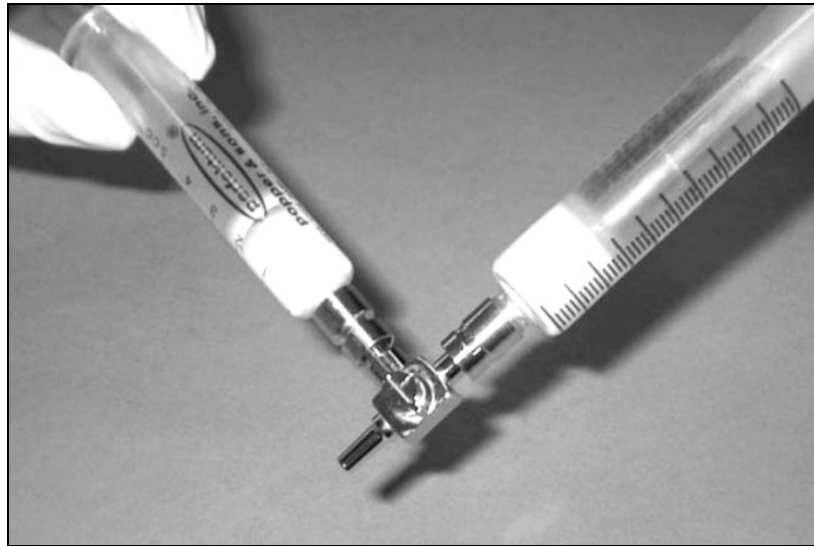


Figura 1.2: Llave metálica de tres vías. Se puede utilizar para acoplar dos jeringas (con punta de metal con rosca), y preparar la emulsión del adyuvante de Freund.

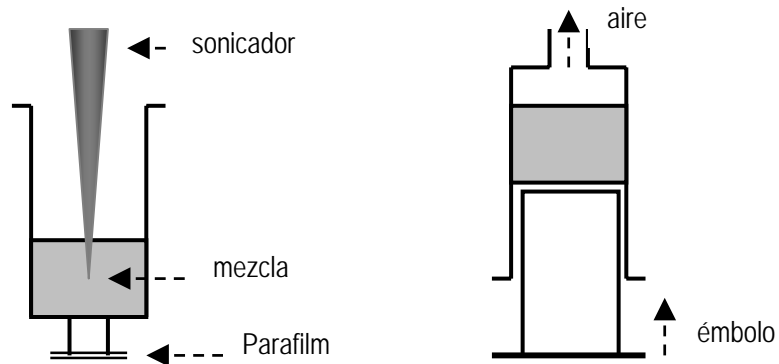


Figura 1.3: Preparación de una emulsión agua/aceite mediante sonicación directa en una jeringa de vidrio sin émbolo. Colocando la punta de un sonicador dentro de la mezcla de antígeno y adyuvante de Freund, se aplican 2-3 pulsos de unos cuantos segundos. Luego se coloca el émbolo y se expela cuidadosamente todo el aire.

Si no se dispone de piezas para acoplar jeringas, o de un sonicador, se puede preparar la emulsión colocando el adyuvante en un vial (de 2-10 ml) e inyectando fuertemente la solución

del antígeno con una jeringa (2-5 ml) con aguja fina (ej. calibre 25) debajo del nivel de aceite. La operación se repite varias veces, aspirando y expeliendo el material con fuerza. Sin embargo, conforme aumenta la viscosidad de la mezcla, es necesario ir aumentando el calibre de la aguja, por ej. a calibres 22, 20, y 18.

Las jeringas y piezas utilizadas en la preparación de la emulsión se pueden lavar con una pequeña cantidad de acetona, para eliminar el aceite, y luego con un detergente neutro. El adyuvante de Freund debe ser manipulado con precaución, ya que su inyección accidental puede ocasionar reacciones de hipersensibilidad significativas, por ejemplo lesiones que causan rigidez permanente en los dedos. También los ojos pueden sufrir daños irreversibles por el contacto con este adyuvante (Goding, 1986), por lo que debe tenerse mucho cuidado, principalmente cuando se trabaja con el sistema de jeringas interconectadas mediante una llave de 3 vías, o cuando se utiliza la técnica del vial abierto: la presión que se ejerce sobre la mezcla viscosa puede causar que la aguja salte con fuerza y que la mezcla nos salpique accidentalmente.

Además del adyuvante de Freund, otro adyuvante de uso común es el **hidróxido de aluminio**. Si no se dispone de este reactivo, puede ser preparado haciendo reaccionar, por ej., 250 ml de sulfato de aluminio al 5% con 100 ml de hidróxido de sodio al 5%, agitando fuertemente. El precipitado que se forma se lava dos veces por centrifugación, con solución salina, y se resuspende hasta su volumen original. Los antígenos se **adsorben** espontáneamente sobre este precipitado, mezclando volúmenes iguales de la suspensión y el antígeno en solución acuosa. El **alginato de sodio** es otro adyuvante similar, que polimeriza en presencia de calcio y forma depósitos con el (los) antígeno(s) adsorbidos. En la **Fig.1.4** se muestra un ejemplo comparativo de la respuesta de anticuerpos obtenida con el uso de distintos adyuvantes.

Escogencia de la especie de animal a inmunizar

El primer requisito para que una molécula sea inmunogénica es su carácter de "extraña" para el individuo. Esto es, la albúmina sérica bovina no va a despertar una respuesta inmune al ser inyectada en una vaca, pero sí puede ser un excelente inmunógeno en un conejo, por ejemplo. Una mayor distancia filogenética entre la especie de la cual proviene el antígeno, y la especie que se inmuniza, generalmente se asocia con una mayor inmunogenicidad, debido a que las diferencias estructurales entre sus componentes ortólogos tienden a ser mayores.

Al escoger la especie de animal a inmunizar, debe tomarse en cuenta un aspecto práctico: el volumen de antisuero requerido. A su vez, esto depende de la dilución final a la cual se utilizará el antisuero. Es posible utilizar especies tan pequeñas como el ratón (que proporciona alrededor de 1 ml de suero), hasta especies de producción industrial como el caballo (del que se obtiene hasta 12-15 litros de plasma en tres días de sangría). Sin embargo, generalmente los animales más utilizados son los conejos y los cobayos (para volúmenes pequeños), o los carneros y las cabras (para volúmenes mayores). En principio, todo antígeno debe ser administrado a una especie distinta de la que proviene. Sin embargo, las reglas son bastante impredecibles. Por ejemplo, se ha encontrado que los ratones no producen una respuesta contra los antígenos del sistema Rh humano, lo cual ha imposibilitado la preparación de anticuerpos monoclonales de ratón (ver **Capítulo 15**) contra dicho antígeno eritrocítico.

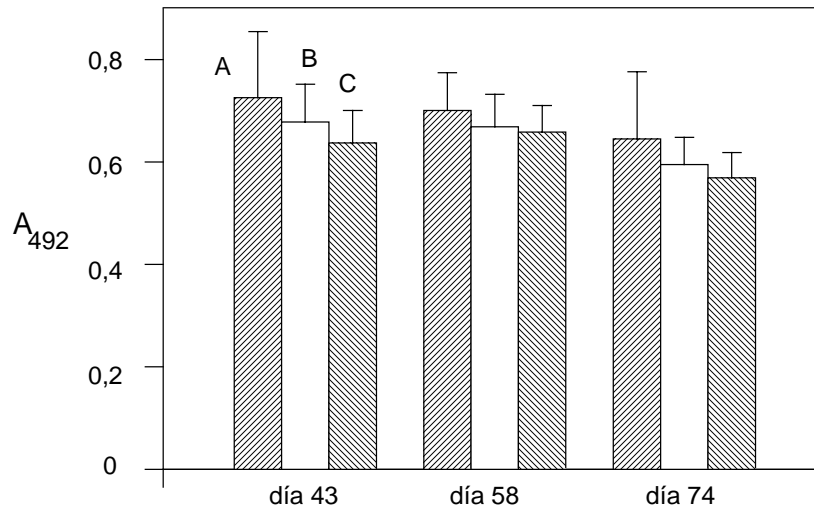


Figura 1.4: Comparación de la respuesta de anticuerpos contra el veneno de *Bothrops asper*, en ratones Swiss, utilizando diferentes adyuvantes para las dosis de refuerzo. Los 3 grupos (hembras) recibieron su dosis inicial con adyuvante de Freund completo. El grupo A continuó su esquema con alginato de sodio, el grupo B con una mezcla de alginato de sodio y muramildipéptido (MDP), y el grupo C con una mezcla de alginato de sodio y lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus*. Cada barra representa el promedio de 8 animales por grupo \pm DE, y corresponde a la absorbancia de los sueros (diluídos 1:2000) en un ELISA que utiliza el veneno como antígeno. Las ligeras diferencias observadas entre los grupos no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Ref: Rucavado *et al.* (1996).

La edad óptima del animal a inmunizar es preferiblemente la de adulto joven, por ser una etapa en la cual el sistema inmune se encuentra plenamente desarrollado. Para algunos antígenos, podrían hallarse diferencias de inmunogenicidad según el sexo del animal.

Cuando se requiere preparar una gran variedad de antisueros, pero en pequeños volúmenes, el ratón es una especie conveniente y económica. Se ha descrito una alternativa para la preparación de antisueros en ratón que aprovecha la técnica de inducción de **tumores ascíticos**. En esta, se inmuniza normalmente al ratón, pero en vez de realizar una sangría final (que proporciona a lo sumo ~ 1 ml de suero), se le inyecta células de un mieloma no secretor (es decir, Ig⁻) en la cavidad peritoneal. Estas células son comúnmente utilizadas en los laboratorios que generan anticuerpos monoclonales mediante tecnología de hibridomas (**Capítulo 15**) e inducen un tumor ascítico al cabo de unos días. De este modo, se puede obtener volúmenes considerables de fluido (hasta 15-40 ml/ratón), con concentraciones de anticuerpos similares a las del plasma (Mahana y Paraf, 1993). Sin embargo, los animales deben someterse a eutanasia durante las fases iniciales de la producción del tumor, por consideraciones éticas.



Figura 1.5: Forma de inmovilizar un ratón. Los dedos pulgar e índice sostienen un pliegue de piel en la región del cuello, tensando apenas lo suficiente para que el animal no gire su cabeza. Los otros dedos aprisionan la cola y parte posterior del ratón contra la mano.

La dosis óptima a administrar puede variar según cada antígeno y cada especie. En general, el objetivo que se persigue es estimular una alta proporción de los clones linfocitarios específicos para el antígeno, sin causar **tolerancia** por exceso (tolerancia de altas dosis), ni estimular clones de muy baja afinidad. Las dosis iniciales para las especies intermedias (conejo, cobayo) están en el ámbito de los 100-1000 μg , y de los 500-5000 μg para las especies grandes (carneros, cabras). Los ratones se inmunizan por lo general con dosis en el ámbito de los 10-100 μg , aunque es posible utilizar dosis aún más bajas para antígenos muy escasos o muy tóxicos (Goding, 1986). En cuanto a las dosis de refuerzo, se sugiere administrar un 20-50% de la dosis inicial, con el fin de seleccionar los clones de mayor afinidad que se han activado durante la respuesta primaria o inicial. Sin embargo, no siempre una alta afinidad implica una alta especificidad, como se discutirá más adelante.

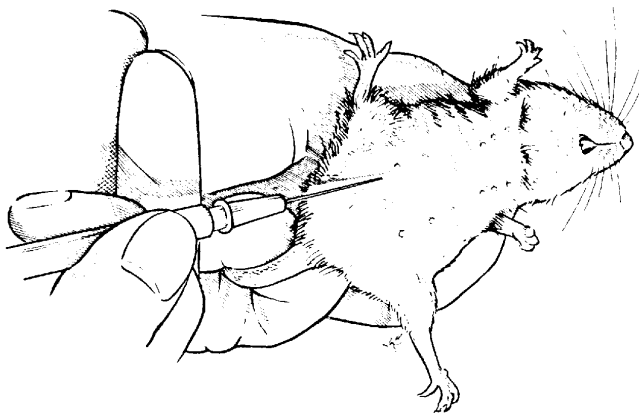


Figura 1.6: Inyección intraperitoneal en el ratón. La aguja (calibre 26 o similar) se inserta a través de la piel del abdomen a la altura de una línea imaginaria que une las extremidades posteriores. Si se inclina el animal hacia un costado, la masa visceral se desplaza ligeramente, reduciendo la posibilidad de que la punción lesione algún órgano.

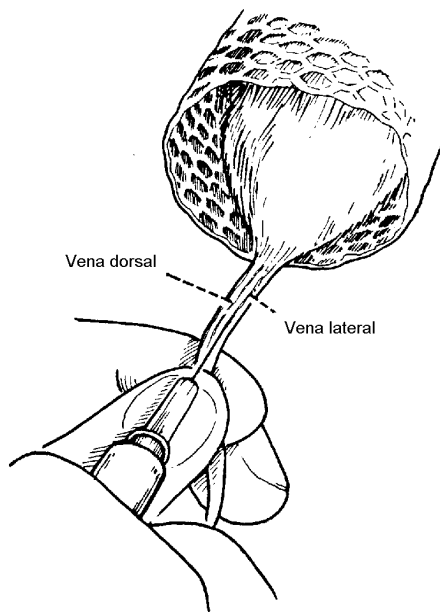


Figura 1.7: **Inyección intravenosa en el ratón.** El animal es inmovilizado introduciéndolo en un tubo ancho (ej. de 50 ml), al cual se le ha hecho una ranura longitudinal por donde se sostiene la cola. Con una aguja fina (calibre 26 o similar) se canula una de sus venas caudales, en forma muy superficial, y

se presiona suavemente el émbolo. Este no deberá ofrecer resistencia si la punción es correcta. Previamente a la inyección, las venas pueden dilatarse exponiendo a los animales al calor de un bombillo durante unos minutos.

Dosis del inmunógeno

En ocasiones, el antígeno de interés puede ser sumamente escaso, o valioso, o no puede administrarse en grandes cantidades debido a su toxicidad. En tales casos es posible lograr la producción de antiseros aún con dosis muy bajas de antígeno. Por ejemplo, durante la preparación de antiseros contra potentes neurotoxinas de serpiente con actividad letal, se logró buenas respuestas con el esquema de inmunización que se señala en el **Cuadro 1.3**, utilizando conejos.

Cuadro 1.3: Esquema de inmunización para la obtención de un antisuero de conejo contra la notexina, una neurotoxina letal de veneno de la serpiente australiana *Notechis s. scutatus**

Día	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	92
Dosis (μ g)	1	1	2	2	4	4	8	8	16	16	24	24	sangría
Adyuvante	FC	FC	FC	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	--
Vía	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	arteria central oreja

* Ref: Alape-Girón *et al.* (1996). FC: adyuvante de Freund completo; FI: adyuvante de Freund incompleto; s.c.: subcutánea.

Tipos de antígenos

El peso molecular del antígeno influye en su inmunogenicidad. Las macromoléculas como proteínas, glicoproteínas, polisacáridos y otras, tienden a ser inmunogénicas *per se*. Las moléculas pequeñas, en el ámbito de 3.000-5.000 daltons, tienden a inducir una respuesta inmune débil, o incluso pueden carecer de inmunogenicidad. La respuesta inmune mejora notablemente cuando se acopla covalentemente estas moléculas pequeñas a una proteína **transportadora** inmunogénica. Las moléculas muy pequeñas, menores de 2.000-3.000 daltons, se comportan como **haptenos**. Esto significa que no son capaces de inducir respuesta por sí solas, por lo que deben ser necesariamente acopladas a un transportador inmunogénico. Es importante recalcar que, aunque los haptenos no inducen una respuesta inmune por sí solos, ellos son capaces de ser reconocidos (por sí solos) por los productos de una respuesta inmune (ej. anticuerpos), si estos ya han sido previamente generados.

Para obtener anticuerpos contra pequeños péptidos sintéticos, por ejemplo (**Cuadro 1.4**), se requiere acoplarlos covalentemente a algún transportador. Los métodos para realizar un acople hapteno-proteína son variados, y frecuentemente utilizan reactivos bifuncionales que establecen un enlace covalente entre las partes a conjugar (Mäkelä y Seppälä, 1986). A continuación se describe una técnica simple para acoplar péptidos a un transportador proteico, basada en el uso de carbodiimida. Este reactivo ataca los grupos carboxílicos (de los aminoácidos Asp y Glu, o el C-terminal libre) para convertirlos en sitios que reaccionan con los grupos amino libres (o primarios) del transportador.

Acople de péptidos pequeños a una proteína transportadora

1. Pesar 5 mg del péptido (3-5 μ moles, dependiendo del peso molecular) y disolver en 5 ml de agua destilada.
2. Agregar 50 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y ajustar el pH a \sim 5,0 colocando una gota sobre un papel indicador. Esperar 5 min y revisar nuevamente el pH para mantenerlo en \sim 5,0.
3. Agregar 17 mg de ovalbúmina u otro transportador proteico (0,3-0,5 μ moles, para obtener una relación molar péptido/transportador de \sim 10/1), disuelta en 5 ml de agua.
4. Incubar por 4 hr a temperatura ambiente.
5. Agregar 1 ml de acetato de sodio 1,0 M (pH 4,2), para una concentración final de 0,1 M, e incubar por 1 hr adicional.
6. Dializar o ultrafiltrar en una membrana de poro pequeño (ej. 3 kDa) contra solución salina amortiguada (ej. PBS, pH 7,2) y finalmente liofilizar.

Cuadro 1.4: Esquema de inmunización para la obtención de un antisuero de conejo contra el péptido sintético p115-129 (secuencia KKYRYYLKPLCKK) de la miotoxina II de *Bothrops asper*, conjugado al toxoide diftérico*

Día	Dosis	Adyuvante	Vía
1	3 mg	Freund completo	i.m.
23	1 mg	alginato	i.m.
51	1 mg	alginato	i.m.
65	1 mg	alginato	i.m.
113	0,5 mg	alginato	i.m.
164	0,5 mg	alginato	i.m.
174	sangría	- - -	arteria central oreja

* Ref: Calderón y Lomonte (1998). La relación molar entre el transportador y el péptido es de 1:3,2.

Los diversos inmunógenos o antígenos pueden clasificarse en dos grandes grupos, según su comportamiento inmunológico; esto es, el tipo y características de la respuesta inmune que inducen:

(1) La mayoría de moléculas de alta complejidad y asimetría estructural (ej. proteínas, glicoproteínas) se comportan como **antígenos T-dependientes**. Este nombre indica que estimulan a los linfocitos B solamente si se cuenta con la colaboración de los linfocitos T cooperadores (Th, CD4⁺). Típicamente estos antígenos inducen el fenómeno denominado **cambio de isotipo** en las células B; es decir, pasar de la síntesis inicial de IgM/IgD a la síntesis de otras clases de inmunoglobulinas como IgG, IgA e IgE (manteniendo el mismo **idiotipo**). Otra característica de estos antígenos es que inducen una población de linfocitos de memoria (T y B) considerable, lo que ocasiona que la respuesta a estímulos repetidos sea cada vez mayor, hasta un cierto límite.

(2) Por otra parte, las moléculas con estructuras repetitivas simples y simétricas (ej. polisacáridos, proteínas poliméricas), tienden a comportarse como **antígenos T-independientes**. Esto significa que tienen la capacidad de estimular a los linfocitos B sin requerir de señales de cooperación por parte de linfocitos T. Estos antígenos, por lo general, no inducen el cambio de isotipo, o en ocasiones inducen un leve cambio, limitado solo a ciertos isotipos como la IgG₃. También se caracterizan por dejar una memoria inmunológica muy débil y de corta duración, en comparación con los antígenos T-dependientes (Abbas *et al.*, 1994; Goldsby *et al.*, 2000). Los antígenos T-independientes del subgrupo 1 (TI-1) tienen la capacidad de activar una alta proporción de linfocitos B sin importar su especificidad antigénica (**activación policlonal**) cuando se administran en altas dosis. Ejemplos típicos de estos antígenos son los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de bacterias Gram-negativas.

Es posible convertir un antígeno T-independiente en T-dependiente, acoplándolo a una proteína u otra molécula capaz de estimular células T. Esto puede ser de utilidad para obtener altos niveles de anticuerpos IgG, y se ha explotado en la elaboración de vacunas contra polisacáridos bacterianos (por ejemplo, los polisacáridos de *Hemophilus influenzae* tipo b).

La degradabilidad del antígeno es otro factor importante para su inmunogenicidad, dado que las respuestas T-dependientes requieren de un procesamiento del antígeno por parte de células presentadoras.

Vía de administración del antígeno

Aunque muchos métodos coinciden en que la mejor ruta de administración para los antígenos particulados es la intravenosa, no hay un consenso sobre cuál es la mejor vía para los antígenos solubles. Diferentes revisiones sobre este tema recomiendan distintas rutas de inmunización. Mientras algunos sugieren utilizar sitios múltiples de inoculación, otros señalan que esto no es de ningún beneficio. Entre las vías de inmunización más utilizadas están la **subcutánea** (s.c.) y la **intramuscular** (i.m.). También existen otras como la **intradérmica** (i.d.; para volúmenes hasta de 100 μ l por sitio), la **intraperitoneal** (i.p.), la inyección en ganglios linfáticos, y la inyección en las almohadillas de las patas posteriores. En ciertos casos es de interés la inmunización por vía digestiva o vía nasal, por ejemplo en el estudio de la inmunidad en mucosas. En el caso de la administración oral de antígenos, se ha encontrado que, bajo ciertas circunstancias, se puede inducir un estado de **tolerancia** (tolerancia oral), un fenómeno que se investiga con gran interés por su potencial aplicación en la modulación terapéutica de enfermedades autoinmunes.

En conclusión, debido a la variabilidad de la respuesta inmune de cada individuo, es difícil determinar si un método es superior a otro. Esto requiere de diseños experimentales estadísticamente válidos, de un costo considerable, especialmente cuando se utiliza animales genéticamente heterogéneos. Por las mismas razones antes expuestas, es muy difícil predecir los resultados de distintos esquemas de inmunización con base en principios teóricos.

Calendario de inmunizaciones y sangrado

Por lo general, la primera dosis de refuerzo se administra de 15 a 30 días después de la dosis inicial. Se prosigue luego con varias dosis de refuerzo, por ejemplo cada 7, 15 o 30 días, hasta que se alcanza un nivel de anticuerpos satisfactorio. Algunos autores recomiendan dejar transcurrir el mayor tiempo posible entre las distintas dosis de antígeno (por ej. varios meses entre la dosis inicial y el primer refuerzo) para lograr antisueros de alta avidéz (Morris, 1980).

En contraste con la gran variedad de calendarios de inoculación descritos en la literatura, el momento óptimo para el sangrado final generalmente se ubica entre 7 y 15 días después del último refuerzo, cuando los niveles de anticuerpos alcanzan su máximo. Debido a que este alto nivel puede mantenerse por un período adicional variable, es conveniente no exsanguinar al animal, sino tomar sangrías voluminosas cada semana, mientras la calidad del antisuero se mantenga aceptable. Es importante obtener una muestra de suero antes de comenzar la inmunización (**suero pre-inmune**) como un valioso control para las distintas técnicas en que se evaluará y utilizará el antisuero obtenido.

Para el sangrado de conejos, una ruta conveniente y segura es la arteria central de las orejas (**Fig.1.8**). Esta puede dilatarse empleando una gota de xilol, y canularse cuidadosamente

con una aguja calibre 22 o 20 (sin jeringa), para obtener volúmenes hasta de 20-30 ml mediante goteo libre. Alternativamente, se puede realizar una sangría parcial o total mediante punción cardíaca (con aguja 20 o 18), aunque este procedimiento es de alto riesgo.

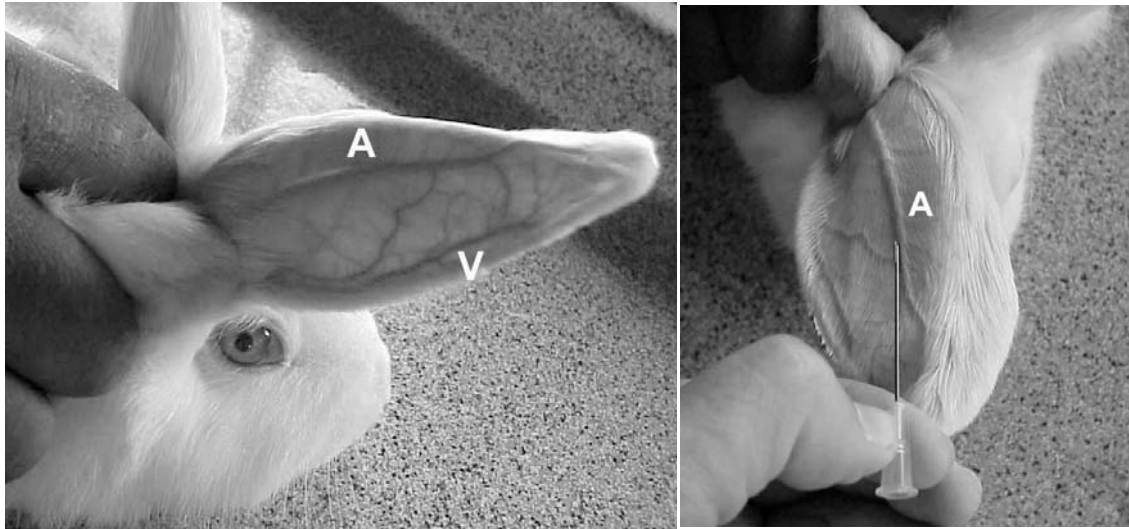


Figura 1.8: Sangría en conejo a través de la arteria central de la oreja. A la izquierda se señalan la arteria central (A), utilizada para la sangría, y la vena marginal (V), utilizada para la inyección intravenosa. A la derecha se muestra la forma para realizar la punción de la arteria, en forma muy superficial, con una aguja calibre 22 o 20 sin jeringa. La sangre se recoge por goteo libre en un tubo.

En el ratón, las sangrías exploratorias, o parciales, se realizan cortando la punta de la cola (2-3 mm) y recogiendo la sangre en un capilar heparinizado, el cual se sella por un extremo con plasticina. Para la exsanguinación, puede anestesiarse al animal con pentobarbital sódico o compuestos similares, y realizar una sangría retro-orbital (del ojo), recogiendo las gotas de sangre en un tubo o pipeta Pasteur (~1 ml). En nuestra experiencia, la anestesia de ratones con una inyección i.p. de Mebumal[®], en dosis de 0,6 mg/10 g de peso corporal, ha dado buenos resultados. Bajo esta anestesia profunda, también se puede realizar la exsanguinación cortando con una tijera la región axilar y recogiendo la sangre con una pipeta. De igual forma, puede hacerse una disección rápida y realizar una punción cardíaca, bajo anestesia, o posteriormente a la inhalación de CO₂ en una cámara especialmente adaptada para esto.

Evaluación del antisuero

Es conveniente realizar pequeñas sangrías exploratorias (sangrías de prueba) a lo largo del calendario de inmunizaciones, con base en las cuales se evalúa la respuesta de anticuerpos, y se decide si el animal está listo para una sangría voluminosa. La manera de evaluar un antisuero depende de la técnica en que se va a utilizar. Sin embargo, en ocasiones puede evaluarse mediante ciertos criterios generales, tales como una inmunodifusión en gel, una aglutinación, un ELISA, etc. (ver capítulos correspondientes en este Manual).

Cuando el inmunógeno es particulado (ej. bacterias, células) se puede evaluar el título y la especificidad del antisuero mediante una **aglutinación directa (Capítulo 8)**. En una aglutinación en lámina, el tiempo que tarda en evidenciarse la reacción, así como el tamaño de los grumos obtenidos, dan una idea aproximada de la avidez del antisuero. Una aglutinación rápida y fuerte indica que la avidez del antisuero es alta.

Para evaluar la respuesta hacia inmunógenos solubles se puede utilizar técnicas como la titulación por **doble inmunodifusión en gel (Capítulo 6)**. Alternativamente, se puede adsorber o acoplar el antígeno a una partícula de soporte para efectuar una **aglutinación pasiva (Capítulo 8)**, o emplear **técnicas inmunoenzimáticas** como el ELISA (**Capítulo 10**). Debe tenerse presente que los títulos obtenidos con diferentes técnicas no son comparables entre sí, debido a su distinta sensibilidad física, así como a otros factores involucrados en cada caso. Por ejemplo, un antisuero que reconozca a un antígeno con un título de 1:16 mediante doble inmunodifusión en gel, podría tener títulos de 1:100.000 o mayores si lo evaluamos mediante un ELISA suficientemente sensible.

La inmunización puede detenerse una vez alcanzado un título estable en el animal, si ya no mejora sensiblemente al aplicar nuevos refuerzos. Sin embargo, cabe destacar que a lo largo del tiempo puede producirse un aumento de la afinidad promedio de los anticuerpos.

Como criterios de evaluación de un antisuero, se utiliza tanto el aspecto cuantitativo (**título**) como el cualitativo (**afinidad y especificidad**), siendo este último el más importante. Para ciertas aplicaciones, no es tan primordial el hecho de que el antisuero posea un título muy alto, sino el que sea de una alta especificidad. Un ejemplo de esto podría ser el desarrollo de una técnica inmunológica para la determinación de una hormona, u otro analito particular, que requiere ser detectado muy selectivamente en el contexto de una muestra compleja. Para otros fines, la cantidad de anticuerpos puede ser el aspecto de mayor interés. Por ejemplo, un alto título es ventajoso para antisueros utilizados en la neutralización de toxinas, o de agentes infecciosos como los virus.

Existe la tendencia a pensar que una alta afinidad de los anticuerpos obtenidos se asocia siempre con una mayor especificidad en su reconocimiento del antígeno, y por ende, una mayor especificidad de las técnicas inmunológicas en que se emplean. Estos dos parámetros no necesariamente correlacionan. En ciertas circunstancias, por ej. en sistemas donde la muestra contiene sustancias que asemejan inmunoquímicamente al antígeno de interés, una alta afinidad de los anticuerpos podría conducir a una baja especificidad de la técnica. Para ilustrar la relación independiente que existe entre la afinidad y la especificidad de los anticuerpos, véase los datos presentados en la **Fig.1.9**.

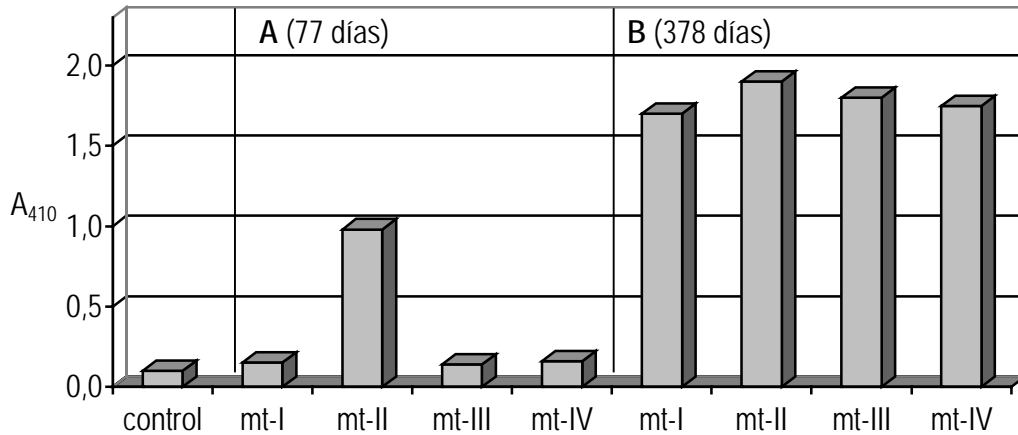


Figura 1.9: Especificidad de los anticuerpos contra la región 115-129 de la mitorxina II de *Bothrops asper*. Se unió distintas isoformas de mitorxina (mt-I, II, III y IV) a placas de ELISA, y se probó la reactividad de un suero de conejo generado contra la región 115-129 de la isoforma II, obtenido en distintos momentos de la inmunización: a los 77 días (A) y a los 378 días (B). En los inicios de la inmunización, pese a que los anticuerpos probablemente tienen menor afinidad y título, reconocen selectivamente a la toxina original, pero no a sus variantes o isoformas (las cuales poseen ligeras variaciones en su secuencia de aminoácidos). Al final de la inmunización, los anticuerpos reconocen indiscriminadamente a las 4 variantes de esta proteína. Ref: Calderón y Lomonte (1998).

La importancia de las variables arriba citadas, en cada método inmunológico, y su evaluación, requieren de una clara comprensión de los principios teóricos en que estos se fundamentan, así como de las circunstancias particulares involucradas en cada caso.

Método general para la preparación de un antisuero en conejo

Haciendo las salvedades señaladas en este capítulo con respecto a la diversidad de esquemas de inmunización existentes, la gran variabilidad de las respuestas inmunes, y las dificultades prácticas para demostrar objetivamente la superioridad de un método sobre otro, se presenta a continuación un método general de inmunización para antígenos proteicos. Este pretende ser solamente una guía de trabajo, que en nuestra experiencia ha dado resultados aceptables.

1. Seleccionar al menos 2 conejos jóvenes, de un peso corporal de al menos 2 Kg, para la inmunización. Los animales deben examinarse para verificar que no muestren signos de infección u otras patologías, y deben mantenerse en condiciones de bioterio adecuadas, en jaulas claramente rotuladas.

2. Tomar una muestra de sangre (2-3 ml) de la arteria central de la oreja, para conservar una alícuota de suero pre-inmune de cada animal.
3. Preparar el antígeno de interés, disolviendo 1-2 mg en 1 ml de solución salina o PBS. Emulsificarlo con 1,5 ml de adyuvante completo de Freund, como se describió en la sección sobre adyuvantes.
4. Inyectar por vía intramuscular, en dos puntos distintos del muslo de cada conejo, 0,5 ml de la emulsión (0,5-1,0 mg de antígeno por conejo). Verificar que la aguja no se encuentre intravenosa, aspirando ligeramente con la jeringa antes de inyectar.
5. Inyectar dosis de refuerzo (0,2-1,0 mg de antígeno por conejo) por la vía intramuscular, emulsificado en adyuvante de Freund incompleto, o disuelto en alginato de sodio (~1 ml). Repetir cada 2 semanas, hasta cumplir 10-12 semanas. La respuesta se puede evaluar 10 días después de cada refuerzo, por ejemplo mediante una doble inmunodifusión en gel. La formación de una banda de precipitación nítida e intensa, indica una afinidad y título apropiados.
6. Una vez alcanzada una respuesta satisfactoria, sangrar a los animales de la arteria central de la oreja (ej. 20-30 ml), separar el suero inmune, y conservarlo en alícuotas a -20°C.

Inmunización con ADN

En años más recientes, se ha desarrollado una nueva estrategia para la inmunización hacia antígenos proteicos, en la cual se administra al individuo el ADN que codifica para el antígeno de interés (en vez del antígeno). El ADN se puede introducir por la vía intramuscular, o a través de la superficie de la piel (en este caso utilizando una pistola de helio a presión; "*gene gun*"; **Fig.1.10**). Las células del organismo captan el ADN y sintetizan el antígeno codificado, durante un lapso de tiempo variable, suficiente para que se desarrolle una respuesta inmune.

Esta estrategia ha cobrado importancia para la inmunización con antígenos de difícil purificación, gracias al auge y la simplicidad de las técnicas para clonar y manipular ADN. La técnica elimina la necesidad de expresar previamente los genes como proteínas para poder inmunizar, poniendo a las propias células del organismo receptor a realizar esta tarea. Diversos estudios han demostrado la factibilidad de estos procedimientos basados en ADN y la posibilidad de obtener respuestas inmunes satisfactorias, como una interesante alternativa con respecto a la inmunización convencional utilizando antígenos (Weiner, 1998; Lizano, 2001). Sin embargo, en ocasiones se obtienen respuestas inmunes de menor magnitud que las obtenidas en forma convencional, administrando directamente el antígeno proteico.



Figura 1.10: **Inmunización de ratones con ADN.** La imagen de la izquierda muestra una pistola génica, utilizada para impulsar partículas de oro recubiertas con el ADN de interés, a través de la piel. Al centro se observa un ratón con el abdomen rasurado, listo para recibir el "disparo" de ADN (derecha).

Cuadro 1.5: **Algunos datos de interés para la cría de animales de experimentación.**

Característica	Ratón	Cobayo	Conejo
Edad de la pubertad	35-40 días	45-70 días	120-180 días
Período de gestación	18-21 días	62-72 días	30-32 días
Duración del ciclo sexual	4-5 días	16-19 días	irregular, ovulación estimulada por el apareamiento
Edad del destete	18-28 días	20-21 días	6-8 semanas

Cuadro 1.6: **Algunos parámetros fisiológicos de animales de experimentación.**

Característica	Ratón	Cobayo	Conejo
Temperatura rectal, °C	35,7-37,9	37,6-39,4	37,5-39,9
Frecuencia respiratoria (/min)	84-230	69-104	36-56
Frecuencia cardíaca (/min)	328-780	260-400	123-304
Peso promedio adulto, kg	0,025	0,7	4,0
Eritrocitos, $\times 10^6/\mu\text{l}$	7,7-25,0	4,5-7,0	4,5-7,0
Hemoglobina, g/dl	14,8	12,3	13,6
Leucocitos, $\times 10^3/\mu\text{l}$	8,0	10,0	9,0
Temperatura óptima, °C	20-24	18-24	17-20
Humedad relativa óptima, %	45-55	45-55	40-60

Capítulo 2

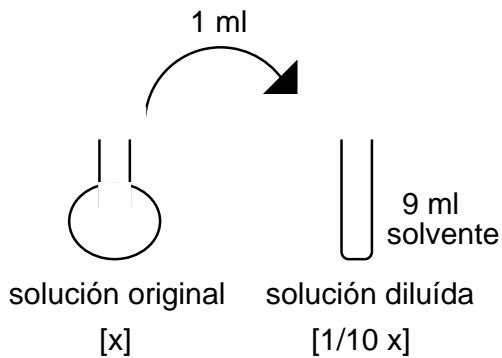
Diluciones Seriadas y Pruebas Serológicas de Titulación

Introducción

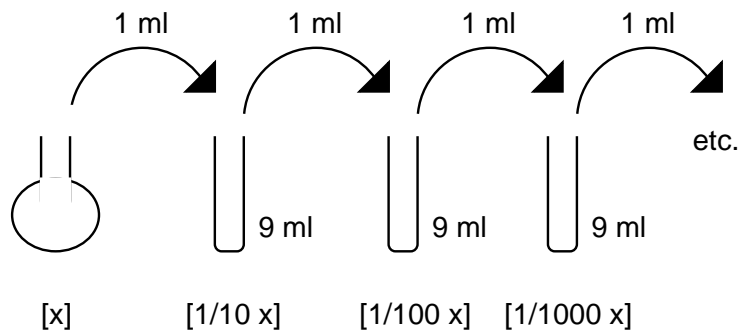
El concepto de **dilución** puede definirse simplemente como la disminución de la concentración de una sustancia en una solución. La preparación de diluciones es una tarea cotidiana en el trabajo de laboratorio, y es fundamental en una gran variedad de técnicas, por lo que la comprensión de sus aspectos básicos y prácticos es de suma importancia.

Dilución directa vs. dilución seriada

Una dilución es **directa** cuando se realiza en un solo paso, desde la solución original hasta la solución final (Ej. 1):



Note que al pasar 1 ml de la solución original al tubo que contiene 9 ml del solvente, obtenemos un **volumen final (VF)** de 10 ml, con lo que habremos disminuído la concentración 10 veces. Es decir, el **factor de dilución (FD)** es 10. El FD es el número de veces que disminuye la concentración de la sustancia original en un paso de dilución. Cuando se prepara un conjunto de diluciones en secuencia, cada una a partir de la anterior, con un FD constante, las llamamos diluciones **seriadas** (Ej. 2):



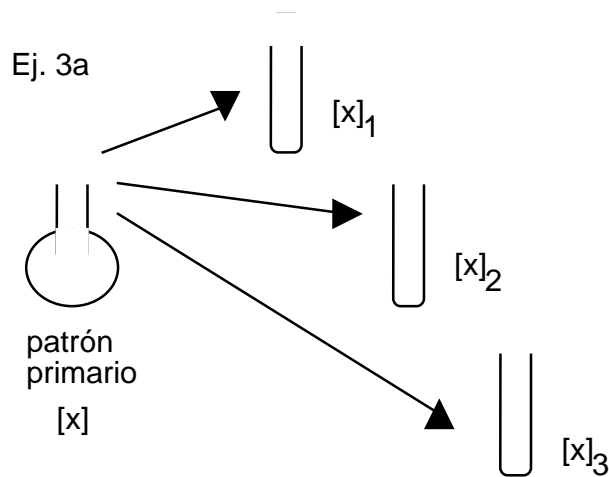
En cada paso de la serie del ejemplo 2, estamos diluyendo 10 veces la solución del tubo precedente, por lo que el FD es 10. Conociendo el FD, podemos calcular cuál es la

dilución de la sustancia original que hay en cada tubo (concentración relativa). En el tubo #1 la concentración es $1/10$ con respecto a la muestra original. En el tubo #2 la concentración es $1/10$ con respecto al tubo anterior, y es $(1/10)(1/10) = 1/100$ con respecto a la muestra original, y así sucesivamente.

En serología se utiliza ampliamente el proceso de dilución seriada para la realización de diversas pruebas de rutina clínica y de investigación. Pero antes de describir los detalles prácticos del montaje de las diluciones seriadas, es necesario señalar una de sus características importantes, que las diferencia de las diluciones directas:

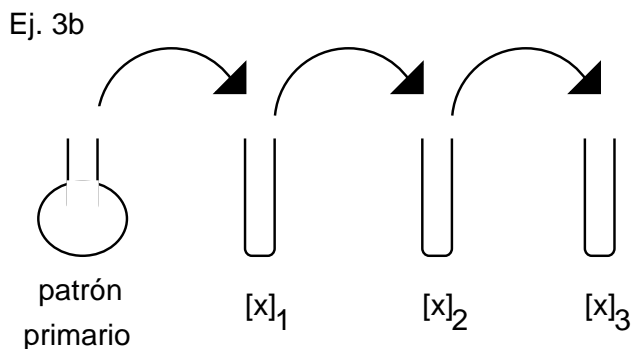
- ◆ las diluciones directas permiten obtener resultados cuantitativos.
- ◆ las diluciones seriadas solo permiten obtener resultados semi-cuantitativos.

¿A qué se debe esta diferencia? Toda medida conlleva un cierto grado de error, o **incertidumbre**. A mayor número de pasos en un proceso, mayor es la incertidumbre que se acumula. Veamos el Ej. 3. Suponga que tenemos una solución de concentración conocida (ej. un patrón primario de una sal, preparado por gravimetría) y queremos preparar soluciones de diversas concentraciones a partir de dicho patrón:



Teóricamente podríamos usar diluciones directas (Ej. 3a) o diluciones seriadas (Ej. 3b) para dicho fin. En el caso de las directas, cada una de ellas posee una incertidumbre similar, ya que se han realizado en un solo paso.

Por otra parte, al utilizar la forma seriada (Ej. 3b), cada solución es preparada a partir de la anterior, por lo que el error de medición se propaga y se amplifica: la incertidumbre aumenta proporcionalmente al número de pasos de dilución.







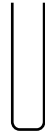


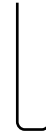
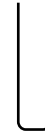




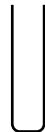


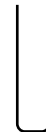
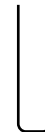




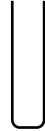


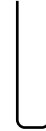
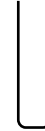
Si la exactitud y precisión logradas mediante diluciones directas son superiores a las obtenidas por dilución seriada, cabe preguntarse cuál es la razón para el uso tan frecuente de estas últimas en serología. Su principal ventaja radica en la posibilidad de abarcar un ámbito muy amplio de concentraciones (diluciones), usando mediciones sencillas y repetitivas.

Note, en el esquema del Ej.3, que las distancias entre las distintas concentraciones de una serie son logarítmicas. En cambio, el ámbito de diluciones obtenible por un proceso directo es mucho más reducido.

Pruebas serológicas de titulación

Muchas pruebas serológicas consisten en estimar, de modo semicuantitativo, la cantidad relativa de anticuerpos séricos contra un determinado antígeno, en un individuo. Para esto se realiza una serie de diluciones de su suero (u otros tipos de muestras) con un solvente apropiado para la prueba, y luego se enfrenta cada dilución contra el antígeno de interés, mediante algún tipo de reacción inmunológica. A mayor concentración de anticuerpos en la muestra, mayor será la dilución capaz de dar una reacción positiva a la prueba.

Ej. 4:

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	Dilución
									
suero 1	+	+	+	+	-	-	-	-	Lectura
									
suero 2	+	+	+	+	+	+	+	-	Lectura
									
suero 3	+	+	+	±?	-	-	-	-	Lectura

En este caso, observamos que el suero 2 posee mayor cantidad de anticuerpos contra el antígeno que se probó, en comparación con el suero 1, ya que aún diluyéndolo 1:128 fue capaz de dar una reacción positiva, mientras que el suero 1 alcanzó a dar positivo hasta una dilución máxima de 1:16. Los resultados se pueden expresar con el término de "**título**" de una muestra, que se define como el inverso de la máxima dilución que da una reacción francamente positiva en una prueba determinada. En el Ej. 4, diríamos que el título del suero 1 es de 16, mientras que el título del suero 2 es de 128. También puede expresarse el título en la forma 1/16, ó 1:16, ó "16 diluciones", etc. Todas estas maneras de expresión

tienen un mismo significado. Note que el suero 3 tendría un título de 8 (o 1:8) porque es la mayor dilución francamente positiva (la reacción en 1:16 fue dudosa).

Aunque en los ejemplos descritos se estimó la cantidad de anticuerpos contra un antígeno dado, los mismos principios podrían ser aplicables a la situación inversa, es decir, la estimación semicuantitativa de un antígeno en la muestras, utilizando sus respectivos anticuerpos.

Cómo preparar diluciones seriadas

La primera decisión al diseñar una dilución seriada es cuál va a ser el **volumen final** (VF) que queremos que quede en los tubos. Para algunas pruebas (por ej. aglutinaciones en tubo o en placas de 96 hoyos; **Capítulo 8**), es conveniente que el VF sea exactamente el volumen requerido para la técnica a realizar. De esta forma, una vez terminadas las diluciones, podemos adicionar los reactivos necesarios a cada tubo (u hoyo) y ahorrar tiempo y material. En otros casos, por el contrario, se necesita que el volumen final sea ligeramente superior al volumen requerido en la técnica. Por ejemplo, al preparar una serie de diluciones para una titulación mediante ELISA (**Capítulo 10**), en donde se requieren muestras de 100 µl por triplicado, un volumen final apropiado para los tubos podría ser de 400 o 500 µl (permitiría pipetear fácilmente 100 µl tres veces).

Una vez determinado el VF, se adiciona a cada tubo de la serie un volumen de solvente igual al VF deseado. El **volumen de transferencia** (VT) es el volumen de solución original (muestra) que agregamos al primer tubo, y que seguimos transvasando a cada tubo hasta completar la serie. El VT se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$VT = \frac{VF}{FD-1}$$

Pasos para el montaje de diluciones seriadas:

- 1.Preparar y rotular los tubos necesarios.
- 2.Adicionar a cada tubo un volumen de solvente igual al VF.
- 3.Calcular el VT.
- 4.Transferir el VT de la muestra al primer tubo.
- 5.Homogenizar.
- 6.Transferir el VT del primer tubo diluído al segundo.
- 7.Homogenizar.
- 8.Continuar transvasando y homogenizando hasta el final.

Ejemplo: ¿Cómo preparar una serie de diluciones (5 tubos) para una prueba de aglutinación que utiliza 0,4 ml de muestra y 0,1 ml de antígeno, con FD=3 y utilizando NaCl 0,15 M como solvente?

En primer lugar, preparamos los 5 tubos que usa dicha técnica, los rotulamos y colocamos en cada uno un volumen de solvente igual a VF que deseamos obtener, o sea, 0,4 ml. Luego calculamos el VT:

$$VT = \frac{VF}{FD-1} = \frac{0,4 \text{ ml}}{3 - 1} = 0,2 \text{ ml}$$

Esto nos indica que debemos transvasar en cada paso un volumen de 0,2 ml. Al llegar al último tubo de la serie descartamos 0,2 ml (el VT), para así obtener el mismo VF en todos los tubos. Algunas veces, principalmente cuando se sospecha que un suero posee un título muy alto para la prueba que estamos realizando, este "sobrante" del último tubo se conserva aparte, con el fin de seguir diluyéndolo en el caso de que todas las diluciones preparadas den positiva la prueba.

Principales cuidados en las diluciones seriadas

La homogenización minuciosa de cada tubo, después de pipetear, es un cuidado fundamental para la correcta preparación de una serie de diluciones. Para esto, mezclamos bien el líquido agregado y el solvente, utilizando la misma pipeta con que vamos transvasando, mediante su llenado y vaciado sucesivo por un mínimo de 5 veces. Dado que la pipeta se está utilizando simultáneamente para la medición y para la homogenización, es posible utilizar una misma pipeta (o puntilla descartable) en todo el proceso, para una misma serie. Los agitadores mecánicos para tubos (ej. Vortex[®]) sustituyen eficazmente la homogenización por pipeteo repetido, agilizando el trabajo.

El uso correcto de las pipetas es fundamental para la obtención de resultados confiables. Las pipetas automáticas agilizan el trabajo de diluciones, y es importante tener claros los detalles de su manejo antes de su empleo. Asimismo, es importante mantener su calibración periódicamente.

Al realizar diluciones seriadas con todos los cuidados y recomendaciones, se logra una precisión de ± 1 tubo (± 1 paso de dilución), por las mismas razones que explican la semicuantitatividad del método. Este es el nivel de incertidumbre aceptado en las titulaciones. Ello implica, por ejemplo, que una diferencia de solo un tubo (un paso de dilución) entre dos muestras, no es significativa. Este concepto tiene relevancia en el trabajo clínico, en especial cuando se realiza la titulación serológica de dos muestras de suero de un mismo paciente, tomadas con 10-15 días de diferencia, con el fin de determinar si en ese lapso ha ocurrido una elevación significativa del nivel de anticuerpos contra un antígeno dado (ej. un agente infeccioso). Este es el concepto de **seroconversión**. Cuando el aumento que se observa en el título es de al menos 2 pasos de dilución, se puede tener certeza de que ha ocurrido una seroconversión. Un aumento de solo 1 paso quedaría en la zona de incertidumbre.

Finalmente, debe recalarse que los procedimientos incorrectos o poco cuidadosos durante la preparación de diluciones seriadas, invalidan cualquier resultado obtenido por este método, y con ello, la confiabilidad de las pruebas.

Ejemplos de la aplicación de diluciones seriadas en titulaciones

Para ilustrar la aplicación de las diluciones seriadas se describirá la titulación de un suero anti-eritrocitos de carnero, preparado en conejo. Este antisuero es útil en diversas técnicas inmunológicas (ej. en la cuantificación de la actividad lítica del complemento). El suero se obtiene mediante la inmunización de conejos con eritrocitos frescos de carnero, o alternativamente, con estromas desnaturalizados de dichos eritrocitos. Un nombre común que recibe este antisuero es el de "hemolisina", debido a que sus anticuerpos IgG e IgM, al activar el complemento, son capaces de inducir la lisis de los glóbulos rojos reconocidos.

La titulación de este antisuero se puede realizar fácilmente mediante técnicas de aglutinación de eritrocitos (**Capítulo 8**). Las más convenientes son las de microaglutinación, realizadas en placas de 96 hoyos con fondo en "U", preparando las diluciones con micropipetas automáticas. Sin embargo, si no se cuenta con el equipo para microaglutinación, se puede utilizar el método tradicional en tubos de ensayo, trabajando incluso con pipetas de vidrio. El uso de este tipo de pipetas presenta una limitación importante en el trabajo serológico, ya que a raíz del riesgo de contaminación por diversos agentes infecciosos, **no es permitido pipetear materiales biológicos mediante aspiración con la boca**. El uso de aditamentos como peras de succión, u otros, acoplados a pipetas de vidrio, hace muy engorrosa la preparación de diluciones seriadas. Por esta razón, se debe preferir siempre el uso de micropipetas automáticas para el trabajo serológico con diluciones.

Para los métodos de titulación por hemaglutinación en tubo, o por microhemaglutinación en placa, referirse a las descripciones correspondientes, en el **Capítulo 8**.

Capítulo 3

Purificación de Inmunoglobulinas mediante Técnicas de Precipitación

Introducción

Los métodos de precipitación de proteínas mediante el uso de compuestos orgánicos (ej. rivanol, ácido caprílico) o de sales inorgánicas (ej. sulfato de amonio, sulfato de sodio) se han utilizado por más de 60 años para fines de su purificación parcial. Sus principales ventajas sobre otras técnicas más modernas son la simplicidad, el bajo costo, la rapidez, y el alto rendimiento final.

La precipitación de proteínas por efecto de sales inorgánicas (*salting-out*) ha sido investigada en detalle. En general, el aumento de la concentración de iones en el solvente conduce a una mayor interacción proteína-proteína, y la consiguiente disminución en su solubilidad. Cada proteína precipita a una cierta concentración de sales, y las diferencias entre las proteínas son aprovechadas para lograr su separación. Los factores más importantes en este proceso son el pH, la temperatura y la concentración de proteínas (Tijssen, 1985; Heide y Schwick, 1978). Para las **inmunoglobulinas** (Igs) se utiliza un pH cercano a su punto isoelectrico promedio, usualmente entre pH 7,0-8,0. La mayoría de proteínas son menos solubles al aumentar la temperatura (por ejemplo, de 4°C a temperatura ambiente). En cuanto a la concentración de proteínas, cuando esta es baja se requiere mayor concentración salina para la precipitación, y viceversa.

Los métodos de precipitación proteica tienen gran utilidad cuando se desea obtener una preparación de inmunoglobulinas parcialmente purificadas, con un mínimo de recursos y un máximo de rendimiento, en forma rápida. Entre estos, los métodos que utilizan sales proporcionan preparaciones enriquecidas en inmunoglobulinas, aunque no logran eliminar por completo la albúmina sérica, así como diversas globulinas del plasma. Por otro lado, la utilización del ácido caprílico (octanoico) es notable, por la relativa pureza con la que se obtienen las inmunoglobulinas, con una contaminación mucho más baja de albúmina, en comparación con el uso de sales (**Fig.3.1**).

El ácido caprílico causa la precipitación de la mayoría de proteínas plasmáticas, con excepción de las inmunoglobulinas, las cuales quedan en solución. Por el contrario, las sales inorgánicas causan la precipitación de las inmunoglobulinas (y otras globulinas), dejando a la albúmina en solución. En este sentido es importante notar que en la precipitación por sales, las inmunoglobulinas son sometidas a un proceso de desnaturalización reversible, ya que se hacen precipitar y luego se redisuelven nuevamente (disminuyendo la salinidad del medio). Esto puede resultar, potencialmente, en mayores alteraciones moleculares en las inmunoglobulinas. Sin embargo, una ventaja es que al momento de redisolver las inmunoglobulinas precipitadas, se tiene la opción de poder

concentrarlas, manteniendo el volumen del solvente a un mínimo. Por otra parte, la técnica del ácido caprílico se considera como un tratamiento menos drástico para las inmunoglobulinas, ya que no las desnaturaliza, aunque a diferencia del método anterior, no permite concentrarlas directamente.

A continuación se presentan algunos procedimientos descritos para la purificación parcial de inmunoglobulinas, basados en procesos de precipitación diferencial de proteínas.

Purificación de Igs séricas por precipitación con sulfato de amonio (Hudson y Hay, 1989)

1. Disolver 1000 g de sulfato de amonio (de alta pureza, libre de metales) en 1000 ml de agua destilada, a ~50°C. Dejar a temperatura ambiente durante la noche y ajustar el pH a 7,2 con una solución diluída de cloruro de amonio o de ácido sulfúrico.
2. Diluir la muestra de suero 1:2 con solución salina fisiológica (NaCl 0,15 M). Colocarlo en un recipiente apropiado, sobre un agitador magnético, a velocidad moderada. Evitar la formación de espuma, pues implica la desnaturalización de proteínas.
3. Agregar la cantidad requerida del sulfato de amonio saturado, poco a poco, para llegar a una concentración final de 45% v/v (ver fórmula adelante). Por ejemplo, para 10 ml de suero se agregan 8,2 ml de sulfato de amonio 100% saturado. La solución se torna blancuzca, por la formación de un precipitado. Dejar en agitación suave por 15-30 min adicionales, para que los grumos de precipitación crezcan.
4. Centrifugar por 15 min a 1000xg y descartar el sobrenadante.
5. Lavar el precipitado, agregando abundante sulfato de amonio (al 45% de saturación), y resuspendiendo bien los grumos del precipitado. Note que a esta concentración el sulfato de amonio no permite que el precipitado se redisuelva, y funciona solo como un solvente que diluye aquellas proteínas que aún están solubles (principalmente albúmina), atrapadas entre los grumos de precipitado. Centrifugar de nuevo.
6. Descartar el sobrenadante y redisolver el precipitado, al mismo volumen de la muestra original, con solución salina. Centrifugar una vez más, con el fin de eliminar residuos de proteína insoluble (desnaturalizada de modo irreversible). Recoger el sobrenadante.
7. Re-precipitar las inmunoglobulinas, ahora con una concentración final de 40% del sulfato de amonio saturado. Centrifugar.
8. Descartar el sobrenadante. Lavar el precipitado con sulfato de amonio al 40% de saturación, y centrifugar.

9. Descartar el sobrenadante. Redisolver el precipitado en un volumen mínimo de solución salina, o de PBS (salina amortiguada con fosfatos, pH 7,2).
10. Eliminar las sales de la preparación final mediante diálisis contra PBS (ej. 5 cambios de 1 litro en 24 hr), ultrafiltración, o cromatografía de filtración en gel (ej. Sephadex P-10, G-25, u otros medios similares).

Nota: Para calcular el volumen de solución saturada que se requiere para alcanzar una concentración dada de sulfato de amonio, se puede utilizar la siguiente fórmula:

$V = \frac{V_m (S_f - S_i)}{1 - S_f}$	<p>V = volumen de solución saturada a agregar</p> <p>V_m = volumen de la muestra de suero a procesar</p> <p>S_f = saturación final deseada</p> <p>S_i = saturación inicial</p>
---------------------------------------	--

Cuadro 3.1: Soluciones saturadas de sulfato de amonio en agua, a diferentes temperaturas*.

Temperatura, °C	0	10	20	25	30
Moles de (NH ₄) ₂ SO ₄ en 1000 g de agua	5,35	5,53	5,73	5,82	5,91
g de (NH ₄) ₂ SO ₄ en 1000 g de agua	706,9	730,7	757,1	769,1	781,0
Porcentaje por peso	41,42	42,22	43,09	43,47	43,85
Densidad (interpolada)	1,2428	1,2436	1,2447	1,2450	1,2449
g de (NH ₄) ₂ SO ₄ en 1000 ml de solución	514,7	525,1	536,3	541,2	545,9
Moles de (NH ₄) ₂ SO ₄ en 1000 ml de solución	3,90	3,97	4,06	4,10	4,13
g de (NH ₄) ₂ SO ₄ a agregar a 1000 ml agua	706,8	730,5	755,8	766,8	777,5

* Heide y Schwick (1978).

Purificación de IgG sérica mediante ácido caprílico (Tijssen, 1985)

Esta técnica permite la purificación rápida de IgG de muchas especies, a partir del suero. También se ha descrito su utilización para purificar anticuerpos monoclonales murinos a partir de fluido ascítico (McKinney y Parkinson, 1987). El ácido caprílico u octanoico se utiliza en condiciones a las cuales precipitan las otras proteínas plasmáticas, dejando a las inmunoglobulinas en solución. La pureza final de la IgG obtenida es cercana al 90% (Tijssen, 1985).

1. Para cada 100 ml de suero, agregar 200 ml de acetato de sodio 0,06 M a pH 4,0 para llegar a un pH final de 4,8.
2. Agregar 6,8 g de ácido caprílico, gradualmente, con agitación fuerte. Dejar 30 min en agitación.
3. Centrifugar. Recoger el sobrenadante y subir el pH con NaOH 1,0 M, hasta el pH deseado. Eliminar las sales y el ácido caprílico de la preparación final mediante diálisis contra PBS (**Fig.3.2**), ultrafiltración, o cromatografía de filtración en gel.

Purificación de IgG sérica por un método combinado, mediante sulfato de amonio y ácido caprílico (McKinney y Parkinson, 1987)

1. Precipitar con ácido caprílico como se describe arriba. Recoger el sobrenadante y ajustar el pH a 7,4 con NaOH 1 M.
2. Precipitar con sulfato de amonio sólido (0,28 g/ml para obtener 45% de saturación) y agitar por 15-30 min, a temperatura ambiente.
3. Centrifugar por 15 min a 5000xg y redissolver el precipitado en PBS, usualmente a 1/10 del volumen original. Eliminar las sales de la preparación final mediante diálisis contra PBS, ultrafiltración, o cromatografía de filtración en gel.

Purificación de Igs equinas mediante ácido caprílico (Rojas et al., 1994)

1. Agregar al plasma equino ácido caprílico (99%) suficiente para lograr una concentración final del 5% (v/v).
2. Agitar fuertemente por 30 min a temperatura ambiente.
3. Filtrar con papel retentivo y obtener el sobrenadante claro. Alternativamente, para procesar pequeños volúmenes, puede centrifugarse por 10 min a 1000xg.
4. Eliminar el ácido caprílico de la preparación final mediante diálisis contra PBS, ultrafiltración, o cromatografía de filtración en gel.

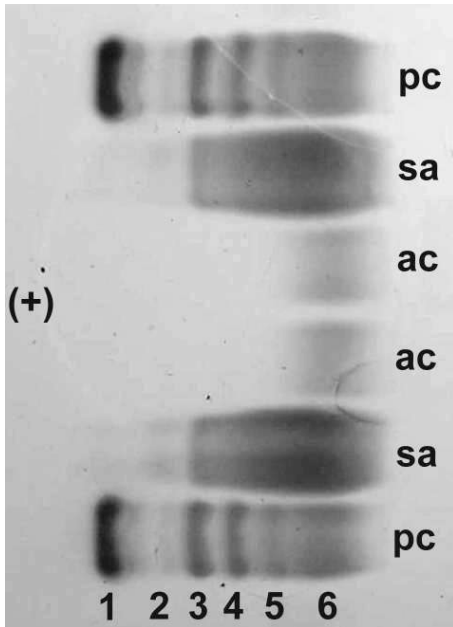


Figura 3.1: **Análisis electroforético** de preparaciones de inmunoglobulinas equinas obtenidas mediante las técnicas de precipitación por sulfato de amonio (sa) o ácido caprílico (ac), respectivamente. El plasma completo (pc) de caballo fue el material inicial, en el cual se puede identificar las distintas bandas: (1) albúmina, (2) alfa-1, (3) alfa-2, (4) beta, (5) fibrinógeno y (6) gamaglobulinas. Nótese como las inmunoglobulinas purificadas mediante sulfato de amonio arrastran cantidades importantes de todas las globulinas y trazas de albúmina, mientras las inmunoglobulinas obtenidas mediante ácido caprílico, aunque están más diluidas, corresponden principalmente a la región electroforética gama. Para una explicación sobre la técnica de electroforesis de componentes séricos, referirse al **Capítulo 11**.

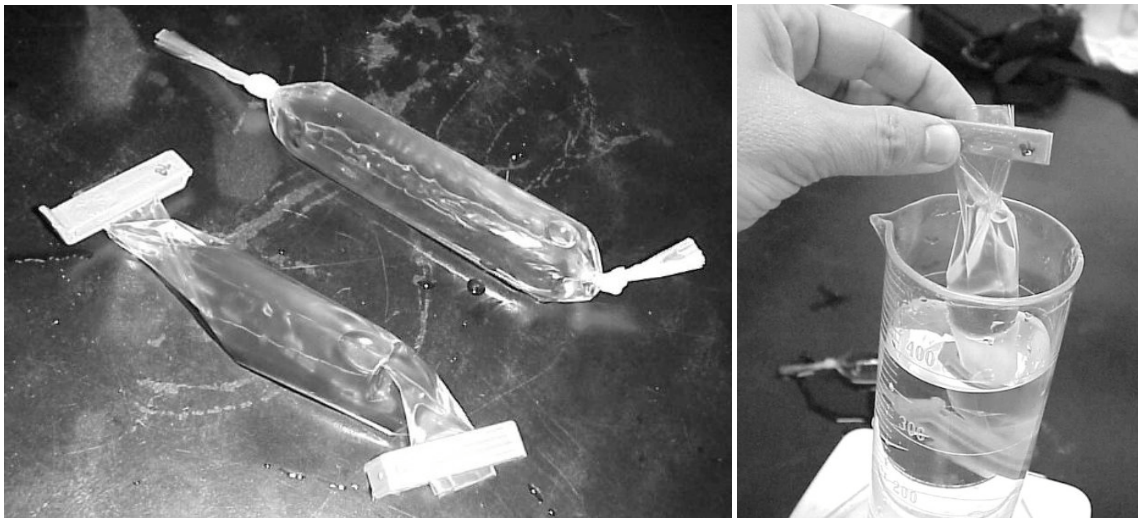


Figura 3.2: **Diálisis**. Las bolsas o membranas de diálisis secas se hidratan en agua destilada y se llenan con la solución proteica, de la cual se va a eliminar las sales y otros pequeños solutos. Debe conocerse de antemano el tamaño nominal del poro, dado por el fabricante (ej. 3.500 daltons, 12.000 daltons, etc.) para asegurarnos de que la proteína de interés no va a escapar de la bolsa junto con los solutos. Las bolsas se sellan en sus extremos mediante prensas especiales, o alternativamente, haciendo nudos (con el cuidado de no tensar excesivamente la región de la membrana que participa en la diálisis, para no alterar mecánicamente el tamaño de los poros). Finalmente se sumerge la bolsa de diálisis en el solvente final deseado (agua destilada, PBS, etc.) y se deja difundir pasivamente los solutos, manteniendo una agitación suave y realizando varios cambios del solvente, preferiblemente a 4°C.

Capítulo 4

Cromatografía de Afinidad e Inmunofinidad

Introducción

La cromatografía de afinidad explota las **interacciones específicas** que ocurren entre las biomoléculas, con la finalidad de lograr su separación. En la naturaleza existen muchos sistemas de unión específica o selectiva, entre los que se puede citar las interacciones antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato, enzima-inhibidor, oligosacárido-lectina, hormona-receptor, ácido nucleico-proteínas, etc. Además de las interacciones naturales citadas, pueden encontrarse interacciones fortuitas, que no por ello son de menor utilidad.

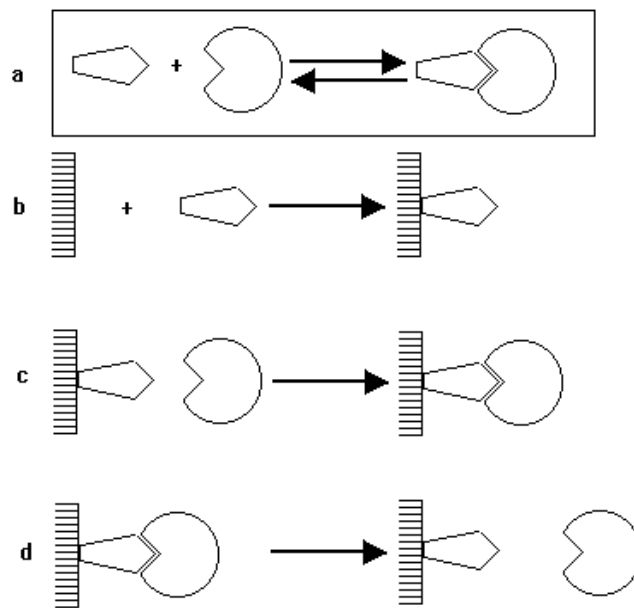


Figura 4.1: **Principio de la cromatografía de afinidad.** En un sistema de interacción específica y reversible entre dos componentes (a), se acopla covalentemente uno de ellos a un medio de soporte (b). Al componente inmovilizado de esta manera se le denomina ligando. Al pasar una muestra heterogénea que contiene el componente complementario, este se unirá al ligando (c), permitiendo así eliminar las demás moléculas mediante lavado. Finalmente, el componente de interés es eluido mediante un cambio en las condiciones del medio, y recuperado (d). *Ref:* adaptado de Pharmacia Biotech, Suecia.

El principio de la cromatografía de afinidad es simple (**Fig.4.1**): se acopla **covalentemente** uno de los dos componentes a un medio de soporte, para capturar al componente complementario a partir de una mezcla compleja de moléculas. Esta unión es

reversible. Después de lavar las moléculas no unidas, se eluye el componente de interés mediante un cambio en las condiciones del medio, que induzcan una disociación.

Para la elución de una columna de afinidad es común utilizar cambios de pH que alteren la afinidad de la unión, causando cambios reversibles y transitorios en las proteínas. Sin embargo también existen otras estrategias para la elución, tales como el uso de soluciones salinas de alta molaridad, el uso de agentes caotrópicos (**Cuadro 4.1**), o las eluciones de tipo competitivo que utilizan el mismo ligando, pero en estado libre.

Cuadro 4.1: Algunas formas de elución en la cromatografía de afinidad *

Condiciones de elución	Comentarios
Glicina-HCl, pH 2,5-3,0	Incompatible con el uso de deoxicolato
Acido propiónico 1 M	Más eficiente que el HCl al mismo pH, posiblemente por una ligera acción detergente. Pero puede causar desnaturalización irreversible.
Dietilamina 0,05 M, pH 11,5	Compatible con deoxicolato, por lo que es útil para antígenos de membrana.
Urea 2-8 M, pH 7,0	El calentamiento causa carbamilación de proteínas
Guanidina-HCl 6 M	Fuertemente desnaturalizante
Tiocianato de sodio 3,5 M	Las trazas inhiben el marcaje con yodo o fluoresceína
Cloruro de magnesio 2-5 M	Incompatible con el uso de deoxicolato
Yoduro de potasio 2-5 M, pH 7,5-9,0	-
Etilén glicol 50% v/v, pH 11,5	Rompe interacciones hidrofóbicas

* Goding (1986)

La cromatografía de afinidad ha ganado terreno por su simplicidad y rapidez, así como su alta selectividad, especialmente después de la introducción de los **anticuerpos monoclonales** (AcM). Con un AcM adecuado, en principio es posible aislar cualquier antígeno en un solo paso cromatográfico y con un alto grado de purificación. En la práctica, sin embargo, pueden presentarse diversos tipos de limitaciones al respecto.

Comercialmente, están disponibles varios tipos de medios de soporte (en forma de microesferas) pre-activados por métodos químicos, para acoplar prácticamente cualquier clase de ligandos, y aislar así sus moléculas complementarias naturales (o fortuitas). La mayoría de las reacciones de acople a un soporte se realizan a través de los grupos amino primarios de las proteínas, a pesar de que el enlace resultante es uno de los menos estables (Goding, 1986). También existen medios de soporte para realizar acoples covalentes a través de otros grupos químicos.

Algunos medios de soporte tienen un **brazo espaciador** en su grupo reactivo, cuyo fin es aumentar la distancia entre la superficie del medio y la molécula covalentemente acoplada. Esto pretende reducir el impedimento estérico en la interacción entre el ligando y su componente complementario, durante el proceso cromatográfico (**Fig.4.2**). Sin embargo, el brazo espaciador también puede dar lugar a fenómenos de adsorción inespecífica de algunas moléculas, especialmente cuando el mismo es de naturaleza hidrofóbica, y se trabaja con una alta concentración de sales. Otro aspecto a considerar en el acople del ligando al medio de soporte es que, en ocasiones, pueden ocurrir cambios importantes en su conformación nativa, en especial cuando el ligando reacciona con el soporte a través de múltiples puntos de unión.

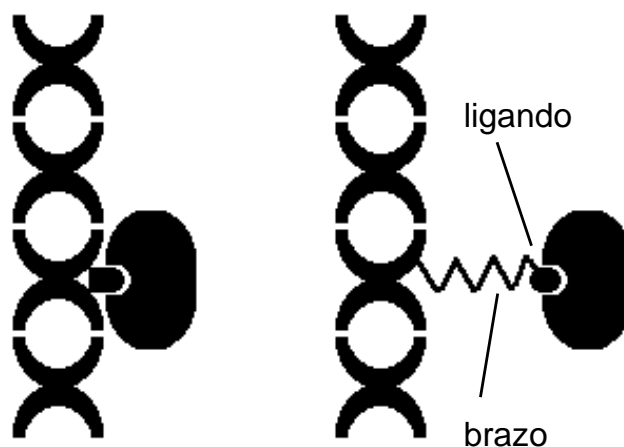


Figura 4.2: El "brazo espaciador". Se esquematiza el acople de una molécula (ligando) directamente al medio de soporte activado (izquierda), o a través de un brazo espaciador (derecha) para facilitar la interacción y unión con su componente complementario, mediante la reducción de posibles impedimentos estéricos.

Acople de proteínas a Sepharose® activada con CNBr

Cuando se desea purificar los anticuerpos específicos contra un antígeno, a partir de un suero inmune, la cromatografía de afinidad es una de las mejores opciones disponibles. Para esto, se acopla covalentemente el antígeno de interés a un medio de soporte, para que actúe como ligando en la captura y posterior elución de los anticuerpos. Uno de los medios de soporte más utilizados es la Sepharose® activada con CNBr. Este medio consiste de microesferas de agarosa tratadas con bromuro de cianógeno, en las cuales se establece un enlace isotiurea con las proteínas, a través de sus grupos amino libres o primarios (ϵ -amino; **Fig.4.3**). También existen otros medios de soporte pre-activados que utilizan reacciones distintas para el acople (N-hidroxisuccinimida, carbonildiimidazol, tolueno-sulfonil cloruro, etc.). Cada uno de ellos posee sus ventajas y desventajas (Goding, 1986).

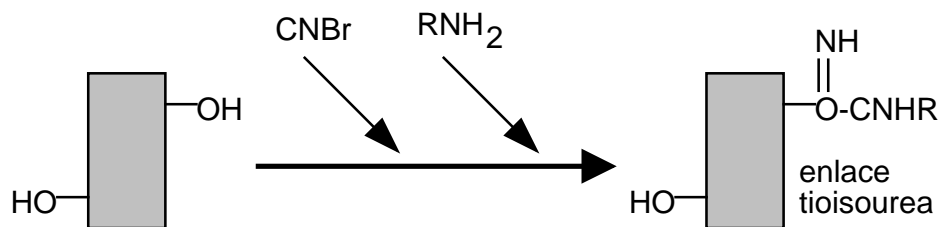


Figura 4.3: Reacción de acople de proteínas a Sepharose 4B activada con CNBr. Se forma un enlace isotiourea entre el medio de soporte (agarosa) y los grupos amino primarios de la proteína.

Procedimiento para acoplar proteínas a Sepharose® activada por CNBr

1. Disolver la proteína en el amortiguador de acople. Utilizar 5-10 mg de proteína por cada ml de gel. El amortiguador de acople se prepara con 4,2 g de NaHCO₃ (concentración final 0,1 M), 14,6 g de NaCl (0,5 M), se ajusta su pH a 8,3 y se afora a 500 ml.
2. Hidratar el gel seco con HCl 1 mM por 15 min (47 µl de HCl concentrado, 11,7 N en 500 ml de agua). Lavarlo varias veces con la misma solución, utilizando al menos 200 ml por cada gramo del gel seco. Esto puede realizarse en un embudo de vidrio poroso, o alternativamente, en tubos de centrifuga de 50 ml. El uso de un pH ácido preserva la reactividad de los grupos químicos del gel para el acople. **Nota:** 1 g de gel seco resulta en ~3 ml de gel hidratado.
3. Lavar por última vez el gel con amortiguador de acople (utilizando por lo menos 5 ml por cada gramo de gel seco). A partir de este momento se debe acoplar la proteína de inmediato, pues al subir el pH, los grupos reactivos del gel comienzan a inactivarse.
4. Transferir rápidamente el gel a la solución de ligando (se recomienda una proporción de gel/amortiguador de 1:2 v/v). Mezclar suavemente en un rotador (no utilizar agitador magnético, para no fragmentar las microesferas). La reacción se puede dejar completar por 2 hr a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C.
5. Bloquear el exceso de grupos reactivos con etanolamina 1 M, o con glicina 0,2 M (1,5 g en 100 ml de agua) a pH 8,0 durante 2 hr a temperatura ambiente o 16 hr en refrigeración.
6. Empacar el gel en una columna cromatográfica y lavar la proteína no acoplada, haciendo 4 ciclos de cambio de pH alto y bajo, respectivamente, con amortiguador de acople (ver arriba) y amortiguador de acetato (4,1 g acetato de sodio [0,1 M], 14,6 g NaCl [0,5 M], ajustar pH a 4,0 y aforar a 500 ml).
7. La columna está lista para ser utilizada. Guardarla siempre en refrigeración. **Nota:** se puede determinar la eficiencia del acople de la proteína al soporte, midiendo la

disminución en la A_{280} de una pequeña alícuota de sobrenadante de reacción, al inicio y al final del proceso.

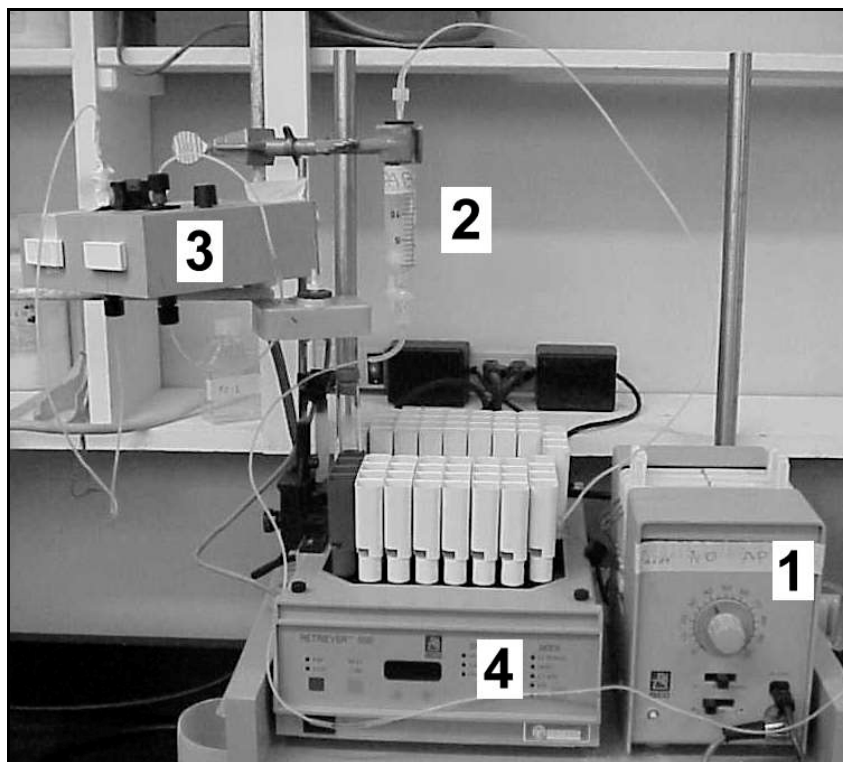


Figura 4.4: Componentes de un sistema de cromatografía líquida convencional (de baja presión). Una bomba peristáltica (1) se encarga de hacer fluir el solvente hacia la columna, a una velocidad constante y regulable; (2) el medio cromatográfico, en este caso una pequeña columna de inmunoafinidad; (3) una fotocelda de flujo continuo, se encarga de detectar la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna, que finalmente termina en un recolector de fracciones (4), o sistema mecánico de tubos intercambiables que se regula por tiempo o por recuento de gotas.

Aislamiento de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad

El siguiente es un procedimiento general para sistemas proteína-proteína. Pueden existir casos particulares en que las condiciones de este método causen la desnaturalización irreversible de las moléculas de interés. En tal caso, deben buscarse otras modalidades de elución (ver **Cuadro 4.1**).

1. Equilibrar la columna de Sepharose-antígeno con PBS, pH 7,2. Cuando la columna se ha dejado de utilizar por algún tiempo, es conveniente realizar una pre-corrida sin muestra, para limpiarla. Conectar la columna a un sistema de detección continua de proteínas (A_{280}).

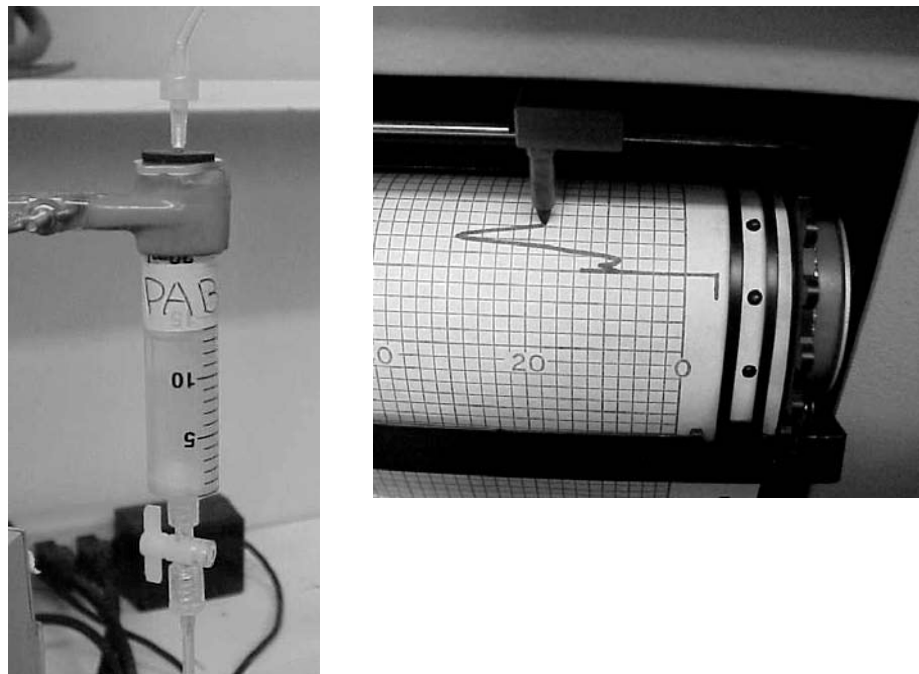


Figura 4.5: **Detalle de una columna y graficador.** A la izquierda se muestra un detalle de la columna de inmunoafinidad de la Figura 4.4, construida con una jeringa descartable de 20 ml, a la cual se le colocó una base de "lana de vidrio" en el fondo, para retener el medio cromatográfico. La jeringa está sellada en su parte superior mediante un tapón de caucho, perforado por una aguja calibre 20 que se conecta a la línea de entrada del solvente. En la parte inferior se acopló una llave de plástico, unida a la línea de salida. A la derecha se muestra la graficación continua de la absorbancia del efluente de la columna, generándose un patrón de elución de proteínas, con base en la señal enviada por la fotocelda de flujo continuo.

2. Aplicar la muestra, diluída a partes iguales con PBS, y pasarla lentamente (ej. 1 gota/10-20 seg). Si el flujo es muy rápido, habrá menor posibilidad de interacción en la columna y el rendimiento final puede disminuir. Cuando se desea obtener el máximo de rendimiento de una muestra, se puede dejarla recirculando continuamente por la columna durante unos 30 min, antes de continuar con el siguiente paso.
3. Una vez pasada la muestra, lavar la columna con unos 50 ml de PBS, con una velocidad de 1 gota/3-4 seg, para eliminar las proteínas no unidas. El lavado debe continuar hasta que la A_{280} del eluente haya regresado completamente a su línea base.
4. Eluir los anticuerpos unidos al antígeno, aplicando el amortiguador de elución (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8-3,0). Recoger fracciones de 3-4 ml en tubos que contienen 0,5 ml de amortiguador receptor (Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8), para neutralizar inmediatamente el pH ácido y renaturalizar los anticuerpos.

5. Una vez recolectados los anticuerpos, re-equilibrar la columna con PBS y conservarla en refrigeración. Una columna de afinidad puede ser reutilizada muchas veces, siempre y cuando la funcionalidad y el rendimiento se mantengan aceptables.

Nota: observe que este mismo procedimiento puede ser utilizado de forma inversa, para purificar un antígeno a partir de una mezcla compleja. Para ello, se puede acoplar a la columna los respectivos anticuerpos, o un anticuerpo monoclonal apropiado, y realizar la purificación del antígeno por inmovinoafinidad.

Cuadro 4.2: Unión de la proteína A y proteína G a las IgG de distintas especies *

Especie	Subclase IgG	Proteína A	Proteína G
Humano	IgG ₁	++	++
	IgG ₂	++	++
	IgG ₃	-	++
	IgG ₄	++	++
Ratón	IgG ₁	+/-	+
	IgG _{2a}	++	++
	IgG _{2b}	++	++
	IgG ₃	++	++
Rata	IgG ₁	+	+
	IgG _{2a}	-	++
	IgG _{2b}	-	+
	IgG _{2c}	++	++
Cerdo	IgG	+	++
Conejo	IgG	++	++
Vaca	IgG ₁	-	++
	IgG ₂	++	++
Oveja	IgG ₁	-	++
	IgG ₂	++	++
Cabra	IgG ₁	+	++
	IgG ₂	++	++
Caballo	IgG (ab)	+	++
	IgG (c)	+	++
	IgG (T)	-	+
Perro	IgG	++	+

* Ref: Bio-Rad, boletín técnico.

Purificación de IgG de distintas especies con Proteína A o con Proteína G

La "proteína A" es un componente de la pared bacteriana presente en muchas cepas de *Staphylococcus aureus* (ej. cepa Cowan I). Algunas cepas son capaces de secretarla al medio de cultivo en forma soluble. Su utilidad radica en que la proteína A es capaz de unirse, en forma selectiva, a la región Fc de las IgG de muchas especies animales, entre ellas la humana (subclases IgG₁, IgG₂ e IgG₄, aunque no la IgG₃), la de conejo, y otras (Langone, 1982; ver **Cuadro 4.2**). La "proteína G" funciona en forma similar, y es obtenida de ciertas cepas de estreptococos. Esta proteína puede unirse a las IgG de algunas especies que muestran una interacción débil con la proteína A (y viceversa), por lo que la escogencia entre ambas se basa en el origen de las inmunoglobulinas que se desea purificar.

Utilizando columnas que poseen proteína A (o proteína G) inmovilizada en un medio cromatográfico, es posible purificar fácilmente la IgG del suero de varias especies (**Fig.4.6**). El procedimiento general es el mismo descrito arriba, basado en la elución de los anticuerpos con glicina ácida.

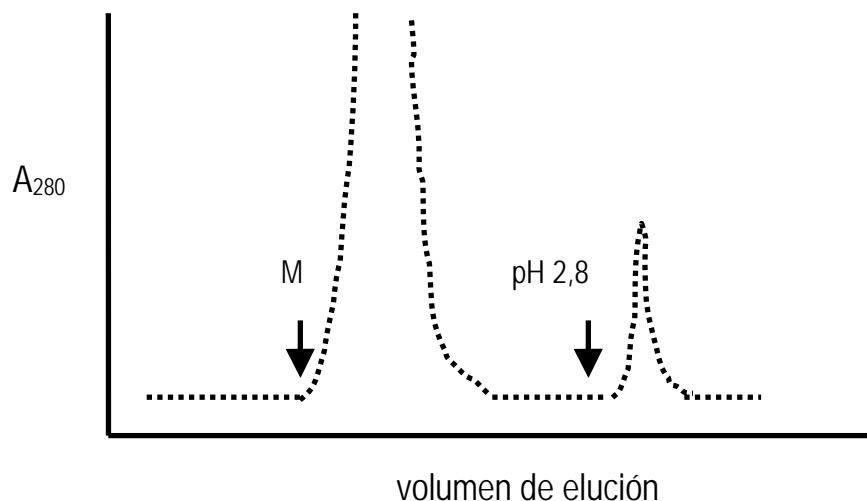


Figura 4.6: **Ejemplo de la purificación de IgG en una columna de Sepharose-proteína A.** El trazo punteado representa la absorbancia a 280 nm de las proteínas. Una muestra de suero de conejo (M) de 1 ml se aplicó a la columna, y esta se lavó con PBS pH 7,2 hasta eliminar toda la proteína no unida. La segunda flecha indica el cambio de amortiguador (glicina HCl, pH 2,8), que induce la elución de la IgG (segundo pico). La columna se vuelve a equilibrar finalmente con PBS, para su almacenamiento a 4°C.

Capítulo 5

Preparación de Geles de Agarosa para Técnicas Inmunológicas

Introducción

Los geles de agarosa sirven como medio de soporte para la realización de una variedad de técnicas inmunológicas, tales como la doble inmunodifusión, la reoforesis, la inmunodifusión radial y diversos tipos de inmunoelectroforesis.

La agarosa es un componente del **agar**, una mezcla de polisacáridos extraída de algunas algas marinas como *Gelidium amansii*, *Gracilaria fortissima*, y otras. Además de la agarosa, el agar contiene agarpectina, un componente con propiedades inconvenientes para ciertas técnicas. La agarpectina posee un alto contenido de grupos ionizables, que pueden interferir con la difusibilidad de algunas moléculas en el agar, y que además generan una alta **electroendosmosis** (ver adelante). Al eliminar la agarpectina del agar, queda la agarosa, que está formada por polisacáridos lineales neutros, compuestos por residuos de galactosa (**Fig. 5.1**) que se alternan y forman redes por entrelazamiento. Estos residuos pueden estar sustituidos en diversos grados por grupos sulfato, metoxilo, piruvato y carboxilo, los cuales determinan en gran parte las propiedades físicas del gel. El bajo contenido de grupos ionizados de la agarosa reduce los problemas de interacción con las muestras, así como sus propiedades electroendosmóticas. A la vez, la agarosa produce geles más resistentes y transparentes que el agar.

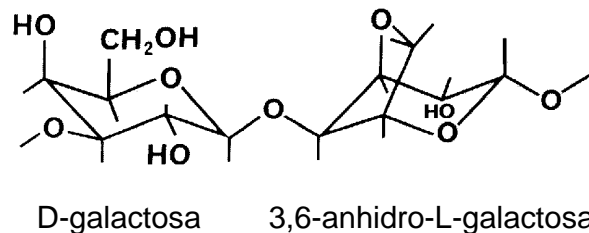


Figura 5.1: Estructura de la subunidad repetida de la agarosa.

La mayoría de tipos de agarosa gelifican a temperaturas cercanas a los 40°C. Para el trabajo con células o con enzimas muy lábiles, existen preparaciones especiales agarosa de bajo punto de gelificación (*low-gelling agarose*), que gelifican a 30°C. La temperatura de gelificación se relaciona directamente con el contenido de grupos metoxilo en el polisacárido.

Aunque los geles de agarosa pueden someterse a muchos ciclos de licuefacción y gelificación, esto debe evitarse, debido a que durante cada calentamiento se hidroliza una

pequeña proporción del polisacárido. Por esto, para mantener la agarosa en estado líquido, es preferible colocarla en un baño de agua a $\sim 50^{\circ}\text{C}$ y no en ebullición prolongada. La hidrólisis de la agarosa puede ser importante en técnicas cuantitativas de difusión, por dos razones:

- (1) varía la concentración final real del gel.
- (2) los fragmentos solubles aumentan la viscosidad de la fase fluida del gel.

Por lo anterior, en vez de fundir y gelificar varias veces una misma preparación de agarosa, es recomendable almacenarla en alícuotas de un volumen apropiado para la técnica a utilizar, las cuales se funden en baño maría para su uso. En la actualidad, también es común la utilización del horno de microondas para este fin.

Al enfriarse, las soluciones de agarosa forman un gel reticular, con poros de tamaño heterogéneo (**Fig.5.2**). El diámetro promedio de los poros es inversamente proporcional a la concentración del gel. La agarosa puede gelificar a concentraciones tan bajas como 0,1% (p/v). Sin embargo, para lograr una consistencia óptima, por lo general se utiliza entre el 0,5 y el 1,5% de concentración. Se estima que un gel al 1% forma poros cuyo límite de exclusión molecular para moléculas esféricas es de $10\text{-}50 \times 10^6$ daltons, en promedio.

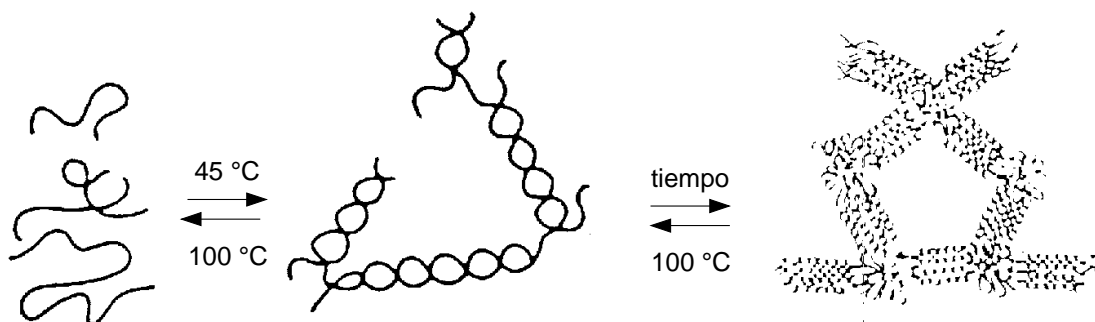


Figura 5.2: Gelificación de la agarosa. Las cadenas lineales en solución ($\sim 100^{\circ}\text{C}$) comienzan a formar una estructura reticular al enfriarse, la cual se estabiliza gradualmente hasta formar la estructura final reticular del gel (*Ref:* adaptado de Pharmacia Biotech, Suecia).

Cuidados en la preparación de los geles

Los geles de agarosa se preparan disolviendo la cantidad requerida del sólido, ya sea en agua o en un amortiguador, aplicando calor directo, hasta lograr una ebullición suave. Esto puede realizarse en un quemador de gas, en una plantilla de calentamiento eléctrica, o en un horno de microondas. La agarosa está completamente disuelta cuando su aspecto es cristalino. Durante el calentamiento convencional, se debe agitar constantemente para evitar que el sólido sedimente y "caramelice" en el fondo. Los agitadores magnéticos con calentador incorporado son un aditamento muy conveniente para preparar soluciones de

agarosa.

Si el amortiguador requerido es termolábil, se puede preparar la agarosa en agua, al doble de la concentración deseada. Una vez disuelta, se enfría ligeramente, y se mezcla con un volumen igual del amortiguador, también preparado al doble de la concentración deseada ("2x"). Los amortiguadores de boratos pueden formar complejos con la agarosa, por lo que no se recomiendan como solvente.

Almacenamiento y cuidados en el empleo de los geles

Cuando se realiza rutinariamente un cierto número de pruebas de laboratorio que utilizan agarosa, conviene preparar agarosa y almacenarla en alícuotas. Para el almacenamiento, se puede agregar un agente antimicrobiano como la azida de sodio¹ (NaN₃) al 0,02%, o el timerosal al 0,01% (siempre que no interfieran con la técnica en que se van a emplear los geles). Es importante usar recipientes herméticos para evitar la deshidratación del gel (sinéresis). Por ejemplo, se puede utilizar tubos de vidrio con tapa de rosca, los cuales pueden ser calentados en baño maría para fundir la agarosa al momento que se requiera. Los geles se pueden almacenar muy bien en refrigeración, hasta por períodos de meses, si se previene la pérdida de humedad.

Cuando se requiere fundir un gel previamente preparado y almacenado, se utiliza un baño maría en ebullición (recuerde aflojar la tapa del recipiente). Una vez en estado líquido, el gel es chorreado sobre la placa de trabajo, sobre una superficie nivelada, y dejado en reposo para que gelifique como una capa de grosor homogéneo (**Fig.5.3**). Usualmente es posible utilizar los geles apenas unos minutos después de la gelificación. Sin embargo, en algunas técnicas cuantitativas se recomienda dejar los geles a 4°C por algunas horas, para que alcancen su máxima estabilidad.

Recubrimiento de placas de vidrio con una "capa base"

Las placas o láminas de vidrio poseen poca adhesividad hacia los geles de agarosa. Por esto, se recubren primero con una capa de agarosa que, una vez deshidratada, forma una película base que da una fuerte adherencia a un segundo gel, o gel de trabajo. Para hacer la capa base, se prepara agarosa al 0,5% en agua destilada, se distribuye sobre la placa, se gelifica y se deja secar en una estufa o una incubadora (37-60°C). La adhesividad entre el vidrio y el gel de trabajo (chorreado posteriormente) no solo le da más estabilidad mecánica al medio, sino que actúa como un sello que evita que las muestras depositadas en los hoyos del gel se desplacen entre el vidrio y el gel (**Fig.5.4**). Los materiales de plástico, tales como placas de Petri, placas comerciales, etc., por lo general poseen una alta adhesividad hacia los geles de agarosa, por lo que no requieren de una capa base.

¹ **Nota:** la azida de sodio es tóxica, y además puede reaccionar con los metales de las tuberías, formando compuestos explosivos. Al descartar soluciones con azida, asegúrese de hacer correr suficiente agua por la tubería.

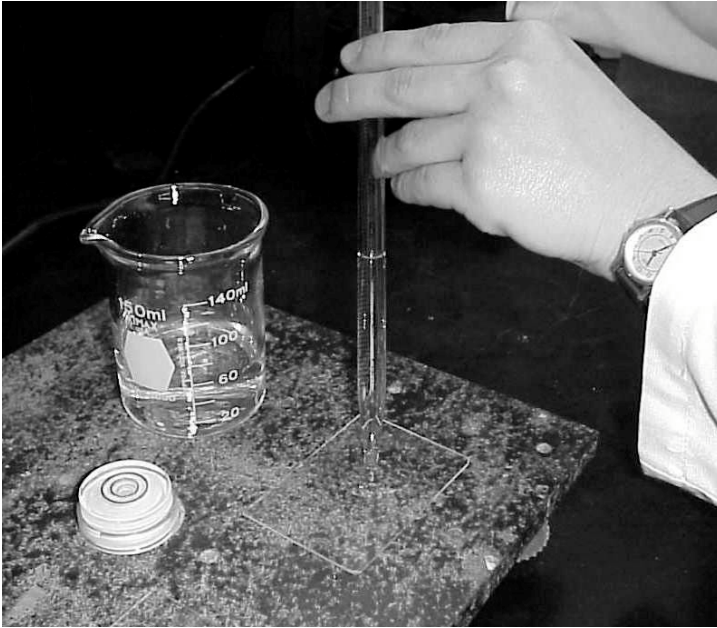


Figura 5.3: Preparación de un gel de agarosa sobre una lámina de vidrio. Se pipetea el volumen requerido de solución de agarosa caliente, y se esparce rápidamente sobre toda la superficie de una placa de vidrio, con cuidado de que no rebase los bordes y sin atrapar burbujas. La placa debe estar sobre una superficie ajustable y nivelada (observe el indicador de nivel, a la izquierda), para asegurar que el grosor final del gel sea uniforme. Una vez esparcida la solución, se deja en reposo hasta que gelifique.

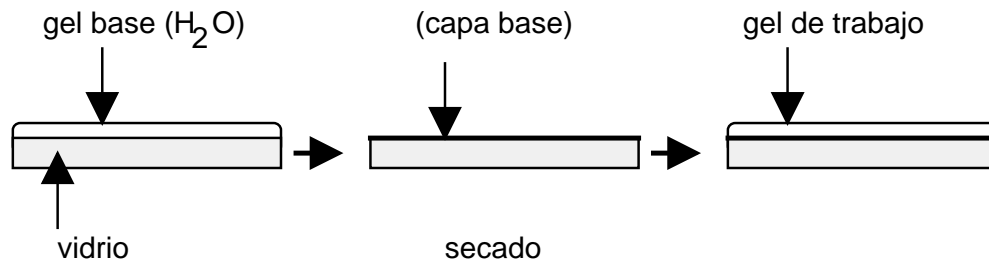


Figura 5.4: Esquema de la preparación de la capa base en una lámina de vidrio para el trabajo con geles de agarosa.

La electroendosmosis en geles de agarosa

La electroendosmosis (EEO) es un flujo de solvente hacia el cátodo (-), que ocurre cuando un gel de agarosa se somete a un campo eléctrico. Este fenómeno ocurre debido a que los grupos negativos ionizados del gel, tales como sulfato y piruvato, se rodean de iones positivos que se asocian con moléculas de agua y se desplazan hacia el cátodo. Se deduce que la EEO será mayor, cuanto más alto sea el contenido de grupos cargados del gel. Existen comercialmente agarosas de distinta EEO, la cual se determina midiendo la distancia que recorre una molécula eléctricamente neutra (ej. el dextrán) cuando el gel es sometido a un campo eléctrico. El valor de EEO se expresa como **movilidad relativa** (M_r) del dextrán, con respecto a la movilidad de la albúmina humana. Debido a que la albúmina

migra hacia el ánodo (+), mientras que el dextrán es arrastrado pasivamente por la EEO hacia el cátodo, los valores se expresan con signo negativo. Por ejemplo:

- agarosa de baja EEO: Mr = -0,02
- agarosa de mediana EEO: Mr = -0,13
- agarosa de alta EEO: Mr = -0,25

Dependiendo de la finalidad, la EEO puede ser ventajosa como un mecanismo que aumenta la separación entre las diversas sustancias durante una electroforesis. Incluso se ha aprovechado el fenómeno electroendosmótico en la técnica de la contraelectroforesis (**Capítulo 12**).

Preparación de un gel para "capa base"

1. Fundir agarosa al 0,5% (p/v) en agua destilada. Chorrear la solución caliente sobre las placas o láminas de vidrio correspondientes, cubriendo cuidadosamente toda su superficie (**Fig.5.3**), sin atrapar burbujas. Una vez ocurrida la gelificación, colocar las placas en una estufa (37-60°C) hasta que se sequen.

Preparación de agarosa para técnicas de electroforesis de proteínas

1. Preparar amortiguador de barbital 0,04 M, pH 8,6, (concentración 2x), disolviendo 9,0 g de dietilbarbiturato de sodio en ~700 ml de agua, y agregando posteriormente 65 ml de HCl 0,1 M y 0,2 g NaN₃. Ajustar el pH final y llevar a 1000 ml. Conservar en refrigeración.

2. Fundir agarosa al 2% (p/v) en agua destilada. Agregar de inmediato azida de sodio al 0,02% y disolver. Antes de que gelifique, mezclarla con un volumen igual de amortiguador de barbital de doble concentración (2x). El gel caliente puede ser vertido sobre las placas de trabajo, o almacenarse en alícuotas, en refrigeración.

Preparación de agarosa para técnicas de inmunodifusión

1. Preparar solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7,2. Disolver 10,3 g de Na₂HPO₄·12H₂O, 1,6 g de NaH₂PO₄ y 6,8 g de NaCl en ~700 ml de agua. Ajustar el pH final y llevar a 1000 ml. Conservar en refrigeración.

2. Fundir agarosa al 1% (p/v) directamente en PBS. Agregar de inmediato azida de sodio al 0,02% y disolver. El gel caliente puede ser vertido sobre las placas de trabajo, o almacenarse en alícuotas en refrigeración.

Capítulo 6

Doble Inmunodifusión en Gel

Introducción

La doble inmunodifusión en gel, desarrollada simultáneamente por Elek y por Ouchterlony en 1949 (Clausen, 1981) es una técnica inmunológica simple y valiosa. En ella se enfrentan antígenos y anticuerpos en un gel de agarosa, colocándolos en hoyos o pocillos circulares adyacentes, para que difundan y formen líneas de precipitación entre ellos. Una de las propiedades valiosas de esta técnica es la información que proporciona con respecto a las relaciones (similitudes o diferencias) inmunoquímicas entre los antígenos probados (Ouchterlony y Nilsson, 1986). Al colocar dos antígenos en hoyos adyacentes y enfrentarlos a un antisuero que los reconoce, se pueden obtener los clásicos patrones de **identidad**, **identidad parcial**, y **no-identidad**, según el caso (**Fig.6.1**).

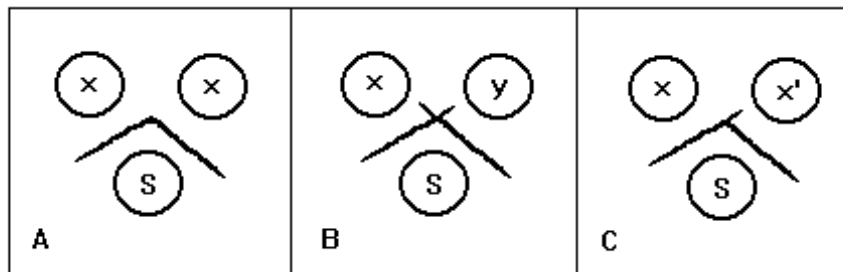


Figura 6.1: Patrones de relación antigénica en la doble inmunodifusión en gel. Los dos hoyos superiores contienen antígenos (x, y o x'), mientras el hoyo inferior contiene un suero inmune (S) con anticuerpos hacia ellos. (A) relación de identidad, (B) relación de no-identidad, y (C) relación de identidad parcial.

En el patrón de identidad, la fusión o continuación suave de la línea de precipitado común a ambos antígenos, indica que estos poseen epitopos similares o comunes, y utilizan los mismos anticuerpos para precipitar. Podrían ser el mismo antígeno, o dos antígenos muy similares que sean indistinguibles antigénicamente. Por otra parte, el patrón de no-identidad (dos líneas de precipitación que se cruzan en forma independiente) indica que el antisuero posee anticuerpos para ambos antígenos, pero que los antígenos no muestran epitopos en común. Finalmente, la aparición de una pequeña saliente o espuela en una línea de precipitación fusionada entre dos antígenos (identidad parcial), indica que existen epitopos similares en ambos (la línea fusionada), pero además, que uno de los antígenos (x) presenta epitopos que no están presentes en el otro (x', el antígeno que señala la

espuela), y para los cuales el suero posee los anticuerpos correspondientes. Es importante esto último, pues dos antígenos pueden ser parcialmente similares y sin embargo dar una reacción de identidad, sin espuela, si en el suero utilizado no existen anticuerpos contra la región que los diferencia estructuralmente. Debe enfatizarse que toda la información obtenible en esta técnica se restringe a aquellos epitopos para los cuales se tienen anticuerpos, lo cual no necesariamente abarca toda la estructura del antígeno. La información obtenible se refiere estrictamente a la **estructura antigénica** de las moléculas. Toda diferencia antigénica observable entre dos moléculas tiene una base estructural, pero no toda diferencia estructural implica diferencias antigénicas observables.

La información sobre las relaciones inmunoquímicas entre dos o más antígenos se puede obtener fácilmente por esta técnica, sobretodo cuando se trabaja con antígenos purificados o con antisueros monoespecíficos (**Fig.6.5** y **Fig.6.6**). Sin embargo, cuando se utilizan sistemas antigénicos complejos y antisueros poliespecíficos (preparados contra mezclas de antígenos), la aparición de múltiples sistemas de precipitación puede limitar y dificultar la interpretación de los resultados.

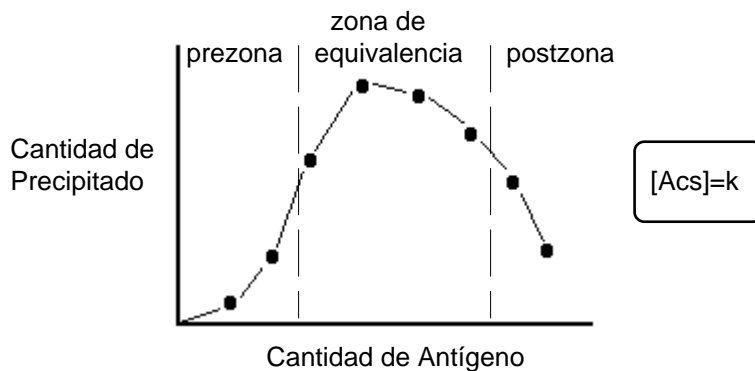


Figura 6.2: La curva de precipitación cuantitativa. Una cantidad fija de anticuerpos se enfrenta a cantidades crecientes del antígeno. Al cuantificar el precipitado obtenido para cada proporción, se observa un aumento gradual hasta un punto máximo, y luego una disminución. La disminución es causada por la formación de complejos pequeños (solubles), cuando uno de los

componentes se encuentra en gran exceso sobre el otro (fenómenos de zona). En cambio, una proporción balanceada de ambos componentes (zona de equivalencia) conduce a la formación de grandes redes tridimensionales de complejos, que precipitan con facilidad. Este principio fue caracterizado en la década de 1950 por Heidelberger, Kendall y Marrack.

En la técnica de doble inmunodifusión en gel operan todos los principios clásicos de las precipitaciones entre antígeno y anticuerpos, originalmente descritos por M. Heidelberger en sus trabajos sobre precipitación cuantitativa (**Fig.6.2**). Existe una proporción óptima de reactivos para la precipitación. En proporciones desbalanceadas, la precipitación se inhibe porque se forman complejos pequeños, que por su bajo peso molecular se mantienen solubles. Estos son los **fenómenos de zona**, que operan en todos los sistemas que dependen de la formación de redes o agregados multimoleculares, incluyendo a las técnicas de precipitación y a las de aglutinación (**Capítulo 8**).

Cuando se enfrentan antígenos y anticuerpos en una inmunodifusión, es importante seleccionar las cantidades óptimas para lograr un sistema balanceado, en donde las líneas de precipitación se formen, idealmente, en una región equidistante a los hoyos, y abarcando una amplia zona hacia los lados, para poder evidenciar las relaciones entre las muestras adyacentes (**Fig.6.3**).

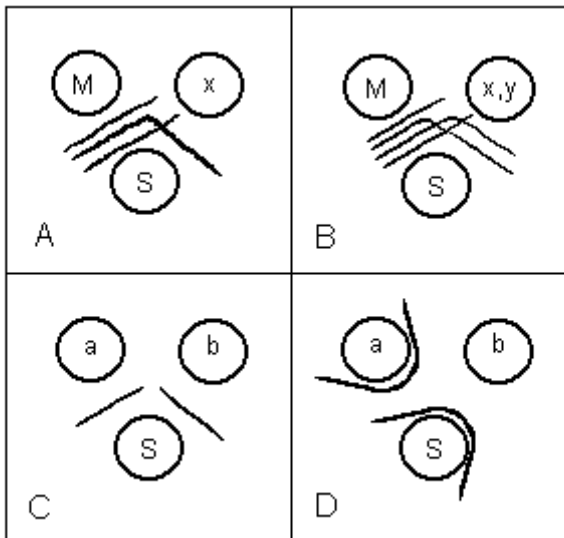


Figura 6.3: Ejemplos de doble inmunodifusión en gel y su interpretación. En (A), una muestra con varios antígenos (M) es enfrentada a su respectivo antisero (S). Se obtienen tres líneas de precipitación, lo que indica que el material contiene, como mínimo, tres antígenos reconocidos por este suero. La muestra (x) corresponde a un componente aislado de la mezcla (M). La fusión de (x) con la línea del centro identifica a esta como la correspondiente a dicho componente. Aunque (x) solo formó una línea de precipitación, esto no se considera como un indicador formal de pureza de dicho material, debido a la baja sensibilidad de esta técnica y otras limitaciones. En (B), una mezcla antigénica (M) es enfrentada a su antisero (S), junto con una fracción que se ha aislado de ella (x, y). Dicha fracción contiene al menos dos componentes,

antigénicamente no relacionados entre sí, dado que sus precipitados se cruzan sin fusionarse. En (C), se tiene un sistema aparentemente bien balanceado entre dos antígenos y un antisero, pero no se puede deducir la relación antigénica entre ellos porque el precipitado no se extiende hasta la región de interés. Esto puede deberse a que las concentraciones de los antígenos y el antisero son bajas, o a que la distancia entre los hoyos de los antígenos es muy grande. Las posibles soluciones son, por tanto, aumentar las concentraciones (o aumentar los volúmenes de muestra en los hoyos), o disminuir la distancia entre los hoyos con los antígenos. En (D), se tiene un sistema desbalanceado o desproporcionado, en donde el antígeno (a) está en muy baja concentración con respecto a la cantidad de anticuerpos presentes en (S), mientras el antígeno (b) está demasiado concentrado.

Aunque la doble inmunodifusión en gel no es una técnica cuantitativa, puede ser utilizada en pruebas de titulación, para estimar y comparar el contenido relativo de anticuerpos (o de antígenos) de las muestras. Por ejemplo, se puede colocar diluciones dobles de un antisero frente a una cantidad fija de antígeno, para establecer cuál es la máxima dilución del suero que es capaz de precipitar (título). En forma inversa, se puede enfrentar diluciones dobles de una muestra que contiene un antígeno, contra una cantidad fija de anticuerpos, para establecer la máxima dilución del antígeno capaz de precipitar (**Fig.6.4**).

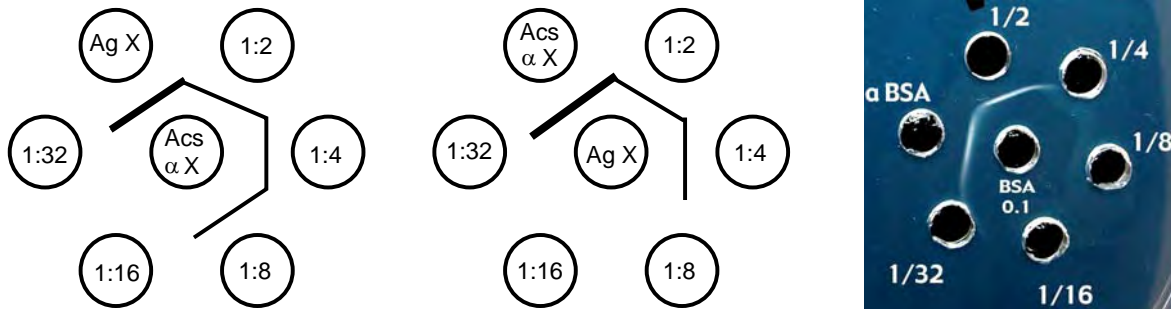


Figura 6.4: **Titulaciones.** Uso de la doble inmunodifusión en gel para la estimación semicuantitativa del antígeno "X" (diagrama de la izquierda) o de anticuerpos anti-"X" (diagrama del centro), a través de diluciones seriadas. La foto a la derecha muestra la titulación de un suero anti-albúmina bovina (BSA) producido en conejos. La línea de precipitación es fuerte en los hoyos 1:1 y 1:2, y más tenue en 1:4 y 1:8, el punto final.

Doble inmunodifusión en gel

1. Preparar agarosa al 1% (p/v) en PBS (**Capítulo 5**) y verterla sobre placas de vidrio (ej. 5 x 7,5 cm) previamente recubiertas con capa base, o en platos de Petri de plástico de 10 cm de diámetro. Utilizar 8 ml de gel para cada vidrio de 5 x 7,5 cm, o 25 ml de gel para cada plato de Petri.
2. Abrir hoyos para las muestras con un sacabocados, formando un patrón hexagonal con un hoyo central. Los hoyos deben tener 4-5 mm de diámetro, y una distancia de ~5 mm entre sus bordes.
3. Llenar los hoyos con las muestras correspondientes (25-30 μ l), teniendo el cuidado de no rebasar su capacidad.

Nota: Las concentraciones óptimas de antígeno se deben establecer mediante pruebas previas, aunque una guía general para antígenos purificados es alrededor de 0,2-1,0 mg/ml. Si la muestra contiene una mezcla de antígenos, hay que utilizarla a mayor concentración, para compensar la heterogeneidad.

4. Dejar difundir las placas en una **cámara húmeda** (una caja tapada, con papel humedecido) a temperatura ambiente, durante al menos 24 hr, sobre una superficie nivelada. Leer los resultados.
5. Si se requiere, los resultados pueden fotografiarse frente a un fondo negro, con iluminación oblicua, para que los precipitados se observen de color blanco. Alternativamente, se puede lavar el gel exhaustivamente con PBS, para eliminar proteínas solubles, y luego teñir los precipitados con un colorante para proteínas. Los

colorantes incrementan la sensibilidad física de la técnica, evidenciando líneas de precipitación tenues que podrían pasar desapercibidas. Si se desea teñir la placa, lavarla sumergiéndola en abundante PBS (o PBS diluido 1:3-1:4 con agua), con agitación suave, por 24-48 hr, realizando varios cambios.

6. Sumergir la placa en el colorante por unos 15-30 min y posteriormente decolorar con varios cambios de ácido acético al 5%, dejando finalmente secar la agarosa sobre el vidrio. Esto resulta en un registro permanente de los resultados, que se puede almacenar por años, o puede fotografiarse convencionalmente.

Nota: Si se requiere un lavado muy rápido de las proteínas, se puede utilizar ciclos de compactación y rehidratación de la agarosa. Se cubre la superficie de la misma con papel filtro y varias capas de papel absorbente. Se coloca encima un vidrio, y finalmente un peso (ej. 1 kg), para comprimir el gel. Después de unos 5 min, la agarosa está completamente adherida a su base. Entonces, se sumerge en un recipiente con PBS para que se hidrate nuevamente por unos 10-15 min. Se repite este ciclo unas 5 veces, antes de realizar la tinción. Para una máxima sensibilidad en la tinción de los precipitados, se puede utilizar el colorante Coomassie R-250. Sin embargo, para esta tinción el lavado previo de las proteínas es más exigente, de lo contrario se obtendrá una mayor tinción "de fondo".

Colorantes para proteínas

Rojo Ponceau-S

1,0 g Ponceau-S; 37,5 g ácido tricloroacético; 37,5 g ácido sulfosalicílico; disolver en agua y llevar a 500 ml. Guardar a temperatura ambiente.

Negro de almidón 10 B

0,1 g negro de almidón (amidoblack 10 B); 45 ml ácido acético 12%; 45 ml acetato de sodio 1,6%; 10 ml glicerol. Guardar a temperatura ambiente.

Azul Coomassie R-250

0,25 g Coomassie blue R-250; 225 ml metanol; 46 ml ácido acético; 230 ml agua; disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua. Mezclar durante 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente.

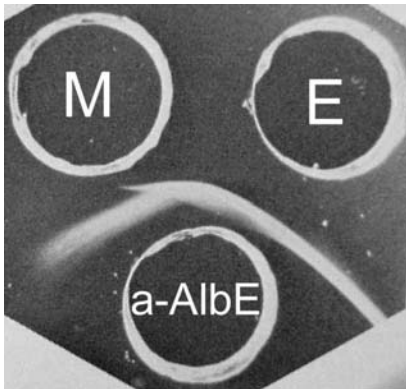


Figura 6.5: Una reacción de identidad parcial, entre la albúmina sérica purificada de elefante asiático (E) y un extracto de músculo de un mamut (M) congelado, de 40.000 años de antigüedad, hallado en Siberia. Ref: Prager *et al.* (1980) *Science* 209, 287.

Figura 6.6: Ejemplo de una reacción de identidad. Los anticuerpos del suero anti-2, colocados en el hoyo central, reconocen claramente al antígeno 2 y al antígeno 3, en forma indistinguible, pero no precipitan con ningún componente de las muestras 1, 4, 5 y 6.

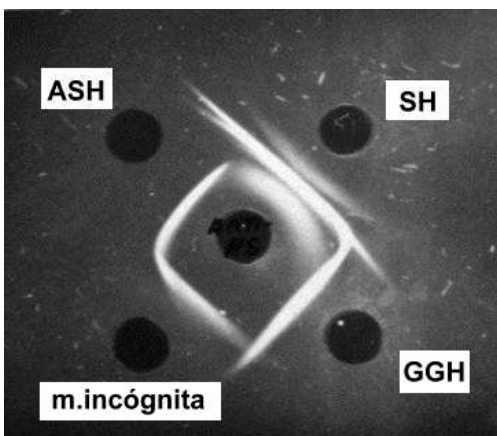
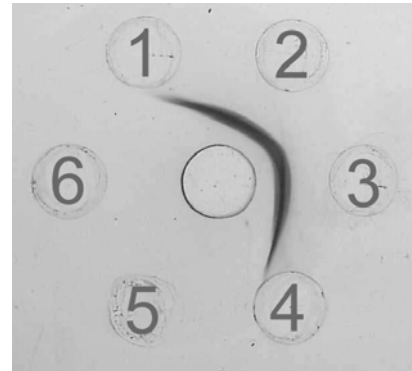
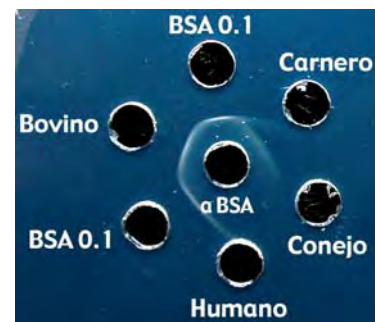


Figura 6.7: Uso de la inmunodifusión para determinar la naturaleza de una muestra incógnita. El hoyo central contiene suero anti-humano total, el cual se enfrentó contra albúmina sérica humana (ASH), suero humano (SH), gamaglobulina humana (GGH), y una muestra incógnita. El precipitado correspondiente a esta última se fusiona completamente con la albúmina, indicando que la incógnita contiene albúmina humana. El precipitado correspondiente a la albúmina en el SH se observa difuso y desplazado hacia el hoyo central, indicando que hay una desproporción (exceso de albúmina) en SH. La espuela entre SH y GGH indica que aunque el antisuero reconoce tanto a la gamaglobulina contenida en el SH, como en la preparación de GGH purificada, también reconoce componentes del SH

que no están presentes en el hoyo GGH.

Figura 6.8: Identidad parcial entre la albúmina bovina y la albúmina de carnero. El hoyo central contiene un suero de conejo anti-albúmina bovina (α -BSA), el cual reconoce con identidad parcial la albúmina del suero de carnero.



Capítulo 7

Inmunodifusión Radial

Introducción

La inmunodifusión radial es una técnica **cuantitativa**, basada en la precipitación en gel de un sistema antígeno-anticuerpo monoespecífico. Para cuantificar un antígeno dado, se incorpora en el gel una cierta cantidad de los anticuerpos correspondientes, con lo que al aplicar una muestra en un hoyo y dejarla difundir libremente, se forma un precipitado circular (**Fig.7.1**). De aquí se deriva el nombre de esta técnica, ya que la difusión de la muestra y su precipitación ocurren en forma radial. El diámetro del círculo o anillo de precipitado guarda una proporción con la cantidad de antígeno en la muestra. De esta forma, se puede establecer una **curva de referencia** con cantidades conocidas del antígeno (estándares o patrones de referencia) y así interpolar los valores de muestras desconocidas.

Los requisitos del método son: **(1)** que el sistema antígeno-anticuerpo forme precipitados en gel; **(2)** que el antisuero sea monoespecífico, es decir, reconozca solo un componente antigénico en las muestras; y **(3)** que el antígeno no exista en diferentes estados físicos en cuanto al número de subunidades (ej. monómero + dímero + trímero, etc.). Esto último podría afectar la velocidad de difusión de las diversas formas del antígeno en el gel y conducir a error.

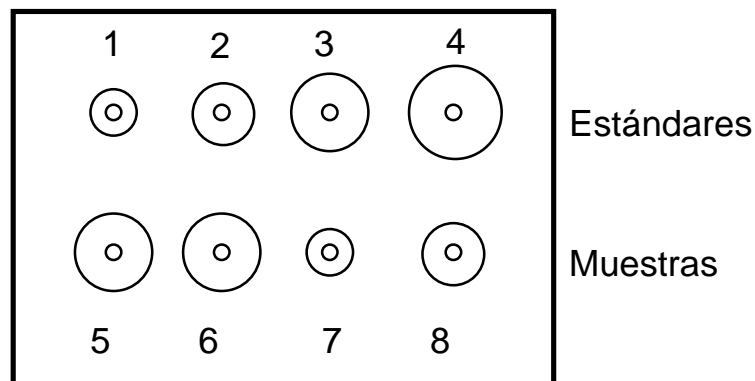


Figura 7.1: **Inmunodifusión radial**. Representación de una placa para la cuantificación de un antígeno "x". El gel de agarosa contiene anticuerpos anti-"x". En los hoyos 1-4 se colocó estándares de concentración conocida de dicho antígeno, para trazar una curva de referencia. Los hoyos 5-8 contienen muestras desconocidas, cuya concentración de "x" se desea determinar.

La técnica de inmunodifusión radial puede utilizarse también para cuantificar anticuerpos contra un antígeno dado, incorporando dicho antígeno en el gel. Sin embargo, esta aplicación es menos común. Entre los usos más frecuentes de este método se encuentran la cuantificación de inmunoglobulinas séricas (que en este caso actuarían como antígeno), de algunos componentes del sistema de complemento (C3, C4), y de algunas otras proteínas plasmáticas.

Existen dos variantes principales del método de inmunodifusión radial. La variante descrita por Mancini *et al.* (1965), se basa en una **difusión completa** de la muestra (48-72 hr) y establece una relación lineal entre la concentración de antígeno y el cuadrado del diámetro del precipitado. La variante descrita por Fahey y McKelvey (1965), se basa en una **difusión parcial** de la muestra (4-16 hr), y establece una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de antígeno y el diámetro del precipitado. El método de difusión completa es más lento, pero proporciona mayor exactitud y precisión, por lo que es el más utilizado.

En la **Fig.7.2** se muestra un ejemplo de la aplicación de la inmunodifusión radial para la cuantificación de una inmunoglobulina sérica, la IgG, empleando placas comerciales. En dicho caso, el gel de agarosa contiene anticuerpos contra la cadena pesada gama humana, los cuales precipitan al encontrarse con la IgG de los estándares, o de las muestras. Con los tres estándares de concentración conocida se traza una curva de referencia, para la interpolación de las distintas muestras.

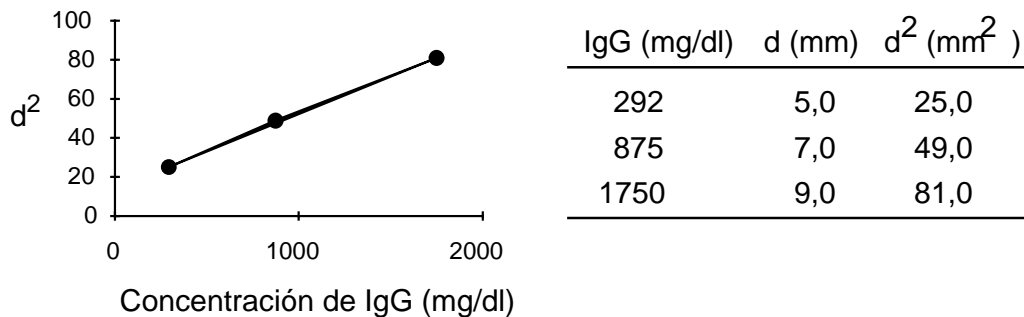


Figura 7.2: Ejemplo del trazado de una curva de referencia para la cuantificación de IgG humana en suero (difusión completa). Las lecturas de los 3 estándares se indican en el cuadro de la derecha. Note que la extrapolación de la recta no se origina de cero, ya que el valor mínimo de Y es el cuadrado del diámetro del hoyo vacío. La interpolación de las muestras en la recta puede realizarse gráficamente, o mediante una ecuación de regresión lineal simple.

Para la mayoría de aplicaciones clínicas de la inmunodifusión radial existen placas comercialmente disponibles, listas para su uso. Sin embargo, esta técnica puede aplicarse a situaciones muy variadas, de manera sencilla y con un mínimo de recursos materiales, como se describe adelante.

Una técnica cuantitativa que compite en la práctica clínica con la inmunodifusión radial, es la **inmunonefelometría**. Esta se basa en la medición de la dispersión de la luz causada por la formación de complejos insolubles antígeno-anticuerpo, al agregar un suero contra el antígeno de interés a la muestra a determinar (**Fig.7.3**). Algunas de sus ventajas son: **(1)** provee resultados en minutos; **(2)** puede automatizarse; y **(3)** debido a que no se basa en la difusión, la presencia de polímeros de antígeno de tamaños diversos no conduce a errores importantes. Su principal desventaja radica en las interferencias que puede causar la turbidez de la muestra (ya sea por la presencia de complejos inmunes pre-existentes o de agregados moleculares de origen no-inmunológico).

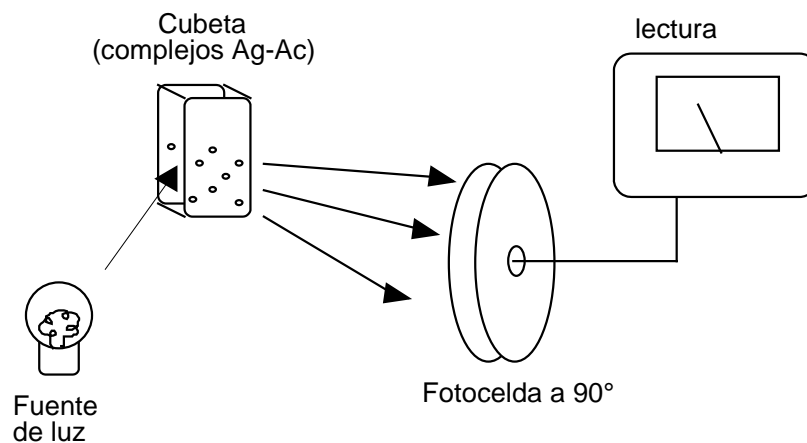


Figura 7.3: Principio de la inmunonefelometría. Los complejos antígeno-anticuerpo que se forman al mezclar la muestra (que contiene el antígeno) con el correspondiente antisuero dispersan la luz, la cual es detectada mediante una fotocelda a 90°.

Método para inmunodifusión radial

Para desarrollar una técnica de inmunodifusión radial propia (no comercial) se requiere: agarosa; un antisuero monoespecífico contra el antígeno de interés; y una solución patrón de concentración conocida del antígeno (para preparar la curva de referencia). Los principales parámetros que deben estandarizarse y optimizarse son: **(1)** la concentración de antisuero en el gel, la cual dependerá del título y avidéz de los anticuerpos; en general, el antisuero se utiliza a una concentración del 2-10% (v/v); **(2)** la cantidad de muestra (usualmente 5-10 μ l). Es fundamental mantener constante el grosor del gel, así como los dos parámetros mencionados, para obtener resultados cuantitativos que sean confiables y reproducibles.

Estas condiciones se deben ajustar con el fin de lograr anillos de precipitado con bordes nítidos, fácilmente visibles, cuyos diámetros varíen entre los 5-15 mm. La aparición

de más de un anillo de precipitación indica que el antisuero utilizado reconoce más de un antígeno (no es monoespecífico), y por lo tanto, no sería apropiado para esta técnica.

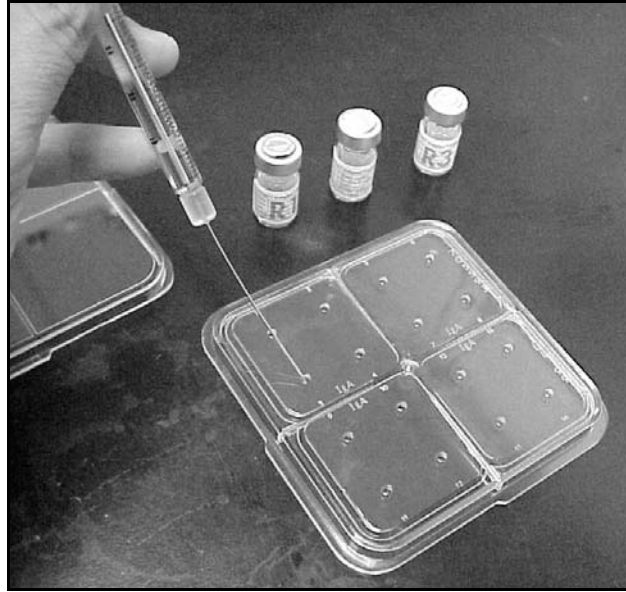


Figura 7.4: **Inmunodifusión radial.** Aplicación de muestras y estándares de concentración conocida en una placa comercial para la determinación de IgM sérica, empleando una microjeringa de precisión tipo Hamilton.

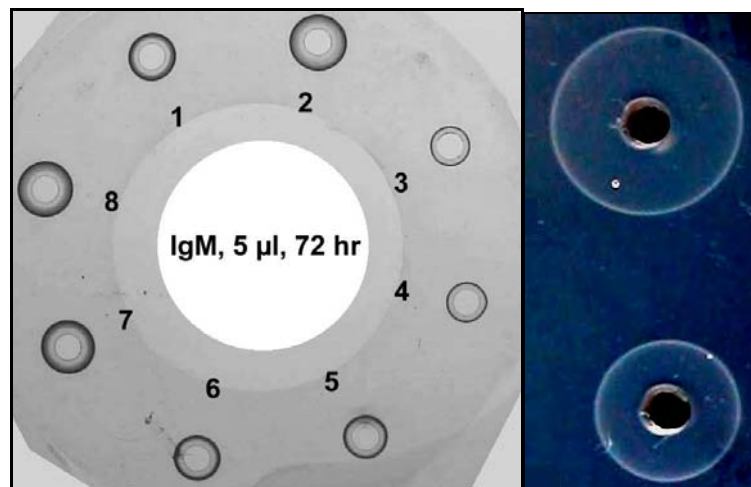


Figura 7.5: **Ejemplo de una inmunodifusión radial para la cuantificación de IgM en muestras de suero humano.** A la izquierda, los precipitados se tiñeron con negro de almidón, solamente para resaltarlos. A la derecha se observa un acercamiento de los precipitados sin teñir, con iluminación oblicua y contra fondo negro.

Procedimiento

1. Fundir agarosa al 1,5% (p/v) en PBS y enfriarla¹ a ~60°, manteniéndola en un baño calibrado. Adicionar el volumen necesario del antisuero (seleccionado a partir de pruebas preliminares) y mezclar. De inmediato, chorrear la(s) placa(s), sobre una superficie nivelada. El volumen del gel debe estandarizarse mediante pruebas preliminares del sistema, para que el grosor sea constante.
2. Una vez gelificadas las placas, estabilizar el gel a 4°C por 60 min, en cámara húmeda. Posteriormente, abrir los hoyos para muestras, con un sacabocados de tamaño predeterminado y constante (ej. entre 2-3 mm). Si se mantienen las placas en bolsas herméticas y con preservante (ej. azida de sodio 0,02%) a 4°C, se pueden conservar durante meses.
3. Al momento de utilizar las placas, cargar las muestras y los estándares en los hoyos, con una micropipeta de precisión (ej. *Hamilton Microsyringe* de 10 µl), preferiblemente por duplicado. El volumen de las muestras debe ser constante y estandarizado. Finalmente, dejar las placas en una cámara húmeda a temperatura ambiente, sobre una superficie nivelada, por 48 hr (difusión completa).
4. Medir los diámetros de los anillos de precipitado, preferiblemente con un visor de precisión, graduado a divisiones de 0,1 mm. La lectura se facilita utilizando una iluminación indirecta del gel. Los precipitados ovales, causados por desnivel o por mala técnica manual en la colocación de las muestras, conducen a error.
5. Construir una curva de referencia para cada corrida de muestras, con al menos tres estándares de concentración conocida. Graficar en papel milimétrico el diámetro elevado al cuadrado (d^2) en el eje Y, contra la concentración de los estándares del antígeno (ej., mg/dl) en el eje X. Trazar la línea de mejor ajuste entre los puntos (notar que no sale del origen, sino del valor que representa el diámetro del hoyo vacío elevado al cuadrado). En condiciones óptimas, los puntos son prácticamente colineales, por lo que las desviaciones usualmente sugieren una imprecisión instrumental o manual.
6. Interpolarse las incógnitas. Si una muestra proporciona un diámetro mucho mayor que el estándar más alto, debe diluirse y repetir la determinación hasta que el valor sea interpolable (no es correcto extrapolar la curva de referencia).

¹ **Nota:** si la temperatura de la agarosa es demasiado alta al momento de adicionar el antisuero, se desnaturalizarán los anticuerpos, afectando su capacidad de reconocimiento.

Capítulo 8

Técnicas de Aglutinación

Introducción

Las técnicas de aglutinación, al igual que otras técnicas inmunológicas, son útiles para la detección de antígenos o de anticuerpos. Se fundamentan en inducir una agrupación macroscópicamente visible de partículas, causada por interacciones antígeno-anticuerpo, que forman puentes entre ellas. Usualmente, el antígeno se encuentra sobre las partículas y los anticuerpos forman los puentes. Pero también pueden utilizarse diseños diferentes, en donde los anticuerpos se encuentran unidos a la superficie de las partículas, y el antígeno forma los puentes.

Tipos de aglutinación y sus variantes

En una aglutinación, los anticuerpos pueden estar dirigidos contra componentes propios de las partículas, por ejemplo de eritrocitos, bacterias, otras células, etc., y en este caso clasificamos a la técnica como una aglutinación **directa** o **activa**. Un ejemplo de aglutinación activa es la tipificación de los grupos sanguíneos, de enorme trascendencia médica. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar dirigidos contra un antígeno que se ha unido artificialmente a una partícula, la cual actúa como un medio de soporte pasivo, en cuyo caso clasificamos a la técnica como una aglutinación **indirecta** o **pasiva** (**Fig.8.1**). Como medios de soporte se puede utilizar **eritrocitos fijados** con formaldehído o glutaraldehído, o materiales sintéticos como el **látex** (una suspensión de microesferas de poliestireno). Los antígenos pueden unirse a estos medios de soporte mediante una variedad de técnicas, la mayoría basadas en la adsorción por fuerzas débiles, aunque también existen métodos para la unión covalente.

Una clara ventaja de las aglutinaciones pasivas con respecto a las técnicas inmunológicas basadas en la precipitación de antígenos solubles, es el aumento en la sensibilidad física (es decir, se logra un límite de detección más bajo). Note que, al unir un antígeno soluble a una partícula, se necesita un número menor de interacciones antígeno-anticuerpo para lograr un conglomerado visible, si se compara con la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo que son necesarios para visualizar un precipitado.

Para la detección de anticuerpos en una muestra, utilizamos partículas que poseen en su superficie el antígeno correspondiente. Su aglutinación pondrá en evidencia a los anticuerpos. En forma inversa, podemos recubrir partículas con anticuerpos, para utilizarlas en la detección de un antígeno dado. Este tipo de técnica se clasifica como una **aglutinación pasiva reversa** (**Fig.8.1**).

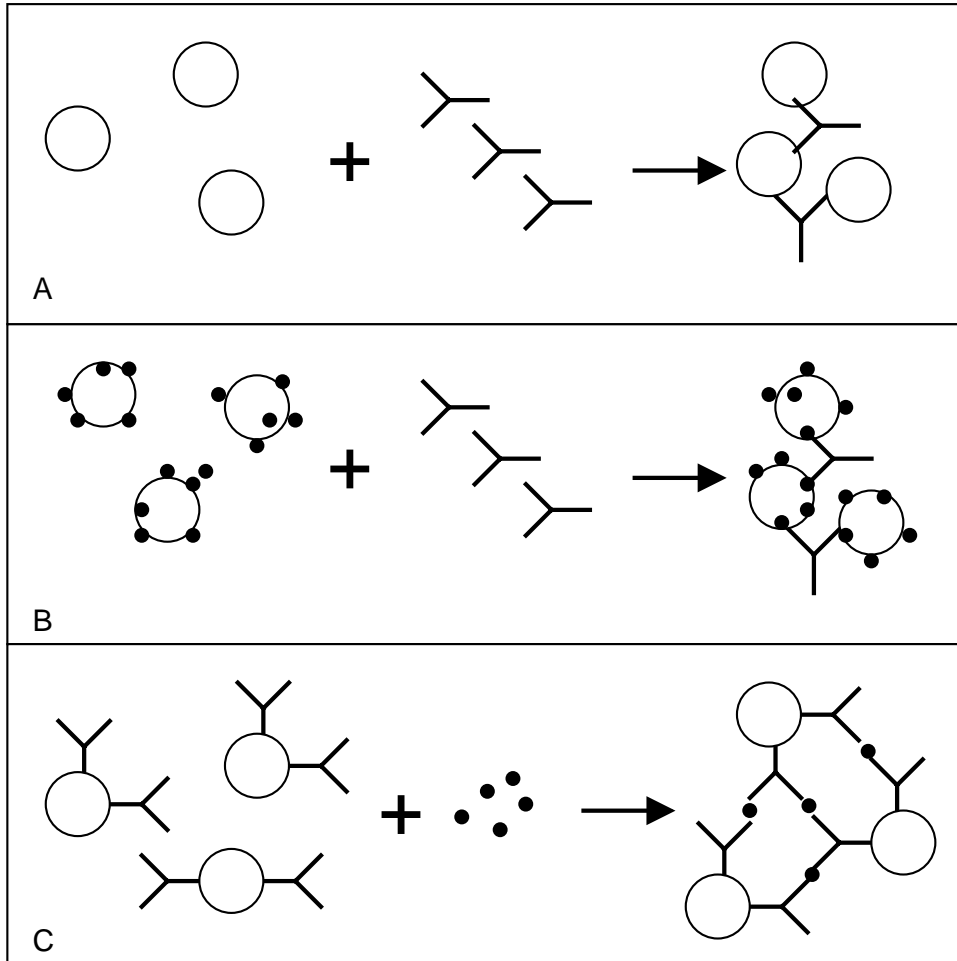


Figura 8.1: Representación esquemática de las técnicas de aglutinación. (A) aglutinación activa, para la detección de anticuerpos; (B) aglutinación pasiva, para la detección de anticuerpos; (C) aglutinación pasiva inversa, para la detección de antígeno.

Otra variante metodológica consiste en detectar un antígeno a través de la **inhibición de la aglutinación**. En esta modalidad, se utilizan partículas recubiertas con un antígeno, y un antisuero con los correspondientes anticuerpos, ajustados a una concentración tal que cause su aglutinación. Al sistema se le añade previamente la muestra desconocida, para determinar si contiene el antígeno buscado. Si este no se encuentra, entonces las partículas aglutinarán por la acción de los anticuerpos. Pero si la muestra contiene el antígeno, este se unirá a los anticuerpos, los cuales no podrán aglutinar a las partículas indicadoras. Note que en esta modalidad, una aglutinación positiva indica la ausencia del antígeno, mientras una aglutinación negativa indica la presencia de este en la muestra. Una de las aplicaciones que más popularizó este diseño, basado en la inhibición de la aglutinación, fue la detección de la hormona gonadotropina coriónica en orina o en sangre, como indicador temprano de embarazo (Fig.8.2).

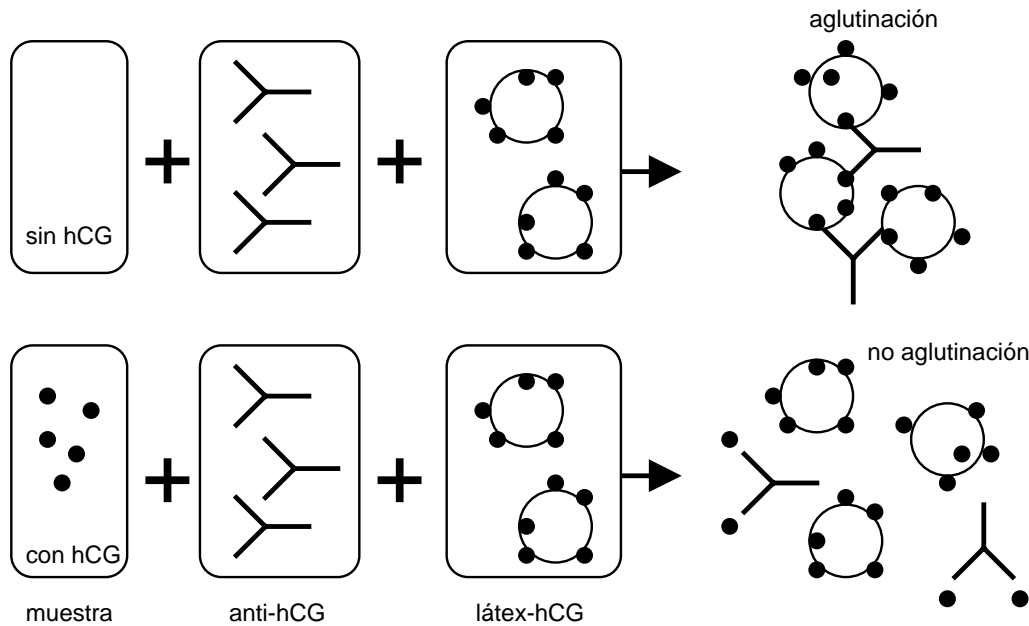


Figura 8.2: **Inhibición de la aglutinación para gonadotropina coriónica (hGC).** Una muestra negativa para el antígeno a determinar (hGC), va a resultar en una lectura de aglutinación del reactivo de látex-hCG. Una muestra positiva para el antígeno inhibirá la aglutinación, al interactuar los anticuerpos con el antígeno libre.

Las técnicas de aglutinación, al igual que las de precipitación, son susceptibles de presentar **fenómenos de zona** (**Capítulo 6** y **Fig.6.2**), dado que ambas se basan en la formación de redes o conglomerados. En una técnica de aglutinación, si se tiene un exceso de anticuerpos contra las partículas indicadoras, puede llegarse a inhibir la formación de los grumos, pues la saturación de sus sitios antigénicos impediría la formación de puentes entre las partículas. De aquí la importancia de trabajar con diluciones apropiadas en estas técnicas, y evitar de este modo la posibilidad de obtener reacciones falsamente negativas.

Las técnicas de aglutinación pueden realizarse en forma semi-cuantitativa, probando diferentes diluciones de una muestra para establecer un título (**Capítulo 2**). Este título representaría la cantidad relativa del analito investigado (ya sea un antígeno, o sus respectivos anticuerpos).

Además de su considerable sensibilidad física, las técnicas basadas en la aglutinación poseen la ventaja de poder realizarse sin necesidad de equipos sofisticados, y de ser muy rápidas. La mayoría se realizan sobre una **lámina** de vidrio o de plástico, en la cual se mezcla una gota de la muestra con una gota de la suspensión de partículas, obteniéndose el resultado en apenas 2 minutos, a simple vista (**Fig.8.3**). Otra forma de realizar estas pruebas es mediante la **sedimentación** de partículas (ej. eritrocitos) en placas de 96 hoyos con fondo en "U". Los eritrocitos que aglutinan, sedimentan en el fondo de los hoyos en forma de un tapete extendido. En cambio, si no aglutinan, forman un punto o botón (**Fig.8.4**). Otra opción consiste en realizar las aglutinaciones **en tubo** (**Fig.8.5**).

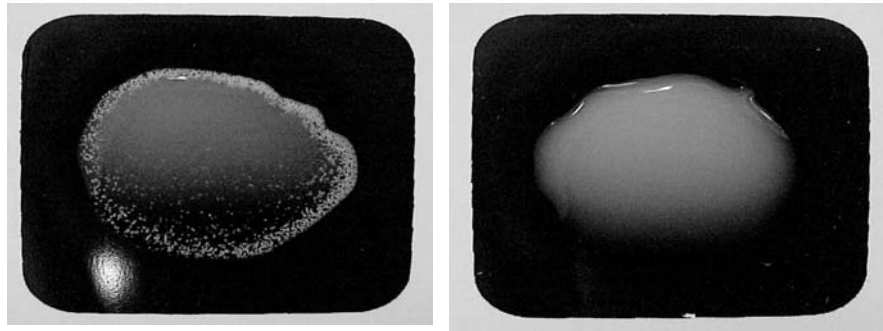


Figura 8.3: **Aglutinación en lámina utilizando látex.** Sobre una lámina (de plástico o vidrio) con fondo negro, se mezcla una gota de muestra y una gota del látex (recubierto con el antígeno o con los anticuerpos). Este ejemplo corresponde a la detección de un antígeno en suero (proteína C-reactiva), utilizando partículas de látex recubiertas con los anticuerpos correspondientes. A la izquierda se observa una aglutinación positiva del látex, al cabo de 2 min, con formación de numerosos grumos. A la derecha se presenta una reacción negativa, en donde el látex se mantiene como una fina suspensión de las microesferas, de aspecto lechoso, sin formar grumos.

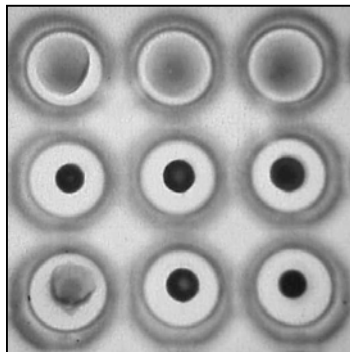


Figura 8.4: **Patrones de hemaglutinación en placas de fondo en "U".** Mediante la técnica de sedimentación de eritrocitos en placas de 96 hoyos, al cabo de 2 horas se puede leer los resultados claramente (vista en forma perpendicular al hoyo), obteniéndose botones centrales en las aglutinaciones negativas, o tapetes extendidos en las aglutinaciones positivas.

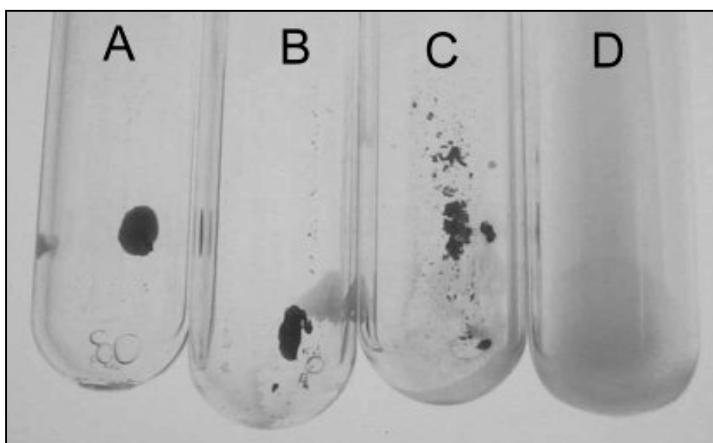


Figura 8.5: **Lectura de la aglutinación en las técnicas en tubo.** Luego de centrifugar los tubos, se resuspende con suavidad cada botón. A, B y C, representan distintos grados de positividad (botón entero, ruptura en pocos fragmentos, o ruptura en grumos pequeños, respectivamente). Un resultado negativo se muestra en D, donde los eritrocitos se resuspenden por completo, sin generar grumos visibles.

La superficie de los eritrocitos, al igual que la de otras células, posee abundantes cargas negativas, las cuales causan repulsión entre ellas. Esta carga se denomina como **potencial zeta** (ζ). Cuando los anticuerpos van a formar puentes entre dos o más eritrocitos (u otras partículas cargadas) en una aglutinación, deben vencer estas fuerzas de repulsión. Dado que las fuerzas dependen en gran medida de la distancia, los anticuerpos de tipo IgM son más eficientes para aglutinar en comparación con los anticuerpos IgG (u otros isotipos no poliméricos). Ello se debe a que la IgM, por su mayor tamaño molecular, permite mantener una mayor distancia entre las superficies, en comparación con la IgG (**Fig. 8.6**).

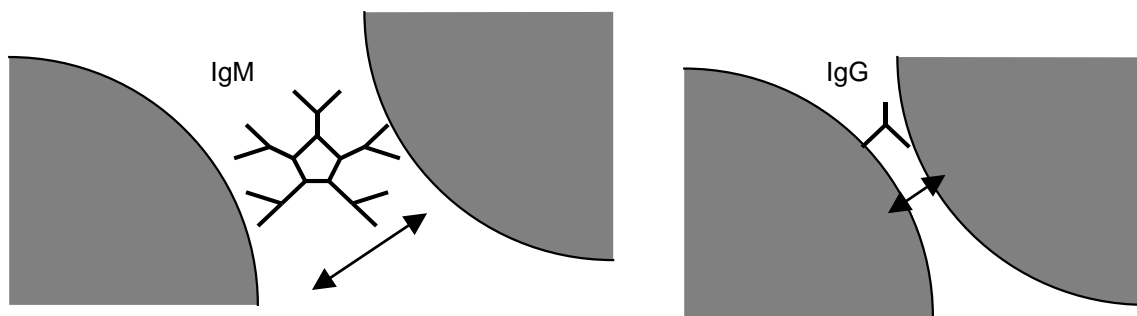


Figura 8.6: Comparación entre anticuerpos IgM e IgG en la aglutinación de partículas (ej. eritrocitos) que se repelen por sus cargas negativas de superficie (potencial ζ). Los anticuerpos IgM, por ser pentaméricos, permiten la formación de puentes entre dos células con una distancia mayor entre sus superficies, en comparación con los anticuerpos IgG u otros anticuerpos monoméricos.

Acople de antígenos a eritrocitos

Una serie de antígenos pueden ser acoplados a eritrocitos, para desarrollar técnicas de aglutinación. La unión puede ser espontánea, por simple **adsorción**. Alternativamente, se puede realizar acoples con eritrocitos modificados químicamente. El siguiente procedimiento se utiliza para el acople de antígenos proteicos a eritrocitos de carnero, utilizando el método del ácido tánico (Hudson y Hay, 1989). También existen otros métodos que se basan en bencidina bisdiazotizada, glutaraldehído, o cloruro de cromo.

1. Obtener eritrocitos de carnero y lavarlos 3 veces con PBS, centrifugando por 10 min a 300xg. Ajustar la suspensión de eritrocitos al 4% (v/v) en PBS, pH 7,2.
2. Agregar 2,5 mg de ácido tánico a 50 ml de PBS y mezclar suavemente con 50 ml de eritrocitos al 4%. Incubar a 37°C por 15 min.
3. Centrifugar a baja velocidad (20 min a 100xg). Si se utiliza mayor fuerza centrífuga, las células tienden a autoaglutinar.

4. Dividir las células en dos alícuotas iguales, y lavar cada una con 50 ml de PBS, por 20 min a 100xg. Una alícuota será recubierta con el antígeno y la otra servirá como control.
5. Resuspender la alícuota a recubrir con antígeno, en 50 ml de PBS, y agregar 50 ml de una solución del antígeno a 2 mg/ml (concentración inicial). Incubar por 30 min a 37°C.
6. Lavar con PBS (centrifugando a baja velocidad) y resuspender ambas alícuotas en 100 ml de amortiguador borato-succinato.

Amortiguador borato-succinato 0,15 M, pH 7,5

Solución A: tetraborato de sodio 0,05 M ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 19 g/l)

Solución B: ácido succínico 0,05 M (5,9 g/l)

Agregar solución B a la solución A, hasta que el pH se estabilice en 7,5

Agregar NaCl hasta 0,14 M y 1% (v/v) de suero equino inactivado (30 min a 56°C)

7. Agregar 10 ml de formaldehído al 40%, tanto a las células con antígeno, como a las células control, con agitación constante. La formalina debe agregarse gota a gota, durante unos 20-30 min.
8. Dejar en reposo hasta el día siguiente a 4°C. Luego agregar otros 10 ml de formaldehído a ambas preparaciones. Dejar sedimentar (24 hr) y descartar el sobrenadante.
9. Agregar un volumen grande de amortiguador borato-succinato y resuspender mediante agitación vigorosa. Dejar sedimentar (24 hr). Lavar de nuevo con borato-succinato, por sedimentación.
10. Ajustar ambas suspensiones al 1% (v/v) y agregar 0,2% de formaldehído (concentración final) como preservante. Las células pueden almacenarse a 4°C hasta por 2 años.

Hemaglutinación en tubo: titulación de un suero anti-eritrocitos de carnero

1. Obtener sangre del conejo inmunizado con los eritrocitos de carnero. Una sangría de ~1 ml, tomada de la arteria central de la oreja, es suficiente. Dejar coagular por ~20 min y separar el suero por centrifugación (5 min).
2. Inactivar el complemento del suero, calentándolo en baño a 56°C por 30 min.
3. Preparar una serie de diluciones dobles (es decir, FD=2) del suero con PBS, en tubos de 10 x 75 mm, con VF=0,2 ml. Emplear 8 tubos, claramente rotulados.

4. Dejar un tubo con 0,2 ml de salina como control negativo de la prueba (permite verificar que los eritrocitos de carnero no muestren una auto-aglutinación espontánea).
5. Agregar 0,1 ml de una suspensión al 2% v/v de eritrocitos de carnero en PBS (previamente lavados 4 veces), a cada tubo, incluyendo al tubo control negativo (PBS). Incubar a temperatura ambiente durante 3 min.
6. Centrifugar los tubos por 30 seg en las centrifugas de velocidad fija para aglutinaciones (recuerde balancear correctamente el rotor).
7. Sacar cuidadosamente los tubos y leer la prueba. Con el tubo en posición casi horizontal, cerca de una fuente de luz (aglutinoscopio), disgregar suavemente el botón de eritrocitos, observando si el mismo genera agregados (aglutinación), que pueden ir desde un solo grumo con el total de células, hasta la formación de un sedimento de aspecto arenoso fino. Si no hay aglutinación, el botón se resuspende homogéneamente, sin mostrar grumos de ningún tipo. Comenzar por el tubo control negativo, y luego leer las distintas diluciones de la muestra de suero. En caso de duda, si se desea repetir la lectura de un tubo, puede volverse a centrifugar y resuspender.
8. Anotar cuál fue la máxima dilución positiva, o título del suero anti-eritrocitos de carnero.

Microhemaglutinación en placa: titulación de un suero anti-eritrocitos de carnero

1. Obtener sangre del conejo inmunizado con los eritrocitos de carnero. Una sangría de ~1 ml, tomada de la arteria central de la oreja, es suficiente. Dejar coagular por ~20 min y separar el suero por centrifugación (5 min). Inactivar el complemento del suero, calentándolo en baño a 56°C por 30 min.
2. Colocar 100 µl (el VF) de PBS en una fila horizontal de hoyos (1-12) de una placa de microhemaglutinación con fondo en U.
3. Colocar 100 µl de PBS en un hoyo que servirá como un control negativo. Anote la localización de muestras y controles en un diagrama para placas de 96 hoyos (como el que se muestra en el **Capítulo 10**). **No rotule ni raye las placas** directamente, pues pueden ser reutilizadas. Puede usar una cinta adhesiva para tal fin.

Nota: las placas de microaglutinación pueden reutilizarse. Su lavado debe ser cuidadoso, ya que las trazas de detergente o el deterioro de la superficie interna de los hoyos, pueden afectar significativamente los patrones de sedimentación de eritrocitos. Para no rayar la superficie interna de los hoyos durante el lavado, se puede aplicar agua a presión, o introducir una torunda de algodón, girándola con suavidad.

4. Realizar la serie de diluciones agregando 100 μ l de la muestra al primer hoyo. Mezclar 5 veces con la micropipeta y transferir 100 μ l al siguiente hoyo (usando siempre la misma puntilla). Al final de la serie, descartar 100 μ l. Cambiar la puntilla de la pipeta para cada muestra de suero, si está titulando varias. Es importante evitar la formación de espuma durante el proceso, pues introduce errores en el pipiteo, y también porque involucra desnaturalización de proteínas.
5. Agregar 25 μ l de una suspensión al 2% v/v/ de eritrocitos de carnero en PBS (previamente lavados 4 veces) a cada hoyo, incluyendo al hoyo control negativo.
6. Dejar sedimentar las células por 2 hr. La placa debe estar sobre una superficie nivelada, lejos de vibraciones causadas por centrífugas u otros artefactos mecánicos.
7. Leer el resultado en cada hoyo. Un botón pequeño en el fondo del hoyo indica que las células no aglutinaron, mientras que un tapete fino que se extiende sobre un área apreciable del hoyo indica aglutinación (**Fig.8.7**). Anotar el título del antisuero.

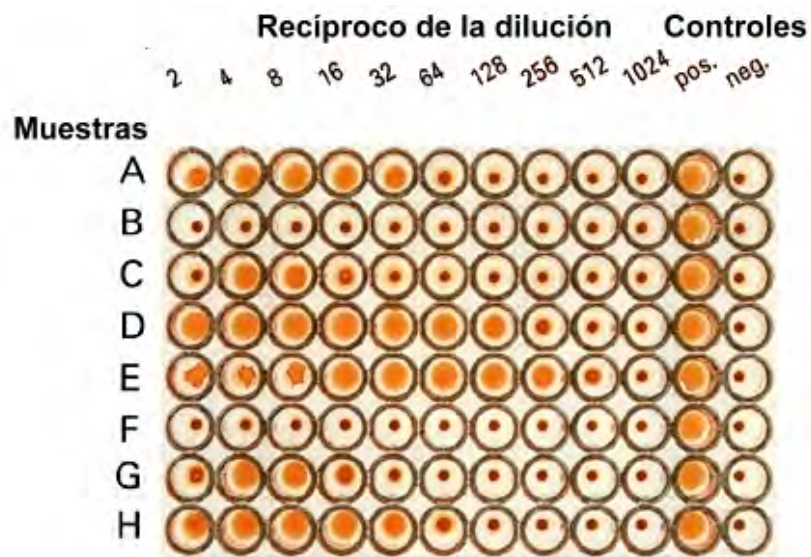


Figura 8.7: Microhemaglutinación en placa de 96 hoyos con fondo en U. Las distintas muestras de suero (A-H) se diluyeron (FD=2) en PBS hasta 1:1024 y se probaron contra eritrocitos de carnero. Las columnas 11 y 12 contienen los controles (+) y (-), respectivamente. Los títulos de las muestras son: A: 32; B: neg; C: 8; D: 128; E: 256; F: neg; G: 16; H: 32. La muestra E presenta un fenómeno de zona en las primeras diluciones, que generalmente se observa (en esta técnica) como un repliegue irregular de los bordes del tapete de células. *Ref:* adaptado de Roitt *et al.* (2001).

Capítulo 9

Marcaje de Proteínas con Biotina

Introducción

El sistema de interacción específica **avidina-biotina** es utilizado en una variedad de técnicas de laboratorio basadas en el marcaje, principalmente en métodos inmunoenzimáticos como el ELISA, la inmunolectrotransferencia (*Western blotting*), la inmunohistoquímica, la inmunofluorescencia, y otros.

La avidina es una glicoproteína básica, obtenida de la clara de huevo, que posee una afinidad muy alta ($>10^{15} \text{ M}^{-1}$) por la biotina. La estreptavidina, obtenida del *Streptomyces avidinii*, es otra proteína que muestra también una altísima afinidad por la biotina. Por otra parte, la (+)-biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que actúa naturalmente como coenzima en reacciones de carboxilación. Una posible función natural de la avidina es secuestrar la biotina, para así inhibir a las enzimas que la requieren como cofactor, y ejercer un efecto antibacteriano.



Figura 9.1: Estructura tridimensional de la avidina, una proteína con alta afinidad por la biotina. La estructura se obtuvo mediante difracción de rayos X con una resolución de 2,7 Å (código 1AVD en el Brookhaven Protein Data Bank).
Ref: Pugliese *et al.* (1993).

La biotina es una molécula pequeña (244 daltons) y fácilmente acoplable a proteínas (anticuerpos, enzimas, etc.) sin afectar sus actividades biológicas, usualmente. Esta propiedad ha sido explotada en el laboratorio para crear sistemas de reconocimiento selectivo de las proteínas marcadas con la biotina, o biotiniladas. Además de tener una alta afinidad por la biotina, la avidina es multivalente, lo cual permite utilizarla como puente entre dos moléculas biotiniladas. Todo lo anterior explica por qué el sistema avidina-biotina ha tenido una gran utilidad en técnicas de laboratorio, facilitando una alta detectabilidad de los analitos de interés, con bajas señales de fondo inespecíficas (Tijssen, 1985).

El acople covalente de la biotina a las proteínas se realiza a través de un enlace amida entre su cadena lateral de ácido valérico (grupo carboxilo) y los grupos ϵ -amino libres (ej. de las lisinas) de las proteínas.

La avidina posee un punto isoeléctrico (pI) de 10,5 y una masa molecular de 15.600 daltons para cada una de sus 4 subunidades (68 kDa en total). Su coeficiente de extinción a 280 nm es de 1,54 para una solución de 1 mg/ml en cubeta de 1 cm. Cada mg de la proteína puede unir un máximo de 14 μ g de biotina, en el ámbito de pH de 2 a 13. La avidina posee 4 sitios de unión a biotina, aunque la disposición espacial de estos hace que cada par de sitios puede unir solamente una molécula biotinilada a la vez. De tal forma, la avidina solo puede formar puentes con 2 moléculas a la vez (Tijssen, 1985). La estructura tridimensional de la avidina (**Fig.9.1**) y la estreptavidina se conocen en detalle. Entre las ventajas que se han señalado de la estreptavidina (60 kDa) sobre la avidina, están el pI más neutral de la primera (lo que le confiere menos carga neta, y así, menos interacciones inespecíficas) y la ausencia de glicosilaciones (que podrían ser potencialmente reconocidas por lectinas) (Jackson y Blythe, 1993).

Marcaje de proteínas con biotina

1. Disolver la proteína a marcar en carbonato de sodio 0,1 M (pH 8,5), a una concentración de \sim 10 mg/ml. A concentraciones bajas de proteína (ej. 1 mg/ml) la mayoría del éster de biotina que se agrega es hidrolizado, en vez de acoplarse.
2. Disolver el éster de biotinil-N-hidroxisuccinimida en dimetilsulfóxido, a 250 μ g/100 μ l y utilizar inmediatamente (es muy inestable). Es recomendable que el volumen de este reactivo no sobrepase el 10% del volumen de la solución proteica. La proporción de biotina recomendable para la reacción es de 50-250 μ g biotina/mg de proteína.
3. Mezclar las dos soluciones suavemente, por 4 hr o toda la noche, a temperatura ambiente.
4. Eliminar el exceso de biotina libre de la preparación, mediante filtración en gel (ej. Sephadex G-25, P-10, etc.), ultrafiltración, o diálisis exhaustiva (**Capítulo 3**).

Capítulo 10

Métodos Inmunoenzimáticos: ELISA

Introducción

Las técnicas inmunoenzimáticas surgieron a mediados de la década de 1960-70, al ser utilizadas para la localización de antígenos en preparaciones histológicas -en analogía con las técnicas de inmunofluorescencia- y para la identificación de líneas de inmunoprecipitación en geles. Poco después, la observación de que tanto antígenos como anticuerpos se pueden adsorber a una **fase sólida**, permitió el desarrollo de estos métodos para la detección y cuantificación de una infinidad de biomoléculas (Engvall y Perlmann, 1971).

Como lo indica su nombre, las técnicas inmunoenzimáticas se basan en el marcaje de anticuerpos o antígenos con **enzimas**, para su posterior detección.

Los **radioisótopos** precedieron históricamente a las enzimas, como marcadores capaces de proveer una potente señal, permitiendo la detección de cantidades muy pequeñas de un analito. Sin embargo, el uso de enzimas como marcadores que proveen una señal mediante su actividad catalítica, presenta una serie de ventajas en comparación con el uso de radioisótopos. Las enzimas poseen un bajo costo, se pueden purificar a partir de fuentes naturales comunes, tienen una aceptable estabilidad o vida útil, y no requieren de equipo muy especializado para la cuantificación de su actividad. Por el contrario, el equipo necesario para medir radioactividad posee un elevado costo, algunos radioisótopos poseen vidas medias muy cortas, y además, su uso presenta riesgos considerables para la salud, y requiere de entrenamiento y permisos especiales, así como facilidades y sistemas de desecho apropiados. Afortunadamente, los límites de detección en las técnicas de marcaje con enzimas, pueden llegar a ser tan bajos como los logrados con radioisótopos, en muchos casos. Aunque algunos reactivos empleados en la detección de enzimas presentan riesgos para la salud, estos pueden prevenirse con normas de laboratorio sencillas.

Desde sus primeras descripciones hasta la actualidad, el desarrollo que han tenido los métodos inmunoenzimáticos, y sus variaciones, ha sido enorme. La introducción de la tecnología de anticuerpos monoclonales (**Capítulo 15**) en las técnicas inmunoenzimáticas, ha sido un elemento fundamental para optimizar su estandarización, reproducibilidad, especificidad y límites de detección.

Actualmente, los inmunoensayos enzimáticos se han convertido en técnicas de gran importancia en el trabajo de laboratorio, tanto de diagnóstico como de investigación. El mercado mundial de estuches de reactivos basados en principios inmunoenzimáticos es uno de los más vastos de la industria biotecnológica. Cientos de empresas ofrecen reactivos pre-estandarizados para la cuantificación de sustancias tan diversas como fármacos, hormonas, drogas, citokinas, mediadores de inflamación, metabolitos, tóxicos, distintas proteínas, anticuerpos, etc.

Clasificación de los métodos inmunoenzimáticos

Aunque la nomenclatura no es completamente uniforme entre distintos textos especializados sobre el tema, los inmunoensayos enzimáticos (abreviados en la literatura en inglés como EIA, de *enzyme-immunoassay*) pueden clasificarse en dos grupos principales: técnicas **homogéneas** y **heterogéneas** (Tijssen, 1985; Voller y Bidwell, 1986). En las primeras, la actividad de la enzima es afectada por la reacción antígeno/anticuerpo, y por esto no requieren separación entre el ligando **unido** y el ligando **libre**. Principalmente se utilizan para la cuantificación de moléculas pequeñas, como drogas y otros haptenos, y se desarrollan por lo general en fase líquida. Un ejemplo de la categoría homogénea es la técnica conocida como EMIT (*enzyme-multiplied immunoassay technique*). En el EMIT, la molécula de interés (ej. una droga) es acoplada covalentemente a la enzima, de modo que esta permanezca activa. Como requisito, el sitio de acople debe ser tal que, los anticuerpos, al unirse al hapteno, inhiban la actividad enzimática del complejo (**Fig.10.1**). De este modo, se logra un sistema en el cual la actividad enzimática depende de la proporción de hapteno/enzima que se haya unido a los anticuerpos. Este sistema es útil para la cuantificación del hapteno en una muestra, estableciendo una competencia entre una cantidad fija de complejo hapteno/enzima y el hapteno a determinar, por los sitios de unión de una cantidad fija de anticuerpos. La actividad enzimática aumenta proporcionalmente a la cantidad de hapteno en la muestra.

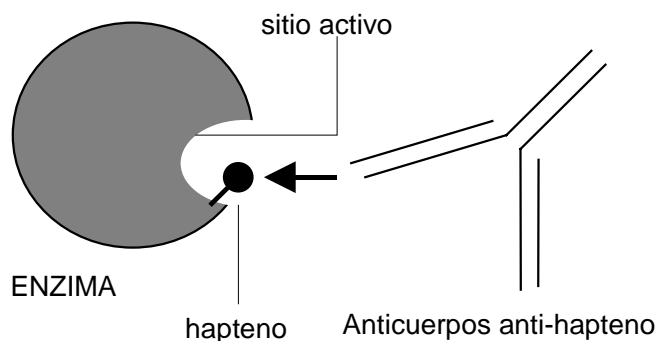


Figura 10.1: Principio de las técnicas inmunoenzimáticas homogéneas (ej. EMIT). Un hapteno, ej. una droga, es acoplado cerca del sitio activo de la enzima indicadora, de tal manera que cuando los anticuerpos lo reconocen, modifican la actividad de la enzima (generalmente la inhiben). Al agregar hapteno libre, presente en la muestra, la enzima es liberada de su inhibición, por simple competencia. La técnica se puede realizar en fase líquida, sin necesidad de separar el ligando unido y el ligando libre, para la lectura.

Bajo los mismos principios, el sistema puede utilizarse para la detección de anticuerpos, aunque no es lo usual. Dos ejemplos del uso del EMIT son la cuantificación de morfina y de tiroxina. En el caso de la tiroxina, es interesante que el conjugado

enzima/tiroxina es inactivo (usando deshidrogenasa málica como enzima) y la unión de los anticuerpos a la tiroxina más bien restablece la actividad (Tijssen, 1985). Como puede apreciarse, el punto crítico en las técnicas homogéneas es la obtención de un complejo enzima/hapteno apropiado, lo que puede requerir de una investigación larga y detallada de las distintas alternativas químicas para el acople. Sin embargo, una vez establecido un sistema, su uso presenta ventajas considerables, tales como el no requerir de una etapa de separación entre reactivos unidos y reactivos libres, la velocidad de la prueba (resultados en minutos), y la posibilidad de automatización.

A pesar de los atractivos de las técnicas homogéneas, han sido las **heterogéneas** las que han logrado la mayor popularidad, y en particular, el ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), debido a su mayor simplicidad y versatilidad. Como se mencionó, en este tipo de técnicas la actividad de la enzima no es afectada por la reacción antígeno-anticuerpo, y por lo tanto, es indispensable contar con una o más etapas de separación entre reactivos unidos y reactivos libres. La forma más simple de lograr esta separación es mediante el uso de una fase sólida, en donde se acopla uno de los reactivos. La fase sólida puede ser lavada después de cada incubación, para eliminar las sustancias que no están unidas.

Se han descrito decenas de diseños de ELISAs, pudiendo ser técnicas **competitivas** o **no-competitivas**. La gran mayoría de los ELISAs son no-competitivos. Existen diseños para la detección de antígenos o de anticuerpos, algunos de los cuales se ilustran en la **Fig.10.2**.

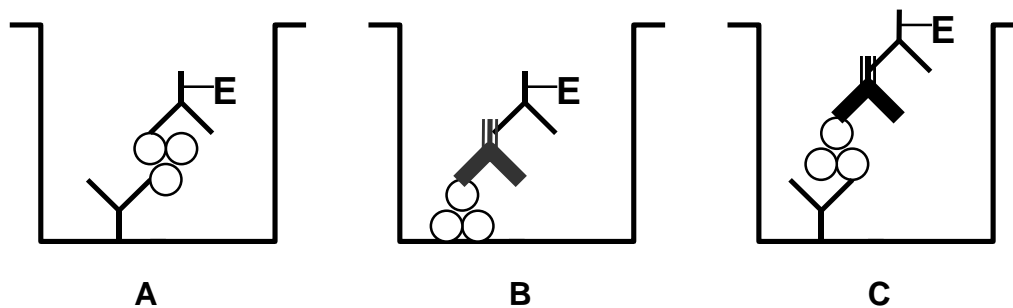


Figura 10.2: Representación esquemática de los diseños de ELISA no-competitivos más comunes. (A) Cuantificación de antígeno; (B) Cuantificación de anticuerpos; (C) Cuantificación de antígeno o de anticuerpos (puede ser utilizado para cualquiera de los dos fines). Ver la discusión de cada diseño en el texto.

Diseños de ELISA para cuantificación de antígeno

El diseño de ELISA para cuantificación de antígenos mostrado en la **Fig.10.2A**, es uno de los de mayor aplicación en los juegos de reactivos disponibles comercialmente. Se basa en unir a la fase sólida una capa de anticuerpos, que capturan el antígeno presente en

las muestras. Después de lavar el material no unido, el antígeno capturado se detecta mediante una segunda capa de anticuerpos contra él, los cuales están conjugados directamente con la enzima indicadora. Esta técnica es denominada también como ELISA en "*sandwich*", o ELISA de captura. Es importante notar que el antígeno debe ser capaz de ser reconocido por al menos dos moléculas de anticuerpos simultáneamente, lo cual no es un problema cuando se utilizan anticuerpos policlonales. Sin embargo, si el ELISA está basado en el uso de anticuerpos monoclonales, es necesario utilizar dos anticuerpos distintos (que reconocen dos epitopos distintos), y que no interfieren entre sí para la unión simultánea al antígeno. Esta modalidad ha sido denominada ELISA "de dos sitios" (*two-site* ELISA) para indicar la distinta especificidad del par de anticuerpos monoclonales. Si el antígeno presenta un mismo epitopo repetido (y accesible) al menos dos veces, es posible usar el mismo anticuerpo monoclonal en la fase sólida y en la detección (**Fig.10.8**). En muchos ELISAs comerciales, se utiliza un diseño mixto monoclonal/policlonal: la captura en fase sólida utiliza un anticuerpo monoclonal, para tener un máximo de especificidad, y la detección del complejo utiliza un conjugado de anticuerpos policlonales, para asegurarse un reconocimiento amplio, a través de múltiples epitopos del antígeno.

En la **Fig.10.2A**, los anticuerpos para la detección del complejo están directamente conjugados con una enzima. Sin embargo, hay otras opciones de diseño disponibles. Si dichos anticuerpos no están marcados, pueden detectarse con una capa adicional de anti-inmunoglobulina/enzima, siempre y cuando los anticuerpos detectores provengan de una especie diferente a la de los anticuerpos unidos a la fase sólida. Este diseño corresponde al esquema de la **Fig.10.2C**, aplicado a la detección de un antígeno.

Diseños de ELISA para cuantificación de anticuerpos

El diseño más simple para este propósito consiste en unir el antígeno a la fase sólida, el cual es reconocido por los anticuerpos presentes en la muestra. Una vez lavado el material no unido, los anticuerpos son detectados mediante un conjugado anti-inmunoglobulina/enzima (**Fig.10.2B**). Escogiendo el conjugado apropiado, es posible cuantificar selectivamente las distintas clases y subclases de anticuerpos contra un antígeno particular, en una muestra.

La unión de proteínas a una fase sólida no está exenta del riesgo de que se presenten cambios conformacionales que afecten su estructura antigénica. Si se presenta un problema de esta naturaleza, se puede recurrir al diseño de la **Fig.10.2C**, aplicándolo a la cuantificación de anticuerpos. El principio es el mismo, pero se evita la unión directa del antígeno a la fase sólida, realizando una captura previa con anticuerpos. Los pasos restantes de la técnica son iguales que en el diseño simple (**Fig.10.2B**), con la salvedad ya mencionada de que los anticuerpos para la captura y para la detección deben ser de especies diferentes (si no fuera así, el conjugado reconocería también a los anticuerpos de la capa utilizada en la captura del antígeno y la técnica no tendría sentido). El diseño alternativo de la **Fig.10.2C** también es útil cuando el antígeno no se logra unir eficientemente a la fase sólida, debido a su naturaleza química u otros factores.

Enzimas y sustratos

Dos de las principales enzimas utilizadas en los inmunoensayos enzimáticos son la **peroxidasa** (obtenida del rábano picante) y la **fosfatasa alcalina** (obtenida de mucosa intestinal bovina). Ambas pueden ser acopladas covalentemente a los anticuerpos sin perder su actividad catalítica, ni alterar la capacidad de unión de los mismos. Son enzimas estables durante largos períodos, si se conservan apropiadamente, y catalizan reacciones simples que pueden generar productos coloreados, tanto **solubles** como **precipitables**. Los productos solubles se utilizan con fines de cuantificación por espectrofotometría, mientras que los productos precipitables se aplican usualmente para técnicas de localización cualitativa (*dot blotting*, electroinmunotransferencia o *Western blotting*, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, etc.). También se pueden utilizar sustratos solubles **fluorogénicos**, esto es, que generan productos fluorescentes, los cuales son detectables a muy bajas concentraciones, mediante el uso de un microfluorómetro (**Fig.10.8**). Sin embargo, el alto costo de dichos instrumentos ha sido un obstáculo para su uso generalizado, siendo más común el uso de lectores de espectrofotometría en el ámbito de la luz visible.

Uso de conjugados no-inmunes o sistemas auxiliares en ELISA

En su forma clásica, los ELISAs (y otros EIAs) utilizan conjugados enzima/anticuerpo. Sin embargo, se puede emplear otros tipos de conjugados, basados en diversos sistemas de reconocimiento específico. Algunos de los sistemas más utilizados se basan en la **proteína A** de *Staphylococcus aureus* o la **proteína G** de estreptococos (que unen las IgG de diversas especies; **Capítulo 4**), la **avidina** y la **estreptavidina** (que se unen a la biotina con alta afinidad; **Capítulo 9**), o diversas **lectinas** (que unen oligosacáridos específicos), por ejemplo. Estas proteínas pueden conjugarse con enzimas para diseñar un ELISA particular. En ocasiones, su desempeño puede ser incluso superior al de los conjugados convencionales basados en anticuerpos.

Pasos generales de las técnicas

Las técnicas de ELISA más simples siguen una serie de pasos comunes, que se resumen en el **Cuadro 10.1**. En cada adición de reactivos (ej. muestras, conjugados, etc.), se incuba por un tiempo que varía de 30 min a 2 hr o más, según cada técnica particular. Estas incubaciones son siempre seguidas de lavados múltiples, usualmente de 3 a 5 lavados consecutivos, cuya finalidad es eliminar las sustancias que no han quedado unidas al sistema de modo específico. El paso final consiste en el desarrollo de color, dado por la conversión catalítica del sustrato en producto. El color puede ser fácilmente cuantificado y guarda una relación con la cantidad del analito buscado en el sistema.

Cuadro 10.1: Pasos generales de las técnicas de ELISA simples.

ELISAs para detección de antígeno ("X")	ELISAs para detección de anticuerpos (anti-"X")
1. recubrimiento de la fase sólida con Acs* anti-X	1. recubrimiento de la fase sólida con Ag purificado
2. bloqueo de sitios libres con proteína irrelevante	2. bloqueo de sitios libres con proteína irrelevante
3. lavado (se puede almacenar placas secas a 4°C)	3. lavado (se puede almacenar placas secas a 4°C)
4. adición de muestra (Ag X)	4. adición de muestra (Acs anti-X)
5. lavado	5. lavado
6. adición del conjugado (Acs anti-X/enzima)	6. adición del conjugado (Acs anti-Ig/enzima)
7. lavado	7. lavado
8. adición del sustrato	8. adición del sustrato
9. detención de la reacción enzimática	9. detención de la reacción enzimática
10. lectura espectrofotométrica	10. lectura espectrofotométrica

* Los anticuerpos contra el antígeno de interés deben ser preferiblemente purificados mediante cromatografía de inmunoafinidad (**Capítulo 4**), o por lo menos, constituir la fracción IgG de un suero inmune, para ser útiles en el recubrimiento.

Recubrimiento de la fase sólida

Las proteínas se unen espontáneamente al plástico, mediante fuerzas no-covalentes. Esto se logra por la simple incubación de la proteína con la fase sólida, durante 2-16 hr. La eficiencia de unión de distintas proteínas a diferentes tipos de plásticos puede variar considerablemente, y es impredecible, por lo que lo ideal es hacer pruebas preliminares con distintas placas comerciales. Los dos tipos principales de placas de 96 hoyos para ELISA son las derivadas del **poliestireno** (placas duras) y del **polivinilo** (placas flexibles).

Utilización de estándares o patrones para curvas de referencia

Para las técnicas de cuantificación de antígeno, se utilizan patrones de concentración conocida del mismo, que se corren simultáneamente con las muestras, con el fin de trazar una curva de referencia. La absorbancia (color) obtenida guarda una proporción con la cantidad de antígeno presente en los estándares y las muestras. De esta forma, las lecturas de absorbancia son convertidas en unidades de masa (ej. pg/ml, ng/ml, etc.).

En el caso de las técnicas para cuantificación de anticuerpos contra un antígeno, no es tan fácil convertir las absorbancias a unidades de masa, pues no siempre se cuenta con los estándares de masa apropiados, por ejemplo anticuerpos aislados por inmunoafinidad con el antígeno (**Fig.10.3**). Es más usual trabajar con unidades relativas o arbitrarias, sin una conversión a unidades de masa. Por ejemplo, se puede estimar la cantidad de anticuerpos mediante curvas de titulación, corriendo diluciones seriadas de cada muestra. El título puede definirse arbitrariamente de varias maneras. Una forma consiste en definir el título como la dilución que resulta en una absorbancia "X", dentro de la región central de

la curva de titulación (por ejemplo 1,0 o 0,5) (**Fig.10.4**). Otra forma consiste en definir el título como la máxima dilución de la muestra que resulta en una absorbancia de 3 veces el valor de las muestras control negativas. Esta última definición utiliza la parte final de la curva de titulación, cerca del aplanamiento, por lo que está sujeta a una mayor variabilidad que la región central, utilizada en la definición anterior. Alternativamente, se puede comparar la absorbancia de las muestras con la de un suero patrón o "control", al cual se le ha asignado un valor de unidades arbitrarias. Muchos EIAs comerciales utilizan esta opción.

Procedimientos: guías generales y ejemplos

La mayoría de técnicas inmunoenzimáticas utilizadas en el trabajo clínico se realizan con juegos de reactivos comerciales, en donde el método ha sido previamente desarrollado y optimizado, y todo el material está listo para su uso. En el trabajo de investigación, o en aplicaciones no rutinarias de estos métodos, puede ser necesario desarrollar una técnica inmunoenzimática para un propósito particular. No es el fin de este capítulo describir en profundidad la metodología para desarrollar y optimizar un ELISA particular, para lo cual el lector es referido a guías especializadas como el manual de Tijssen (1985), entre otras. A continuación se brinda una guía general, tanto para la cuantificación de antígenos, como de anticuerpos. Estos procedimientos se ilustran con algunos ejemplos de ELISAs utilizados en el Instituto Clodomiro Picado. También se presenta un ejemplo de ELISA comercial (**Fig.10.6**), y su correlación con un método radioinmune (**Fig.10.7**), a modo de ilustración.

ELISA para cuantificación de anticuerpos

1. Recubrir placas con el antígeno de interés (100 μ l/hoyo), diluido en amortiguador de recubrimiento (ver Reactivos). Incubar por 10-16 hr a TA. La cantidad óptima de antígeno se encuentra en el ámbito de 0,05-5 μ g/hoyo, y puede determinarse en pruebas preliminares, con una cantidad fija de suero y cantidades variables del antígeno. Es recomendable escoger la mínima cantidad de antígeno capaz de proporcionar la máxima señal.
2. Decantar y agregar 100 μ l/hoyo de albúmina bovina (u otra proteína irrelevante para el sistema) al 1% en PBS (si se va a trabajar con peroxidasa) o en amortiguador FALC (para trabajar con fosfatasa alcalina), durante 30-60 min, para bloquear o saturar los sitios libres del plástico.
3. Lavar 5 veces las placas con amortiguador de lavados (PBS-Tween o FALC). Secar a TA y guardar en refrigeración (incluso meses, protegiendo de la humedad), hasta su uso.

4. Diluir seriadamente las muestras de suero a titular, con PBS-1% albúmina o con FALC-1% albúmina (según la enzima a utilizar), con $FD=2$ o $FD=3$. Por lo general, se parte de una dilución del suero de 1:100-1:200, por la alta sensibilidad de la técnica. Colocar las distintas diluciones (100 μ l) en los hoyos¹, preferiblemente por triplicado. Dejar un hoyo para el control de sustrato (blanco). Incluir un suero control positivo (si se tiene) y un suero normal (negativo), tratados de igual manera que las muestras. Cuando se corren varias placas simultáneamente, la inclusión de estos controles en cada una, permite evaluar la reproducibilidad y la validez de las comparaciones. Incubar por 1-2 hr a TA.
5. Lavar 5 veces con amortiguador de lavados (PBS-Tween o FALC). No dejar secar las placas. Tener siempre preparada la solución del paso siguiente, antes de descartar o aspirar por quinta vez la solución de lavado.
6. Agregar el conjugado anti-inmunoglobulina/enzima (100 μ l/hoyo) adecuado para la especie de la que provengan los anticuerpos a detectar, en dilución previamente determinada. Es conveniente utilizar conjugados anti-inmunoglobulina/enzima comerciales (de preferencia purificados mediante inmunoafinidad), los cuales funcionan bien a altas diluciones (ej. 1:2000-1:10.000). Diluir el conjugado en amortiguador con 1% de proteína irrelevante. Incubar 1-2 hr a TA.
7. Lavar 5 veces con el amortiguador de lavados correspondiente (PBS-Tween o FALC).
8. Agregar el sustrato correspondiente a la enzima (100 μ l/hoyo), preparado al momento y protegido de la luz. Incubar a TA hasta obtener un color adecuado (señal de fondo <0,1-0,2 y señales máximas cercanas a 1,5-2,0). La reacción es por lo general muy rápida con peroxidasa (~5-30 min), y más lenta (~15-60 min) con fosfatasa. Detener la reacción² con 50 μ l de NaOH 2 M/hoyo (fosfatasa alcalina) o con 50 μ l de HCl 2 M (peroxidasa). Leer las absorbancias de inmediato a 405-410 nm (fosfatasa) o 490-492 nm (peroxidasa) en un espectrofotómetro para placas.
9. Procesar las lecturas, calculando el promedio y desviación estándar (SD) de los triplicados. La magnitud de la SD es un indicador del desempeño personal e instrumental. Los lectores de microplacas modernos están equipados con un puerto para comunicación serial con computadoras, donde los datos pueden ser analizados con una hoja de cálculo o con paquetes de *software* para ELISA.

¹ Para el trabajo con placas de 96 hoyos, se hace indispensable utilizar una hoja de registro con un diagrama de las posiciones de las muestras, como el que se muestra en la **pág. 77**.

² En los ensayos que utilizan fosfatasa alcalina, no es necesario detener la reacción si se utiliza un lector automático de alta velocidad (**Fig.10.10**), ya que la reacción es relativamente lenta. Esto constituye una ventaja, pues permite realizar varias lecturas consecutivas de una misma placa, hasta llegar al punto óptimo, sin tener que detener la reacción.

10. Trazar la curva de titulación para cada suero, graficando la absorbancia promedio correspondiente a cada dilución \pm la SD. Calcular el título de cada muestra, interpolando la dilución que corresponde a una absorbancia de 0,5. Como ilustración de este tipo de ELISAs, ver los ejemplos de la Fig.10.3 y la Fig.10.4.

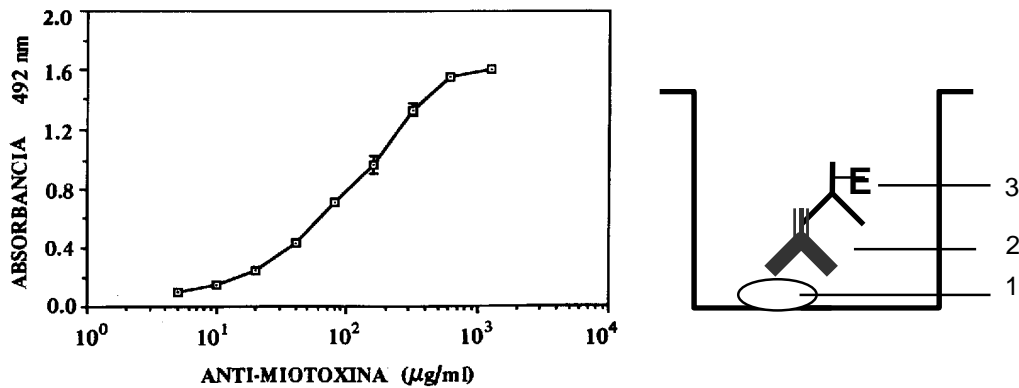


Figura 10.3: ELISA para la cuantificación de anticuerpos equinos anti-miotoxina de *Bothrops asper*. Izquierda: curva de referencia en unidades de masa, preparada con estándares de concentración conocida de anticuerpos anti-miotoxina equinos purificados mediante cromatografía de afinidad. Derecha: diseño de la técnica; (1) miotoxina, 0,4 µg/hoyo; (2) anticuerpos anti-miotoxina (muestra); (3) conjugado anti-Igs equinas/peroxidasa. La técnica se utilizó para estudiar la distribución *in vivo* de los anticuerpos equinos contra la toxina, en un modelo animal. Ref: Rovira *et al.* (1992).

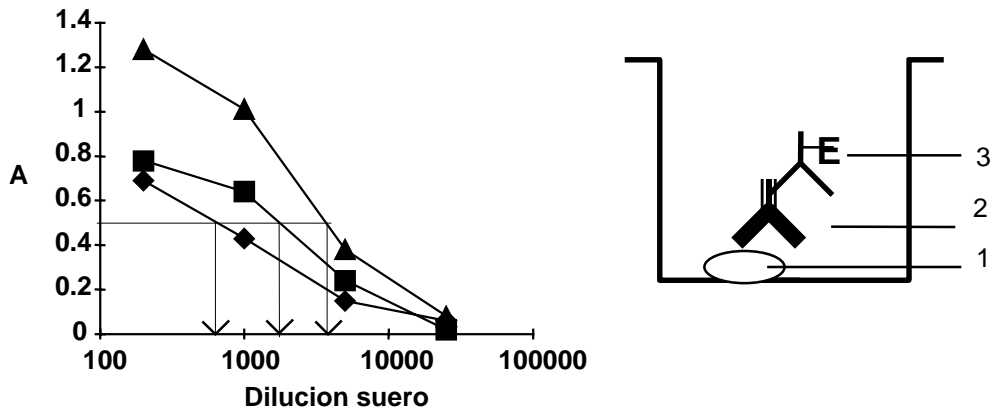


Figura 10.4: ELISA para la titulación de anticuerpos equinos contra el veneno de *Bothrops asper*. Izquierda: curvas de titulación para comparar el nivel de anticuerpos en 3 muestras de suero, de un mismo animal, a los 14 días (◆), 28 días (■) y 42 días (▲) de inmunización. El título se definió arbitrariamente como la dilución que resulta en una absorbancia de 0,5 y se calculó por interpolación. Note el aumento del título en el tiempo. Derecha: diseño del método; (1) veneno crudo de *B. asper*; (2) anticuerpos equinos contra el veneno; (3) conjugado anti-Igs equinas/peroxidasa. La técnica es útil para evaluar la respuesta inmune de equinos durante la producción industrial de suero antiofídico. Ref: Angulo (1995).

ELISA para cuantificación de antígeno

1. Recubrir las placas de 96 hoyos con los anticuerpos (o anticuerpo monoclonal) de captura (100 μ l/hoyo) en amortiguador de recubrimiento. Incubar por 10-16 hr a TA. La dilución óptima de los anticuerpos debe determinarse previamente, seleccionando la menor concentración capaz de proveer una máxima señal. Esta dilución puede variar desde 1:250-1:500 hasta 1:5000 o más, dependiendo de la afinidad, especificidad y pureza de los anticuerpos de captura. La pureza es un factor crítico, ya que se busca adherir al plástico la mayor proporción posible de anticuerpos contra el antígeno de interés.
2. Decantar y agregar 100 μ l/hoyo de albúmina bovina (u otra proteína irrelevante para el sistema) al 1% en PBS (si se va a trabajar con peroxidasa) o en amortiguador FALC (si se va a trabajar con fosfatasa alcalina), durante 30-60 min, para bloquear o saturar los sitios libres del plástico.
3. Lavar 5 veces las placas con el amortiguador de lavados (i.e. PBS-Tween o FALC). Secar a TA y guardar en refrigeración (incluso meses, protegiendo de la humedad), hasta su uso.
4. Colocar las muestras y los estándares del antígeno (100 μ l) en sus respectivos hoyos, preferiblemente por triplicado. Dejar hoyos para el control de sustrato solo (blanco) y para muestras control (-) y (+), si están disponibles. Las muestras deben ser diluidas en soluciones con proteína (ej. 1% albúmina en PBS o en FALC). Incubar 1-2 hr a TA.
5. Lavar 5 veces con el amortiguador de lavados correspondiente (PBS-Tween o FALC). No dejar secar.
6. Agregar 100 μ l/hoyo del conjugado, en dilución óptima previamente establecida, en amortiguador con proteína. Incubar 1-2 hr a TA.
7. Lavar 5 veces con el amortiguador de lavados correspondiente. No dejar secar.
8. Agregar el sustrato correspondiente a la enzima (100 μ l/hoyo), preparado al momento y protegido de la luz. Incubar a TA hasta obtener un color adecuado (señal de fondo <0,1-0,2 y señales máximas cercanas a 1,5-2,0). Detener la reacción con 50 μ l de NaOH 2 M/hoyo (fosfatasa alcalina) o con 50 μ l de HCl 2 M (peroxidasa). Leer las absorbancias de inmediato a 405-410 nm (fosfatasa alcalina) o 490-492 nm (peroxidasa) en un espectrofotómetro para placas.
9. Procesar las lecturas, calculando el promedio y desviación estándar (SD) de los triplicados. Trazar la curva de referencia con los valores de los estándares de antígeno, graficando la concentración vs. la absorbancia. Calcular los valores de

concentración de las muestras por interpolación. Las extrapolaciones no son válidas, por lo que si una muestra llega al punto máximo de lectura debe diluirse y analizarse nuevamente. A modo de ilustración de estas técnicas, observe los ejemplos de las **Figs.10.5, 10.6 y 10.8.**

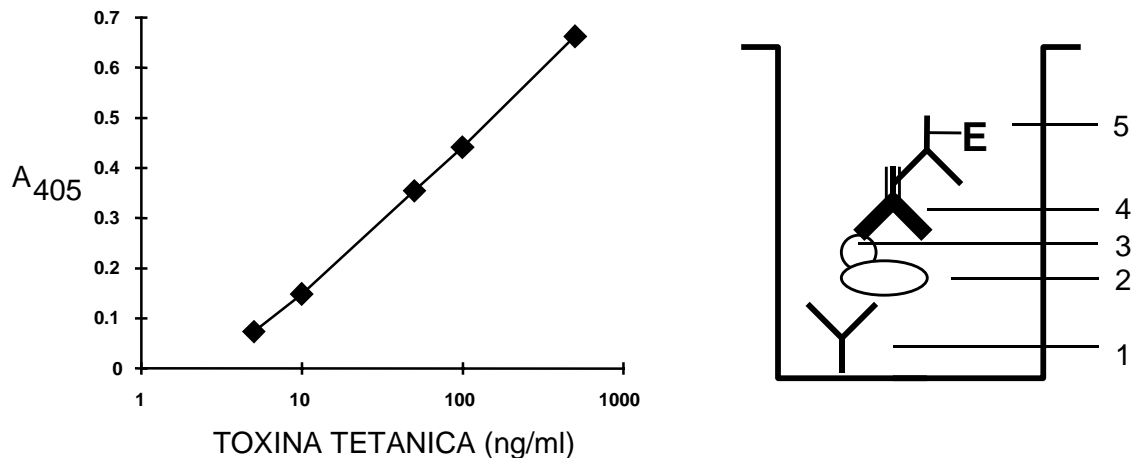


Figura 10.5: Cuantificación de toxina tetánica mediante ELISA. Izquierda: curva de referencia con estándares de concentración conocida de la toxina. Derecha: diseño (1) suero equino anti-tetánico, 1:3000; (2) toxina tetánica (muestras); (3) fragmento C de la toxina; (4) suero de conejo anti-fragmento C, 1:500; (5) conjugado anti-IgG de conejo/fosfatasa alcalina, 1:2000. La determinación de toxina tetánica mediante este ELISA muestra buena correlación con el método de estimación basado en su actividad letal en ratones, lo cual es de utilidad en la cuantificación y estandarización de toxina en muestras para la producción de toxoide y suero anti-tetánico. *Ref:* E. Chaves, N. Rojas y A. Alape (1995), comunicación personal.

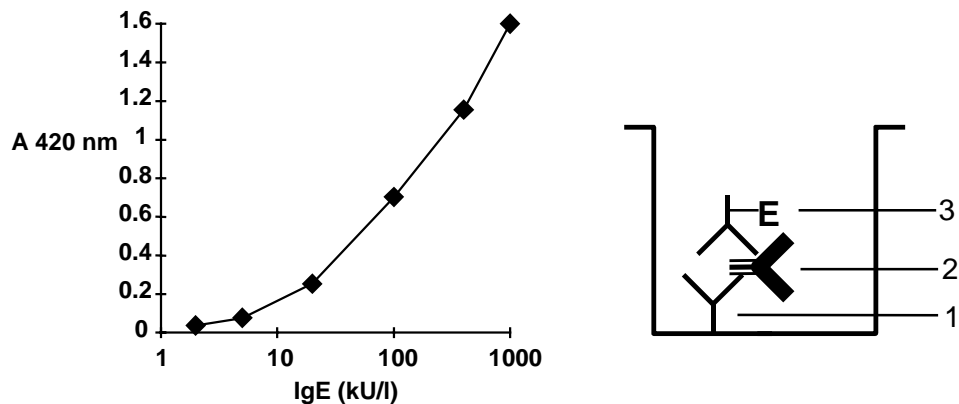


Figura 10.6: Ejemplo de una curva de referencia para la cuantificación inmunoenzimática de IgE sérica. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. La desviación estándar es menor que el tamaño del símbolo. A la derecha se esquematiza el diseño: (1) anticuerpo monoclonal anti-IgE; (2) IgE (muestras); (3) anticuerpo monoclonal anti-IgE conjugado con fosfatasa alcalina.

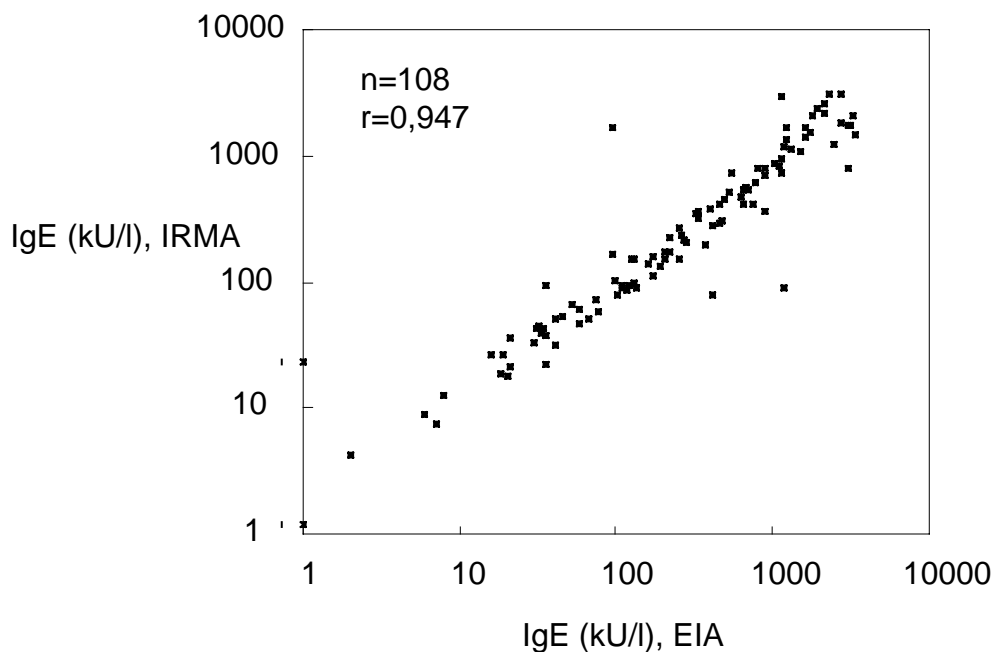


Figura 10.7: Análisis de correlación entre dos métodos para la cuantificación de IgE sérica: inmunoenzimático "IgE-EIA" vs. radioinmune "IRMA-count total IgE", en 108 muestras. El coeficiente de correlación (r) es de 0,947. *Ref:* Lomonte *et al.* (1991).

Reactivos: sistema para fosfatasa alcalina

Amortiguador de recubrimiento (Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 9,0).

12,1 g Tris; 8,7 g NaCl; ajustar pH con HCl y aforar a 1000 ml. Refrigerar.

Amortiguador FALC (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, ZnCl₂ 20 μM, MgCl₂ 1mM, pH 7,4).

6,1 g Tris; 8,7 g NaCl; 0,8 ml solución madre de ZnCl₂ 0,025 M; 1,0 ml solución madre de MgCl₂ 1 M; 0,2 g azida de sodio; ajustar pH con HCl y aforar a 1000 ml. Refrigerar.

Solución madre ZnCl₂ 0,025 M:

0,34 g ZnCl₂/100 ml

Solución madre MgCl₂ 1 M:

20,3 g MgCl₂/100 ml

Amortiguador del sustrato para fosfatasa alcalina:

0,5 ml solución madre de MgCl₂; 97 ml dietanolamina; 0,2 g azida de sodio; 1000 ml agua destilada; ajustar pH a 9,8 con HCl y refrigerar.

Sustrato (p-nitrofenilfosfato):

Al momento, disolver en el amortiguador de sustrato a concentración final de 1 mg/ml.

Reactivos: sistema para peroxidasa

Amortiguador de recubrimiento:

Igual que en sistema para fosfatasa alcalina. Asegurarse de que ningún reactivo tenga azida de sodio (inhibe).

Amortiguador de lavados: PBS-Tween 0,05%, pH 7,2 (fosfatos 0,04 M, NaCl 0,12 M):

15,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 13,5 g NaCl; ajustar pH a 7,2, aforar a 2000 ml y agregar 1 ml Tween-20.

Amortiguador del sustrato para peroxidasa: citrato de sodio 0,1 M pH 5,0.

29,4 g citrato de sodio $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); ajustar pH a 5,0 y aforar a 1000 ml. Refrigerar.

Sustrato para peroxidasa:

Disolver *o*-feniléndiamina (OPD) a 2 mg/ml en su amortiguador, al momento, y agregar 4 μl de H_2O_2 al 30% por cada 10 ml de solución final.

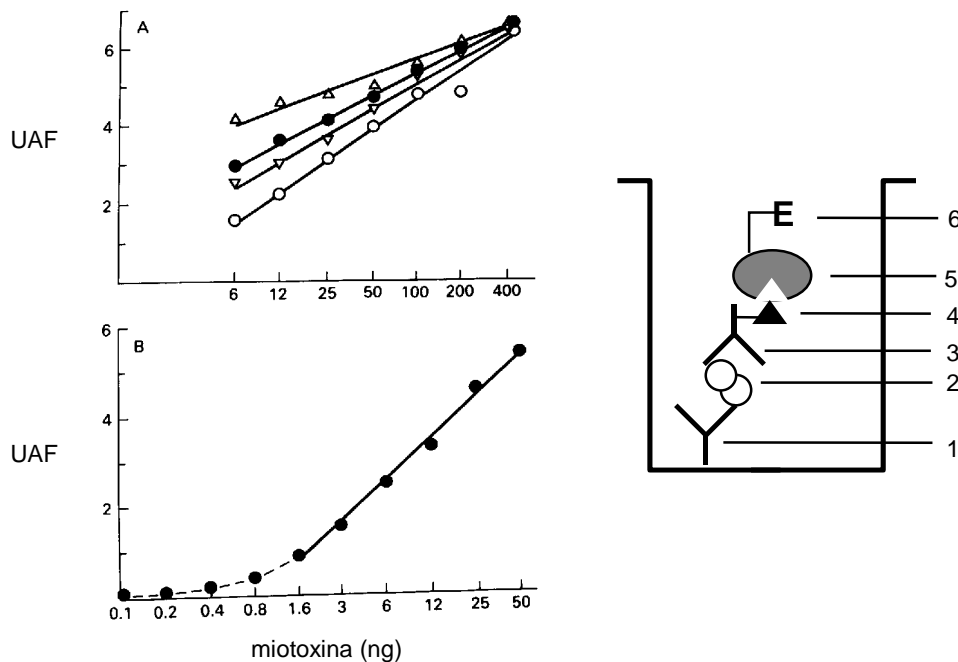


Figura 10.8: ELISA fluorogénico de dos sitios para cuantificar miotoxina de *Bothrops asper*. Derecha: diseño: (1) anticuerpo monoclonal (MAb-3) anti-miotoxina; (2) miotoxina (muestras); (3) MAb-3 marcado con biotina (4); (5) avidina conjugada con fosfatasa alcalina (6). El sustrato 4-metil-umbeliferil fosfato (MUP), que genera un producto fluorescente, medible en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Note que es posible usar el mismo anticuerpo monoclonal en la captura y en la detección gracias a la naturaleza dimérica del antígeno. Izquierda: (A) optimización de la dilución del MAb-3 para captura (\blacktriangle 1:250, \bullet 1:500, \blacktriangledown 1:1000; \circ 1:2000). (B) determinación del límite de detección (0,4-0,8 ng) con MAb-3 de captura a 1:500. Ref: Lomonte y Kahan (1988).

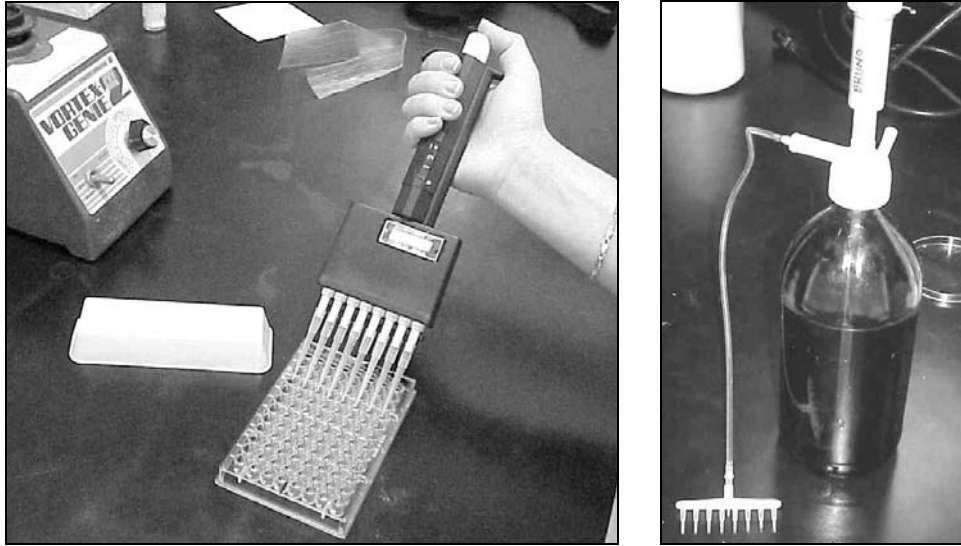


Figura 10.9: **Aditamentos importantes para realizar técnicas de ELISA.** Las pipetas multicanal, en versiones de 8 o de 12 puntas, son la herramienta más útil para el trabajo en las placas de 96 hoyos. Los reactivos como el conjugado, sustrato, etc. pueden ser colocados en canales de plástico (como se muestra a la izquierda) para agilizar el pipeteo. Para facilitar el lavado de las placas se puede utilizar un sistema sencillo de 8 puntas acoplado al recipiente con la solución lavadora mediante una válvula de repetición. También existen aparatos lavadores automatizados, con bombas de vacío, de mayor costo.



Figura 10.10: **Lector automático de placas de 96 hoyos.** Estos espectrofotómetros utilizan un sistema de haces de luz múltiples, perpendiculares a la placa, que permiten leer la absorbancia de los 96 hoyos en menos de 10 segundos. Las lecturas pueden ser enviadas a una impresora, o mejor aún, a una computadora, en donde pueden procesarse y almacenarse. Los lectores poseen un conjunto de filtros para seleccionar la longitud de onda apropiada, y son útiles en muy diversas técnicas, además del ELISA.

Capítulo 11

Electroforesis de Proteínas en Poliacetato de Celulosa o en Agarosa

Introducción

La electroforesis **de zona** es una técnica para la separación de moléculas con base en su carga neta, en un campo eléctrico. Puede ser utilizada con fines **analíticos** (ej. evaluación de proteínas séricas), con fines **preparativos** (ej. purificación de proteínas), o para ser combinada con métodos inmunoquímicos (ej. inmunoelectroforesis y sus variantes). La electroforesis de zona puede utilizar distintos medios de soporte, como las cintas o membranas de **poliacetato de celulosa** y los geles de **agarosa**. Las proteínas migran sin restricción de tamaño cuando se utiliza estos medios. La técnica en membranas es más rápida, aunque más limitada en el volumen de muestra, mientras la técnica en agarosa es más lenta, pero permite el uso de mayores volúmenes de muestra (lo cual es importante en las técnicas inmunoeléctroforéticas).

Usualmente se realiza la electroforesis en un medio con pH entre 8,2 y 8,6. La mayoría de las proteínas séricas se cargan negativamente a este pH y migran hacia el ánodo (+). Las inmunoglobulinas, en promedio, poseen poca carga a este pH, y por tanto migran poco desde el punto de aplicación (**origen**). Las cinco zonas clásicas separadas en este sistema son la albúmina y las globulinas α_1 , α_2 , β y γ . Aunque los amortiguadores de pH 8,2-8,6 son los más utilizados, se pueden variar las condiciones para el análisis de otros tipos de muestras. Los amortiguadores clásicos han sido a base de barbituratos (barbital sódico y ácido dietilbarbitúrico). Sin embargo, dadas las restricciones en el uso de estas sustancias, se puede utilizar otros sistemas amortiguadores (por ejemplo Tris-glicina) con resultados satisfactorios.

Las proteínas separadas por electroforesis pueden fijarse y teñirse con varios tipos de colorantes, los cuales varían en sensibilidad. El **negro de almidón 10 B** (azul oscuro) y el **Ponceau-S** (rojo, ligeramente más sensible) son algunos colorantes comunes. Si se requiere mayor sensibilidad se puede utilizar el **Coomassie G-250** (azul brillante) o **Coomassie R-250** (azul violeta).

Las proteínas separadas electroforéticamente pueden someterse a un análisis cuantitativo mediante **densitometría**. Esto requiere que el medio de soporte sea transparente, por lo general. En el caso de la agarosa, los geles son naturalmente transparentes, pero en el caso del poliacetato de celulosa, que es opaco, debe realizarse un proceso de transparentización. En breve, la densitometría consiste en pasar el electroferograma final (la placa de agarosa o la membrana de poliacetato de celulosa teñida) por un espectrofotómetro especialmente diseñado para que el haz de luz rastree gradualmente una línea continua, que abarca la región de interés. La fotocelda de detección

está acoplada a un sistema graficador, que proporciona un trazo en donde la absorbancia es proporcional a la concentración de proteína (**Fig.11.2**). El área bajo la curva de cada pico electroforético es proporcional a la cantidad de proteína en la banda correspondiente.

Las técnicas electroforéticas tienen gran versatilidad, dado que se pueden realizar tinciones para la detección de diversos tipos de sustancias, incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos, y ácidos nucleicos. También se pueden adaptar para la detección específica de enzimas y sus isoformas (a través de su actividad particular) o de antígenos (en combinación con una variedad de técnicas inmunológicas).

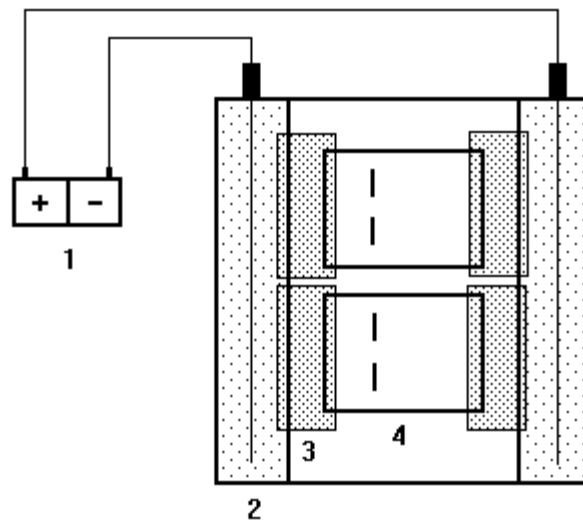


Figura 11.1: Partes básicas de una cámara de electroforesis en agarosa o poliacetato de celulosa. (1) fuente de poder; (2) recipientes con electrodos sumergidos en el amortiguador; (3) puentes de contacto entre el amortiguador y el medio electroforético (ej. papel filtro, esponjas, etc.); (4) medio electroforético (agarosa o poliacetato de celulosa).

Electroforesis en poliacetato de celulosa

1. Hidratar la membrana (manejarla con pinzas), sumergiéndola lentamente en el amortiguador de electroforesis. Dejarla sumergida como mínimo por 10 min.
2. Preparar la muestra (ej. suero) agregándole unos granitos de azul de bromofenol. Este colorante migra hacia el ánodo y sirve para visualizar el frente de migración.
3. Sacar la membrana y colocarla sobre una hoja de papel secante o papel filtro. Secar el exceso de líquido cuidadosamente, sin que se seque el medio por completo.
4. Aplicar la muestra (ej. 1-3 μ l) sobre la membrana con un aplicador especial o según el sistema particular utilizado. Inmediatamente (para reducir la difusión) colocar la membrana en su posición, en la cámara electroforética (**Fig.11.1**), haciendo un

contacto uniforme con los recipientes del amortiguador a ambos lados. Los distintos tipos de cámaras varían en sus sistemas de contacto, como esponjas, papel filtro, imanes para sostener las membranas, etc.

5. Encender la fuente de poder y correr las muestras a 180 v durante 15-20 min (hasta que el frente de migración haya recorrido por lo menos 3-4 cm).
6. Bajar el voltaje a cero y apagar la fuente de poder. **Asegúrese** de haber desconectado la corriente **antes** de abrir la cámara. Retirar la membrana y sumergirla en el colorante deseado, ej. Ponceau-S, por 10 min. Decolorar en ácido acético al 5%, haciendo varios cambios, hasta que el fondo de la membrana sea blanco nuevamente.
7. Si es necesario transparentizar (para densitometría), colocar la membrana sobre una lámina de vidrio, sin atrapar burbujas, y sumergirla por 1 min en metanol. Luego sumergir por 30-60 seg en el reactivo transparentizador, y colocar durante unos minutos en una estufa a 100°C, hasta que se aclare. Se puede utilizar una secadora de cabello con aire caliente en sustitución de la estufa.

Electroforesis en gel de agarosa.

1. Preparar el volumen deseado de agarosa (1% p/v) en amortiguador de electroforesis (ej. Tris-glicina). Si el amortiguador es termolábil (ej. barbital), se funde la agarosa en agua, al doble de concentración, y se agrega un volumen igual del buffer "2x". Para una placa de 8x10 cm se puede utilizar 12 ml de gel. Es importante que las placas de vidrio hayan sido recubiertas previamente con capa base (**Capítulo 5**).
2. Con el gel fundido, chorrear de inmediato la placa sobre una superficie nivelada. Rápidamente colocar unos trozos de "clip" (para formar los hoyos de las muestras) en el lugar deseado y dejar gelificar. Los "clips" se retiran posteriormente con un imán. También es posible utilizar un peine de teflón para formar las ranuras de las muestras. Después de la gelificación, mantener la placa en cámara húmeda, si no se va a utilizar de inmediato.
3. Preparar las muestras como se describió arriba, con azul de bromofenol. Eliminar material insoluble por centrifugación. Cargar las muestras (ej. 3-15 μ l) en las ranuras.
4. De inmediato, colocar la placa en la cámara y encender la fuente de poder. Utilizar 16 mAmp por cada placa de 8 cm de sección transversal (2 mAmp/cm) hasta que el colorante haya migrado unos 4-5 cm.
5. Bajar los controles de la fuente de poder a cero y apagarla. **Asegúrese** de haber desconectado la corriente **antes** de abrir la cámara. Sumergir la placa en colorante (ej. Ponceau-S) durante 20-30 min. Decolorar en ácido acético al 5%, haciendo

varios cambios, hasta que la agarosa quede transparente. Si se desea un registro permanente se puede secar la placa en una estufa.

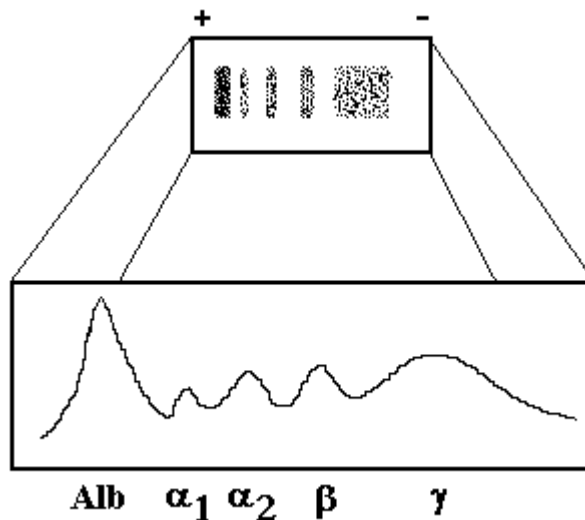


Figura 11.2: Conversión de las bandas electroforéticas (ej. de proteínas séricas) en un trazo densitométrico. El área bajo la curva de cada pico es proporcional a la cantidad de proteína en la banda correspondiente.

Reactivos

Amortiguador de barbituratos 2X (0,044 M, pH 8,6 $\mu=0,1$)

9 g dietilbarbiturato de sodio; 65 ml HCl 0,1 M; ajustar pH y aforar a 1000 ml; conservar en refrigeración.

Amortiguador Tris 0,116 M-glicina 0,3 M (alternativo al barbital)

14,1 g Tris; 22,6 g glicina; ajustar pH a 8,6 y aforar a 1000 ml; conservar en refrigeración.

Colorante negro de almidón 10B (amidoblack 10B)

0,1 g amidoblack; 45 ml ácido acético al 12%; 45 ml acetato de sodio al 1,6%; 10 ml glicerol. Conservar a temperatura ambiente.

Colorante Ponceau-S:

1,0 g Ponceau-S; 37,5 g ácido tricloroacético; 37,5 g ácido sulfosalicílico; ajustar a 500 ml con agua destilada. Conservar a temperatura ambiente.

Transparentizador

Acido acético glacial 20 ml; alcohol metílico 80 ml.

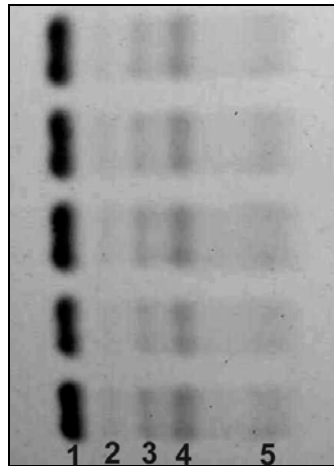


Figura 11.3: **Electroforesis de sueros humanos.** Se muestran varios sueros con un patrón normal de proteínas, separados en membranas de poliacetato de celulosa a pH 8,6 y teñidos con Ponceau-S. Las regiones electroforéticas que se indican son: (1) albúmina, (2) alfa-1, (3) alfa-2, (4) beta y (5) gama. El ánodo (+) se encuentra a la izquierda, mientras el punto de aplicación u origen está a la derecha de la región gama.

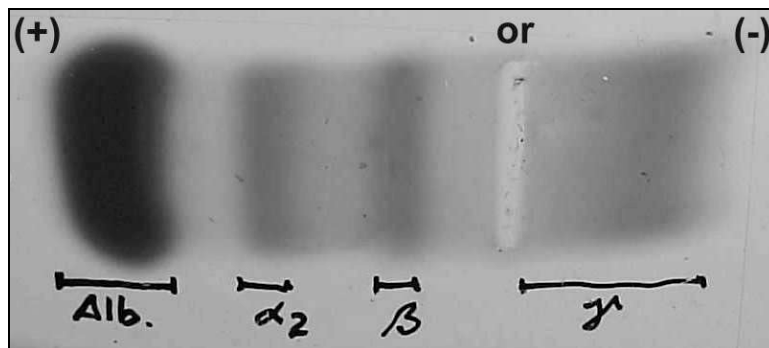


Figura 11.4: **Electroforesis de suero humano en agarosa.** Obsérvese que la intensa zona de la albúmina enmascara a la región alfa-1. Esta foto corresponde a una muestra corrida en un gel de agarosa, en el que se abrió el canal correspondiente a la muestra mediante la inclusión de un trozo de "clip" en el gel. A pH 8,2 la acción electroendosmótica del gel arrastra a las gamaglobulinas hacia el cátodo (-), a partir del punto de aplicación (or). Compare la ubicación de la región gama con respecto a la Figura 11.3.

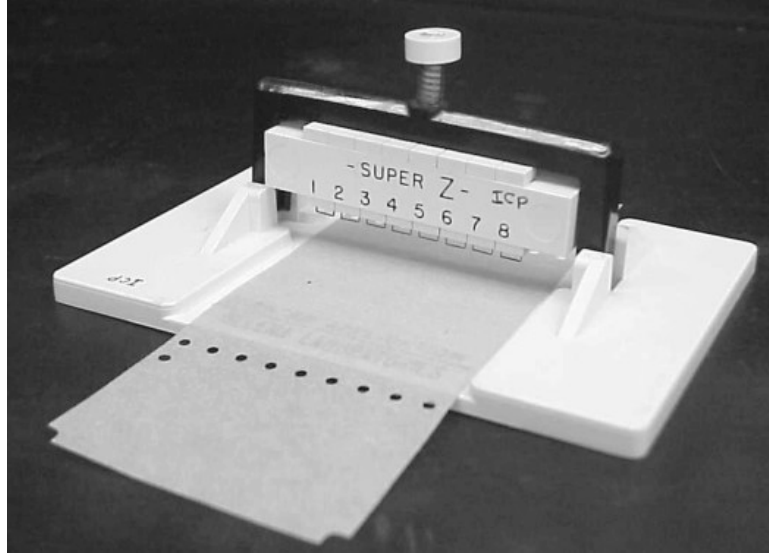


Figura 11.5: Aplicador de muestras para electroforesis en cintas de poliacetato de celulosa. Las muestras se colocan en un cargador con alambres que atrapan 2-3 μ l, mediante capilaridad. Luego, el cargador se presiona suavemente sobre la cinta prehidratada, dejando marcadas las muestras por contacto, sobre su superficie.



Figura 11.6: Fuente de poder y cámara para electroforesis en poliacetato de celulosa. La fuente de poder (izquierda) se conecta a los electrodos de la cámara (derecha), observando la polaridad correcta. La cámara tiene una tapa acrílica transparente que permite visualizar la corrida de las muestras, a la vez que previene accidentes por descargas eléctricas.

Capítulo 12

Inmunolectroforesis

Introducción

La inmunolectroforesis, descrita por Grabar y Williams en 1953, es la combinación de una electroforesis con una inmunodifusión en gel. En la etapa electroforética se separan los antígenos de una mezcla, y en la etapa de inmunodifusión se precipitan dichos antígenos con sus respectivos anticuerpos, formando bandas en forma de arco.

La corrida electroforética se realiza en una placa de agarosa, en la cual se abren uno o más pocillos circulares para las muestras. Después de la corrida, se abre un canal largo, paralelo a la dirección de la corrida (**Fig.12.1**). El canal se llena con el antisuero correspondiente y la placa se deja en cámara húmeda por 24 hr. Durante este período, los diferentes antígenos difunden en forma radial, mientras el antisuero difunde en forma perpendicular al canal. Cuando antígenos y anticuerpos se encuentran, se forman precipitados en forma de arco (para cada sistema antígeno-anticuerpo), siguiendo los mismos principios de la doble inmunodifusión en gel (**Capítulo 6**).

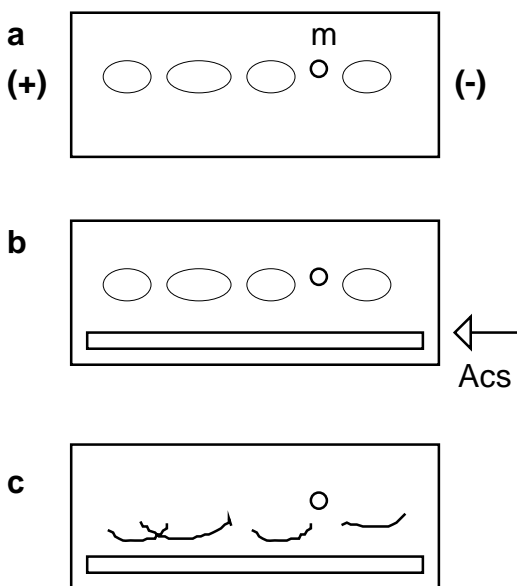


Figura 12.1: Inmunolectroforesis simple. En "a", la muestra (m) se separa electroforéticamente en un gel de agarosa. Los componentes separados se representan por las áreas punteadas. Una vez finalizada la corrida, en "b", se abre un canal a lo largo de la placa para colocar el antisuero deseado. En "c", después de 24 hr de difusión, se evidencian los distintos sistemas antígeno-anticuerpo que precipitaron, formando arcos. Abajo: separación de suero bovino (SB) y posterior difusión frente a anticuerpos contra la albúmina (suero α -BSA).



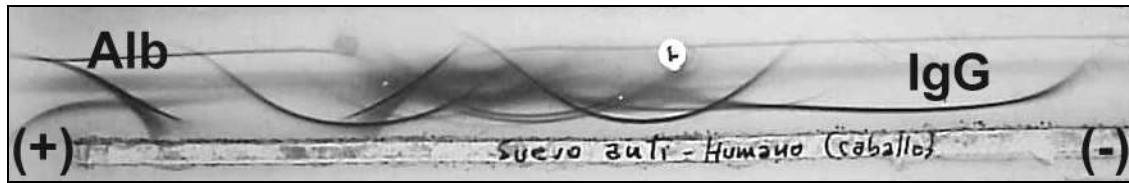


Figura 12.2: **Inmunoelectroforesis de un suero humano.** Después de separar electroforéticamente una muestra de suero humano (hoyo superior) en agarosa a pH 8,2 se dejó difundir contra un suero anti-humano total de origen equino (canal inferior). De los múltiples arcos de precipitación obtenidos puede identificarse con claridad el de la albúmina (Alb), con su clásica forma en "bote" a la izquierda, y el arco extendido de las IgG, el cual es el más catódico, a la derecha.

La inmunoelectroforesis tiene utilidad para analizar mezclas de antígenos, y caracterizar sus propiedades electroforéticas y antigénicas. En el campo clínico, es útil para determinar la presencia y tipo de **paraproteínas** (por ejemplo, en mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, gamapatías monoclonales benignas, etc.). También permite evidenciar la ausencia o disminuciones sustanciales de algunos componentes séricos tales como IgG, IgA e IgM, o el factor C3 del complemento. En la clasificación de mielomas se utilizan sueros monoespecíficos contra los distintos isotipos de cadenas pesadas y livianas, para determinar el tipo de inmunoglobulina involucrado en la neoplasia. Dado que en los mielomas hay un aumento considerable de una inmunoglobulina monoclonal, en la inmunoelectroforesis se detecta una distorsión en el correspondiente arco de inmunoprecipitado (**Fig.12.3**).

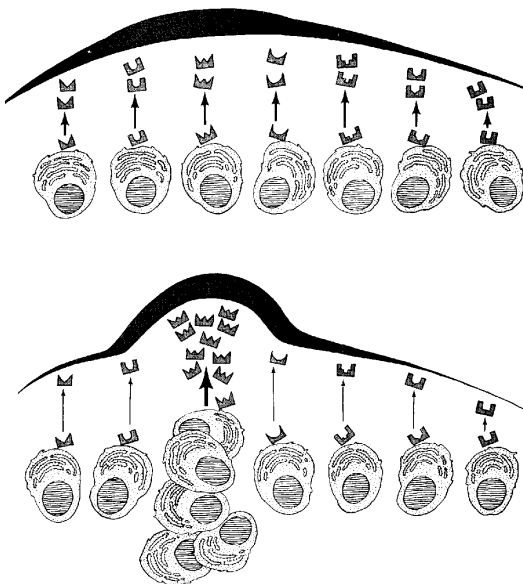


Figura 12.3: **Distorsión de un arco inmunoelectroforético causado por una paraproteína monoclonal (ej. en mieloma múltiple).** Dada la heterogeneidad estructural en las inmunoglobulinas, aún de un mismo isotipo, estas tienen un comportamiento electroforético típico, que consiste en una migración en zona ancha y difusa. Por esta razón, los arcos de precipitado correspondientes a IgG, IgM, o IgA son anchos (arriba). Sin embargo, si un determinado clon de células plasmáticas sufre transformación neoplásica, se producirá una gran cantidad de una inmunoglobulina monoclonal, que distorsionará la continuidad del arco correspondiente (abajo).

Posteriormente a la descripción del método original de la inmunoelectroforesis simple, surgieron numerosas variantes, algunas de ellas con fines cuantitativos. Entre ellas,

la **inmunolectroforesis en cohete** permite la cuantificación de antígenos, al incorporar sus anticuerpos correspondientes (monoespecíficos) en el gel para obtener un precipitado alargado, cuya altura es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (**Fig.12.4**)

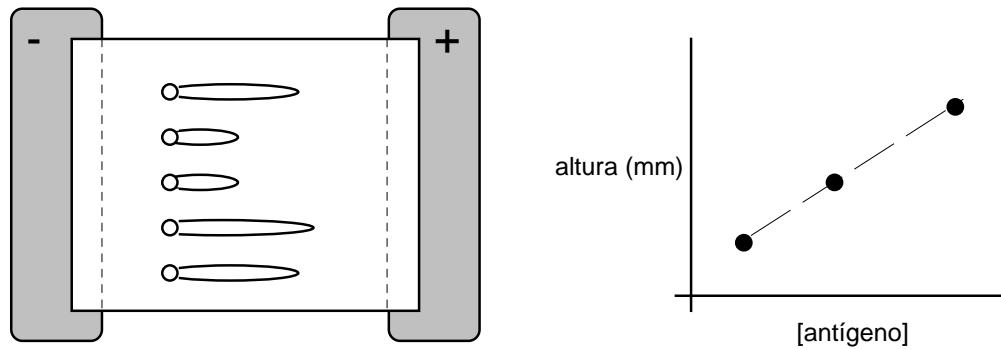


Figura 12.4: **Inmunolectroforesis en cohete**. La placa con gel de agarosa contiene anticuerpos contra el antígeno a determinar. Las muestras se colocan en los pocillos circulares y se someten a un campo eléctrico para que se formen los precipitados alargados ("cohetes"), cuya altura depende de la concentración del antígeno. Utilizando estándares de concentración conocida, se traza una curva de referencia graficando la altura del precipitado (mm) contra la concentración del antígeno.

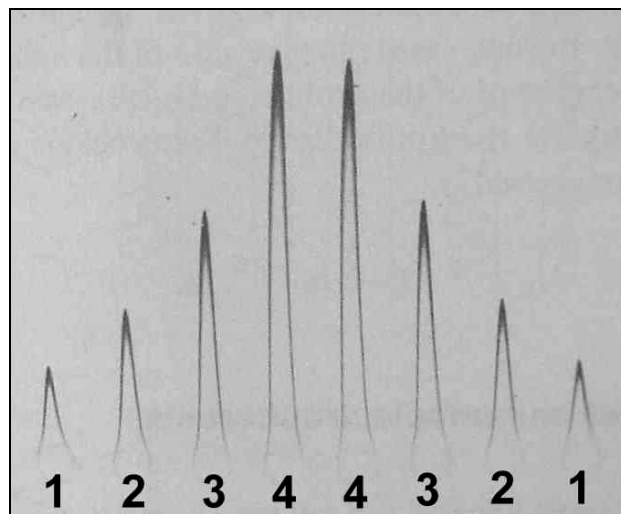


Figura 12.5: **Inmunolectroforesis en cohete**. Los hoyos 1-4 se llenaron con muestras de 5 μl de albúmina humana, con las siguientes concentraciones: (1) 15 $\mu\text{g/ml}$, (2) 30 $\mu\text{g/ml}$, (3) 60 $\mu\text{g/ml}$ y (4) 120 $\mu\text{g/ml}$. El gel de agarosa al 1% contiene anticuerpos anti-albúmina (7 $\mu\text{l/cm}^2$), y se corrió a pH 8,6 por 3 hr a 10 V/cm, con el ánodo arriba.

Otra variante, la **inmunolectroforesis bidimensional**, permite aún mayor resolución que la "simple", al separar una mezcla de antígenos en una dimensión de

electroforesis y luego correr perpendicularmente una segunda dimensión electroforética en un gel con anticuerpos (**Fig.12.6**).

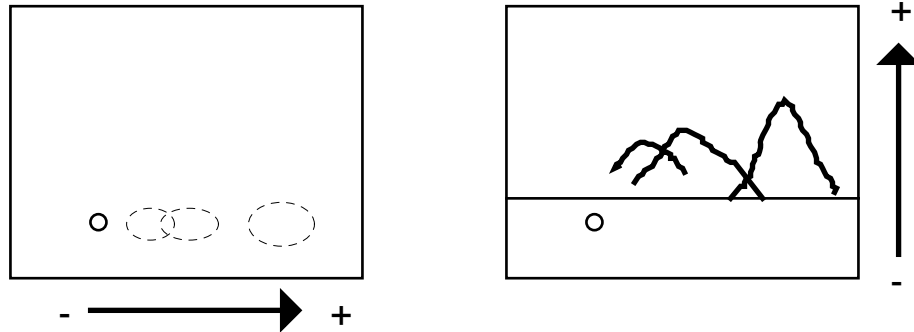


Figura 12.6: **Inmunoelectroforesis bidimensional**. Una muestra proteica es separada en un gel de agarosa (primera dimensión, izquierda). Posteriormente se corta la porción superior del gel (derecha, línea horizontal) y se agrega otro gel de agarosa que contiene anticuerpos contra los antígenos de interés. En este punto se aplica otra electroforesis (segunda dimensión) en un ángulo de 90° con respecto a la primera, para que se formen distintos arcos de precipitación antígeno-anticuerpo.

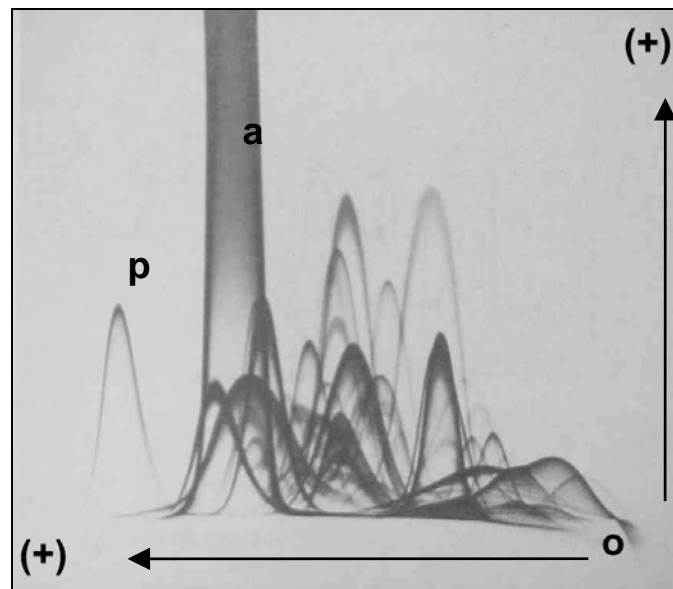


Figura 12.7: **Inmunoelectroforesis bidimensional**. En la primera dimensión (horizontal) se corrió 3 μ l de suero humano, desde el origen (o) hacia el ánodo. En la segunda dimensión (vertical) se corrió las proteínas en un gel con suero anti-humano total (9 μ l/cm²), a pH 8,6. Nótese el gran número de componentes que precipitan (tinción con Coomassie G-250). Se puede identificar la pre-albúmina (p) y la albúmina (a), entre algunos otros arcos conocidos.

La **contrainmunoelectroforesis** (CIEF) es una variante que podría considerarse como una doble inmunodifusión, movida por electroforesis. En esta técnica, se hace migrar

electroforéticamente, pero en sentidos opuestos, dos muestras que contienen, respectivamente, el antígeno y los anticuerpos. La técnica se basa en que a valores de pH cercanos a 8, las inmunoglobulinas poseen poca carga neta y son arrastradas hacia el cátodo por la electroendosmosis (**Capítulo 5**). La CIEF es útil para detectar antígenos ácidos ($pI < 7$), que migran hacia el ánodo a $pH \sim 8,2$. Al encontrarse el antígeno con sus respectivos anticuerpos, se forma una banda de precipitación en un tiempo mucho menor (1-2 hr) que en una inmunodifusión, ya que el movimiento de las muestras es acelerado por el campo eléctrico (Fig.12.8).

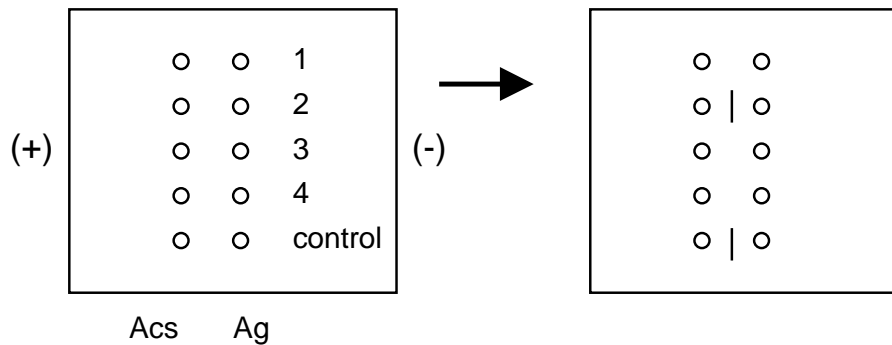


Figura 12.8: **Contrainmuno-electroforesis**. En la placa de agarosa, se colocan antígenos y anticuerpos en la posición indicada en el diagrama de la izquierda. Después de la corrida electroforética, se observan las bandas de precipitación formadas (derecha). En este ejemplo, solo las muestras "control" y #2 estarían dando un resultado positivo.

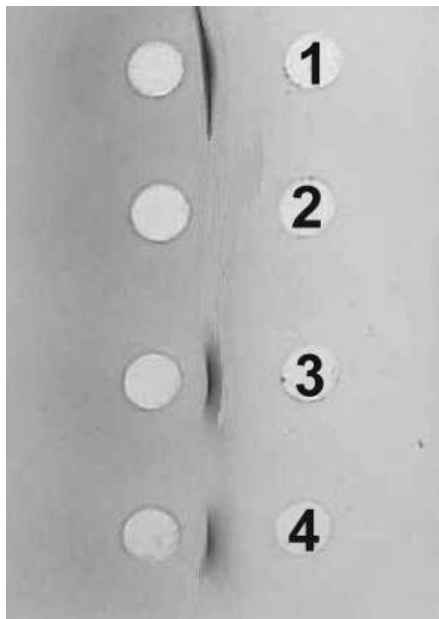


Figura 12.9: **Contrainmuno-electroforesis**. Las muestras 1-4 se enfrentaron contra un antisuero (hoyos de la izquierda) para la detección de un antígeno ácido. El ánodo se encuentra a la izquierda. Las muestras 1, 3 y 4 son positivas, mientras la 2 es negativa.

Esta técnica clásica fue utilizada, por ejemplo, para la detección del antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg) en donadores de sangre. Para ello, se coloca un suero anti-HBsAg en el lado del ánodo, y los sueros a probar en el lado del cátodo.

También puede servir para detectar anticuerpos contra HBsAg en sueros, colocando estos hacia el ánodo y llenando los pocillos del cátodo con una preparación conocida de HBsAg. En la actualidad, se utilizan técnicas más sensibles en el tamizaje de donantes de sangre. Otro ejemplo clínico de aplicación de la CIEF ha sido la detección de anticuerpos contra algunos antígenos nucleares (ej. antígeno Sm), producidos en ciertas enfermedades autoinmunes.

Immunolectroforesis simple

1. Preparar agarosa al 1% en amortiguador de electroforesis (ej. Tris-glicina o barbital, **pág.81**). Para placas de 8x10 cm se puede utilizar 18 ml de gel, y para placas de 5x7,5 cm se puede utilizar 8 ml. El vidrio debe tener capa base (**Capítulo 5**).
2. De inmediato, chorrear la placa sobre una superficie nivelada, esparciendo cuidadosamente el gel por los bordes, sin dejar burbujas. Dejar gelificar.
3. Abrir el(los) pocillo(s) de 3-4 mm en el gel con un sacabocados. Si se utilizan varios pocillos, debe dejarse una distancia de al menos 15 mm entre ellos. Es conveniente dibujar previamente un molde con las posiciones de los pocillos y los canales, para colocarlo debajo de la placa y utilizarlo como guía.
4. Agregar azul de bromofenol al menos a una de las muestras, para visualizar el frente de migración. Cargar las muestras en sus hoyos correspondientes (~30 µl/hoyo).
5. De inmediato, colocar la placa en la cámara electroforética. Encender la fuente de poder y ajustar a 2mA/cm de sección transversal (ej. 16 mA para las placas de 8 cm de altura). Correr hasta que el colorante haya migrado unos 5-6 cm.
6. Al finalizar la corrida, sacar la placa de la cámara. **Asegúrese** de haber desconectado la corriente **antes** de abrir la cámara. Cortar el (los) canal (es) para el antisuero en el gel, con la ayuda de una cuchilla doble (~3 mm diámetro). Con una cuña o espátula, retirar el gel del canal, y cargar el volumen establecido de antisuero, con micropipeta. Dejar algunos minutos para que el antisuero comience a ser absorbido por el gel, y baje su nivel, antes de mover la placa, para evitar que rebalse.
7. Colocar la placa en cámara húmeda por 24-48 hr a temperatura ambiente. Observar y registrar los resultados¹.

¹ **Nota:** si se requiere teñir los inmunoprecipitados, seguir las instrucciones de lavado, tinción y decoloración que se indican en el **Capítulo 6**.

Capítulo 13

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Introducción

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bis-acrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "*polyacrylamide gel electrophoresis*"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia (**Capítulo 14**). En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

Estimación del peso molecular por SDS-PAGE

Se deduce de lo anterior que esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido (**Fig.13.1**). Estas determinaciones poseen un margen de error de ~10%. Algunos tipos de proteínas pueden mostrar una migración atípica en esta técnica, por ej. proteínas con puntos isoeléctricos muy extremos (donde la carga intrínseca puede ser lo suficientemente fuerte para influir en la movilidad), o proteínas altamente glicosiladas.

La determinación del PM de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM. No obstante, en ocasiones es útil analizar muestras no reducidas de una proteína, por ejemplo, para evaluar su composición de subunidades. En tal caso, la movilidad electroforética en SDS-PAGE, aunque guarda una cierta relación con el PM, no necesariamente corresponde con su PM exacto, dependiendo de la forma y los pliegues causados por los enlaces disulfuro, que seguirían intactos aún después de la interacción SDS-proteína, en condiciones no reductoras.

Si la muestra ha sido reducida con 2-mercaptoetanol (u otro reductor como el ditioneitol), los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios son disociados, la estructura cuaternaria se pierde y las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales. La movilidad electroforética relativa (R_f) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El R_f se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (u otro punto de referencia arbitrario). Ejemplo:

Cuadro 13.1: Determinación del peso molecular de una proteína "incógnita", mediante SDS-PAGE. Las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol, y corridas en un gel al 12% de concentración.

Marcador	PM	Distancia (mm)	R_f (vs. 70 mm)
Albúmina bovina	66.000	6,5	0,092
Ovalbúmina	45.000	13,0	0,186
Gliceraldeh-3-P-DH	36.000	18,0	0,257
Anhidrasa carbónica	29.000	25,0	0,357
Tripsinógeno	24.000	28,5	0,407
Inhibidor de tripsina	20.100	38,0	0,543
α -Lactalbúmina	14.200	50,0	0,714
Banda incógnita	?	44,0	0,623

Al graficar estos datos en papel semilogarítmico ($x=R_f$, $y=\text{Log PM}$) se observa la relación mencionada (**Fig.13.1**). El PM estimado para la proteína incógnita es de 16.200 daltons, interpolando mediante una regresión lineal en los puntos adecuados.

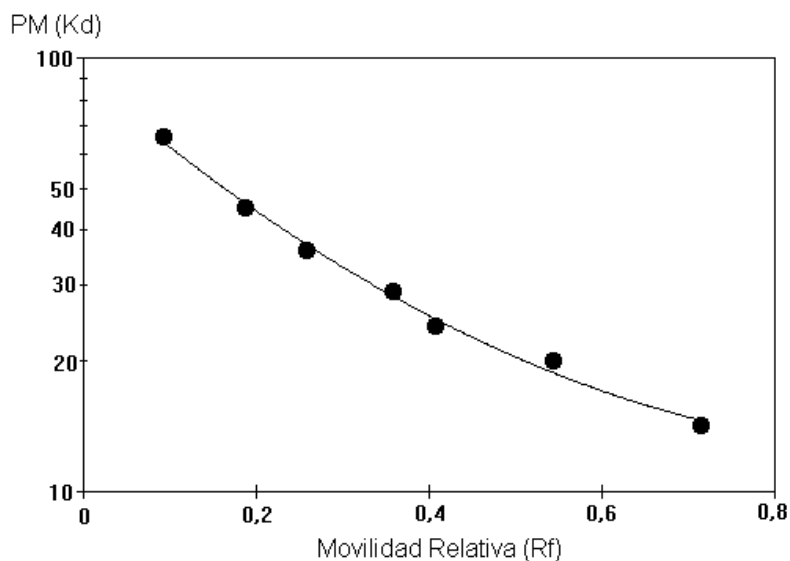


Figura 13.1: Ejemplo de una curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE. Los datos corresponden al ejemplo del Cuadro 13.1. Nótese que la línea de regresión con los estándares de PM conocido muestra una ligera curvatura, típica de los geles de concentración homogénea. Para la interpolación de bandas incógnitas, en la práctica es más sencillo aplicar una regresión lineal simple a los puntos colineales más cercanos a la muestra. La extrapolación de la curva hacia el eje Y, donde $R_f=0$, indica que, teóricamente, las proteínas mayores de 100 Kd no penetran en el gel.

Para ilustrar la utilidad del análisis de una proteína bajo condiciones de reducción o no-reducción, se puede usar como ejemplo la molécula de IgG (**Fig.13.2**). Al correr una preparación pura de IgG no reducida, se obtendrá una sola banda, en la región de PM ~ 150-160 Kd. Si se trata la muestra con un reductor como el 2-mercaptoetanol, se observará dos bandas: una de ~50 Kd (la cadena γ) y otra de ~25 Kd (las cadenas livianas kappa y lambda).

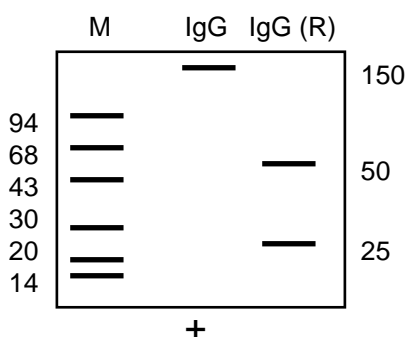


Figura 13.2: Análisis de la composición de subunidades de una proteína en SDS-PAGE. Una muestra de IgG purificada (carril central) que no fue tratada con agente reductor, migrará con un PM aparente de 150-160 Kd. La misma se separará en dos bandas, al ser reducida [IgG (R)], con PM de 50 y 25 Kd, respectivamente. A la izquierda se representan los marcadores de PM conocido (M).

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético **discontinuo**, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (en el gel superior o **compactador**) y luego las separan (en el gel inferior o **separador**; **Fig.13.3**).

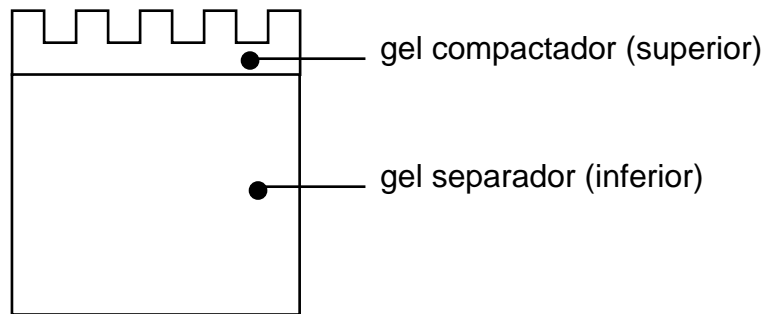


Figura 13.3: Partes de un gel de SDS-PAGE. Está compuesto de dos geles de distinta porosidad y pH, que cumplen funciones diferentes, para aumentar el poder de resolución.

En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros del gel. Así, si se requiere resolver componentes de muy alto PM, se utilizan geles al 5% o al 7,5%, mientras que los geles de poro menor, ej. 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de ~10.000-90.000 daltons.

Geles en gradiente

Ciertos tipos de muestras poseen componentes con PMs muy variados, que incluyen desde macromoléculas hasta pequeños péptidos. En tales casos, el uso de un gel separador de concentración **homogénea** limita a resolver adecuadamente solo una fracción determinada de los componentes. La alternativa para estos casos es la utilización de geles de concentración heterogénea, en los cuales se prepara un **gradiente** que va desde una concentración baja, al inicio del gel (ej. 5%), aumentando hacia el final (ej. 30%) Estos geles proporcionan la mejor resolución obtenible por SDS-PAGE para mezclas heterogéneas, y su preparación requiere de un aditamento simple para generar gradientes, que puede ser obtenido comercialmente, o preparado en el laboratorio (**Fig.13.4**).

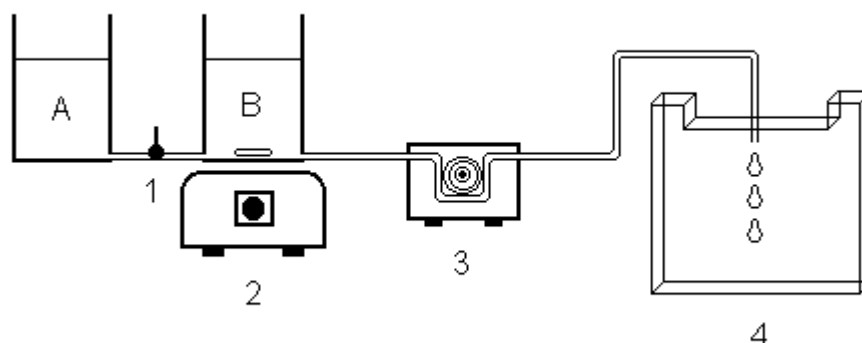


Figura 13.4: Esquema de la preparación de un gel de poliacrilamida en gradiente. 1:lave; 2:agitador magnético; 3:bomba peristáltica; 4:molde de vidrio para el gel; A:solución diluida (concentración mínima); B:solución concentrada (concentración máxima).

Preparación de geles para SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Las cantidades que se describen a continuación¹ sirven para el sistema de mini-geles de Bio-Rad (Mini-Protean II[®]). Las mismas pueden adaptarse para otras cámaras de diversa capacidad, conservando las proporciones.

1.Para la preparación del gel separador (5 ml, grosor = 0,75 mm), mezclar los siguientes reactivos, según el porcentaje de gel deseado, en un frasco Kitasato de 50 ml:

Componente	Concentración final						
	20%	15%	12%	10%	7,5%	5%	
agua desionizada	367	1167	1683	2000	2367	2783	μl
amortiguador separador	1250	1250	1250	1250	1250	1250	μl
SDS	50	50	50	50	50	50	μl
acrilamida/bisacrilamida	3333	2500	2000	1667	1250	833	μl

2.Preparar el molde para el gel. Hacer una marca a ~1-1,5 cm debajo del nivel del "peine" de muestras. Retirar el peine.

¹ **Nota:** la acrilamida es **neurotóxica**. Al pesar el reactivo sólido debe usarse guantes y mascarilla. Limpie cualquier residuo de acrilamida en la balanza y sus alrededores, pues la inhalación es tan nociva como el contacto con la piel. Al preparar geles es necesario usar guantes e igualmente, limpiar cualquier derrame. Los sobrantes de solución de monómeros no deben ser vertidos en el desagüe, deben polimerizarse para descartarlos en forma de gel (ya que el polímero pierde la toxicidad).

3. Con la mezcla de reactivos a temperatura ambiente, desgasear aplicando vacío², 15 min.
4. Iniciar la polimerización agregando 3 µl de TEMED y 15 µl de persulfato de amonio³ a la mezcla. Inmediatamente mezclar y verter la solución en los vidrios (molde), hasta la marca hecha en el paso #2, sin atrapar burbujas. De seguido, eliminar la curvatura (menisco) en la superficie, con una delgada capa (1-2 mm) de agua destilada o de isobutanol, depositada suavemente sobre la mezcla. Dejar que polimerice el gel (óptimamente en 15-20 min).
5. Una vez que la interfase entre el polímero y el agua se torna visible, esperar 10-15 min adicionales para que se complete la reacción. Luego, decantar el exceso de líquido de la superficie, y colocar el peine para muestras, en posición ligeramente inclinada (para no atrapar burbujas).
6. Mezclar los componentes del gel superior (compactador):

Componente	Cantidad
agua desionizada	1,5 ml
amortiguador superior	630 µl
SDS	33 µl
acrilamida/bisacrilamida	330 µl
TEMED	2 µl
Persulfato de amonio	10 µl

7. Una vez agregados los catalizadores, mezclar y verter de inmediato en el molde, nivelando el peine a su posición horizontal, sin atrapar burbujas. Dejar polimerizar.
8. Quitar el peine deslizándolo suavemente, y lavar los hoyos llenándolos con agua y aspirando luego con una jeringa. Esto elimina residuos de componentes no polimerizados.
9. Preparar las muestras. Estas se pueden analizar en estado **reducido** o **no reducido**, mezclándolas con el respectivo amortiguador de muestras. Si las muestras son sólidas, se pueden disolver directamente en el amortiguador "1x". Si son líquidas, se mezclan partes iguales de muestra y amortiguador "2x". La cantidad de proteína a aplicar depende de la sensibilidad del sistema de detección (ej. µg para tinción de Coomassie, ng para tinción de plata) y de la heterogeneidad de la muestra. Para reducir los enlaces disulfuro de las muestras con amortiguador reductor, colocarlas

² asegurarse de que el sistema de vacío cuente con una trampa de seguridad.

³ las cantidades de persulfato y TEMED pueden variar según cada lote y estado de los reactivos.

en baño de agua a ebullición durante 5 min. Para correr muestras no reducidas, se mezclan con amortiguador (sin reductor) y se aplican al gel directamente, sin calentar. La concentración de las muestras a usar depende de su heterogeneidad. Las mezclas complejas de proteínas se pueden preparar a ~5-10 mg/ml.

- 10.** Cargar las muestras en los hoyos (5-15 μ l, correspondiendo por ej. a 10-30 μ g en el caso de mezclas complejas, o 3-10 μ g para proteínas purificadas). Para esto, se puede llenar previamente todos los hoyos con amortiguador de cámara, y luego aplicar las muestras "bajo el amortiguador" (dado que son más densas por la glicerina), con una jeringa Hamilton o con una pipeta de puntas capilares. Es fundamental asegurar que no ocurran contaminaciones cruzadas entre los distintos hoyos. Igualmente, si se utiliza una pipeta Hamilton, hay que lavarla exhaustivamente entre las distintas muestras. Incluir marcadores de PM en uno de los carriles, como referencia.
- 11.** Llenar el tanque con el amortiguador de cámara (180 ml en el tanque inferior y 120 ml en el superior). Colocar el gel en la cámara y correr a 200 v (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegue casi al borde inferior del gel (45-60 min).
- 12.** Sacar el gel y sumergirlo en fijador⁴ durante 15 min, en un recipiente tapado (para evitar los vapores tóxicos del metanol), con agitación suave. Además de fijar, esta solución extrae una cierta proporción del SDS del gel, el cual interfiere con la tinción.
- 13.** Teñir el gel durante 1 hr con azul Coomassie R-250. Eliminar luego el exceso de colorante con varios cambios del decolorador. La decoloración es más rápida si se agrega al recipiente unos trocitos de esponja (tipo espuma de poliuretano) limpios, que actúan adsorbiendo el colorante.
- 14.** Registrar los resultados por fotografía. Si se desea guardar el gel por algunos meses, se puede dejar en ácido acético al 7% en cajas o bolsas de plástico selladas. El gel puede secarse sobre un papel filtro grueso, o entre trozos de celofán. Para esto se sumerge el gel durante la noche en 5% metanol con 3% glicerol, se monta sobre el papel filtro o celofán, con otra hoja de celofán encima, y se coloca en un secador de vacío durante 1-3 hr a 60°C. El secado de geles no está exento de riesgos, ya que pueden ocurrir rupturas que lo arruinen. A mayor concentración del gel, mayor es la dificultad para el secado, y viceversa. Si no se dispone de un secador, se puede emplear un vidrio con peso sobre el celofán para secar a temperatura ambiente, más lentamente.

⁴ Actualmente existen colorantes basados en sistemas completamente acuosos (ej. SafeBlue[®]) que no requieren fijadores ni decoloradores con alcoholes, muy convenientes. La decoloración se realiza con agua destilada.

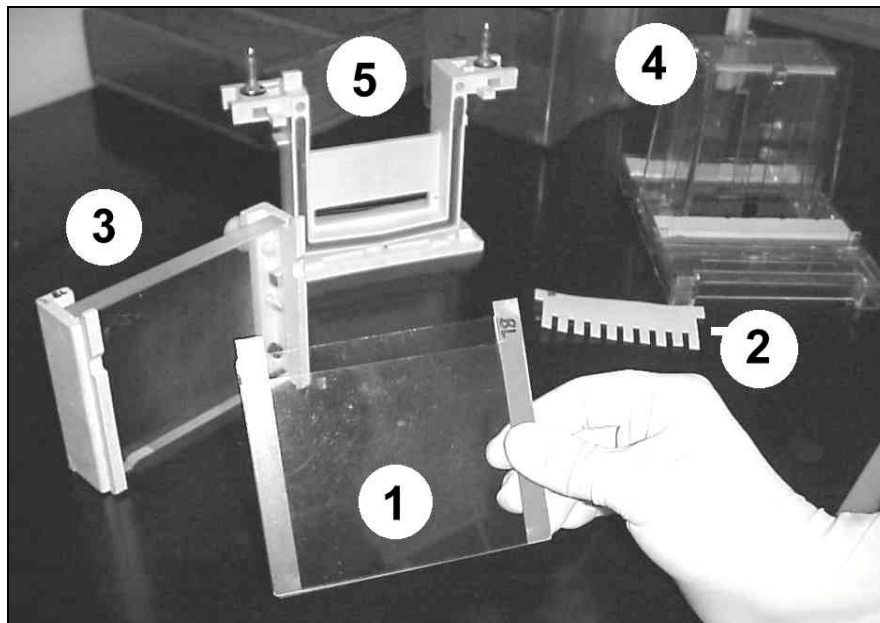


Figura 13.5: Preparación de un gel de poliacrilamida: partes. (1) vidrios separados por reglitas de teflón, que determinan el grosor del gel; (2) peine para formar los hoyos para muestras; (3) bloque de plástico para ensamblar los vidrios; (4) base para realizar el chorreo del gel; (5) núcleo de la cámara de electroforesis, con los electrodos.

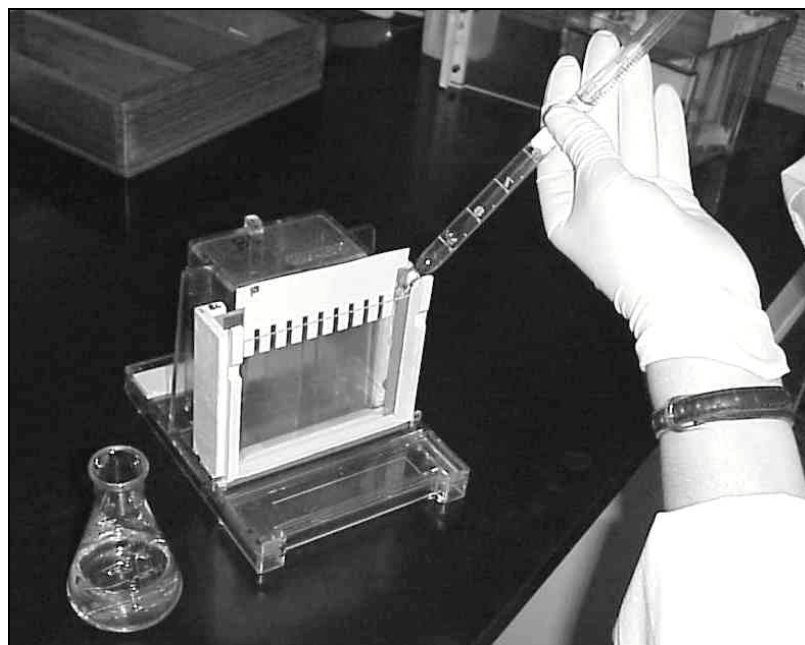


Figura 13.6: Polimerización del gel. Una vez ensambladas las piezas del molde, los componentes del gel se mezclan con los catalizadores e inmediatamente se vierten en el espacio entre los vidrios.

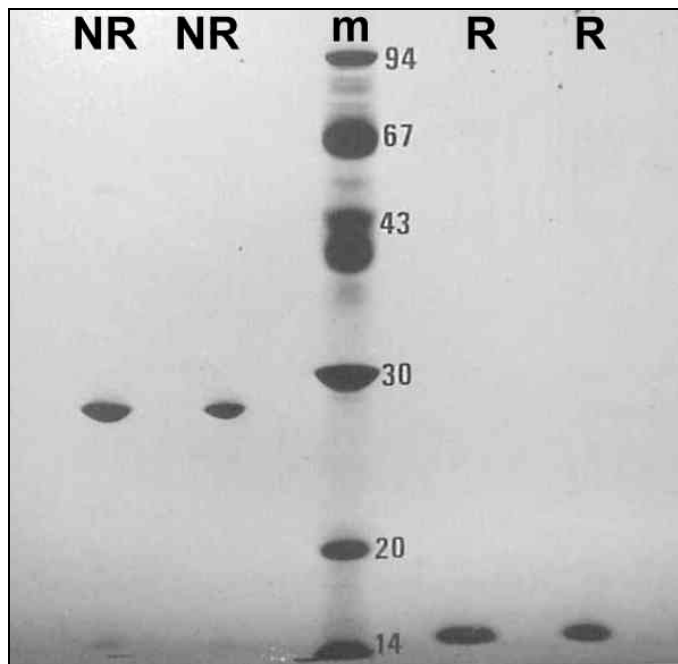


Figura 13.7: Análisis de la pureza y composición de subunidades de una proteína mediante SDS-PAGE. Los carriles rotulados NR y R corresponden a muestras de una lectina aislada del veneno de *Cerrophidion (Bothrops) godmani*, en condiciones no-reducidas y reducidas, respectivamente. El carril central (m) posee marcadores de peso molecular, cuya masa (kDa) se indica a la derecha. Se deduce que esta proteína es un dímero formado por subunidades de aproximadamente 14 kDa (Lomonte *et al.*, 1990).

Reactivos

Solución de monómeros de acrilamida:

29,2 g acrilamida; 0,8 g bis-acrilamida; disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml. Filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio, en refrigeración (<1 mes).

Amortiguador del gel separador (inferior):

18,15 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 8,8 con HCl, aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

Amortiguador del gel compactador (superior):

3,0 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 6,8 con HCl, aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10x):

12 g Tris; 57,6 g glicina; 4 g SDS; disolver en ~300 ml de agua. El pH debe quedar entre 8,3-8,4 si las pesadas son correctas (debe evitarse el ajuste del pH para no alterar la fuerza iónica de esta solución). Aforar a 400 ml. Guardar a temperatura ambiente. Diluir 10 veces al momento de utilizar.

Persulfato de amonio:

Preparar al momento una solución al 10%. Este reactivo es muy higroscópico (sellar bien el frasco y mantener en desecador). Una alternativa es preparar alícuotas (ej. 200 µl) en viales pequeños y congelarlas.

Solución de SDS:

1,0 g duodecilsulfato de sodio; disolver en 10 ml de agua. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente.

Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2x):

10,0 ml amortiguador del gel superior; 16,0 ml solución de SDS; 50 mg azul de bromofenol; 12,0 ml glicerol; 4,0 ml agua; mantener a temperatura ambiente (<2 meses).

Amortiguador de muestras reductor (solución concentrada 2x):

El mercaptoetanol es inestable en esta solución, por lo que se prepara una pequeña cantidad del reactivo para una semana. Agregar 0,2 ml de 2-mercaptoetanol a 4,2 ml del amortiguador no reductor. Guardar a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los agentes son 4% SDS y 5% 2-Me. El 2-Me es tóxico y de olor desagradable (usar en campana de extracción).

Fijador:

500 ml metanol; 70 ml ácido acético glacial; 430 ml agua; Guardar a temperatura ambiente en recipiente hermético. *Importante:* Evitar el contacto y la inhalación de vapores de metanol.

Colorante Coomassie Blue R-250:

0,25 g Coomassie blue R-250; 225 ml metanol; 46 ml ácido acético; 230 ml agua; disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua. Mezclar durante 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente. Aunque el colorante puede ser reusado varias veces para ciertos fines, la sensibilidad declina (usualmente es del orden de 0,5 µg de proteína), por lo que se prefiere usar una pequeña cantidad y descartarla cada vez. Otro tipo de Coomassie, el G-250, puede ser utilizado como colorante para geles, aunque su sensibilidad es menor.

Decolorador:

200 ml metanol; 100 ml etanol; 50 ml ácido acético; 650 ml agua; guardar a temperatura ambiente.

Capítulo 14

Immunoelctrotransferencia (*Western Blotting*)

Introducción

El uso de técnicas inmunológicas basadas en el marcaje de anticuerpos, especialmente con enzimas, tiene importancia fundamental en los laboratorios biomédicos. La técnica denominada originalmente en inglés *Western blotting*, es de gran utilidad en el análisis de mezclas antigénicas y sus interacciones con anticuerpos. Esta técnica combina una separación electroforética de los antígenos, su transferencia electroforética a un medio de soporte en forma de membrana u hoja, y finalmente, su inmunodetección a través del uso de anticuerpos marcados (u otras moléculas con capacidad de reconocimiento selectivo como lectinas, proteína A, proteína G, avidina, etc.). Estos métodos han recibido diversos nombres, tanto en la literatura en inglés (*Western blotting*, *immunoblotting*, *electroblotting*), como en español. En este resumen se utiliza como traducción el nombre de **immunoelctrotransferencia**, para señalar que el método combina una electrotransferencia con una inmunodetección.

Históricamente, el nombre original de "*Western*" surgió después de que un investigador de apellido Southern desarrolló una técnica para transferir ADN de geles a membranas, que se popularizó con el nombre de *Southern blotting*. Posteriormente surgieron métodos para la transferencia de ARN, que fueron denominados, por contraposición, como *Northern blotting*. Al surgir finalmente las técnicas basadas en la transferencia de proteínas, se originó el nombre de *Western blotting*. El método fue descrito simultáneamente por varios grupos de investigadores, aunque una de las referencias más citadas es la de Towbin *et al.* (1979). A pesar de que la técnica se puede realizar utilizando marcaje con radioisótopos, el uso de enzimas ha tenido la mayor aceptación. El empleo de enzimas o de isótopos confiere a estas técnicas una alta sensibilidad física para la detección de cantidades muy bajas de antígenos o de anticuerpos.

En sus inicios, la immunoelctrotransferencia no tuvo aplicaciones en el trabajo de rutina clínica. Sin embargo, en poco tiempo se difundió rápidamente en el campo hospitalario gracias a su introducción como un método de referencia para la detección de anticuerpos contra proteínas de los virus HIV, agentes etiológicos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

El poder de la immunoelctrotransferencia radica en que combina la alta resolución de las técnicas electroforéticas, con la posibilidad de evaluar la capacidad de unión de los componentes separados frente a distintas sondas biospecíficas, tales como anticuerpos, lectinas, etc. (**Figs.14.1** y **14.2**), con una alta sensibilidad. Además, cuando la técnica se realiza a partir de geles de SDS-PAGE, los resultados proveen información directa en cuanto al peso molecular de los antígenos que interaccionan.

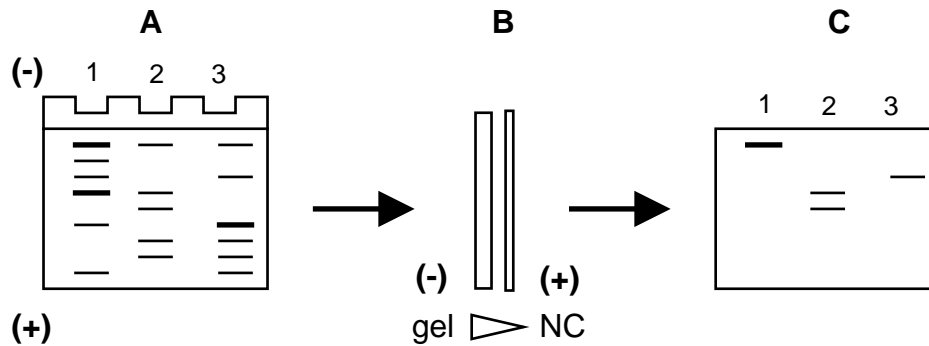


Figura 14.1: **Principio de la inmunoelectrotransferencia.** Se inicia con la separación electroforética de una mezcla de antígenos, por ejemplo mediante SDS-PAGE (A). Los componentes separados son transferidos del gel hacia una membrana de nitrocelulosa (NC) mediante un campo eléctrico (B), quedando inmobilizados sobre su superficie por uniones no-covalentes, probablemente hidrofóbicas. La membrana u hoja de nitrocelulosa es tratada finalmente con anticuerpos (u otras sondas bioespecíficas) acoplados a una enzima, para poder visualizar los componentes de interés.

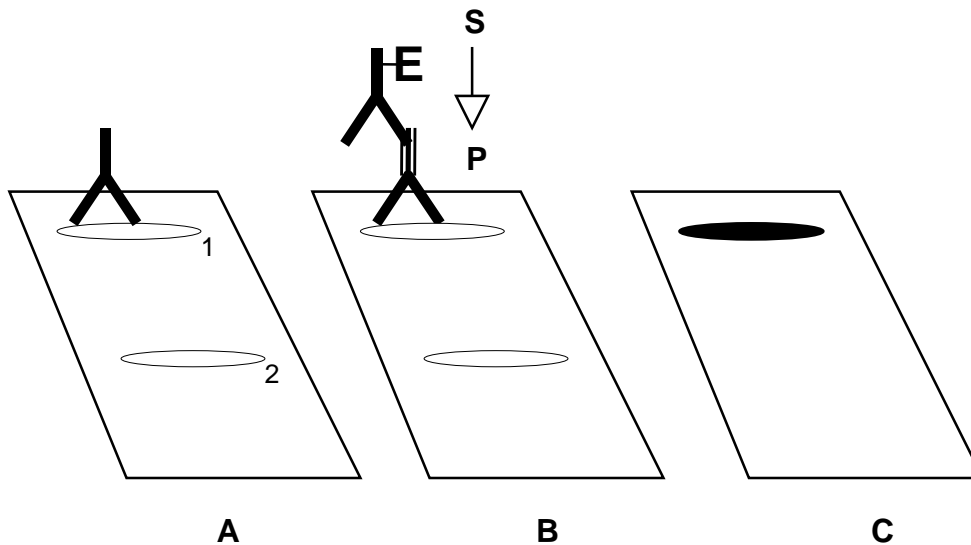


Figura 14.2: **Principio de la detección inmunoenzimática sobre membranas de nitrocelulosa.** Los componentes unidos a la nitrocelulosa son accesibles a la interacción con anticuerpos (u otras moléculas). En A, los anticuerpos reconocen al antígeno 1, pero no al antígeno 2. Después de lavar, en B, los anticuerpos unidos al antígeno son detectados mediante un conjugado anti-inmunoglobulina/enzima, que convierte el sustrato incoloro (S) en un producto (P) coloreado precipitable. La visualización final de dicha reacción se esquematiza en C.

Los pasos generales de una inmunoelectrotransferencia se resumen en el **Cuadro 14.1**. La separación electroforética más utilizada es la de poliacrilamida con duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), que separa las proteínas con base en su peso molecular (**Capítulo 13**). Sin embargo, también es posible utilizar una amplia gama de técnicas electroforéticas en combinación con transferencia (**Cuadro 14.2**).

Cuadro 14.1: Procedimiento general en las técnicas de inmunoelectrotransferencia.

-
- a. Separación electroforética de la mezcla de antígenos
 - b. Transferencia a nitrocelulosa (u otro tipo de membrana)
 - c. Bloqueo de sitios libres de la nitrocelulosa con una proteína irrelevante
 - d. Detección específica de antígenos o anticuerpos, mediante:
 - conjugados enzima-Acs
 - conjugados enzima-proteína A o proteína G
 - conjugados enzima-avidina
 - otros
 - e. Revelado de bandas con un cromógeno precipitable
-

Cuadro 14.2: Algunas técnicas de separación electroforética combinables con inmunoelectrotransferencia.

Técnica	Propiedad física en que se basa la separación
SDS-PAGE	peso molecular
PAGE (nativa)	peso molecular y carga, solo para proteínas ácidas
PAGE catódica (nativa)	peso molecular y carga, solo para proteínas básicas
Isoelectroenfoque	punto isoeléctrico
Electroforesis 2-D (IEF+SDS)	punto isoeléctrico (1ª dimensión), peso molecular (2ª)
Electroforesis 2-D (nativa)	carga (1ª dimensión), carga y peso molecular (2ª)

Para la interpretación de los resultados, es importante tomar en cuenta que los epitopos **conformacionales** (o discontinuos) de las proteínas son alterados por la acción del detergente SDS (**Capítulo 13**). Los anticuerpos dirigidos contra epitopos conformacionales, en ocasiones no pueden ser detectados cuando la inmunoelectrotransferencia se hace a partir de SDS-PAGE (aunque puede haber algún grado de renaturalización parcial de ciertas proteínas al pasar del gel a la nitrocelulosa). Esto es muy evidente cuando se utiliza un anticuerpo monoclonal contra un epitopo conformacional. En los sueros policlonales, sin embargo, hay muchos anticuerpos que reconocen epitopos lineales (continuos, secuenciales) del antígeno, por lo que prácticamente siempre dan una señal positiva, independientemente de la desnaturalización

causada por el SDS.

La inmunoelectrotransferencia, al igual que prácticamente todas las técnicas inmunoquímicas, puede ser utilizada para la detección de antígenos o de anticuerpos, según el interés. Por ejemplo, en las pruebas serológicas para diagnosticar la infección por HIV, se confirman las reacciones positivas obtenidas en las pruebas de tamizaje mediante ELISA (el cual utiliza una mezcla de antígenos del HIV para detectar los respectivos anticuerpos en los pacientes), mediante una inmunoelectrotransferencia. Para esto, se separan primero las proteínas virales mediante SDS-PAGE, y se transfieren a una hoja de nitrocelulosa, la cual se puede recortar en forma de cintas delgadas. El suero del individuo en estudio se incuba con una cintilla, para determinar si contiene anticuerpos contra uno o más componentes virales, detectados mediante el uso de conjugados anti-inmunoglobulina/enzima. La técnica tiene una alta sensibilidad física y una buena especificidad diagnóstica, y se utiliza como un método de referencia o confirmación en este campo.

Inmunoelectrotransferencia (Western blotting) a partir de SDS-PAGE

1. Una vez terminada la corrida electroforética (detalles en **Capítulo 13**), desconectar la fuente de poder. Sacar el gel y ensamblar el "cassette" de transferencia, colocando (a) la primera esponja; (b) dos hojas de papel filtro mojadas con amortiguador de transferencia; (c) el gel; (d) la nitrocelulosa, previamente hidratada por algunos minutos en el mismo amortiguador; (e) dos hojas de papel filtro; y (f) la otra esponja. Es fundamental que no se atrapen burbujas entre el gel y la nitrocelulosa, pues esto impediría la transferencia de las proteínas en esa área.
2. Colocar el "cassette" dentro de la cámara de transferencia, con la nitrocelulosa¹ (NC) hacia el ánodo. Introducir el bloque de enfriamiento y una barra magnética en la cámara. Colocar sobre un agitador magnético a baja velocidad, y encender la fuente de poder, transfiriendo las proteínas a 150 mA durante 2 hr.
3. Apagar la fuente de poder, sacar el gel transferido y teñirlo con Coomassie R-250, para evaluar la eficiencia del proceso, comprobando que queda poca proteína en el gel (note que las proteínas de mayor masa molecular tienen mayor dificultad en transferirse).
4. Sacar la hoja de NC y pre-teñirla con negro de almidón diluido 1:100 en amortiguador Tris 0,02 M pH 7,5. Colocar en un agitador durante 15 min. Decolorar con varios cambios de agua destilada y marcar sobre la NC la posición de los estándares de PM (y cualquier otro punto de referencia útil) con una aguja, antes de que se decoloren.

¹ Nota: manipular la membrana de nitrocelulosa con guantes limpios o con pinzas de punta plana, no directamente con las manos.

Eliminar aquellas porciones de la NC que muestren distorsiones, burbujas, u otras zonas indeseables, si estas llegaran a producirse. El colorante azul se desvanecerá gradualmente durante el resto del proceso.

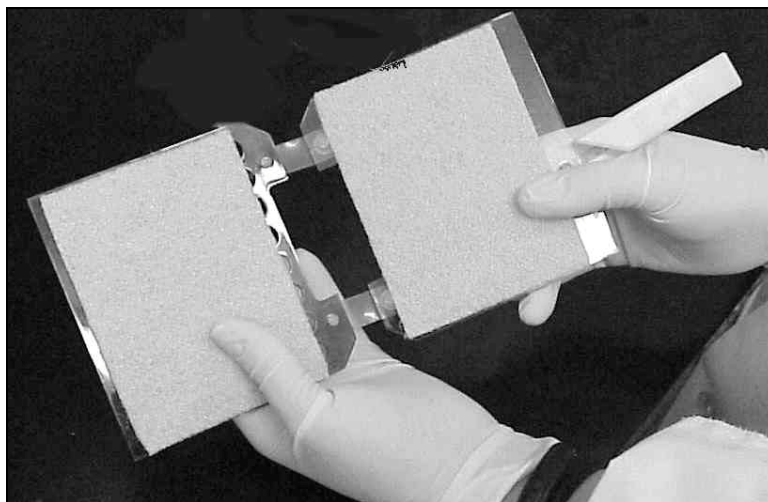


Figura 14.3: *Cassette* de electrotransferencia, donde se colocan el gel y la nitrocelulosa entre hojas de papel filtro y esponjas. Una vez ensamblado el "sandwich", el *cassette* se cierra convenientemente con la prensa que se observa a la derecha.

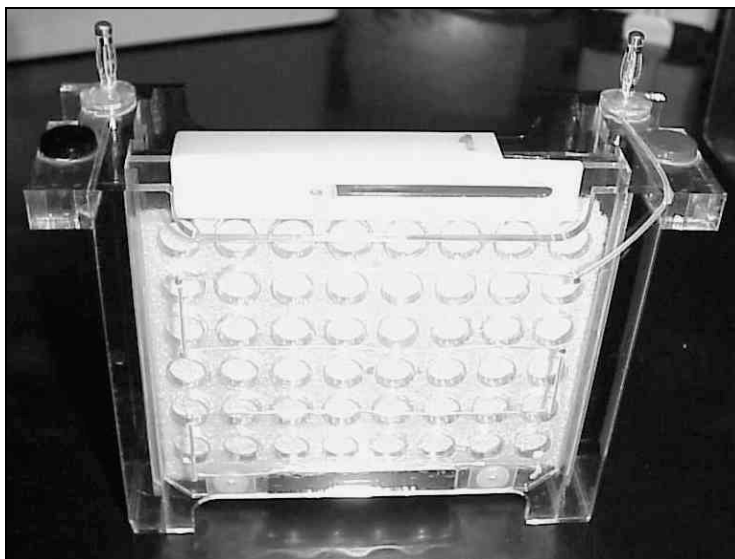


Figura 14.4: **Bloque de electrotransferencia**, donde se colocan 1 o 2 cassettes ensamblados, observando cuidadosamente la orientación final de los electrodos (+) y (-) a los lados.

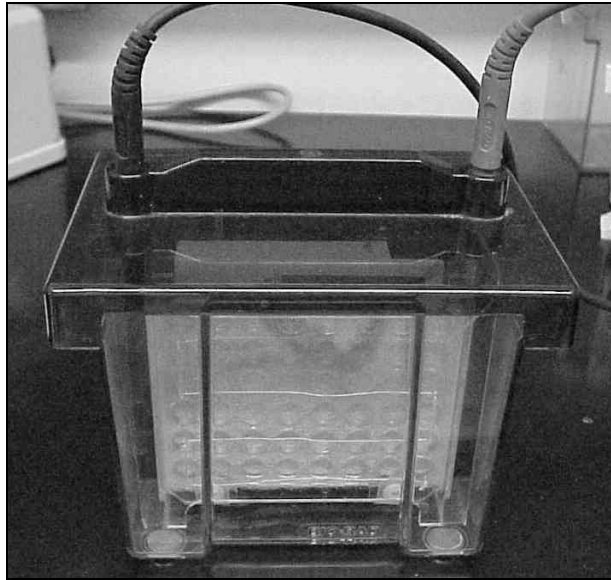


Figura 14.5: Cámara de electrotransferencia con la tapa y electrodos conectados.

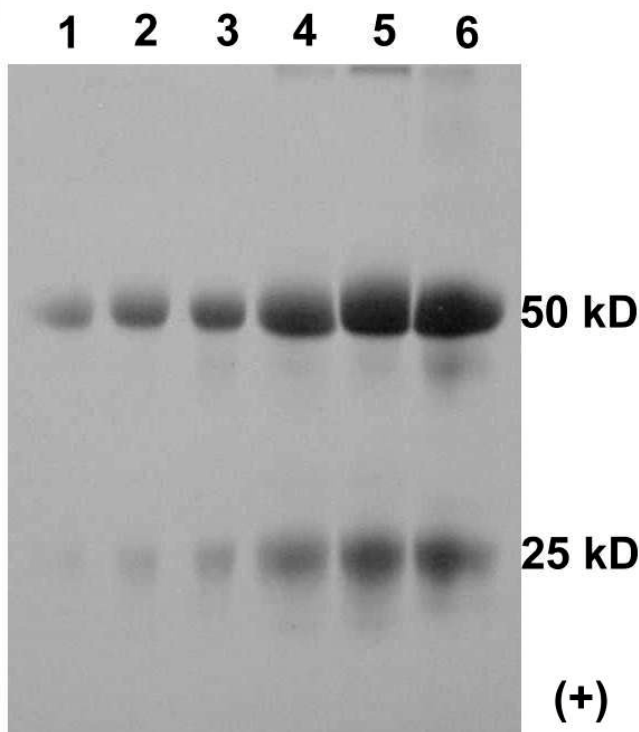


Figura 14.6: Electroinmunotransferencia (Western blotting): revelado. En este ejemplo, se quería determinar si un conjugado comercial anti-IgG humana, marcado con peroxidasa, era específico para la IgG (anti-gama) o si reconocería a todas las inmunoglobulinas (anti-gama + anti-cadenas livianas), ya que dicha información no estaba disponible en el frasco. Para esto, se tomó cantidades variables de una preparación purificada de IgG humana, reducida con 2-mercaptoetanol (carriles 1-6) y se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, con SDS. El gel se transfirió luego a nitrocelulosa, y después de saturar la membrana con albúmina bovina, se incubó con el conjugado en estudio. El revelado final de la peroxidasa con H_2O_2 y cloronaftol resultó en la aparición del patrón de coloración mostrado. Se deduce que el conjugado anti-IgG humana posee anticuerpos no solo contra la cadena

pesada gama (50 kD), sino también contra las cadenas livianas (25 kD). Es decir, el conjugado es un anti-inmunoglobulinas totales, y no un anti-IgG selectivo.

5. Bloquear los sitios libres de la NC, sumergiéndola en la solución de proteína bloqueadora durante por lo menos 30 min, con agitación suave.

6. Agregar los componentes del sistema de detección, según cada finalidad particular:

(a) **si la finalidad es** detectar anticuerpos contra una mezcla de antígenos, agregar una dilución apropiada del suero en estudio, en solución de lavados con 0,2% de proteína, e incubar por 1-4 hr, con agitación suave (el tiempo se optimiza según cada sistema). La dilución apropiada para los sueros se determina mediante pruebas preliminares, generalmente a partir de 1:100, escogiéndose alguna que permita detectar tanto sueros débiles como fuertes, con un mínimo de tinción de fondo ("*background*").

(a') lavar (4x5 min) el material no unido con la solución de lavados, en el agitador.

(a'') agregar el conjugado anti-inmunoglobulina/enzima correspondiente (ej. anti-Ig humana, para sueros humanos), en dilución apropiada, durante 1-2 hr, con agitación. La dilución óptima del conjugado depende de su potencia y se determina previamente, escogiéndose aquella que proporcione la mejor señal con la menor tinción de fondo posible. Cuando se desea detectar IgG, también es posible utilizar conjugados de proteína A/enzima o proteína G/enzima. Otros isotipos y subclases se pueden detectar con los conjugados monoespecíficos correspondientes.

(a''') lavar (4x5 min) el material no unido, y revelar con un sustrato precipitable para la enzima utilizada. El uso de controles negativos (i.e. suero negativo, ausencia de suero) y positivos, revelados en paralelo, es indispensable.

(b) **si la finalidad es** la detección directa de antígenos sobre la NC, agregar una dilución apropiada de los anticuerpos correspondientes, ya sea directamente conjugados a una enzima (para proseguir con el revelado), o alternativamente, seguidos de una segunda capa de conjugado anti-inmunoglobulina/enzima, y del revelado. Los pasos de incubación, lavado, etc. son similares a los arriba descritos (a''').

7. Revelar la membrana de NC con la solución de sustrato precipitable correspondiente a la enzima utilizada. La reacción puede detenerse descartando la solución de sustrato y lavando la membrana con abundante agua destilada.

8. Estimar el peso molecular (PM) de las bandas que dieron una reacción positiva, interpolando en la curva de referencia de los marcadores (**Capítulo 13**). *Nota:* el uso de marcadores comerciales "pre-teñidos", que son visibles directamente sobre la NC, facilita la determinación del PM de los antígenos.

Dot-blotting

La técnica conocida en inglés como "*dot-blotting*" puede considerarse como una variante de un ELISA, pero realizada sobre una membrana de nitrocelulosa, con los mismos procedimientos de detección utilizados en una inmunoelectrotransferencia o "*Western blotting*". En similitud con dichas técnicas, en el *dot-blotting* también se une a los antígenos sobre una membrana de nitrocelulosa, pero su diferencia radica en que no se realiza ninguna etapa de separación electroforética previa a la inmunodetección. Más bien, el antígeno o mezcla antigénica se aplica directamente sobre la NC, en forma de mancha o punto (de allí el nombre de "*dot*") (**Fig. 14.7**).

La aplicación de las muestras sobre la NC puede ser manual, simplemente pipeteando un pequeño volumen (1-3 μ l) sobre la membrana, dejando que las proteínas queden unidas en unos minutos. También puede utilizarse sistemas de filtración, cuando se quiere adherir proteínas diluídas, en volúmenes mayores (ej. 100-300 μ l). Para esto, se coloca la membrana dentro de un molde acrílico en formato de 96 hoyos, y se utiliza una bomba de vacío para hacer pasar las muestras a través de la NC, descartando el solvente que atraviesa la membrana y dejando unidas a las proteínas sobre la superficie de filtración. La membrana es posteriormente retirada del aditamento de filtración, para proseguir con los pasos de inmunodetección deseados.

Los procedimientos para la inmunodetección en el *dot-blotting* son idénticos a los descritos en la inmunoelectrotransferencia. Obsérvese que el *dot-blotting* puede ser un método muy conveniente de tamizaje preliminar de muestras, antes de realizar un análisis más detallado de una mezcla antigénica mediante *Western blotting*. También puede explotarse esta técnica para tamizar sueros por la presencia de determinados anticuerpos, para fines de apoyo diagnóstico (**Fig.14.8**).

Reactivos

Amortiguador para electrotransferencia (geles con SDS):

29,6 g glicina; 6 g Tris; 400 ml metanol; ajustar pH a 8,3 y aforar a 2000 ml; mantener en refrigeración.

Amidoblack para pre-tinción no-desnaturalizante de proteínas en NC (solución 100x):

0,5 g negro de almidón; 50 ml ácido acético glacial; 225 ml metanol; 225 ml agua destilada; diluir 1:100 al momento de usar con el amortiguador Tris 0,02 M, pH 7,5.

Solución de proteína para bloquear NC:

Albumina bovina 1% y caseína 1%, en PBS pH 7,2; no utilizar azida de sodio (inhibe la peroxidasa). Para algunos procedimientos se puede agregar Tween-20 al 0,05%, sin embargo en ciertos sistemas puede causar el desprendimiento de proteínas de la NC (Hoffman y Jump, 1986).

Solución de lavados con proteína:

Diluir 1:10 la solución anterior (proteína bloqueadora) con PBS, para obtener 0,2% de proteína final.

Amortiguador Tris 0,02 M, pH 7,5:

4,8 g Tris; 58,5 g NaCl; disolver, ajustar pH y aforar a 2 litros.

Sustrato precipitable para peroxidasa:

Para 60 ml, disolver 30 mg de 4-Cl-1-naftol en 10 ml de metanol (proteger de la luz). Al momento, agregar 50 ml del amortiguador Tris pH 7,5 y 25 μ l de peróxido de hidrógeno concentrado (35%).

Sustrato precipitable para fosfatasa alcalina:

(1).solución madre Tris 2,0 M pH 9,0:

24,22 g Tris; disolver, ajustar pH con HCl y aforar a 100 ml.

(2).solución de trabajo:

10 ml de solución madre Tris; 11,7 g NaCl; 1 ml $MgCl_2$ 1M; aforar a 200 ml.

(3).solución A:

2,5 mg BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) disueltos en 50 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) y luego diluídos con 1 ml de la solución de trabajo.

(4).solución B:

3 mg NBT (nitroblue tetrazolium) disueltos en 1 ml de metanol.

(5).Proteger todo de la luz, mezlar A + B + 18 ml de solución de trabajo y agregar a la NC.

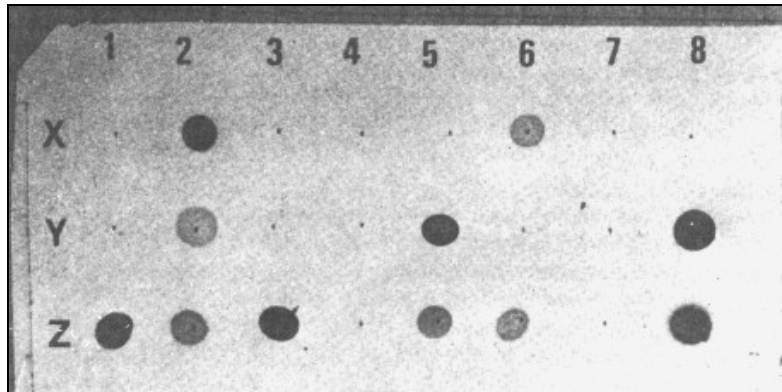


Figura 14.7: **Dot-blotting**: para determinar si los venenos de diversas especies de serpientes contienen toxinas antigénicamente relacionadas con las miotoxinas de *Bothrops asper* de Costa Rica, se colocaron muestras de 2 μ l (5 mg/ml) sobre la membrana y se adicionó anticuerpos de conejo producidos contra dichas miotoxinas. Los anticuerpos unidos se detectaron con un conjugado proteína A-peroxidasa, revelando con cloronaftol y peróxido de hidrógeno. Las muestras corresponden a: X1: *Bothrops castelnaudi*; X2: *B. colombiensis*; X3: *B. barnetti*; X4: *Micrurus nigrocinctus*; X5: *Naja naja atra*; X6: *B. pictus*; X7: *Naja naja kaouthia*; X8: *Lachesis muta*; Y1, *M. surinamensis*; Y2: *M. alleni*; Y3: *Echis carinatus*; Y4: *Notechis scutatus*; Y5 *B. bilineatus*; Y6: *Loxosceles laeta* (araña); Y7: *Vipera russelli*; Y8: *B. xanthogramma*; Z1: *B. atrox* (Ecuador); Z2: *B. atrox* (Perú); Z3: *B. brazillii*; Z4: *M. frontalis*; Z5: *Trimeresurus flavoviridis*; Z6: *Crotalus atrox*; Z7: *M. carinicauda*; Z8: *B. asper* (Costa Rica) (control positivo). Ref: Lomonte *et al.* (1990).

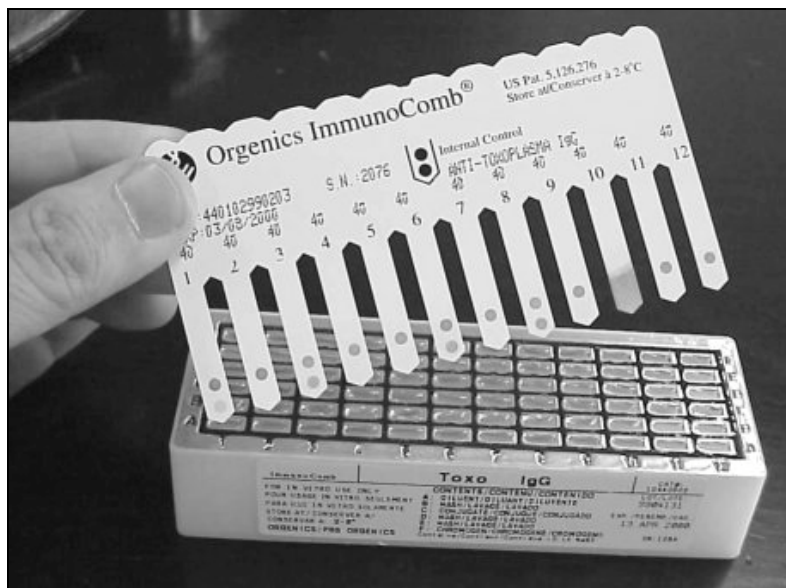


Figura 14.8: **Aplicación comercial del "dot-blotting"** en la detección cualitativa de anticuerpos IgG séricos contra antígenos de *Toxoplasma*, un protozooario parásito de importancia médica. El peine tiene adheridas las proteínas del agente infeccioso, a las cuales se unen los posibles anticuerpos de las muestras de suero. Los lavados se llevan a cabo en el bloque de plástico inferior, y la detección final de los anticuerpos se logra con un conjugado anti-inmunoglobulina G humana/peroxidasa.

Capítulo 15

Hibridomas y Anticuerpos Monoclonales

Introducción

Cuando un antígeno estimula al sistema inmune específico, los mecanismos de respuesta involucran siempre la participación de un cierto número de clones de linfocitos T y B distintos, es decir, la respuesta es naturalmente **policlonal**. Por tal razón, los antisueros convencionales contra un antígeno purificado, o incluso contra pequeñas porciones de este, siempre van a contener una mezcla de anticuerpos policlonales, cuyas características de isotipo, afinidad y especificidad no son constantes. El poder contar con la disponibilidad de un determinado anticuerpo único, en donde todas las moléculas del mismo sean absolutamente idénticas en su estructura y, por ende, en sus propiedades, había sido una meta dorada de la inmunología, perseguida durante muchos años. La solución a este problema fue obtenida gracias al trabajo de C. Milstein y G. Köhler, quienes publicaron en 1975 un método que permitía, por primera vez, obtener anticuerpos provenientes de un solo clon de linfocitos B: los **anticuerpos monoclonales** (Köhler y Milstein, 1975, 1976). Esta tecnología, basada en la generación de células híbridas -producto de la fusión entre un linfocito B y una célula tumoral de mieloma-, tuvo un impacto profundo en todas las ciencias biomédicas. El valor de este aporte fue reconocido al otorgársele el Premio Nobel de Fisiología y Medicina, en 1980, a Köhler y Milstein, junto con Niels K. Jerne, uno de los pioneros de la teoría de la selección clonal en las respuestas inmunes.

El fundamento del método para obtener anticuerpos monoclonales (AcM) mediante la **tecnología de hibridomas** radica en fusionar un linfocito B (que aporta la información codificante para el anticuerpo) con una célula de mieloma (célula plasmática cancerosa que aporta la capacidad de multiplicación y crecimiento ilimitado), para obtener un híbrido celular con las características deseadas: síntesis y secreción de un anticuerpo y crecimiento perpetuo (**Fig.15.1**). Las diversas líneas celulares de mieloma utilizadas en este método deben reunir al menos dos características especiales: la primera es haber perdido la capacidad de secretar inmunoglobulina propia (Ig^{-neg}), con el fin de no aportar esta información genética adicional al hibridoma resultante, y que el mismo produzca solo la Ig codificada por el linfocito B fusionado; y la segunda, es carecer de alguna de dos enzimas requeridas para el crecimiento en un medio de cultivo **selectivo** denominado HAT. Las enzimas en cuestión son la hipoxantina-guanosina fosforibosil-transferasa (HGPRT) y la timidina kinasa (TK). Por tanto, las células de mieloma utilizadas deben tener la propiedad de ser $HGPRT^{-neg}$ o TK^{-neg} .

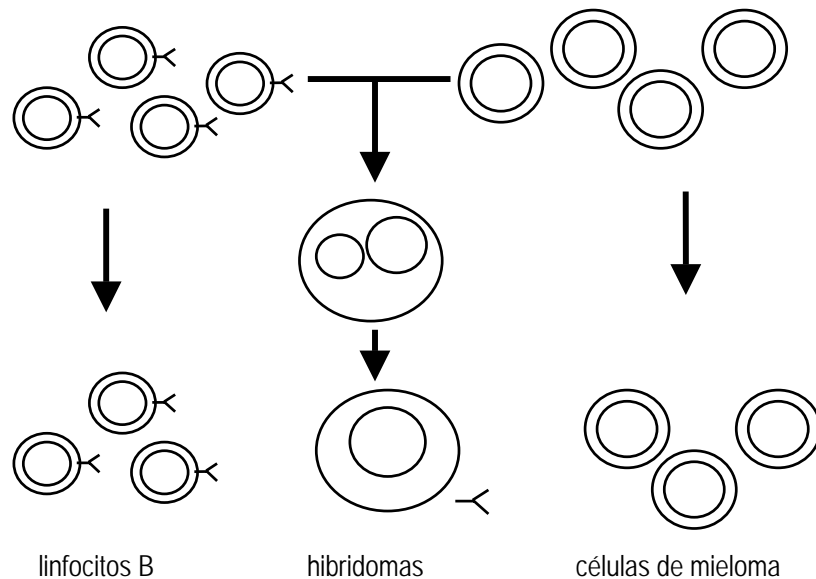


Figura 15.1: Fusión de linfocitos B con células de mieloma para la obtención de hibridomas. Un hibridoma contiene el material genético de los núcleos de ambas células fusionadas. Para seleccionar a las células híbridas y deshacerse de las células de mieloma que no se fusionaron, se utiliza el medio selectivo HAT, en donde el mieloma HGPRT^{-neg} (o TK^{-neg}) no puede sintetizar ácidos nucleicos y muere. Los linfocitos B normales mueren espontáneamente después de algunos días en cultivo.

El medio selectivo HAT contiene hipoxantina, aminopterina (o ametopterina) y timidina. La aminopterina actúa como inhibidor de la vía principal de síntesis de ácidos nucleicos. Esto obliga a las células a utilizar una ruta alterna, que utiliza la hipoxantina y la timidina como precursores, y que requiere de las enzimas HGPRT y TK. Dado que las células de mieloma son deficientes en alguna de estas enzimas, no sobreviven en el HAT.

Pasos de la técnica para generar hibridomas murinos

La técnica más difundida para la preparación de hibridomas utiliza células de ratón (murinas). También se han producido numerosos AcM con células de rata. Las técnicas clásicas que se describen en este capítulo no han sido tan exitosas para la generación de AcM humanos (aunque existen algunos hibridomas de este tipo) en comparación con los AcM murinos. De hecho, otras estrategias han servido para la obtención de AcM humanos, tales como las técnicas de transformación de linfocitos B mediante infección *in vitro* por el virus Epstein-Barr, y más recientemente, los métodos de manipulación directa de ADN.

El primer requisito para la obtención de uno o varios AcM contra un antígeno dado es que este sea capaz de estimular una respuesta inmune humoral en el animal utilizado, ya que dependemos de la activación del mayor número de linfocitos B con especificidad para

el antígeno de interés. A mayor inmunogenicidad, mayor expansión clonal, y mayor probabilidad de hallar hibridomas con la especificidad deseada después de una fusión celular. Sin embargo, acá se destaca una de las características más ventajosas de la tecnología de hibridomas: no se requiere que el antígeno esté altamente purificado para lograr nuestro objetivo. Dado que la técnica culmina con la obtención de anticuerpos derivados de células únicas (**clones**), no importa si la inmunización despertó una respuesta contra posibles contaminantes de la preparación de antígeno (ver **Capítulo 1**). En el caso de antígenos de muy difícil purificación, los AcM se han constituido en una alternativa fundamental para tener un reactivo inmunológico específico.

Los principales pasos del método se esquematizan en la **Fig.15.2**. Inicialmente, se inmunizan ratones **singénicos**, por ejemplo de la cepa BALB/c, con el antígeno de interés (o al menos una preparación enriquecida con el antígeno), y al cabo de algunas semanas, se sacrifica un animal para obtener una suspensión de sus linfocitos esplénicos. Estas células se mezclan con las células de mieloma¹, previamente cultivadas en el laboratorio, en presencia de un agente que promueve la fusión de las membranas celulares: el polietilén-glicol (PEG). De esta mezcla se obtiene un número variable de híbridos celulares, al azar. Las células se siembran (distribuyéndolas en varias placas de 96 hoyos) en el medio selectivo HAT, para que sobrevivan solo los hibridomas, los cuales empiezan a proliferar rápidamente (sus tiempos de generación son de 12-16 hr).

El siguiente paso consiste en probar los sobrenadantes de los cultivos que están proliferando, mediante alguna técnica inmunológica sensible, que nos permita determinar si el medio contiene el anticuerpo deseado. Una de las opciones más versátiles es el ELISA, aunque esto depende de los fines particulares del AcM buscado y de la naturaleza del antígeno (ej. si es una proteína de membrana celular, o soluble, etc.). Una vez identificados los cultivos que contienen posibles anticuerpos de interés, se procede a separar las células en nuevos cultivos que provienen de una sola célula progenitora (**clonación**). Para esto se utilizan diversas estrategias, tales como la clonación por dilución limitante y otras. De esta forma, se llega a obtener un cultivo monoclonal del hibridoma de interés, cuyas células se pueden conservar por congelación en nitrógeno líquido (-196°C), para producir su respectivo AcM cada vez que se necesite.

Producción del anticuerpo monoclonal

La producción del AcM a partir de las células de hibridoma se puede realizar mediante dos estrategias generales. *In vitro*, es posible utilizar cultivos masivos, en donde se puede generar cantidades considerables del AcM, que van desde concentraciones de µg/ml hasta mg/ml de medio de cultivo. Esta opción es más costosa, debido a los requerimientos del cultivo celular masivo en cuanto a equipo, medios y suplementos. Sin embargo, proporciona material más fácil de purificar y evita la utilización de animales. Otra opción es la producción *in vivo*, en donde las células de hibridoma son inyectadas en

¹ Las líneas de mieloma aptas para estos métodos se obtienen comercialmente o a través de la colaboración entre laboratorios.

la cavidad peritoneal de ratones singénicos con respecto a la cepa que originó a los linfocitos B y al mieloma. Las células del hibridoma proliferan rápidamente en el ratón y causan un tumor ascítico, del cual se puede obtener volúmenes relativamente grandes de fluido, que contiene altas concentraciones del AcM (~mg/ml). El fluido ascítico contiene un mayor número y variedad de proteínas contaminantes, en comparación con el uso de medios de cultivo de composición definida *in vitro*, haciéndose necesario purificar el AcM mediante diversas técnicas. Por otra parte, la producción *in vivo* involucra la utilización y sacrificio de animales, a los cuales vamos a inducir un tumor, por lo que ha recibido cuestionamientos desde el punto de vista de la ética del trabajo con animales de experimentación. Las normas vigentes en muchos países exigen que esta opción se reduzca al mínimo posible, solo para casos plenamente justificados.

Una vez producido un AcM, es importante determinar su isotipo (pues de esto van a depender muchas de sus propiedades), empleando antisueros que reconocen las distintas clases y subclases de cadenas pesadas, mediante técnicas como la doble inmunodifusión en gel (**Capítulo 6**) o el ELISA (**Capítulo 10**). Igualmente, es necesario determinar cuál es su especificidad para la molécula antigénica de interés bajo distintas condiciones, evaluar sus posibles reacciones cruzadas, y en ocasiones, se llega a determinar su especificidad molecular fina a nivel del epitopo reconocido (esto es posible sobretodo cuando el epitopo es secuencial, probando la capacidad de unión del AcM frente a una colección de péptidos sintéticos traslapados que representan secuencias parciales de la proteína).

Características de los anticuerpos monoclonales

Las ventajas de los anticuerpos monoclonales (con respecto a las preparaciones policlonales convencionales) radican en su propiedad de ser moléculas únicas e idénticas entre sí. Cada AcM va a tener una especificidad y afinidad **constantes**, reproducibles de lote a lote. El hecho de reconocer solamente un epitopo, disminuye notablemente la probabilidad de obtener reacciones cruzadas con otros antígenos. Sin embargo debe enfatizarse que un AcM, por el solo hecho de ser monoclonal, no está exento de la posibilidad de dar reacciones cruzadas con otros antígenos distintos al homólogo. Ello va a depender de la presencia del epitopo reconocido por él, o de estructuras suficientemente similares, en otras moléculas. Dado que todas las moléculas de una preparación dada de un AcM son idénticas, su estandarización es mucho más fácil que la de los reactivos policlonales, en donde la relación proteína/actividad puede variar considerablemente entre las distintas preparaciones o lotes de un producto.

El desempeño de los AcM en las distintas técnicas inmunológicas es muy bueno, cuando se han seleccionado los anticuerpos óptimos en especificidad, afinidad e isotipo para un fin particular. Ello ha permitido importantes avances en métodos como los ensayos inmunoenzimáticos, técnicas radioinmunes, inmunofluorescentes, y de aglutinación.

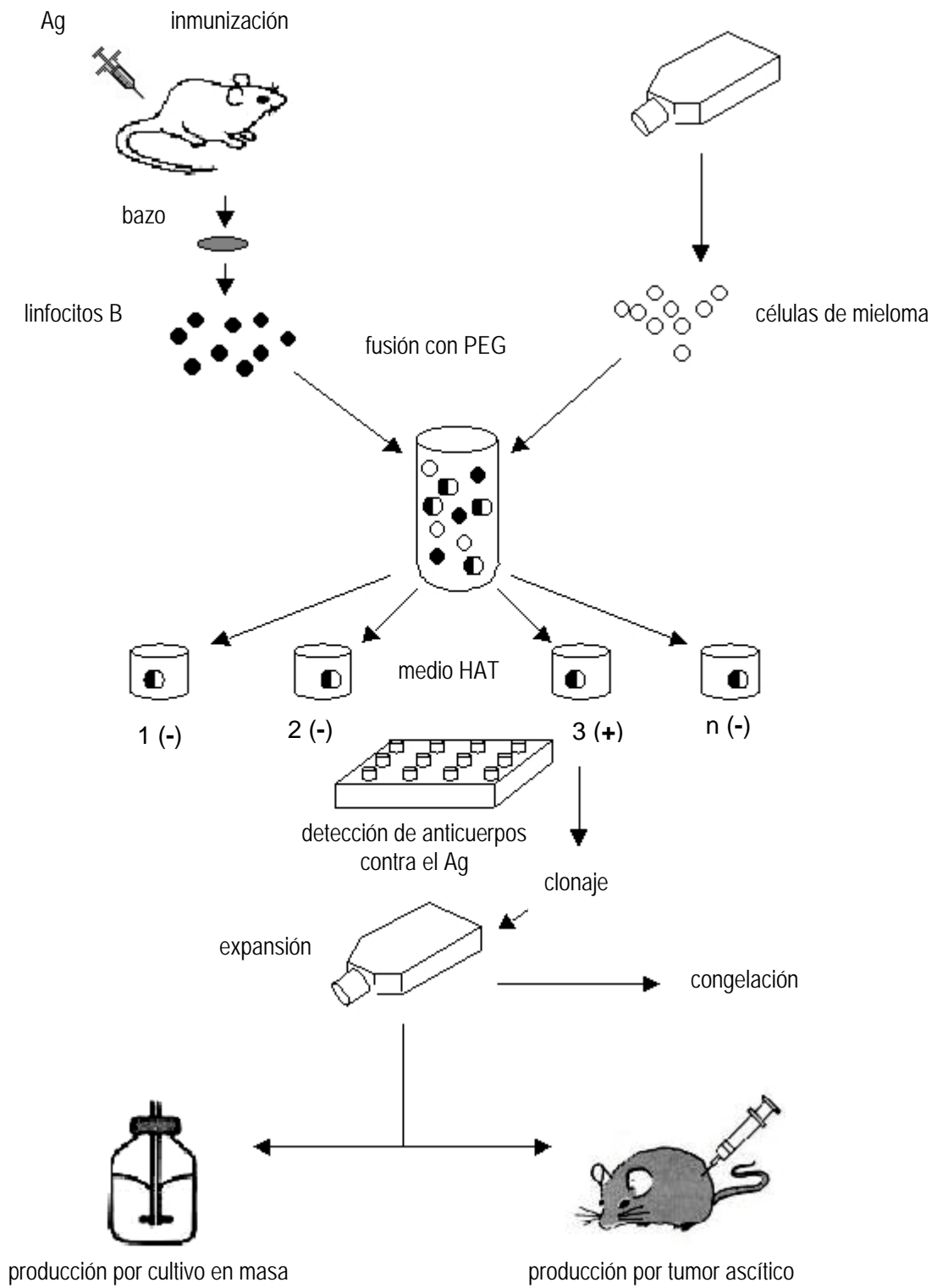


Figura 15.2: Pasos para la generación de un anticuerpo monoclonal murino mediante la tecnología de hibridomas.

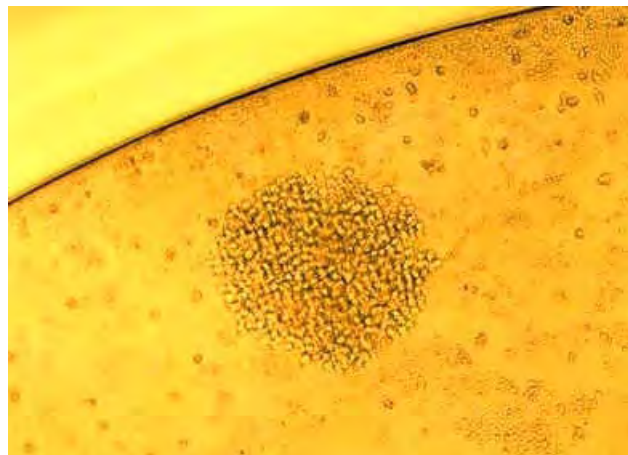
Una característica desventajosa de los AcM se encuentra en las técnicas clásicas basadas en la precipitación, dado que al reconocer un solo epitopo de un antígeno, estos anticuerpos no logran formar complejos multimoleculares adecuados (a menos de que se trate de antígenos que posean repeticiones del epitopo en cuestión -y simultáneamente accesibles- en dos o más sitios). En general, se reconoce que los anticuerpos policlonales superan ampliamente a los AcM en técnicas de inmunoprecipitación.

En las aglutinaciones, a pesar de que son técnicas igualmente dependientes de la formación de agregados múltiples de partículas, los AcM se desempeñan eficientemente, dado que normalmente el antígeno (o epitopo) reconocido va a estar disponible repetidamente sobre la superficie de las partículas. La Fig.15.3 muestra una aglutinación de eritrocitos humanos mediante algunos AcM. De hecho, los reactivos basados en AcM han desplazado gradualmente a los antiseros policlonales en los bancos de sangre, en la determinación de los distintos grupos sanguíneos, mediante técnicas de aglutinación.



Figura 15.3: Aglutinación en lámina de eritrocitos humanos grupo A mediante dos distintos anticuerpos monoclonales. Izquierda: un AcM anti-A comercial, utilizado en bancos de sangre. Derecha: un AcM anti-A preparado en el Instituto Clodomiro Picado (clon HB1D3A12). Ref: Lomonte *et al.*, datos sin publicar.

Figura 15.4: Aspecto microscópico de una colonia de células de hibridoma, observada con bajo aumento (10x). Aunque es probable que todas las células de la colonia provengan de una sola célula híbrida inicial, esto debe garantizarse realizando pasos de clonaje, como se describe en el texto.



Generación de hibridomas murinos

Existe una gran diversidad de métodos y detalles técnicos para la generación de hibridomas, según las preferencias de cada laboratorio y cada investigador. A continuación se proporcionan los lineamientos generales de la técnica empleada en nuestra experiencia.

Mantenimiento del mieloma NS-1

Preparar las células de mieloma ~2 semanas antes de la fusión celular, a partir de un vial almacenado en nitrógeno líquido (debe evitarse mantenerlas en cultivo durante períodos prolongados). Descongelar un vial de células NS-1 y expandir hasta tener por lo menos 3 platos P-100 o 3 botellas de 25 cm². Nunca dejar que la densidad pase de 1x10⁶ cél/ml (puede disminuir la capacidad de fusión). Utilizar densidades iniciales de 1-3x10⁴ cél/ml en medio DME completo + 20% SFB y vigilar de cerca el crecimiento, densidad y morfología, hasta el momento de la fusión. Unos 3-4 días antes de la fusión se debe agregar 6-tioguanina al medio para eliminar posibles células con reversión en la deficiencia de HGPRT.

Fusión celular

- 1.El día de la fusión, comenzar por cosechar y preparar las NS-1. Recoger las células y lavarlas en medio DME base. Obtener 1x10⁷ cél en un tubo de 50 ml y colocarlas en la incubadora, mientras se obtienen los linfocitos esplénicos.
- 2.Preparar el PEG (1,2 ml) en un tubo estéril, a 37°C.
- 3.Sacrificar el ratón y remover asépticamente el bazo, colocándolo en un plato P-100 con 4 ml de DME base. Eliminar la mayor cantidad de tejido conectivo y grasa con instrumentos estériles. Transferir el bazo a una malla metálica estéril, y desmenuzar todo el tejido con un émbolo estéril, enjuagando con DME. Recoger las células y filtrarlas por un embudo con gasa estéril, recogiénolas en un tubo de 50 ml. El rendimiento promedio de esplenocitos de un bazo es del orden de 10⁸ células.
- 4.Centrifugar el tubo con NS-1 y el tubo con los linfocitos esplénicos. Resuspender en 10,5 ml de DME sin suero cada tubo.
- 5.Mezclar en un tubo rotulado "fusión" 10 ml de NS-1 + 10 ml de linfocitos. El sobrante (0,5 ml) de los tubos anteriores se utiliza para sembrar controles posteriormente.
- 6.Centrifugar el tubo "fusión". Decantar el sobrenadante y resuspender el botón con suavidad.

7. Agregar 1 ml del PEG tibio en un tiempo de 1 min, rotando lentamente el tubo en posición casi horizontal. Tratar de que no queden agregados grandes (si es así, deshacerlos mecánicamente o con pipeta Pasteur, con suavidad). Esperar 1 min a TA.
8. Agregar 1 ml de medio HT, igual que como se agregó el PEG, en un tiempo de 1 min. Cargar 2 ml más de HT y agregarlos en 2 min, siempre con rotación. Esperar 2 min. Agregar 4 ml en 1 min y esperar 4 min. Finalmente, agregar 8 ml en 1 min. La velocidad de rotación debe aumentar conforme se progresa en la dilución.
9. Centrifugar el tubo y decantar. Resuspender con suavidad (los híbridos son muy frágiles en este punto). Resuspender el botón con 15 ml de medio HT y colocar en un P-100 en la incubadora por 1-2 hr.
10. Cosechar cuidadosamente del P-100 en un tubo de 50 ml. Centrifugar y decantar. Resuspender suavemente con medio HAT y llevar al volumen apropiado para el número de placas a cultivar (20 ml/placa). Utilizar unas 4-5 placas de 96 hoyos por cada fusión, sembrando 200 μ l/hoyo de la suspensión celular, con pipeta multicanal y un canal estéril. Sembrar algunas hileras de hoyos con NS-1, como control del HAT. Dejar en reposo en la incubadora durante 6 días.

Post-fusión

1. El día 6, leer todas las placas y anotar las posiciones con crecimiento de colonias de hibridomas (**Fig.15.4**).
2. Si hay placas con contaminación es mejor descartarlas y no arriesgar el resto. Alimentar las colonias el día 6 con medio HAT fresco. Para esto se aspira cuidadosamente unos 75 μ l del sobrenadante y se reemplaza con un volumen igual de medio, disgregando suavemente las colonias. Se puede pasar de medio HAT a HT una vez que los controles de células NS-1 hayan muerto. Alimentar cada 3-5 días o antes si el indicador vira a amarillo.
3. Probar los sobrenadantes celulares mediante ELISA (u otra técnica) cuando el crecimiento de los híbridos supere el 50% de la superficie del hoyo. Los hoyos positivos pasan a expansión y clonaje.

Expansión y clonaje

1. Los hoyos positivos en la prueba de tamizaje son expandidos a placas de 24 hoyos, con 0,5 ml de medio DME. Dejar el hoyo de 96 original como copia y cuidarlo. Una vez

que se logre crecimiento en hoyo de 24 y se confirme la positividad, se clona. Alternativamente, también puede clonarse a partir del hoyo de 96.

2. Para el clonaje, preparar 2 tubos de 50 ml, con 14 y 30 ml de medio DME, respectivamente. Colocarlos en la incubadora a 37°C.
3. Cosechar una pequeña cantidad de las células a clonar y colocarlas en un tubo estéril con 1 ml de medio. Homogenizar y contar. Calcular el volumen a transferir al tubo de 30 ml, con la fórmula:

$$\text{ml a transferir} = \frac{(1,5 \text{ cél/ml})(30 \text{ ml})}{(\text{cél/ml contadas})}$$

4. El volumen de transferencia no debe ser menor de 15 µl, para minimizar el error. Si la suspensión fuera muy concentrada, se debe diluir para transferir un volumen razonablemente medible. Transferir el volumen calculado al tubo de 30 ml y homogenizar. Luego transferir 7 ml de este al tubo con 14 ml y homogenizar. Las concentraciones finales serán de 1,5 y 0,5 cél/ml. Sembrar en 2 placas de 96 hoyos rotuladas, a 200 µl/hoyo, comenzando con el tubo de 21 ml (0,1 cél/hoyo) y luego con el de 23 ml (0,3 cél/hoyo).
5. Leer el crecimiento a los 6-7 días, igual que en la fusión. Para que un clon sea válido estadísticamente (distribución de Poisson) no debe haber más de 9 hoyos con crecimiento en toda la placa y microscópicamente se debe ver solo una colonia ($p < 0,05$). Si no se obtiene un clon estadísticamente válido, es mejor reclonar de un hoyo positivo no válido, que del cultivo original (por probabilidad). Tamizar por producción del AcM todas las colonias derivadas del hoyo original.

Congelación de células

1. Preparar la cantidad requerida de medio para congelación (DME + 20% SFB + P/S + 10% DMSO), unos 10 ml por línea celular. Mantenerlo frío sobre hielo.
2. Preparar los viales de congelación, 6-10 por cada línea celular, rotulados. Cosechar las células de hibridoma en su fase log tardía. Contar. Centrifugar y resuspender en el medio de congelación frío a 4×10^6 cél/ml.
3. Colocar 0,5 ml de la suspensión en cada vial, cerrarlo herméticamente y colocarlo durante 1 hr a -20°C. Luego pasarlo a -70°C durante la noche. Al día siguiente, transferir al tanque de nitrógeno líquido (usar guantes y careta), anotando la posición en el archivo o libro de registro.

4. Dejar un cultivo de cada línea celular en mantenimiento, hasta que se haya superado la prueba de viabilidad. Para esto, descongelar 1 vial después de 4-7 días de la congelación, e iniciar un cultivo nuevo. Si este tiene éxito, puede descartarse el cultivo fresco de seguridad.

Descongelación de células

1. Usar la careta acrílica de protección. Sacar el vial del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente descongelarlo en agua a 37°C.
2. Recoger la suspensión del vial con una pipeta Pasteur y estratificarla sobre un tubo con 10 ml de medio base tibio. Centrifugar y decantar el sobrenadante.
3. Resuspender en medio DME completo + 10-20% SFB y sembrar en un hoyo de placa de 6 hoyos, en P-60, o en botella de 25 cm².

Producción de fluido ascítico

1. Utilizar ratones BALB/c de por lo menos 2 meses de edad. Inyectarles 0,5 ml i.p. de pristano (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano) o aceite mineral, con aguja 22x1. Esperar 10-14 días.
2. Expandir el hibridoma de interés varios días antes de que se cumpla el plazo para la sensibilización con pristano. En el día 12±2, inocular 2x10⁶ cél/0,5 ml vía i.p. a cada ratón. Las células se cosechan y se resuspenden en DME base, sin SFB.
3. Observar periódicamente los animales. Entre 8-20 días se forma la tumoración ascítica. Punzar la cavidad peritoneal con aguja 18 sin jeringa, cuando las dimensiones de la tumoración sean apropiadas, dejando gotear el fluido en un tubo. Repetir la recolección cada 2 días. Cuando el animal entre en hipotermia u otros signos adversos, se debe sacrificar. Centrifugar el fluido ascítico y recoger el sobrenadante rico en AcM. Conservar a -20°C.

Medios y suplementos

Medio base: DME (*Dulbecco's modified Eagle medium*). Mantener en refrigeración.

Suero fetal bovino: Mantener a -20°C en congelador sin ciclos de eliminación de escarcha. Envasar estéril en frascos de 100 ml. El frasco que está en uso se mantiene en refrigeración. El resto se guarda en congelación.

Medio DME completo: Para crecimiento y mantenimiento, mezclar medio base con suero fetal (10-20%) y agregar antibióticos (P/S) y glutamina, a partir de sus soluciones concentradas (ej. 100x), etc. Si se requiere, suplementar con vitaminas, piruvato, u otros factores. Para cultivos muy críticos, usar 15-20% del suero fetal. Para cultivos de rutina, basta con 10% de suero fetal, a menos de que se observen problemas de crecimiento.

Medio DME + HAT: Reconstituir el vial de HT (hipoxantina y timidina) y el vial de A (aminopterina) con 10 ml de DME sin suero (o según el volumen indicado por el fabricante). Mantener en refrigeración los viales reconstituídos (ej. 50x). Al preparar HAT se diluyen las soluciones 1:50. Las molaridades finales de H, A, y T son respectivamente 100, 0,4 y 16 μM .

Medio DME + 6-tioguanina: Preparar una solución 100x, disolviendo 2,5 mg de 6-tioguanina en unas gotas de NaOH 0,5 M y llevando a 3 ml con DME. Se puede calentar suavemente para ayudar a disolver. Conservar en refrigeración. Al momento de usarse (con las células de mieloma NS-1) agregar 0,1 ml para cada 10 ml del medio DME. Utilizarlo desde 3 días antes de la fusión. La concentración final queda en 5×10^{-5} M.

Solución de azul tripán (0,4%): Disolver 100 mg de azul tripán en 25 ml de PBS. Filtrar en papel. Mantener a TA, no tiene que estar estéril, pero si se observa contaminación hay que descartarlo.

Acido pirúvico: Pesar 0,22 g de ácido pirúvico y disolver en 20 ml de DME. Esterilizar por filtración en 0,22 μm , alicuotar y congelar. Queda como solución 100x.

Glutamina: Pesar 0,73 g y disolver en 25 ml de DME. Esterilizar por filtración en 0,22 μm y alicuotar como solución 100x. Congelar.

Capítulo 16

Marcaje de Anticuerpos con Fluoresceína para Técnicas de Inmunofluorescencia

Introducción

La idea de marcar anticuerpos por medio del acople covalente de compuestos fluorescentes (o fluorocromos) es atribuida a A. Coons, quien publicó sus trabajos pioneros en 1941. Los primeros marcajes los realizó con isocianato de fluoresceína, demostrando que los anticuerpos mantenían su capacidad de interaccionar con los antígenos correspondientes. Este compuesto fue sustituido pocos años después por el isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), que ha sido probablemente el fluorocromo más utilizado hasta la actualidad. Un **fluorocromo** se define como un compuesto que al ser excitado por la radiación en el ámbito ultravioleta (UV) o cercano, emite luz visible al devolver la energía absorbida por los electrones que pasan temporalmente a orbitales de mayor nivel, regresando a su estado basal. Cada fluorocromo posee una longitud de onda óptima para su excitación, y emite luz visible de una longitud de onda característica (**Fig.16.1**). Además de la fluoresceína (FITC), que emite fluorescencia verde-amarilla, existe toda una gama creciente de fluorocromos que también poseen gran aplicabilidad en los métodos de inmunofluorescencia. Algunos ejemplos son el isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC; fluorescencia rojiza) y la ficoeritrina (PE; fluorescencia amarilla-naranja).

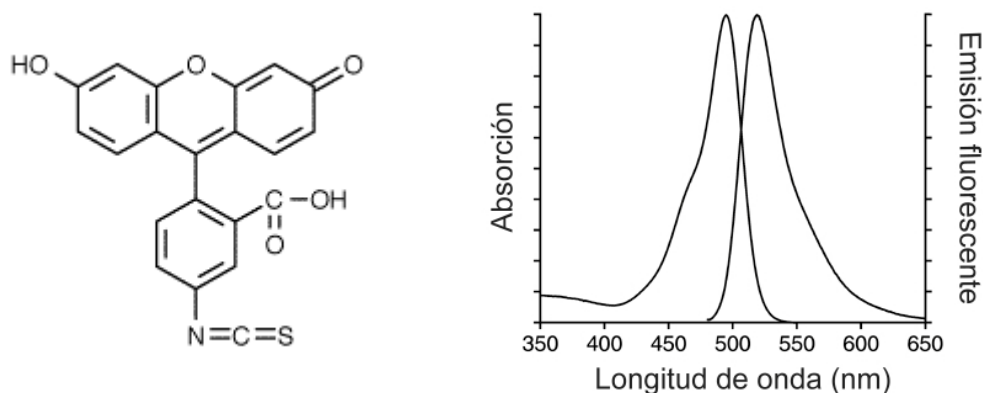


Figura 16.1: **Isotiocianato de fluoresceína (FITC)**. Estructura del FITC, uno de los fluorocromos más populares en las técnicas de inmunofluorescencia (izquierda), y sus espectros de absorción y emisión (derecha), con máximos a 495 nm y 525 nm, respectivamente.

El propósito de contar con anticuerpos marcados, o fluorescentes, es lograr la detección de antígenos con una alta sensibilidad física. Al igual que en todas las técnicas inmunológicas, es igualmente posible marcar a un antígeno con la finalidad de detectar sus correspondientes anticuerpos. El uso de estas estrategias constituye el campo de las técnicas de inmunofluorescencia. Estas se pueden realizar en una amplia variedad de formatos, tanto a nivel de microscopía, como mediante el empleo de instrumentos cuantitativos sofisticados de análisis automatizados, incluyendo la citometría de flujo, una de las técnicas más poderosas basadas en la inmunofluorescencia.

Marcaje con FITC

La conjugación de los anticuerpos (u otras proteínas) con el isotiocianato de fluoresceína se lleva a cabo por el ataque nucleofílico de los grupos amino primarios desprotonados de la proteína sobre el isotiocianato, formando un enlace tiourea. La máxima eficiencia en la conjugación se logra a pH 9,5, donde la mayoría de residuos de lisina se encuentran desprotonados. Debe evitarse la presencia de otros posibles nucleófilos en el medio, tales como amortiguadores Tris, aminoácidos, iones de amonio o azida de sodio, ya que inhiben la reacción.

Los isotiocianatos de fluorocromos son muy susceptibles a la hidrólisis, aún por la simple humedad del aire, por lo que deben ser mantenidos en desecador y en frío. Antes de su uso, se debe dejar que el frasco alcance la temperatura ambiente para evitar la condensación. Durante la reacción de acople a la proteína, ocurre una reacción de hidrólisis concomitante que compite. A concentraciones proteicas altas, por ejemplo >10 mg/ml, se favorece la reacción de acople sobre la de hidrólisis y se pueden lograr eficiencias hasta del 70%. Si se dispone de soluciones proteicas más diluidas, por ejemplo de 1-2 mg/ml, aún es posible realizar el marcaje, aunque se requiere una cantidad mayor de fluorocromo para compensar. La reacción de marcaje es simple, y el fluorocromo hidrolizado que queda como residuo no acoplado a la proteína puede eliminarse mediante técnicas que explotan su diferencia de peso molecular con respecto a la proteína marcada, por ejemplo cromatografía de filtración en gel, o ultrafiltración. La diálisis exhaustiva es muy lenta y no se recomienda utilizarla para esta separación final.

Uno de los parámetros de interés en la reacción de marcaje es la relación molar fluorocromo/proteína (F/P). Si esta proporción es muy baja, la intensidad de la fluorescencia será pobre. De hecho, la proporción no debe ser menor a 1, ya que ello implicaría una proporción de anticuerpos que no fueron marcados, y que competirían con aquellos que acoplaron al fluorocromo, disminuyendo la sensibilidad física de la técnica. Por otro lado, el límite superior de la relación F/P está dado por una serie de factores. Entre ellos, es sabido que la incorporación del FITC en los anticuerpos disminuye marcadamente su punto isoelectrico, y una conjugación excesiva puede generar productos fuertemente cargados (acídicos) que tienden a dar más uniones inespecíficas en las técnicas, especialmente cuando se utilizan células o tejidos fijados. Una proporción F/P usual para el marcaje de anticuerpos es 2-3, para células fijadas, o 4-6 para células vivas intactas.

Para el FITC, es posible calcular la relación F/P obtenida luego de la reacción por medio de una fórmula, basada en lecturas espectrofotométricas a 280 nm y 495 nm:

$$\text{razón F/P} = \frac{2,87 \times A_{495}}{A_{280} - 0,35 \times A_{495}}$$

Los anticuerpos a marcar deben estar al menos parcialmente purificados, y los mejores resultados en las técnicas se otienen cuando la pureza de los anticuerpos es alta, con una baja contaminación de otras proteínas que también se estarían marcando y que podrían producir señales indeseables o inespecíficas.

A continuación se describe un procedimiento general para el marcaje con FITC (Goding, 1986):

1. Dializar los anticuerpos a marcar contra un amortiguador de carbonato/bicarbonato a pH 9,5 (ej. 8,6 g Na₂CO₃, 17,2 g NaHCO₃, para un litro de agua). Si los anticuerpos se tienen en estado sólido, y libres de nucleófilos, se pueden disolver directamente en este amortiguador. Calcular la concentración de los anticuerpos mediante su A₂₈₀ (u otro método), utilizando como coeficiente de extinción molar para cubeta de 1 cm el valor de 1,38 para 1 mg/ml.
2. Preparar una solución del FITC (evitando su hidratación al pesarlo y conservarlo) a 1 mg/ml, en dimetilsulfóxido (DMSO). Usar de inmediato.
3. Agregar el volumen deseado para el marcaje a la solución de proteína gota a gota, con agitación. La proporción recomendable es de 20-80 µg FITC/mg proteína (aunque esto va a depender de la calidad del reactivo y de la concentración de proteína a marcar, como se indicó en el texto). Proteger de la luz el tubo de reacción, ej. con papel aluminio.
4. Mantener en agitación suave a temperatura ambiente por 2 hr.
5. Separar el remanente del FITC no acoplado mediante cromatografía en Sephadex G-25 o ultrafiltración. No se recomienda la diálisis.

Técnicas de inmunofluorescencia

En esta familia de métodos, se visualiza un antígeno (o sus correspondientes anticuerpos) en una laminilla bajo el microscopio, aprovechando la fluorescencia que emite la molécula marcada, al ser iluminada con luz ultravioleta de la longitud de onda apropiada. Incluso es posible puede utilizar dos sondas marcadas con fluorocromos

distintos, que emitan fluorescencia diferente (ej. verde y roja) para realizar una detección simultánea de dos antígenos presentes en la laminilla, por ejemplo células o tejidos fijados. Dado que el material a analizar se puede visualizar también mediante microscopía de luz visible, la inmunofluorescencia permite detectar de manera eficiente la ubicación del antígeno en el contexto de la morfología convencional.

Los microscopios para realizar inmunofluorescencia poseen esencialmente una fuente de luz ultravioleta (lámpara de mercurio o de xenón, entre otras) que sirve para excitar a los fluorocromos, y un sistema óptico con **filtros de barrera** que solamente permiten el paso de la longitud de onda visible apropiada hacia el usuario, eliminando la radiación UV, peligrosa para nuestra retina. Los **filtros de excitación** son utilizados para seleccionar la longitud de onda adecuada para activar al fluorocromo a utilizar. Los primeros microscopios de este tipo empleaban una iluminación convencional (**trans-iluminación**), en donde la luz proviene desde abajo de la laminilla o portaobjetos, y debe atravesar tanto a esta como a la muestra (ej. un tejido), para finalmente generar la fluorescencia que va a ser visualizada por el usuario. Posteriormente se desarrollaron los microscopios de **epi-iluminación**, en donde gracias a un aditamento óptico denominado lente dicróico, o espejo dicróico, es posible iluminar las muestras desde arriba, a través de la misma ruta que sigue la luz visible percibida finalmente por el usuario (**Fig.16.2**).

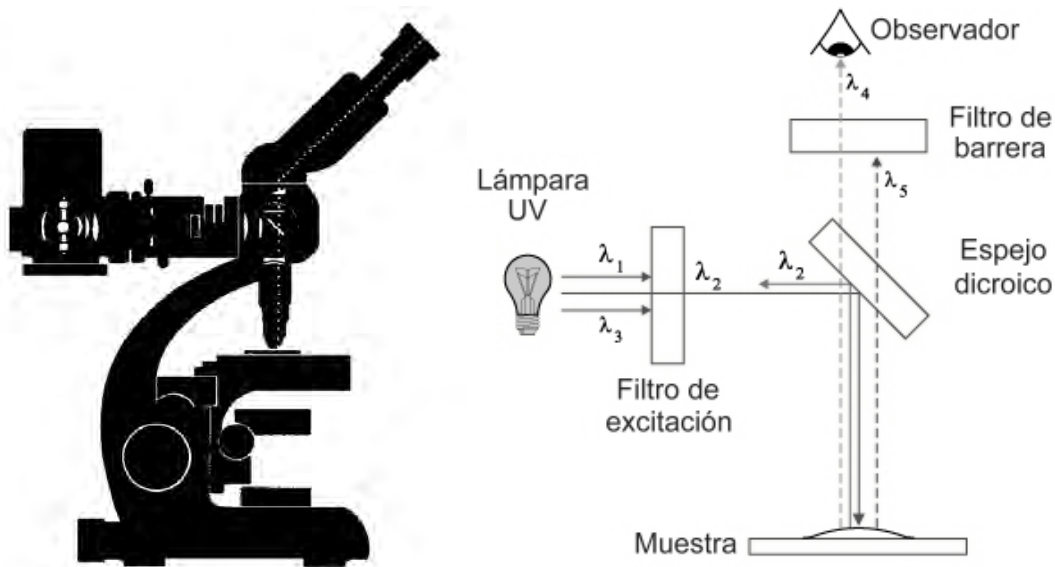


Figura 16.2: **Microscopio de fluorescencia con epi-iluminación.** A la izquierda se muestra la ubicación del sistema de epi-iluminación en el microscopio. Un diagrama simplificado de los componentes ópticos principales (derecha) muestra el filtro de excitación, que deja pasar solamente la longitud de onda deseada (λ_2), la cual es reflejada por el espejo dicróico hacia la muestra. Este componente deja pasar la luz fluorescente generada por el fluorocromo (λ_4 , λ_5), la cual es seleccionada aún más (λ_4) por el filtro de barrera, antes de llegar al observador.

Las técnicas de inmunofluorescencia se clasifican como **directas** o **indirectas**. En las primeras, la sonda marcada con el fluorocromo (usualmente anticuerpos policlonales o un anticuerpo monoclonal) interactúa directamente con el antígeno presente en la muestra, poniéndolo en evidencia. Un ejemplo de esto puede ser la detección de un marcador de superficie celular en un tejido mediante sus correspondientes anticuerpos marcados con el fluorocromo. Por otra parte, las técnicas indirectas son aquellas en las que la sonda marcada sirve para detectar a los anticuerpos que, a su vez, se han unido al antígeno (**Fig.16.3**). Este tipo de técnicas es muy útil para la búsqueda de anticuerpos séricos, por ejemplo, contra antígenos tisulares en enfermedades autoinmunes, o contra un determinado agente infeccioso. Para ello se utilizan conjugados de anticuerpos marcados, dirigidos contra las inmunoglobulinas de la especie de interés, preparados en otra especie: ej. FITC-anti-inmunoglobulina G humana preparado en cabra, etc.

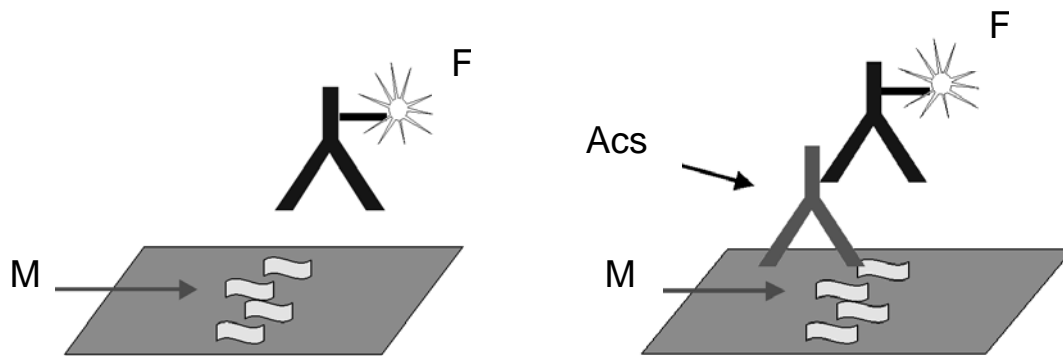


Figura 16.3: **Inmunofluorescencia directa e indirecta**. La técnica directa (izquierda) recibe su nombre porque el conjugado fluorescente (F) se une directamente al antígeno de interés en la muestra (M), evidenciándolo. En la técnica indirecta (derecha), el conjugado fluorescente detecta a los anticuerpos que se han unido al antígeno. En esta variante por lo general se logra una mayor sensibilidad física que en las técnicas directas, porque comúnmente varias moléculas del conjugado fluorescente se unen a los anticuerpos primarios, multiplicando así la intensidad de la señal.

Una de las técnicas que ha revolucionado la inmunofluorescencia actualmente es su combinación con la **microscopía confocal**, en la cual es posible analizar en gran detalle la morfología de células vivas, marcadas con diversas sondas fluorescentes, y logrando una reconstrucción tridimensional de las imágenes a través de iluminación con luz láser y manejo computarizado de los datos. Por otro lado, la **citometría de flujo**, que igualmente aprovecha el marcaje inmunofluorescente de células, se ha convertido en una técnica de gran poder y utilidad en el laboratorio, como se describe a continuación.

Citometría de flujo

Esta técnica representa uno de los desarrollos de mayor impacto en la medicina de laboratorio moderna, al permitirnos realizar mediciones muy rápidas en células (u otras partículas) individuales en suspensión, conforme estas pasan -una por una- a través de un punto específico de análisis. El aspecto más importante de esta tecnología es que las mediciones se realizan sobre cada célula o partícula individual, y no sobre un promedio de toda su población. La capacidad de poder analizar cuantitativamente múltiples parámetros de las partículas mediante la aplicación de un haz de luz láser, constituye una de las mayores fortalezas de estas técnicas instrumentales. Un desarrollo ulterior de los citómetros de flujo, el **separador de células activado por fluorescencia** (FACS, *fluorescence-activated cell sorter*), permite no solamente el análisis de las células, sino su aislamiento, basado en propiedades predeterminadas por el usuario.

En los campos de la inmunología y la hematología, las técnicas de citometría de flujo han emergido como un pilar fundamental para el análisis y la caracterización detallada de las células sanguíneas. Entre las aplicaciones clínicas más frecuentes de estos métodos se encuentran la caracterización de leucocitos en estados de inmunodeficiencia (innatos o adquiridos) y en enfermedades onco-hematológicas. El desarrollo de la tecnología de hibridomas, al proveer anticuerpos monoclonales capaces de reconocer epitopos únicos de las moléculas de superficie celular, ha expandido enormemente las posibilidades de los análisis basados en la citometría. A esto se debe agregar el desarrollo de un número cada vez mayor de fluorocromos, utilizados para marcar covalentemente a los anticuerpos monoclonales que se emplean en estas técnicas (**Cuadro 16.1**).

Cuadro 16.1: Algunos fluorocromos utilizados para marcar anticuerpos en inmunofluorescencia y citometría de flujo *.

Fluorocromo	Pico de absorción	Pico de emisión
fluoresceína	495 nm	520 nm
tetrametilrodamina	543 nm	570 nm
rojo Texas	596 nm	620 nm
rojo Princeton	490 nm	579 nm
ficoeritrina-R	495 y 564 nm	576 nm
aloficocianina	650 nm	660 nm
cumarina	357 nm	460 nm

* Ormerod (1990).

Los métodos manuales de recuento celular por inmunofluorescencia son muy lentos y laboriosos, en comparación con las amplias posibilidades de análisis y la automatización que ofrece la citometría de flujo. Claro está, el principal obstáculo para una mayor difusión

de la citometría de flujo, en los laboratorios medianos y pequeños, radica en el alto costo de los instrumentos (**Fig.16.4**), así como en la complejidad técnica para el adecuado mantenimiento de los mismos.



Figura 16.4: Un citómetro de flujo.

La suspensión celular que se desea analizar mediante un citómetro de flujo es conducida mecánicamente a una sección que la convierte en una delgada corriente de fluido, finalmente dispersado en gotas microscópicas en las que incide un fino haz de luz láser¹ (**Figs.16.5 y 16.6**). Cada célula dispersa en varias direcciones esta luz, la cual es recogida por distintos fotodiodos y tubos fotomultiplicadores. Dos parámetros físicos de las células son cuantificados con base en la dispersión de la luz: la **dispersión frontal** (*forward scattering*), que correlaciona principalmente con su tamaño, y la **dispersión lateral** (*side scattering*), a 90°, que correlaciona mayormente con su granularidad, o complejidad de la superficie. Además, si las células son pretratadas con anticuerpos fluorescentes contra distintos marcadores, la luz láser activa a los fluorocromos correspondientes y las señales emitidas son detectadas por tubos fotomultiplicadores. Los citómetros comúnmente poseen capacidad para utilizar de dos a cuatro canales distintos para la cuantificación de fluorescencia, lo que permite analizar, por tanto, la presencia de dos a cuatro marcadores celulares simultáneamente. Algunos instrumentos más sofisticados poseen un número aún mayor de canales de fluorescencia.

¹ LASER, acrónimo de "light amplification by stimulated emission of radiation".

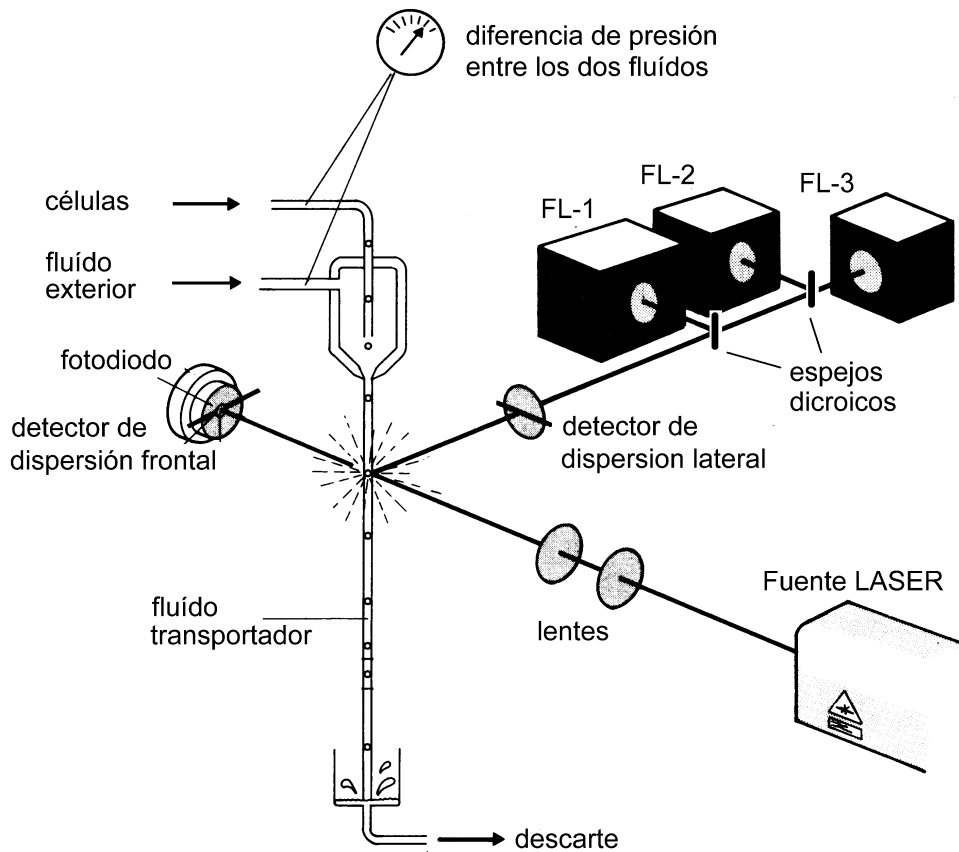


Figura 16.5: Diagrama simplificado de un citómetro de flujo. El haz de luz láser es enfocado sobre el punto de análisis, por el cual cruzan continuamente las células. La dispersión frontal de luz es detectada en línea con la trayectoria incidente, mientras la dispersión lateral es detectada en un ángulo de 90° . Adicionalmente, un conjunto de espejos dicróicos dirige los distintos tipos de luz fluorescente (emitida por anticuerpos marcados) a los tubos fotomultiplicadores. El esquema representa un instrumento con 3 canales de fluorescencia (FL).

Un citómetro de flujo puede analizar suspensiones celulares a velocidades tan altas como 500-1.000 células por segundo. El paso de cada célula es contabilizado como un evento individual, y todos los parámetros que registra el sistema de análisis óptico son integrados mediante una computadora. Usualmente se analizan unos 10.000 eventos por muestra, en pocos minutos. A través de poderosos programas de captura de datos y análisis, es posible desplegar los resultados en forma tanto numérica como gráfica, con un conjunto de posibilidades de presentación que incluye diagramas de dispersión (**Fig.16.7**), de contorno (**Fig.16.8**), histogramas de frecuencias (**Fig.16.9**) y otros.

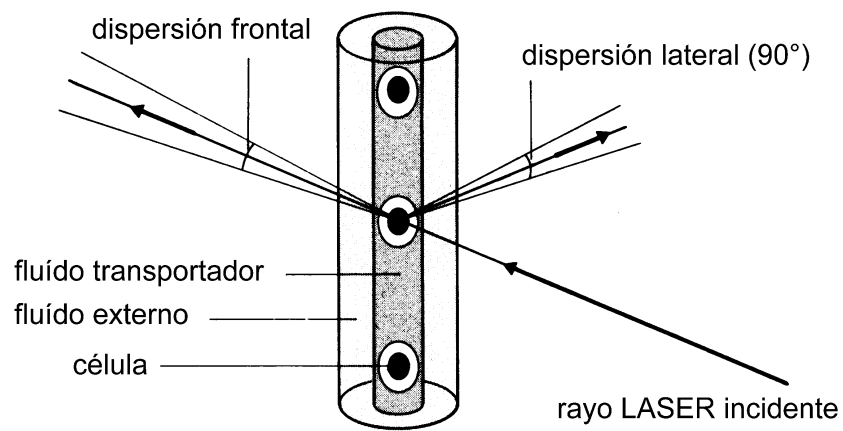


Figura 16.6: Detalle esquemático del punto de análisis de un citómetro de flujo, en donde las células cruzan el rayo de luz láser, dispersando la luz y emitiendo fluorescencia (si se han pretratado con anticuerpos marcados con fluorocromos).

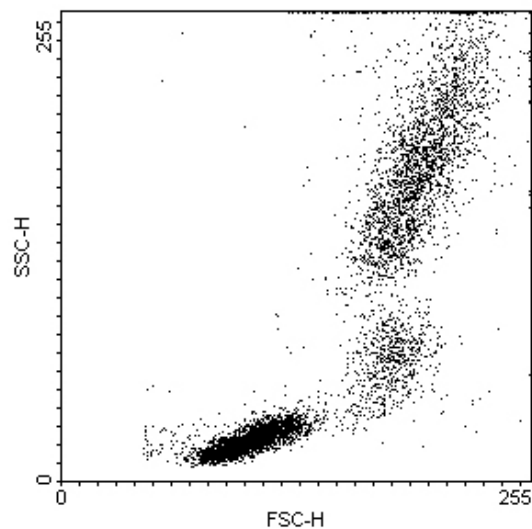


Figura 16.7: Diagrama de dispersión de una muestra de leucocitos sanguíneos analizada por citometría de flujo. El eje vertical indica la dispersión lateral (granularidad de las células), mientras el horizontal indica la dispersión frontal (tamaño). Cada célula es graficada como un punto. La zona de puntos más densa (región con menor tamaño y granularidad, abajo), corresponde a los linfocitos. Arriba a la derecha se ubica la región de los granulocitos, mientras los monocitos se ubican entre ambas zonas.

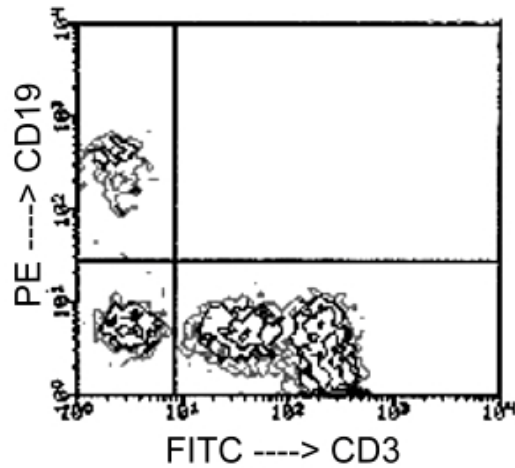


Figura 16.8: Cuantificación de linfocitos T y B. El eje vertical indica la fluorescencia emitida por el anti-CD19-ficoeritrina (PE), que marca a los linfocitos B. El eje horizontal corresponde al anti-CD3-fluoresceína (FITC), como marcador de linfocitos T. El gráfico es una representación de tipo "contorno", con cuatro ciclos logarítmicos para la intensidad de la fluorescencia en cada eje. Las dos líneas internas establecen los límites de positividad de la señal (en contraposición con la señal negativa del cuadrante inferior izquierdo). Puede observarse el predominio de los linfocitos T (cuadrante inferior derecho) sobre los B (cuadrante superior izquierdo), así como la ausencia de células con ambos marcadores (cuadrante superior derecho).

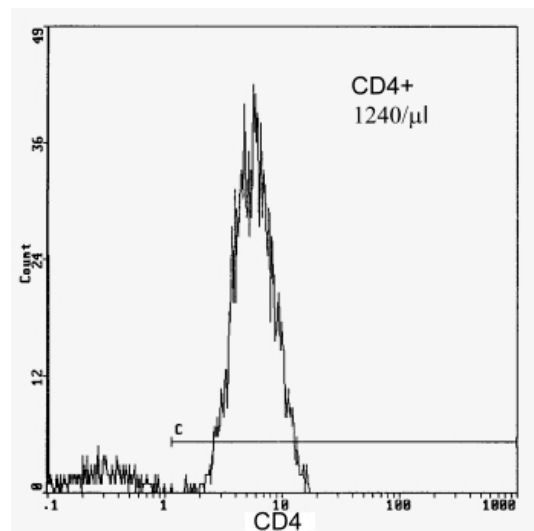


Figura 16.9: Representación tipo histograma para el análisis de un solo marcador celular. En este ejemplo, las células se trataron con anti-CD4-FITC, para la cuantificación de linfocitos T cooperadores (Th).

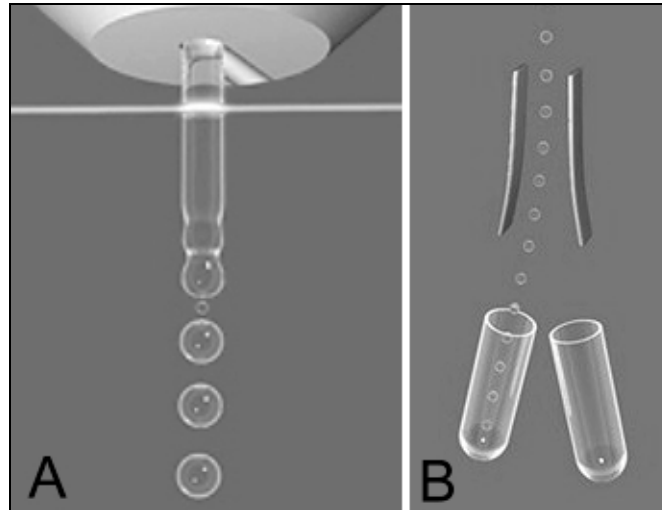


Figura 16.10: **Separador de células activado por fluorescencia (FACS, *fluorescence-activated cell sorter*)**: en este tipo de instrumentos, después del análisis de las células es posible aislar una determinada subpoblación. El fluido transportador de las células es disgregado en gotas microscópicas (A), cuya trayectoria puede ser desviada mediante la aplicación de una carga eléctrica momentánea, al pasar por placas magnéticas deflectoras (B). De este modo, el instrumento dirige las gotas hacia recipientes distintos, para aislar las células que expresan un marcador dado.

Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. (1994) *Cellular and Molecular Immunology*, 457 pp. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- Adams, R.L.P. (1990) *Cell Culture for Biochemists*, 364 pp. Amsterdam: Elsevier.
- Alape-Girón, A., Lomonte, B., Gustafsson, B., Da Silva, N.J. y Thelestam, M. (1994) Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon* **32**, 713-723.
- Alape-Girón, A., Gustafsson, B., Lomonte, B., Thelestam, M. y Gutiérrez, J.M. (1994) Immunochemical characterization of *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom with monoclonal and polyclonal antibodies. *Toxicon* **32**, 695-712.
- Alape-Girón, A., Miranda-Arrieta, K., Cortés-Bratti, X., Stiles, B.G. y Gutiérrez, J.M. (1997) A comparison of *in vitro* methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Toxicon* **35**, 573-581.
- Angulo, Y. (1995) Efectos fisiopatológicos en equinos inoculados con venenos de serpiente para la producción de sueros antiofídicos. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica.
- Angulo, Y., Núñez, C.E., Lizano, S., Soares, A.M. y Lomonte, B. (2001) Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* **39**, 879-887.
- Arquembourg, P.C. (1975) *Immuno-electrophoresis*. Basel, S. Karger.
- Bartels, G., Herrera, A., Salas, P., Sierra, R. y Lomonte, B. (1995) Antibodies to *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients, asymptomatic adults, and children from Costa Rica. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **103**, 428-432.
- Bers, G. y Garfín, D. (1985) Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. *Biotechniques* **3**, 276-288.
- Bio-Rad (1984) Acrylamide polymerization: A practical approach. Boletín #1156. Bio-Rad Laboratories, Richmond, California.
- Calderón, L. y Lomonte, B. (1998) Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Archs. Biochem. Biophys.* **358**, 343-350.
- Calderón, L. y Lomonte, B. (1998) Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115-129. *Toxicon* **37**, 683-687.
- Campbell, A.M. (1984) *Monoclonal Antibody Technology*, 259 pp. Amsterdam: Elsevier.
- Clausen, J. (1981) *Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules*, p.49. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press.
- Cox, J.C. y Coulter, A.R. (1997) Adjuvants: a classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**, 248-256.
- Dresser, D.W. (1986) Immunization of experimental animals. En: *Handbook of Experimental Immunology*, vol.1 (Weir, D.M., Ed.), p.8.1. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Engvall, E. (1980) Enzyme immunoassay: ELISA and EMIT. *Methods Enzymol.* **70**, 419.
- Fahey, J.L. y McKelvey, E.M. (1965) Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* **94**, 84-90.
- Freshney, R.I. (1992) *Animal Cell Culture: a Practical Approach*, 329 pp. Oxford: IRL Press.
- Goding, J.W. (1986) *Monoclonal antibodies: principles and practice*, 315 pp. London, Academic Press.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. y Kuby, J. (2002) *Immunology*, 665 pp. New York, W.H. Freeman.

- Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Publications.
- Heide, K. y Schwick, H.G. (1978) Salt fractionation of immunoglobulins. En: *Handbook of Experimental Immunology*, vol.1, *Immunochemistry*, p.7.1 (Weir, D.M., Ed.) Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Herbert, W.J. (1978) Mineral oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. En: *Handbook of Experimental Immunology*, vol. 3, p.A3.1 (Weir, D.M., Ed.) Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Hoffman, W.L. y Jump, A.A. (1986) Tween-20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose. *J. Immunol. Methods* **94**, 191-196.
- Horwitz, C.H. (1980) Laboratory diagnostic of rheumatoid diseases. *Postgraduate Medicine* **67**, 193-203.
- Hooton, J.W.L. y Paetkau, V. (1986) Random assignment of treatments in a 96-well (8x12) microtiter plate. A practical method. *J. Immunol. Methods* **94**, 81-89.
- Hudson, L. y Hay, F.C. (1989) *Practical Immunology*, 507 pp. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Jackson, P. y Blythe, D. (1993) Immunolabeling techniques for light microscopy. En: *Immunocytochemistry, a practical approach* (Beesley, J.E., Ed.), 248 pp. Oxford: IRL Press.
- Kabat, E.A. y Mayer, M.M. (1971) *Experimental Immunochemistry*. Springfield: Charles C. Thomas Publisher.
- Köhler, G. y Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- Köhler, G. y Milstein, C. (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* **6**, 511-519.
- Kuby, J. (1997) *Immunology*, 664 pp. New York, W.H. Freeman.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langone, J.J. (1982) Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *J. Immunol. Methods* **55**, 277-296.
- Låås, T. (1989) Electrophoresis in gels. En: *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications* (Janson, J.C. y Rydén, L., Eds.), p.349. New York, VCH Publishers.
- Lizano-González, S. (2001) La inmunización con ADN recombinante: una nueva alternativa para el desarrollo de vacunas. En: *Avances en Medicina Molecular* (Alape-Girón, A., Ed.), pp.94-100. Universidad de Costa Rica.
- Lomonte, B. (1998) *Nociones de Inmunología*, 40 pp. San José: Editorial Lara, Segura & Asociados.
- Lomonte, B. (1999) Bases moleculares del reconocimiento de antígenos. *Acta Pediátrica Costarricense* **13**, 52-54.
- Lomonte, B. y Mata, E. (1985) Producción de placas de inmunodifusión radial para la cuantificación de IgG humana. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **6**, 227-231.
- Lomonte, B. y Kahan, L. (1988) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. *Toxicon* **26**, 675-689.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Carmona, E. y Rovira, M.E. (1990) Equine antibodies to *Bothrops asper* myotoxin II: isolation from polyvalent antivenom and neutralizing ability. *Toxicon* **28**, 379-384.
- Lomonte, B., Furtado, M.F., Rovira, M.E., Carmona, E., Rojas, G., Aymerich, R. y Gutiérrez, J.M. (1990) South American snake venom proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **23**, 427-435.

- Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. y Ramírez, G. (1990) Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). *Toxicon* **28**, 75-81.
- Lomonte, B., Salas, P. y Quesada, F. (1991) Determinación inmunoenzimática de los niveles séricos de inmunoglobulina E en niños asmáticos de la meseta central de Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **12**, 1-6.
- López-Yap, A., Abdelnour, A., Lomonte, B. y Porras, O. (2001) Serum antibody response to polysaccharides in children with recurrent respiratory tract infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 1012-1014.
- Løfvborg, U.L. (1984) *Guide to Solid Phase Immunoassays*. Roskilde: NUNC.
- Mäkela, O. y Seppälä, I.J.T. (1986) Haptens and carriers. En: *Handbook of Experimental Immunology*, vol.1: Immunochemistry, p.3.1 (Weir, D.M., Ed.). Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Mahana, W. y Paraf, A. (1993) Mice ascites as a source of polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **161**, 187-192.
- Mancini, G., Carbonara, A.O. y Heremans, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235-254.
- McKinney, M.M. y Parkinson, A. (1987) A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Methods* **96**, 271-278.
- Merlini, G., Piro, P., Pavesi, F., Epis, R. y Aguzzi, F. (1981) Detection and identification of monoclonal components: immunoelectrophoresis on agarose gel and immunofixation on cellulose acetate compared. *Clin. Chem.* **27**, 1862-1865.
- Morris, B.A. (1980) A short course on antibody production. En: *Radioisotopic and labelled reagent microanalytical methods used in medical research and clinical diagnosis*. The British Council, University of Surrey.
- Neremberg, S.T. (1975) *Diagnóstico Electroforético*, p.48. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Nokamuro, R., Pebles, C., Molden, D. y Ton, E.M. (1984) Advances in laboratory tests for autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. *Lab. Med.* **15**, 190-198.
- Nowotny, A. (1969) *Basic Exercises in Immunochemistry*. New York: Springer-Verlag.
- Ormerod, M.G. (1990) An introduction to fluorescence technology. En: *Flow Cytometry, a Practical Approach* (Ormerod, M.G., Ed.), 29-44. Oxford: IRL Press.
- Ouchterlony, Ö. y Nilsson, L.Å. (1986) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: *Handbook of Experimental Immunology* vol.1: Immunochemistry, p.32.1. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Owen, M.J. y Lamb, J.R. (1988) *Immune Recognition*, 73 pp. Oxford: IRL Press.
- Pugliese, L., Coda, A., Malcovati, M. y Bolognese, M. (1993) Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **231**, 698.
- Ramírez, P., Bonilla, J.A., Moreno, E. y León, P. (1983) Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detection with peroxidase-bound lectins and protein A. *J. Immunol. Methods* **62**, 15-22.
- Rojas, G., Jiménez, J.M. y Gutiérrez, J.M. (1994) Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* **32**, 351-363.
- Rovira, M.E., Carmona, E. y Lomonte, B. (1991) Immunoenzymatic quantitation of antibodies to *Bothrops asper* myotoxins after polyvalent antivenom administration in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **25**, 23-33.
- Rucavado, A., Moreno, E. y Gutiérrez, J.M. (1996) Effect of adjuvants on the antibody response of mice to *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**, 1337-1340.

- Sittenfeld, A. y Moreno, E. (1988) A sensitive blotting system for detection of α -fetoprotein variants with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **106**, 19-26.
- Stähli, C., Miggiano, J., Stocker, J., Staehelin, Th., Haring, P. y Takács, B. (1983) Distinction of epitopes by monoclonal antibodies. *Meth. Enzymol.* **92**, 242.
- Syu, W.J. y Kahan, L. (1987) Use of protein-stained immunoblots for unequivocal identification of antibody specificities. *J. Immunol. Methods* **103**, 247-252.
- Thompson, R.A. (1977) *Techniques in Clinical Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Tijssen, P. (1985). *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, p.96. Amsterdam, Elsevier Science Publishers.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Towbin, H. y Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot immunobinding: Current status and outlook. *J. Immunol. Methods* **72**, 313-340.
- Voller, A. y Bidwell, D. (1986) Enzyme-linked immunosorbent assay. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, p.99. Washington: American Society for Microbiology.
- Walker, J.M. (1984) Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis. En: *Methods in Molecular Biology*, vol.1: *Proteins* (Walker, J.M., Ed.), p.57. New Jersey, Humana Press.
- Weeke, B. (1973) Rocket immunoelectrophoresis. En: *Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis* (Axelsen, N.H., Kroll, J. y Weeke, B., Eds.), p.37. Oslo: Universitetsforlaget. Suplemento N°1 de *Scand. J. Immunology*, vol.2.
- Weeke, B. (1973) Crossed immunoelectrophoresis. En: *Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis* (Axelsen, N.H., Kroll, J. y Weeke, B., Eds.), p.47. Oslo: Universitetsforlaget. *Scand. J. Immunology*, vol.2 (supl.1).