



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA: QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**ELABORACIÓN DE REACTIVOS BIOLÓGICOS PARA LA  
IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO  
PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILOS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ANA CRISTINA ROSADO SILVA**

**DIRECTOR DE TESIS:** M. en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ

**ASESOR DE TESIS:** Dr. RUBÉN MARROQUIN SEGURA

**MÉXICO, D.F. 2013**



---

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es dedicado primero a Dios por darme la oportunidad y los medios para realizarlo, a mis padres Araceli Silva y Pedro Rosado por estar conmigo en todo y ser mi soporte, a mi hermana Azalia que está siempre pendiente de mí, al Dr. Rubén Marroquín y M. en C. Rodolfo Carreón darme la oportunidad en este proyecto a mis amigos Manuel y Lizbeth, Liliana, Tania, Stephanie, Humberto, Abraham, Iván, Ricardo, David, Rodrigo, Cinthia, Jorge, Christian, Carlos, Adrián, Paty Demare y Paty Vidal y a muchas personas más por apoyarme en todos los aspectos, solo me queda decirles gracias.





## CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	1
1 RESUMEN.....	2
2 INTRODUCCIÓN.....	3
3 MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 Radicales libres .....	4
3.2 Antecedentes históricos .....	5
3.3 Especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	9
3.3.1 Radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ .....	9
3.3.2 Radical hidropéroxilo o dióxido de hidrógeno (H-O-O $\cdot$ ).....	10
3.3.3 Radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno ( $\cdot$ OH).....	10
3.3.4 Radical péroxilo (ROO $\cdot$ ) .....	11
3.3.5 Radical alcóxilo (RO $\cdot$ ).....	11
3.4 Especies reactivas de oxígeno no radicales .....	12
3.4.1 Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).....	12
3.4.2 Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) .....	12
3.4.3 Ácido hipocloroso (HOCl).....	13
3.5 Metabolismo de los ROS en la mitocondria .....	14
3.6 Mecanismo de acción de las ROs sobre las proteínas .....	16
3.7 Estrés oxidativo .....	18
3.8 Anticuerpos .....	20
3.9 Antígeno.....	22
3.9.1 Determinante antigénico (DA) o Epítipo.....	22
3.9.2 Clasificación de los antígenos.....	24
3.9.3 Vías de administración y dosis de antígeno .....	25
3.10 Antígenos proteicos.....	26
3.10.1 Albúmina.....	26
3.10.2 Ovoalbúmina (OVA).....	27
3.10.3 Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	29
3.10.4 Propiedades fisicoquímicas .....	33



3.11 Factores que controlan la antigenicidad e inmunogenicidad.....	34
3.11.1 Naturaleza química .....	34
3.11.2 Extrañeza.....	34
3.11.3 Complejidad química .....	35
3.11.4 Peso molecular .....	35
3.11.5 Conformación estérica .....	35
3.11.6 Carga.....	35
3.11.7 Presencia de grupos rígidos.....	36
3.11.8 Configuración óptica .....	36
3.12 Naturaleza de los enlaces formados entre antígenos y anticuerpos .....	36
3.13 Haptenos.....	38
3.13.1 Selección del portador .....	38
3.14 Técnicas de acoplamiento .....	39
3.14.1 Fijación directa.....	39
3.15 2,4-Dinitrofenilhidrazina .....	41
3.16 Adyuvantes, Vías de administración y Dosis del Antígeno .....	41
3.16.1 Adyuvante.....	41
3.16.2 Técnicas para la obtención de anticuerpos anti-haptenos.....	43
3.17 Métodos de laboratorio para la detección de antígeno anticuerpo.....	43
3.17.1 Técnica de precipitación .....	45
3.17.2 Radioinmunoanálisis (RIA).....	46
3.17.3 Ensayo de Inmunoabsorbente Ligado a Enzima .....	47
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	51
5 HIPÓTESIS DEL TRABAJO .....	52
6 OBJETIVOS.....	53
7 REACTIVOS .....	54
8 MATERIAL.....	55
9 EQUIPOS .....	56
10 MÉTODOS.....	57
10.1 Preparación de conjugados DNP-BSA y DNP-OVA.....	57



---

10.2 Método de Lowry .....	57
10.3 Inmunización .....	59
10.4 Método Acoplamiento de dos Pasos de Glutaraldehído (Método Avrameas).....	60
10.5 Método de Inmunoabsorbente .....	60
10.6 Método de ELISA .....	61
11 RESULTADOS .....	63
12 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	72
13 CONCLUSIONES .....	74
14 SUGERENCIAS.....	74
14 REFERENCIAS .....	75





---

## ABREVIATURAS

ROS especies reactivas de oxígeno

DNPH 2,4-dinitrofenilhidrazina

OVA ovoalbúmina

BSA albúmina sérica bovina

CoA acetil coenzima A

SOD superóxido dismutasa

NO oxido nítrico

NADPH nicotinamida adenin dinucleotido fostato reducido

RL radicales libres

RI respuesta inmune

Ag antígeno

Ac anticuerpo

Ig inmunoglobulina

IV vía intravenosa

ID vía intradérmica

SC vía subcutánea

IM vía intramuscular

IP vía intraperitoneal

RIA radioinmunoanálisis

ELISA ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima

HRP peroxidasa de rábano picante



---

## 1 RESUMEN

El estrés oxidativo es el conjunto de mecanismos que mediante las especies reactivas de oxígeno ROS por sus siglas en inglés (reactive oxygen species) , produciendo alteraciones en la proteólisis, provocando la oxidación de aldehídos y generando un gran número de grupos carbonilos dentro de la célula, causando alteraciones en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos lo cual puede desencadenar una serie de graves patologías como: arteroesclerosis, cáncer, diabetes mellitus, enfermedad Alzheimer, entre otras. Aún que existen kits comerciales para su valoración como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa; pero debido a que hay pocos y muchos de ellos necesitan de equipos especializados para la lectura de los resultados esto aumenta los costos. En este trabajo se obtuvo un anticuerpo a partir del hapteno 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que se conjugó con los acarreadores ovoalbúmina (OVA) y albúmina sérica bovina (BSA); y se valoró su funcionalidad por ensayo inmunoenzimático, proporcionando un resultado óptimo, esto podría proporcionar un método alternativo para la obtención de anticuerpos específicos en la determinación de proteínas que presenten grupos carbonilos generados por el estrés oxidativo, para ser usado en técnicas inmunoenzimáticas



---

## 2 INTRODUCCIÓN

La oxidación es un proceso que involucra una pérdida de electrones, captación de oxígeno o pérdida de hidrógeno; asimismo, la reducción es el caso inverso donde hay captación, electrones o pérdida de oxígeno. Todo proceso de oxidación siempre va acompañado de una reducción.<sup>1</sup>

En la naturaleza existen procesos oxidativos la combustión y la respiración esto tienen características semejantes, ya que son procesos a través de los cuales algunos sustratos combustibles se transforman en energía consumiéndose el oxígeno, liberándose agua y dióxido de carbono. Los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía a través de reacciones de este tipo.

El oxígeno es importante para la vida, pero también puede ser fuente de enfermedades a través de una producción incontrolada de especies reactivas de oxígeno (ROS), rompiendo el equilibrio y generando lo que se llama estrés oxidativo. En este proceso, los ROS intervienen en procesos fisiológicos y patológicos que modifican los ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, proteínas y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, etc.). En el caso de las proteínas, las EROs modifican las cadenas laterales del ácido en los aminoácidos (sobre todo: lisina, arginina, prolina e histidina) resultando la generación de carbonilos libres.<sup>2</sup>

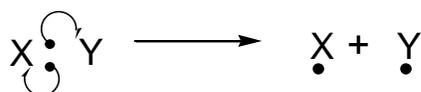
Existen pruebas para determinar las oxidaciones de las diferentes enzimas utilizadas para la valoración del estrés oxidativo; sin embargo, su adquisición es costosa y requieren de aparatos especializados para interpretar los tres resultados, por lo que en este trabajo se implementó la elaboración de reactivos biológicos para la detección de grupos carbonilo a partir de OVA (ovoalbúmina), BSA (albúmina sérica bovina) con la DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) realizando la conjugación del hapteno generando un anti-DNPH que fue probado con la técnica de ELISA.



### 3 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas generadas por el rompimiento homolítico de enlaces, los cuales contienen un electrón desapareado en uno de sus orbitales, proporcionándoles alta inestabilidad y reactividad<sup>3</sup>. (Figura 1).



**Figura 1 Generación de un radical libre.<sup>3</sup>**

En general estos procesos se producen a través de la absorción de radiación ionizante, ultravioleta, visible o térmica; o por reacciones redox tales como las de transferencia de electrones no enzimática, reacciones catalizada por metales o procesos catalizados por enzimas. <sup>4</sup>

Las reacciones en las que están implicados los radicales libres son fundamentales para el normal funcionamiento de un amplio espectro de procesos biológicos. Debido a la presencia generalizada del oxígeno molecular en los organismos aerobios y su capacidad de aceptar fácilmente electrones, las especies reactivas de oxígeno en gran medida median las reacciones en las que se implican un radical libre a nivel celular.

La mitocondria es la principal generadora de radicales libres y, normalmente, el 2% del oxígeno es reducido en forma incompleta al aceptar un menor número de electrones, dando compuestos intermediarios inestables, ROS (especies reactivas de oxígeno). Otras fuentes, del superóxido y el peróxido, son las enzimas oxidativas: como la xantina oxidasa, la acil CoA (Acetil Coenzima A) oxidasa, citocromos P-540, peroximas, y organelos del citosol ricos en oxidasas; estas enzimas se activan en procesos fisiológicos que favorecen la producción de ROS, provocando lesión en las biomoléculas (proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos), generando una variedad de



transformaciones fisiológicas y bioquímicas que llegan a producir deterioro y muerte celular.<sup>4</sup>

### 3.2 Antecedentes históricos

La presencia de radicales libres en materiales biológicos fue descubierto hace más de 110 años. Comenzando con los estudios clásicos de Gomberg<sup>5</sup> (1900) y de Paneth<sup>6</sup> (1929) demostraron la existencia en fase gaseosa de arreglos moleculares, relativamente estables, conteniendo un electrón desapareado en sus órbitas de valencia. Estos arreglos moleculares, productos de la ruptura hemolítica, correspondían a los radicales trifenilmetilo (Fen)<sub>3</sub>-C· y alquilo (R·), para indicar con el punto al electrón desapareado y se denominaron radicales libres. En sus estudios de formación de ácido bromhídrico, a partir de bromo e hidrógeno en fase gaseosa, Rice y Herzfeld<sup>7</sup> (1934) clasificaron las reacciones que involucran la formación de un radical libre en reacciones de iniciación, propagación, inhibición y terminación. La nomenclatura de Rice-Herzfeld se utiliza actualmente en bioquímica, donde se habla de reacciones de propagación o adición y terminación para el proceso de peroxidación lipídica y el efecto de los antioxidantes. En 1939, Leonor Michaelis<sup>8-10</sup> propuso que la oxidación de todas las moléculas orgánicas bivalentes ocurre con la formación de un radical libre intermediario y lo demostró con una titulación, la formación de las benzoquinonas y naftoquinonas. En 1946, Michaelis describió la reducción univalente secuencial del oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con formación de radical superóxido (O<sub>2</sub>·), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y radical hidroxilo (HO·) como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final y de reducción total. (Figura 2.)



Figura 2 Reducción del oxígeno<sup>12</sup>



En 1954, Rebeca Gerschman<sup>11</sup>, publicó “*oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common*”. La hipótesis se basa en el efecto sinérgico del oxígeno hiperbárico y de la radiación X, en la prolongación de vida a la que son sometidos los ratones a oxígeno hiperbárico por tratamiento con radio-protectores conocidos (sustancias con grupos tioles y antioxidantes), esto dio origen a la “*teoría de Gerschman*”, que postulaba:

- a) los radicales libres del oxígeno son el mecanismo común de las toxicidades del oxígeno y de la radiación.
- b) un aumento en la presión parcial de oxígeno o una disminución de la defensa antioxidante llevan igualmente al daño celular y tisular.
- c) la toxicidad del oxígeno es un fenómeno continuo.

Estos postulados no fueron aceptados en su momento, considerando que los radicales libres eran demasiado reactivos y tóxicos para existir en los sistemas biológicos en condiciones fisiológicas.<sup>12</sup> Poco después, Denham Harman<sup>13</sup> y su hipótesis de los radicales de oxígeno, pueden formarse como subproductos de las reacciones enzimáticas en vivo. En 1956, Harman describe que los radicales libres son como una caja de pandora; los males que generan pueden explicar el daño grave celular, mutagénesis, cáncer, y por último el proceso degenerativo de envejecimiento biológico.<sup>14</sup>

La ciencia de los radicales libres en los organismos vivos, entra a una segunda era en 1969 al describir McCord y Fridovich<sup>15</sup> la función de la enzima superóxido dismutasa<sup>14</sup> (SOD) convenciendo a la mayoría de sus colegas que los radicales libres son importantes en la biología. En 1972-73, Boveris y Chance<sup>16,17</sup> describieron la producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las mitocondrias del hígado y corazón, como un proceso fisiológico modulado por las condiciones energéticas de la célula. En 1975-77, Boveris y Cadenas<sup>18-20</sup> identificaron al radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> como precursor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial de una reacción catalizada por la Mn-SOD de la matriz mitocondrial, identificaron a la



reacción de la autoxidación no enzimática de la ubisemiquinona (UQH $\cdot$ ), el intermediario michaeliano univalente de la oxidación del ubiquinol, de la cadena respiratoria mitocondrial, como fuente principal del radical O $_2^-$  en los órganos de los mamíferos. Unos años después, Boveris y Turrens encontraron que la reacción de autoxidación de la flavina semiquinona de la NADH-deshidrogenasa de la cadena respiratoria en una reacción de auto-oxidación análoga a la descrita para la ubisemiquinona como el marcapaso del proceso de envejecimiento en los órganos de los mamíferos, y a la reacción de auto-oxidación de la flavina semiquinona de la NADH-deshidrogenasa como un paso determinante en enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la enfermedad de Parkinson. Estas observaciones, sobre la producción mitocondrial de O $_2^-$ , unificaron los campos de las superóxido dismutasas y de la producción de O $_2^-$  y H $_2$ O $_2$  en las células de mamíferos y abrieron el camino a la aplicación de los conceptos de producción, estados estacionarios y utilización de radicales libres y especies químicas relacionadas en condiciones fisiológicas y patológicas en los órganos de los mamíferos.<sup>12</sup>

Numerosos investigadores se inspiraron en investigar el daño oxidativo causado por los radicales en el DNA, proteínas, lípidos y otros componentes de la célula. Una tercera era se inició con los primeros informes que describen ventajosos efectos biológicos de los radicales libres. Mittal y Murard<sup>21</sup> sugieren que el anión superóxido (O $_2^-$ ), éste derivado del radical hidroxilo, estimula la activación del guanilato ciclasa y la formación del segundo mensajero. Efectos similares fueron reportados para el superóxido derivado del peróxido de hidrógeno. Ignarro, Kadowitz<sup>22</sup>, Moncada<sup>23</sup> y colaboradores descubrieron el rol de óxido nítrico (NO) que es regulador molecular en el control de relajación del músculo liso e inhibición de la adhesión plaquetaria. Roth y Dröge<sup>24</sup> encontraron que el anión superóxido en bajas concentraciones (proveniente del peróxido de hidrógeno) incrementa la producción de interleucina 2 (la cual es un factor de proliferación) en células T. Keyse y Tyrrell<sup>25</sup> mostraron que el peróxido de hidrógeno induce hem-oxigenasa (HO-1). Storz<sup>26</sup> y colaboradores reportaron la inducción de



varios genes en bacterias por acción del peróxido de hidrógeno y Schreck y Baeueller<sup>27</sup> reportaron la activación del factor transcripción, factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) por acción del peróxido de hidrógeno en células de mamíferos<sup>12, 14</sup> (Figura 3)

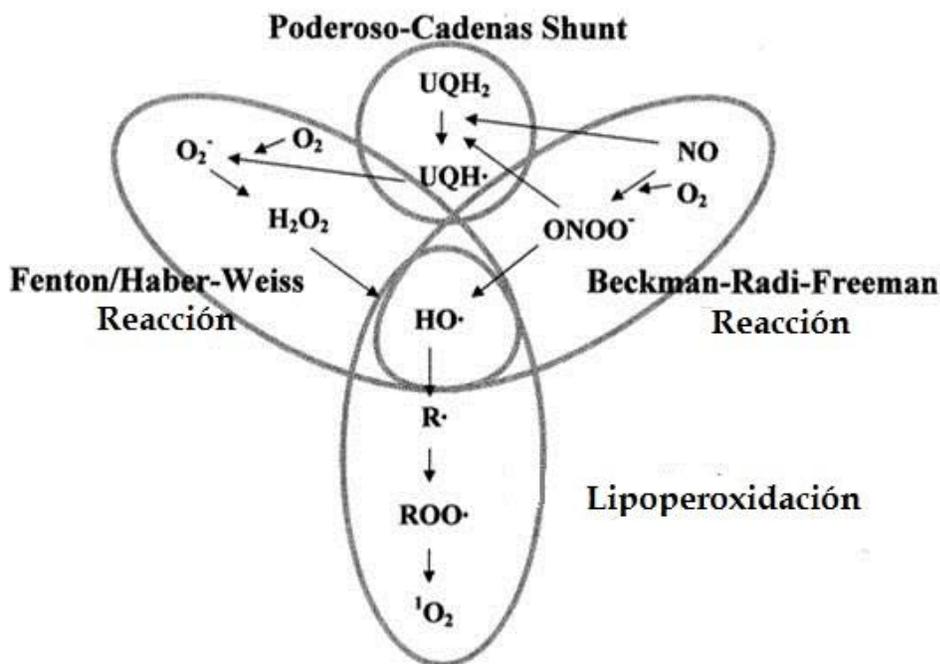


Figura. 3 Esquema de reacciones de radicales libres en los sistemas biológicos<sup>12</sup>

A principios del siglo XXI surgieron una gran cantidad de evidencias mostrando que los organismo vivos no sólo han adaptado a una convivencia hostil con los radicales libres, de hecho, han desarrollado mecanismos para un uso ventajoso de éstos; las funciones fisiológicas que involucran a los radicales libres o sus derivados,



son las siguientes: la detección de la tensión de oxígeno y la regulación de las funciones que son controladas por la concentración de oxígeno, mejora las transducciones de señales de receptores de membrana, incluyendo el receptor de antígeno de linfocitos y las repuestas de estrés oxidativo que aseguren el mantenimiento de la homeostasis redox. El campo de la regulación redox, también está recibiendo una creciente atención de los colegas clínicos en vista del papel que el estrés oxidativo juega en numerosas enfermedades. El delicado equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de los radicales libres sin duda tiene un aspecto importante de la vida. Se ha presentado un amplio crecimiento en la investigación de la “regulación biológica redox” teniendo un gran impacto en diversas disciplinas, como fisiología, biología celular y medicina clínica.<sup>12, 14</sup>

### **3.3 Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

#### **3.3.1 Radical superóxido $O_2^{\cdot-}$**

Es formado por la reducción univalente del estado triplete del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Este proceso se da mediante las enzimas; NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa o de manera no enzimática por reactivos redox compuestos, tales como el compuesto semi-ubiquinona de la cadena de transporte electrónico mitocondrial después el SODs lo convierte enzimáticamente en peróxido de hidrógeno. En tejidos biológicos no se puede convertir enzimáticamente en peróxido de hidrógeno y oxígeno. En presencia de la reducción de metales de transición (ej. iones hierro y cobre) el peróxido de hidrógeno se puede convertir en hidroxilo, que es altamente reactivo. Por otro parte, el peróxido de hidrógeno se convierte en agua por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, en esta reacción el glutatión peroxidasa, se oxida a glutatión disulfuro y transformado en glutatión reductasa en un proceso que consume a la NADPH. Así el peróxido de hidrógeno y óxido nítrico se convierten fácilmente, por las enzimas y reacciones no enzimáticas, en especies reactivas no radicales como el oxígeno no singulete, peróxido de hidrógeno, peroxinitrilo, estas especies pueden dar lugar a nuevos radicales. Actúa,



fundamentalmente como agente reductor donando su electrón extra, también como agente oxidante, aunque de manera más pobre, en cuyo caso es reducido a peróxido de hidrógeno.

Su reactividad química del radical superóxido es alta en disolventes orgánicos, aunque es poco reactivo en soluciones acuosas, lo que permite difundirse lejos de su lugar de formación reaccionando con otras sustancias dentro de la célula y comprometiendo el funcionamiento de la misma. El radical superóxido es producido extracelularmente es capaz de entrar a las células a través de los canales aniónicos transmembrana. Ataca al ADN, fosfolípidos de membrana, polisacáridos, tioles y aminas. Aunque se piensa que la mayoría de sus efectos dañinos derivan de su capacidad para generar radicales libres altamente tóxicos, como el radical hidroxilo, también se le ha implicado en el inicio y en la peroxidación lipídica.<sup>4</sup>

### 3.3.2 Radical hidroperoxilo o dióxido de hidrógeno (H-O-O)

El radical H-O-O es la forma protonada del radical superóxido, más liposoluble. Es un oxidante mucho más potente que el radical superóxido y su vida media es mayor, tiene un papel más importante en la lesión oxidativa de compuestos biológicos. Sin embargo, ha sido implicado en las reacciones de terminación de peroxidación lipídica.<sup>4</sup>

### 3.3.3 Radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno (-OH)

El monóxido de hidrógeno es el estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de tres electrones, también se genera de la reacción Haber-Weiss o en la reacción de Fenton. Otros mecanismos por los que se puede formar radical hidroxilo *in vivo*, independientemente de iones metálicos, es la interacción entre el radical superóxido y el ácido hipocloroso, ambos producidos por neutrófilos activados.

El OH es el oxidante más potente de los sistemas biológicos y el radical libre del oxígeno más reactivo que se conoce, debido a su capacidad de difusión mínima,



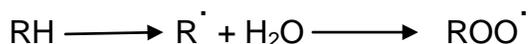
reaccionando allí donde se produce. Se combina rápidamente con moléculas de su alrededor cediendo y captando electrones, poniendo en marcha reacciones en cadena; su vida media es extremadamente corta.

El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son menos reactivos, ya que pueden difundir ciertas distancias desde su lugar de formación, generando radical hidroxilo cuando se encuentra con metales de transición. Reacciona con todas las moléculas conocidas y muy relevante es el daño que produce en el ADN donde induce mutaciones e inactiva las enzimas y las membranas que desencadena la peroxidación lipídica.

En el organismo no existen sistemas de defensa directos para neutralizar al radical hidroxilo.<sup>4</sup>

### 3.3.4 Radical peroxilo ( $\text{ROO}^\cdot$ )

Lo más característico es su formación en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (RH), donde R= radical alquilo.



Posee una capacidad oxidante baja y una menor reactividad en relación con el radical hidroxilo; su vida media es mayor lo que le confiere mayor capacidad de difusión en los sistemas biológicos. Los radicales peroxilo también inician la oxidación de proteínas y carbohidratos.<sup>4</sup>

### 3.3.5 Radical alcoxilo ( $\text{RO}^\cdot$ )

El radical superóxido puede reaccionar con los hidroperóxidos lipídicos y formar radicales alcoxilo; es un radical orgánico, y su reactividad con los lípidos es intermedia entre el radical peroxilo e hidroxilo.<sup>4</sup>



### 3.4 Especies reactivas de oxígeno no radicales

#### 3.4.1 Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )

Es un oxidante y reductor débil, es relativamente estable y poco reactivo en ausencia de iones metálicos; por sí mismo, oxida lentamente la mayoría de las moléculas orgánicas en un medio acuoso, esencialmente los grupos sulfhídrico; puede ser muy tóxico para las células, ya que reaccionando con el radical superóxido (reacción de Haber-Weiss) o en presencia de iones hierro o cobre (reacción de Feton), que actúan como catalizadores, forman radicales altamente reactivos como el radical hidroxilo.

El peróxido de hidrógeno es, además un sustrato de la enzima mieloperoxidasa, que cataliza una reacción en la cual se produce un producto altamente oxidante, como el ácido hipocloroso. El peróxido de hidrógeno se mezcla muy bien con agua y es tratado por el organismo como a la misma, lo que le proporciona gran capacidad de oxidación, atravesando con facilidad las membranas. La base de esto reside en su estado no ionizado y de poca carga.<sup>4</sup>

#### 3.4.2 Oxígeno singulete ( $^1O_2$ )

El oxígeno molecular puede absorber una determinada cantidad de energía (mínimo 23 Kcal/mol), con lo que uno de sus electrones desapareados salta a un orbital de mayor energía e invierte su giro. Esta es una forma reactiva del oxígeno en la que se ha eliminado la restricción cinética que supone tener dos electrones desapareados con giros paralelos, incrementando con esto su capacidad oxidante. Es lo que se denomina oxígeno singulete, del que existen dos formas. El más importante biológicamente es la forma delta ( $^1\Delta_g$ ) la cual tiene dos electrones apareados ocupando el mismo orbital, con el otro orbital vacío, figura 4.

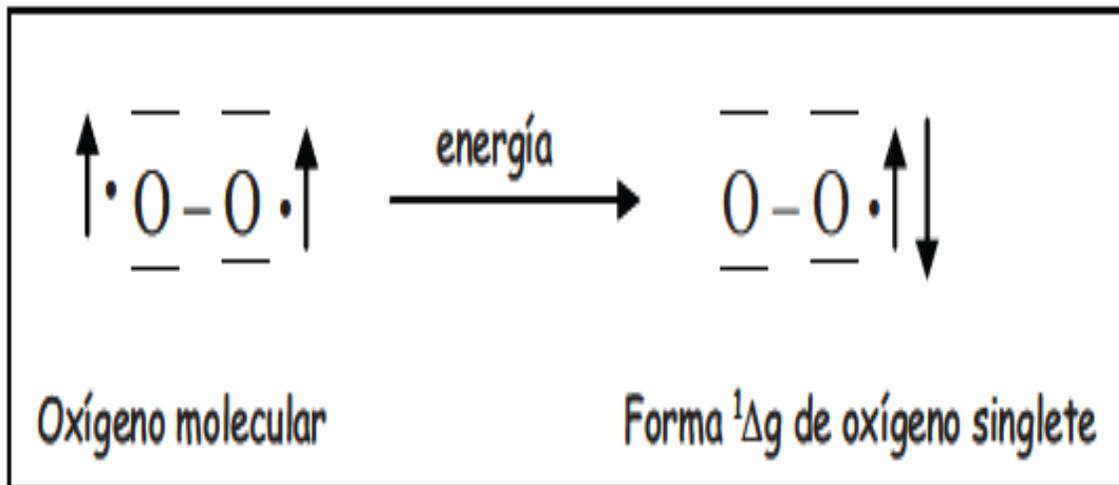


Figura. 4 Transformación del oxígeno<sup>4</sup>

La energía necesaria para que se produzca la reacción anterior la aporta la misma luz visible.

Es un poderoso agente oxidante, muy reactivo su vida media a 37°C es de  $1 \times 10^{-6}$  segundos, el ADN es uno de los lugares donde actúa y también está implicado en la peroxidación lipídica.<sup>4</sup>

### 3.4.3 Ácido hipocloroso (HOCl)



El ácido hipocloroso es el mecanismo de defensa utilizado por los neutrófilos, pero no de los macrófagos, la activación se da por la liberación de mieloperoxidasa al medio extracelular donde cataliza fundamentalmente la oxidación de iones cloro por el peróxido de hidrógeno (formado por la dismutación del radical superóxido generado por la NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana de los neutrófilos) a ácido hipocloroso. Es un agente antibacteriano muy potente, actúa a bajas concentraciones dañando las proteínas de membrana (al oxidar sus grupos sulfhídrico) e impidiendo su



función, mientras que en, altas concentraciones, las células sufren lisis por daño oxidativo generalizado; también puede producir una modificación oxidativa de la superóxido dismutasa perdiendo ésta su actividad.<sup>4</sup>

### 3.5 Metabolismo de los ROS en la mitocondria

El primer radical, generado por la mitocondria, es el ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), de la reducción monoeléctrica del oxígeno ( $O_2$ ), (Figura 5). La cadena de transporte de electrones mitocondrial consume continuamente el  $O_2$  reduciéndolo, formando agua y ganando 4 electrones en esta reacción, generándose una pequeña cantidad del ión superóxido como subproducto. Este ión es bastante reactivo, y se convierte en peróxido de hidrógeno, que es más estable a través de la actividad de la Mn-SOD en la matriz mitocondrial y a través de la Cu, Zn-SOD en el espacio intramembranal. La abundancia de esta enzima, así como su presencia en ambos compartimientos de la mitocondria, da fe de la importancia de la eliminación de los iones superóxido por parte de la mitocondria. En efecto, la mortalidad de animales en los cuales se ha bloqueado la Mn-SOD disminuye notablemente al ser tratados con un mimético de SOD permeable a las membranas.

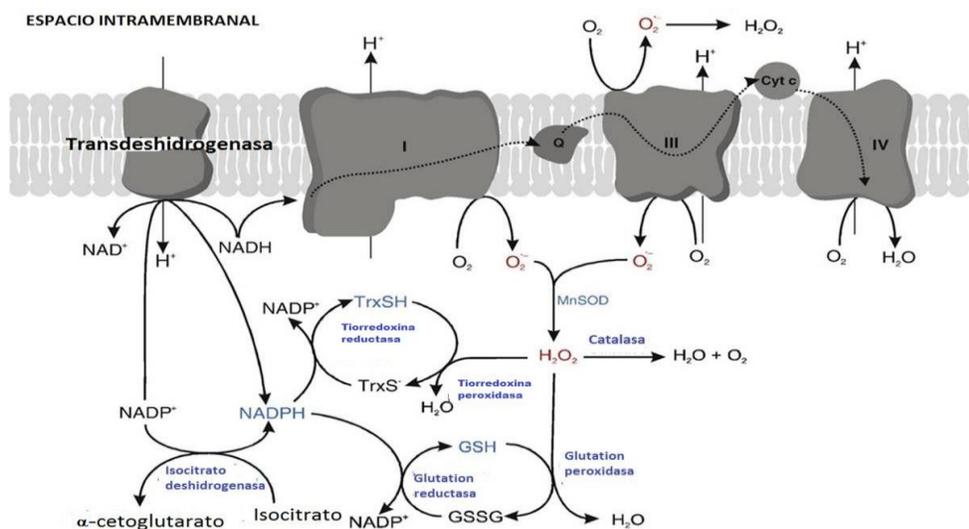


Figura. 5 Metabolismo de las ROS en la mitocondria<sup>28</sup>



El peróxido de hidrógeno generado en la mitocondria tiene muchos destinos posibles, porque el peróxido de hidrógeno es relativamente estable en una membrana-permeable (son transportados por las acuaporinas presentes en la membrana interna mitocondrial) este puede difundirse dentro de la célula y ser removido por los sistemas antioxidantes del citosol, como la catalasa, glutatión peroxidasa, tiorredoxina peroxidasa. La mitocondria genera peróxido de hidrógeno el cual puede también actuar como molécula de señalización en el citosol afectando múltiples redes de control.

La mitocondria presenta eficientes peroxidinas y reductasas asociadas para remover peróxido de hidrógeno. Esto incluye en el sistema mitocondrial glutatión peroxidasa y reductasa, los cuales remueven el peróxido de hidrógeno, usando como fuente un electrón, la reducción del glutatión, y el sistema de la tiorredoxina peroxidasa y reductasa, la cual usa electrones desde la tiorredoxina. Esto ocurre con el citosol equivalente de este sistema, en ambos, la tiorredoxina y glutatión mitocondrial, son reducidos por NADPH. Así los niveles de NADPH están estrechamente relacionados con la capacidad antioxidante mitocondrial.

En la mitocondria, el NADP es reducido en parte por la actividad de la NADPH/NADP transhidrogenasa, cuya función es ser una bomba de protones, usa la respiración para generar gradiente electroquímico de  $H^+$  y desplazar la reacción a la formación NADPH. Esta característica relaciona el acoplamiento de enlace mitocondrial y el potencial de membrana para el potencial redox, por lo tanto, si la mitocondria no está totalmente acoplada o si disminuye el potencial de membrana, la energía de enlace puede ser incapaz de responder rápidamente a los altos niveles de oxidación NADPH y el daño oxidativo puede ocurrir teniendo una menor tasa de eliminación de hidroperóxido. De hecho, las moléculas que oxidan los nucleótidos de piridina aumenta el daño oxidativo el  $Ca^{2+}$  en las mitocondrias, este  $Ca^{2+}$  liberado esta asociado con la permeabilidad mitocondrial, formando a una membrana no selectiva de la mitocondria; esta permeabilización induce severas condiciones, incluyendo el estrés oxidativo.



Cuando no metaboliza el sistema antioxidante mitocondrial, el peróxido de hidrógeno puede generar el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) a través de la reacción metal-catalizador de Fenton, el radical hidroxilo es altamente reactivo se cree que actúa esencialmente dañando la molécula, por esta razón, la mitocondria ha desarrollado un eficiente sistema de eliminación del peróxido de hidrógeno y que es mecanismo de metal-quelación, previniendo la formación de este radical. Experimentos usando quelación de hierro previenen el daño mitocondrial y pérdida de la integridad, necesarias para mejorar la generación de ROS, demostrando que el radical hidroxilo es de las especies que dañan a la mitocondria.

Mitocondria y lisosomas son considerados como los dos organelos subcelulares más importantes que intervienen en el estrés oxidativo, su papel en la apoptosis y envejecimientos son reconocidos de forma general. Las EROs son principalmente productos de la fosforilación oxidativa mitocondrial y se derivan de los radicales superóxido generados durante el transporte de electrones, y los lisosomas que contienen altas concentraciones de hierro redox-activo que pueden catalizar la ruptura homolítica de peróxido de hidrógeno, el cual produce el radical hidroxilo, extremadamente reactivo por la reacción de Fenton. El aparato de Golgi es el núcleo de procesamiento y clasificación de los lípidos y las proteínas en el camino desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática y otros destinos. Cuando se produce el estrés oxidativo, las células contrarrestan el efecto oxidante resultante y restauran el equilibrio redox.<sup>28-29</sup>

### **3.6 Mecanismo de acción de las ROs sobre las proteínas**

El efecto de los ROS sobre una determinada proteína depende de la composición de los aminoácidos, de la importancia y localización de los aminoácidos que median la conformación y actividad de la proteína, así como de la posibilidad de reparación de la lesión. La localización celular de las proteínas y la naturaleza de la amenaza de los ROS también influye sobre el daño proteico.<sup>30</sup> Este daño se realiza sobre los enlaces



insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol, en proteínas ricas de ciertos aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína) pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales a partir de las proteínas agredidas se generan algunos productos como los hidroperóxidos proteícos que son relativamente estables y pueden generar nuevos radicales al reaccionar con metales de transición. Los residuos de aminoácidos azufrados, así como los de lisina e histidina, suelen ser muy susceptibles al daño oxidativo, en los primeros, los grupos sulfhídrido se generan puentes disulfuros que pueden ocasionar el establecimiento de puentes covalentes cruzados entre proteínas o subunidades con formación de agregados, lo que puede producir una inactividad enzimática. En los segundos, se produce su oxidación a grupos aldehídos lo cual, también, puede ocurrir con residuos de aspártico, prolina y arginina, esto da lugar a un incremento de grupos carbonilo en las proteínas agredidas.

La producción de grupos carbonilo impide el cumplimiento de algunas funciones, como transporte iónico de membranas, receptores, mensajeros celulares, y enzimas reguladoras del metabolismo.<sup>4</sup>

En los casos extremos llega a producirse, incluso, la fragmentación de las cadenas polipeptídicas.

Diferentes sistemas han demostrado capacidad de producir daño oxidativo *in vitro*. Se ha observado que el 4-hidroxi-2-nonenal, producto final de la peroxidación lipídica, se une covalentemente a diversas proteínas, estas modificadas por la unión del nonenal muestran gran susceptibilidad de ser ubiquitinadas, estos cambios se han podido demostrar en sistemas *in vivo* donde se ha producido el estrés oxidativo en riñones de animales de experimentación mediante la inyección intraperitoneal de nitrito acetato férrico.

En términos generales, la modificación oxidativa de las proteínas incrementa la degradación y susceptibilidad a la proteólisis, posiblemente por el incremento de su hidrofobicidad. Sin embargo, es necesario considerar que, determinados tipos de



modificaciones pudieran incrementar la resistencia a la proteólisis, lo que conduciría a la acumulación de estas proteínas alteradas dentro de la célula.<sup>33</sup>

### 3.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ha generado gran interés, sobre todo porque es un factor importante en la etiología de las graves patologías, y las especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno están implicadas en las respuestas fisiológicas al estrés, incluyendo la defensa contra agentes infecciosos, la transducción de la señalización celular, la inducción de respuestas mitogénicas, y el mantenimiento del estado redox celular. En las células sanas, ROS/RNS se producen en niveles bajos, y cualquier daño que causan comúnmente se repara, por lo que suele existir un equilibrio con los antioxidantes que limpian ROS/RNS y previenen las lesiones de los tejidos. Sin embargo, cuando la producción de radicales libres o de sus subproductos excede la capacidad de los mecanismos de defensa antioxidante, la formación de ROS/RNS aumenta, lo que daña las moléculas e inicia una cascada de eventos que dan lugar a estrés oxidativo.<sup>29</sup>

Las ROS/RNS se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia, por exposición a determinados agentes externos, como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, etc.

En el año 1956 Harman<sup>13</sup> propuso la teoría de los radicales libres en el envejecimiento, sugiriendo que los radicales libres, producidos durante la respiración aerobia, causan daño oxidativo, que se acumula, y resulta en una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos, en una interferencia de patrones de expresión génica y



pérdida de la capacidad funcional de la célula, lo que conduce al envejecimiento y a la muerte.

La hipótesis del estrés oxidativo en el envejecimiento refiere que el completamiento del programa genético que gobierna la secuencia y duración de varias fases ontogénicas, está ligado al gasto de una suma definida de energía. El nivel de estrés oxidativo depende de la velocidad de generación de oxidantes y de los niveles de defensa antioxidante, los cuales están genéticamente controlados, pero están influenciados también, por factores epigenéticos.

El estrés oxidativo ejerce una influencia reguladora en la expresión génica y es diferente en los distintos estadios del desarrollo.

Durante el desarrollo inducen la expresión de nuevas proteínas o la supresión de determinados genes por lo que es posible que en la fase adulta supriman, también, la expresión de determinados genes. A partir de estas observaciones, Sohal y Allen<sup>33</sup> postularon que el envejecimiento no está gobernado por un programa genético per se, pero que ocurre por la influencia del estrés oxidativo en el programa genético.<sup>32</sup>

Se ha sugerido que el efecto del estrés oxidativo en la expresión génica sea a través de 2 mecanismos:

1. Efecto directo sobre la producción y el procesamiento del RNA
2. Cambios en la distribución iónica de la célula.

Las ROS/RNS puede causar daño oxidativo a las proteínas, los lípidos y el ADN, lo que inhibe las funciones normales de las proteínas y los lípidos y facilita la mutagénesis del DNA, por lo tanto, estas especies juegan un papel fundamental en varias condiciones clínicas.<sup>29</sup>



### 3.8 Anticuerpos

Los anticuerpos son una familia de glucoproteínas conocidas, también, con el nombre de inmunoglobulinas y se encuentran principalmente en el suero; en general, están compuestas de cadenas polipeptídicas que constituyen 82% a 96% del total de la molécula y el 4% a 18% de carbohidrato. Las propiedades biológicas de estos dependen del componente peptídico. Estas proteínas son producidas por las células plasmáticas como producto de un estímulo antigénico. Los anticuerpos funcionan como receptor para el antígeno cuando se encuentran en la superficie de los linfocitos B y su principal función es unirse de forma específica a un antígeno determinado facilitando su eliminación del organismo. Los anticuerpos tienen como estructura fundamental dos cadenas ligeras (L) idénticas entre sí de aproximadamente 220 aminoácidos de longitud y 25 kDa de peso molecular y dos cadenas pesadas (H) idénticas entre sí, de aproximadamente 440 aminoácidos de longitud y 50 kDa de peso molecular; en conjunto, constituyen el monómero de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras y pesadas tienen una región constante (C) y una variable (V). La cadena pesada tiene de cuatro a cinco dominios con un puente disulfuro intracadena cada uno, denominados del amino al carboxilo terminal: VH, CH1, CH2, CH3 y CH4. Las cadenas ligeras tienen dos dominios (VL y CL) y se unen con las cadenas pesadas (y éstas entre sí) mediante puentes disulfuro. El número de puentes disulfuro entre cadenas pesadas varía con cada isotipo. La secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras (dominios VH y VL) determinan la especificidad de un anticuerpo y las regiones complementarias entre ellas forman el sitio de unión entre el anticuerpo y su epítipo. En los seres humanos existen cinco clases o isotipos principales de cadenas pesadas:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y dos de cadenas ligeras:  $\kappa$  y  $\lambda$ . Las inmunoglobulinas formadas por cada uno de estos tipos de cadenas pesadas se conocen como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE respectivamente, y pueden asociarse a cualquiera de los dos tipos de cadenas ligeras, figura 6.

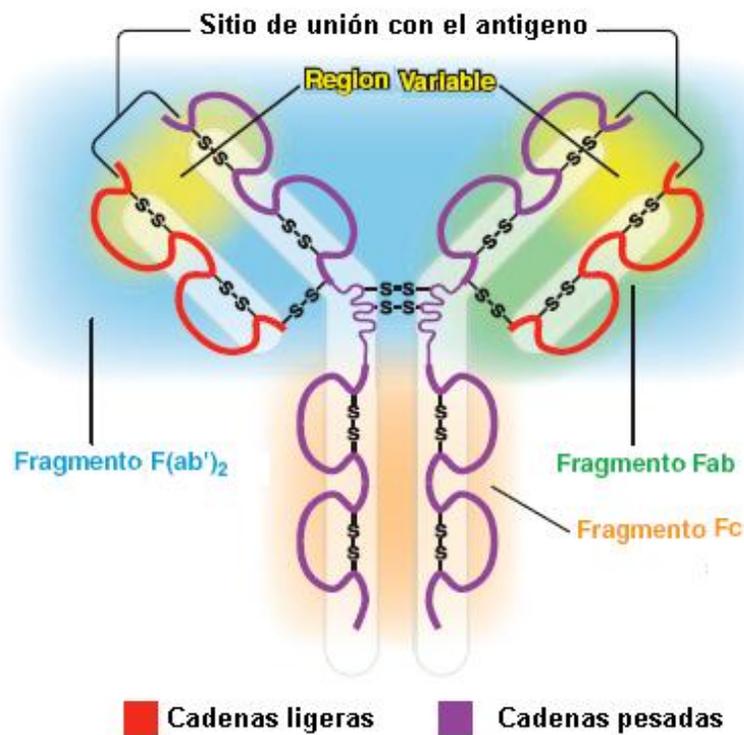


Figura 6 Estructura de un anticuerpo<sup>40</sup>

Cuando se corta una molécula de inmunoglobulina con distintas proteasas vegetales (pepsina, papaína), los fragmentos resultantes muestran que en los anticuerpos existen dos sitios funcionales. Los extremos amino-terminales (dos por monómero de inmunoglobulina) tienen una cadena ligera y la mitad de una pesada, se unen al antígeno en forma monovalente y se denominan Fab por sus siglas en inglés (fragment antigen-binding) que contiene el sitio que reacciona con los antígenos. La región hipervariable corresponde a tres sitios en ambos dominios, cuya secuencia de aminoácidos cambia notablemente más que en el resto de la región. Los tres sitios están formados por secuencias no lineales que en la estructura terciaria quedan adyacentes y forman el sitio activo del anticuerpo, ésta es la parte que determina la especificidad y la heterogeneidad de los anticuerpos. El fragmento cristalizante (Fc), que contiene la mitad de carboxilo terminal de las dos cadenas pesadas y que no se une al antígeno, es responsable de las funciones biológicas de los anticuerpos, como



su capacidad de unirse a receptores en la superficie celular y la activación del sistema del complemento.<sup>33, 34,35,36</sup>

### 3.9 Antígeno

El término antígeno se emplea de dos formas:

- Una sustancia que al ser inoculada en un animal induce la producción de anticuerpos
- Una sustancia que tiene la propiedad de interactuar con el sitio activo de los anticuerpos, es decir: que tiene especificidad antigénica.

Las moléculas capaces de generar una respuesta inmune (RI) llamado inmunógeno, permite describir este aspecto de la antigenicidad de una sustancia. El término antigenicidad define dos propiedades de una sustancia: inmunogenicidad y su especificidad antigénica. En un antígeno, dado sólo en conjunto ciertas áreas, llamadas determinantes antigénicos o epítomos, son los que determinan estas propiedades de inmunogenicidad y especificidad antigénica.<sup>34</sup>

#### 3.9.1 Determinante antigénico (DA) o Epítopo

Cuando un anticuerpo reacciona con su antígeno, la interacción se efectúa exclusivamente entre el sitio activo del anticuerpo o parátipo y una porción discreta del antígeno determinante antigénico ó epítopo.

*Los DA secuenciales o continuos*, son sólo accesibles al anticuerpo, si se encuentran en la superficie de la proteína. Sin embargo, cuando la proteína se encuentra en su estado nativo la mayoría de estos determinantes no son accesibles al anticuerpo. Un epítopo puede estar formado por la siguiente secuencia de cinco aminoácidos (aa): alanina-tirosina-lisina-glicina-glutámico, y puede existir otro epítopo secuencial constituido con los mismos aa pero con secuencia diferente: lisina-tirosina-alanina-glutámico-glicina.



Los linfocitos B son capaces de reconocer epítomos conformacionales, mientras que los linfocitos T sólo reconocen epítomos secuenciales. Otra diferencia, en el reconocimiento de los antígenos por estas células, es el receptor de la célula B que reconoce haptenos y el receptor de células T (TCR) no lo hace. De acuerdo con Michael Sela<sup>39,40</sup> los DA o epítomos se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Secuenciales o continuos
- Ocultos
- Inmunodominantes
- Conformacionales o discontinuos
- Neoantígenos

Cada epítomo estimulará a una clona diferente de linfocitos B. Un epítomo secuencial para linfocitos B está formado en general por cuatro o seis aa. Para el caso de los linfocitos T, éstos reconocen epítomos secuenciales de tamaño variable; los linfocitos T citotóxicos (Tc) reconocen péptidos de siete a nueve aminoácidos y los linfocitos T cooperadores (Th) reconocen de doce a veinte aa.

*Un epítomo oculto*, como su nombre lo indica, no se encuentra accesible y sólo funciona como tal cuando el antígeno, generalmente una proteína, sufre un cambio en su estructura tridimensional, es decir, un cambio conformacional.

*Un DA o epítomo inmunodominante* es aquel reconocido por la mayoría de los individuos inmunizados con un inmunógeno que contiene varios epítomos.

*Los DA conformacionales o discontinuos*: la mayoría de estos epítomos sobre la superficie de la estructura proteica están formados por aminoácidos separados en la secuencia, pero se encuentran próximos en el espacio, debido a que dependen de la estructura tridimensional de las macromoléculas; así, en una proteína, están representados por segmentos alejados dentro de la molécula, que, debido a su



estructura terciaria (el superenrollamiento), dichos segmentos interaccionan. Estos son importantes: un ejemplo son las vacunas, ya que la protección de éstas depende de la generación del anticuerpo contra epítomos conformacionales, es posible que esta protección no se induzca si los epítomos conformacionales desaparecen a consecuencia de la desnaturalización de las proteínas que forman las vacunas.<sup>41</sup>

*Los neoantígenos*, son originados por modificaciones covalentes (fosforilaciones, proteólisis) del antígeno original.<sup>39</sup>

### 3.9.2 Clasificación de los antígenos

Existen varias clasificaciones de los antígenos que serán analizadas posteriormente; Sela sugirió una clasificación sencilla:

- *Antígenos naturales*: se encuentran libres en la naturaleza; provienen de diversas fuentes, como microorganismos, células de otros individuos o de animales, alimentos, artrópodos, pólenes, etcétera.
- *Antígenos artificiales*: son el resultado de la unión de una proteína inmunógena con haptenos. Se utilizan en experimentación y diagnóstico.

Estas uniones también se pueden producir *in vivo*. Por ejemplo: el conjugado que elaboramos (OVA-DNP o BSA-DNP).

- *Antígenos sintéticos*: son aquellos que se construyen a partir de monómeros en el laboratorio, estos polipéptidos son sintetizados en condiciones controladas, se puede diseñar o preparar como el investigador lo proponga. Este tipo de antígeno permitió entender muchos de los fenómenos de inmunogenicidad, así como preparar las primeras vacunas semisintéticas o sintéticas.<sup>42</sup>



### 3.9.3 Vías de administración y dosis de antígeno

La dosis óptima de un antígeno para lograr una RI, generalmente se determina de forma experimental, empleando diferentes dosis y midiendo el título del anticuerpo generado. Dosis bajas de antígenos inducen la formación de bajas cantidades de anticuerpos, pero de este modo, estos anticuerpos son de gran afinidad y tienen una alta especificidad para el antígeno. Incluyen las clases de anticuerpos responsables de la hipersensibilidad inmediata (Ig E en el hombre y IgG1 en el cobayo).

La administración de bajas dosis de antígeno estimulan de preferencia las células T, de ahí la posibilidad de inducir una RI a dosis que no provocan una producción de anticuerpos evidenciables y la posible obtención de una inmunidad mediada por células sin anticuerpos circundantes.<sup>22</sup> Dosis intermedias del antígeno generan RI; cuando se emplean dosis excesivas también se genera tolerancia. Es importante enfatizar que, en general, una sola dosis de antígeno no produce una respuesta fuerte y, por lo tanto, para alcanzar una RI óptima, es indispensable inmunizar varias veces. En el caso de los animales se repiten las inoculaciones espaciándolas una o dos semanas; en el ser humano varían con el tipo de vacuna. Estas dosis repetidas se conocen con el nombre de refuerzos. Todos los antígenos experimentales se administran por vía parenteral, que se refiere a cualquiera que no sea oral. Las rutas más comunes de administración son: la vía intravenosa (IV), la intradérmica (ID), la subcutánea (SC), la intramuscular (IM) y la intraperitoneal (IP). La ruta de inmunización tiene influencia directa sobre el órgano linfóide secundario al que llegará el antígeno y por lo mismo, el tipo de respuesta que se generará. Aquellos antígenos que se inoculan por la vía IV llegarán rápidamente al bazo (tal vez de forma inmediata). Los que son inoculados por las otras vías, permitirán que el antígeno sea transportado a los ganglios linfáticos drenantes más cercanos. Las diferentes estirpes de linfocitos que pueblan estos órganos serán las causantes de las diferentes respuestas generadas<sup>38</sup>.



### 3.10 Antígenos protéicos

Todos los polipéptidos de peso molecular suficiente (como regla general superior a 1000 dáltones) y sin excepción todas las proteínas, son inmunogénicos, pero en grados diversos. De acuerdo con la intensidad de la respuesta inmunitaria inducida, se habla de antígenos fuertes o débiles; por lo común, las albúminas son antígenos fuertes y los polipéptidos antígenos débiles. La modificación de las proteínas por tratamientos físicos (como el calor) o químicos, que provocan cambios de conformación, pueden en algunos casos (aunque no en muchos) modificar o reducir la inmunogenicidad. La hidrólisis enzimática también puede afectar, en grados diversos, a la inmunogenicidad de una proteína. En contraste, el formaldehído que provoca la abolición de las actividades biológicas de las proteínas, notablemente la de las toxinas proteicas (las transforma en anatoxinas), no modifica su inmunogenicidad.<sup>42</sup>

#### 3.10.1 Albúmina

La albúmina es una de las proteínas ampliamente estudiada y la más abundante de las proteínas en el plasma, alcanzando a una concentración de 5g /100 mL. Se han reportado diversos estudios de la estructura y las propiedades de esta, sus interacciones con otras proteínas; con el fin de entender cómo afecta su funcionalidad.

La albúmina es considerada como albúmina de suero o albúmina plasmática (se debe tener cuidado de distinguir la albúmina, que se refiere a la clara de huevo, albúmina o albúmina de suero. La albúmina es la proteína más abundante en el sistema circulatorio y contribuye en un 80% a la presión osmótica coloidal de la sangre, se ha determinado que la albúmina sérica es la principal responsable del mantenimiento del pH en la sangre. En los mamíferos, la albúmina se sintetiza inicialmente como señal preproalbúmina en el hígado, (Figura 7) después se elimina el péptido, la proalbúmina resultante es procesada por el propéptido de seis residuos de la nueva cadena N-terminal. La albumina liberada en torrente sanguíneo tiene una vida media de 19 días.<sup>43</sup>

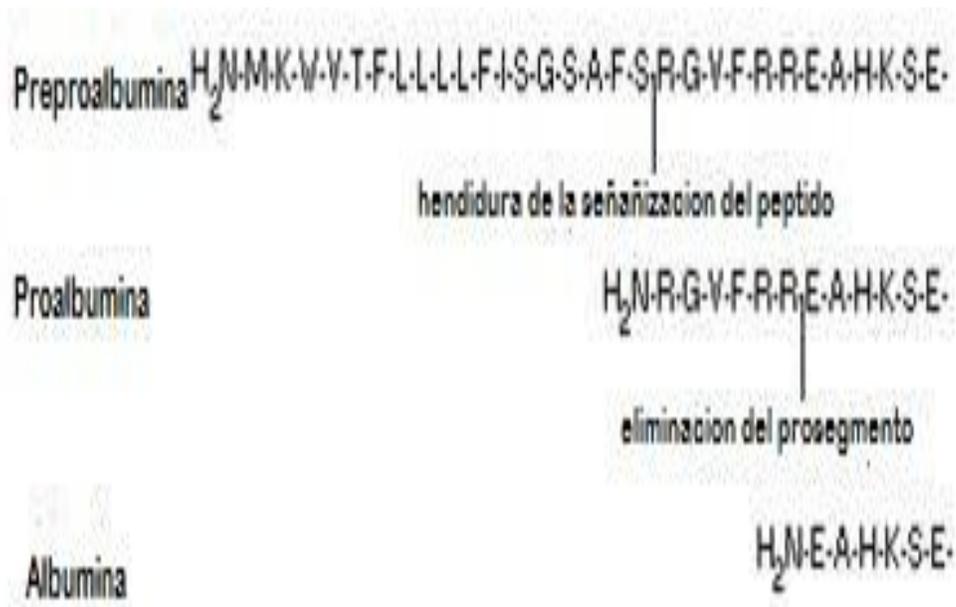


Figura. 7 Etapas de la formación de la albumina<sup>43</sup>

### 3.10.2 Ovoalbúmina (OVA)

Es la principal proteína de la clara del huevo, representa el 60% del total de proteínas, así como la seroalbúmina del plasma sanguíneo, con la cual se puede comparar. Se encuentra, además, en la sangre de las gallinas ponedoras (aunque no en los machos ni en las hembras de aves no ponedoras), sin embargo, no es holoproteína; está ligeramente fosforilada, 0.13% de fósforo y contiene ocho residuos de glúcidos por molécula de 46.000 daltons. Cabe destacar que la ovoalbúmina contiene manosa y glucosamina en un solo bloque, pero no contiene ácido neuramínico, figura 8.



**Figura. 8 Estructura de la Ovoalbúmina**

La composición en aminoácidos de esta proteína es notablemente equilibrada. Sólo un aminoácido se encuentra en una concentración superior al 10% (Glu: 14%) y ninguno en una concentración menor al 1.3%. Contiene 20 residuos de lisina, 14 ácido aspártico, y 33 de ácido glutámico para conjugación. Es una sola cadena peptídica con un punto isoeléctrico de 4.6. La media de esto es de 400 residuos y son hidrofóbicos. Esta se desnaturaliza<sup>41</sup> sobre 56°C.

La estructura espacial de la molécula ha sido difícil de determinar, sobre todo por el hecho de dar reacciones negativas con los reactivos de los grupos terminales (derivados dinitrofenílicos para los N- y carboxilasa para los C-terminales). De hecho, el grupo C-terminal corresponde a la prolina y el grupo N-terminal a una glicina N-acetilada. En el momento de la puesta existen seis residuos de cisteína y un único



puente disulfuro, pero en el curso de la conservación del huevo aumenta el número de puentes disulfuro; se forma la S-ovoalbúmina que es más termoestable que la proteína nativa, ya que se desnaturaliza de 76-80°C aproximadamente.

La ovoalbúmina tiene propiedades gelificantes y espumantes que se utilizan en la práctica. Estas propiedades, sin embargo, dependen del estado de la proteína y así se reducen a medida que aumenta la proporción de S-ovoalbúmina.

La proteólisis de la ovoalbúmina por la subtilisina es destacable como ejemplo, de proteólisis limitada. Esta enzima forma teóricamente varias uniones, pero en este caso deben estar protegidas. En primer lugar se produce una ruptura de la unión Ala-Ser, sin ruptura de la molécula en dos partes (debido a la existencia del puente S-S), seguidamente se liberan, sucesivamente, un dipéptido y un pentapéptido y es entonces cuando se forma la 2-placalbúmina.<sup>43</sup>

### **3.10.3 Albúmina Sérica Bovina (BSA)**

En 1970, se determinó la secuencia completa de aminoácidos de la albúmina por medios químicos, siendo de 585 residuos para la humana y de 583 para la bovina respectivamente.

Se caracteriza por un bajo contenido de triptófano y metionina y un alto contenido en cisteína y la presencia de aminoácidos cargados como: ácido aspártico, glutámico, lisina y arginina. El contenido de glicina e isoleucina del BSA es más bajo que en la media general de otras proteínas, (Tabla 1).



Ala 48	Cys 35	Asp 41	Glu 58
Phe 30	Gly 17	His 16	Ile 15
Lys 60	Leu 65	Met 5	Asn 14
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Ser 32
Thr 34	Val 38	Trp 3	Tyr 21

**Tabla. 1 de composición de aminoácidos de BSA<sup>49</sup>**

Debido a su amplia disponibilidad, alta solubilidad y elevados sitios de acoplamiento es muy popular como vehículo de compuestos antigénicos.

Su peso molecular es de 67,000 Da y tiene 59 residuos de lisina, que proporciona aminas primarias útiles para la conjugación.<sup>44</sup>

#### **3.10.3.1 Estructura primaria, secundaria y terciaria**

La estructura de BSA se compone de tres dominios homólogos (I, II, III) que se dividen en nueve ciclos (L1-L9) por 17 puentes disulfuro, como se observa en la figura 9.

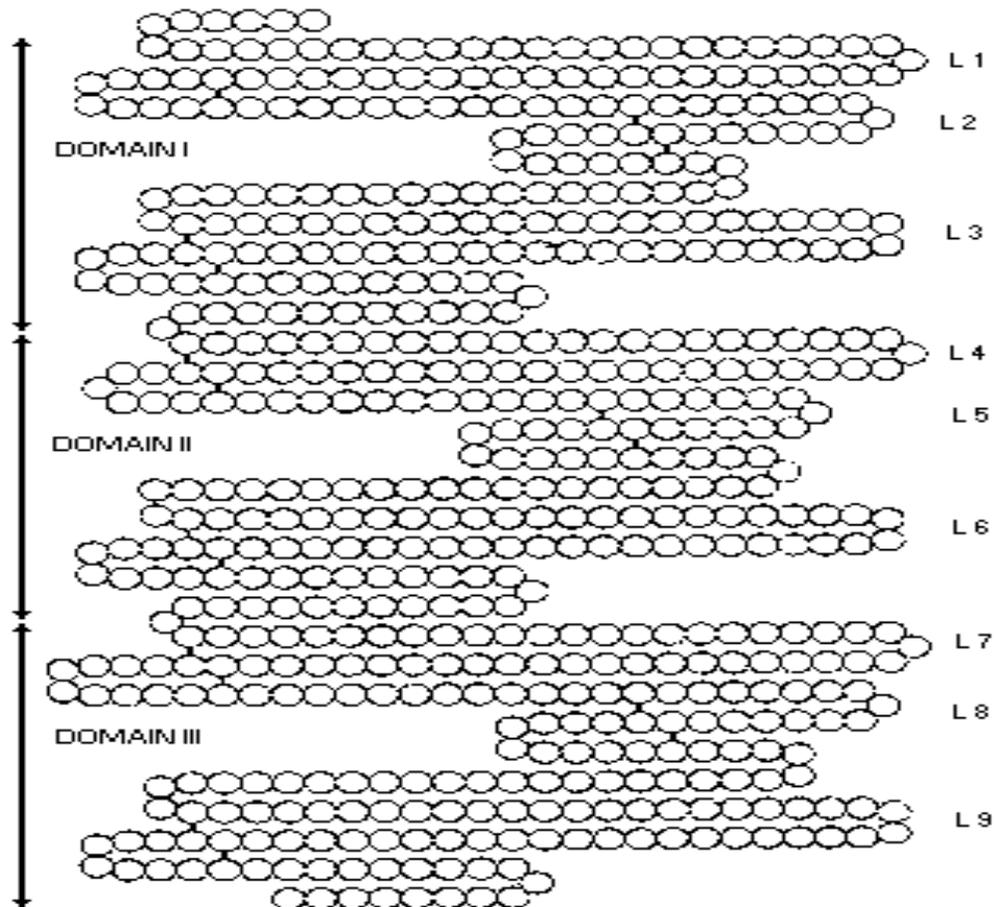
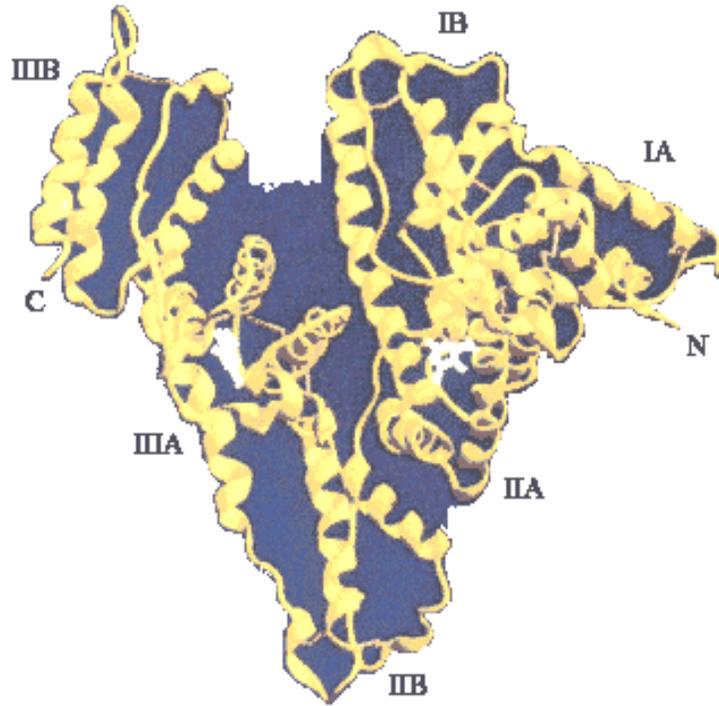


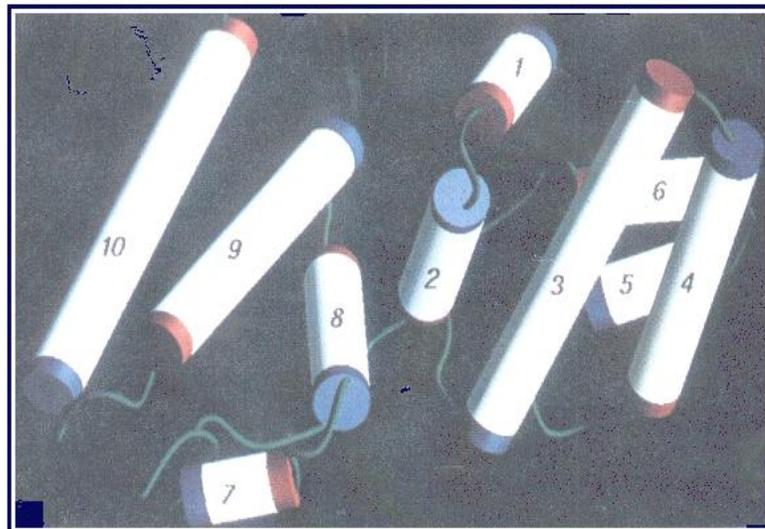
Figura. 9 Estructura de los ciclos del BSA<sup>47</sup>

Los bucles en cada dominio se componen de una secuencia de grandes-pequeños-grandes que forman un triplete. Cada dominio, a su vez, es el producto de subdominios (IA, IB.....), la estructura primaria de la albúmina es inusual entre las proteínas extracelulares en la posición de un solo sulfhídrido (Cys-34) del grupo. En rayos X es predominante una estructura alfa-helicoidal (67%) como se muestra en la figura 10.



**Figura.10 Estructura de los subdominios del BSA<sup>24</sup>**

Cada uno de los dominios puede ser dividido en diez segmentos helicoidales, del 1-6 para el subdominio A y 7-10 para el subdominio B, como se aprecia en la figura 11.



**Figura. 11 Segmentos de los subdominios de la BSA<sup>21</sup>**



El motivo para el subdominio A figura 12 el de la izquierda y para el subdominio B el de la derecha

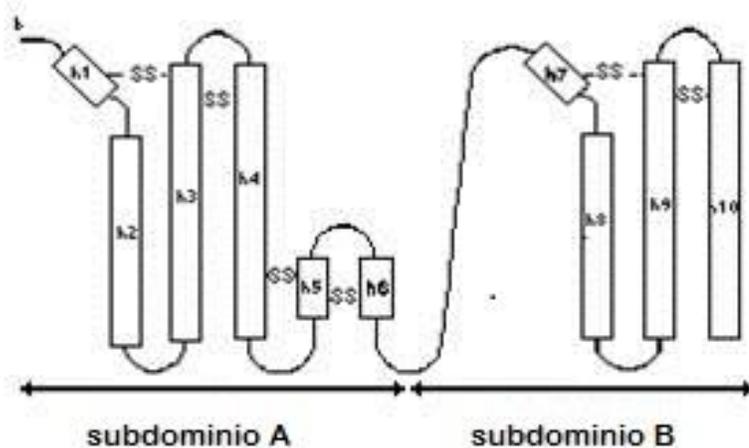


Figura. 12 Subdominio A y subdominio B<sup>24</sup>

Los dominios I y II y los dominios II y III están conectados a través de extensiones helicoidales de 10 (I) - 1 (II) y 10 (II) - 1 (III), la creación de las dos hélices más largas de la albúmina.

#### 3.10.4 Propiedades fisicoquímicas

La albúmina no es uniformemente cargada dentro de la estructura primaria. A pH neutro, se calculó una carga neta de -10, -8 y 0 para los dominios I, II y III de la albúmina sérica bovina. Tiene una viscosidad intrínseca de 3.7 a 4.2 gr/mL, reportes del aumento de la viscosidad con el aumento de división de los enlaces disulfuro de la



BSA. La viscosidad de soluciones de BSA aumenta linealmente con la concentración de hasta 65 mg por mL y de manera exponencial en concentraciones más altas.<sup>42-45</sup>

### 3.11 Factores que controlan la antigenicidad e inmunogenicidad

#### 3.11.1 Naturaleza química

Hasta el momento, ninguna sustancia inorgánica es capaz de activar a los linfocitos a través de sus receptores y nunca se han producido respuestas inmunes contra ellas; por lo tanto, sólo las moléculas orgánicas son capaces de estimular a los linfocitos a través de sus receptores, capacidad que indudablemente tienen bases evolutivas, puesto que son las sustancias orgánicas y no las inorgánicas las que presentan un mayor peligro a la integridad de un organismo. De las moléculas orgánicas, las proteínas fueron las primeras que se identificaron como antigénicas, seguidas de los polisacáridos y finalmente, los lípidos, los ácidos nucleicos, y las combinaciones de todas estas macromoléculas: glucoproteínas, lipoproteínas y glucolípidos

#### 3.11.2 Extrañeza

Bajo condiciones normales, un organismo responde inmunológicamente sólo a sustancias ajenas o extrañas y, cuanto más alejada filogenéticamente sea la sustancia,

mejor será la respuesta. Es por esto que las moléculas de microorganismos son excelentes inmunógenos en los humanos. El concepto de extrañeza se refiere a dos situaciones, a saber:

- Cuando la sustancia es extraña debido a que no se encuentra en el organismo un ejemplo: es el caso de un polisacárido de *Mycobacterium tuberculosis* o de *Nocardia asteroides*.



- Cuando una proteína filogenéticamente conservada se emplea como un antígeno, por ejemplo: Las colágenas que son prácticamente idénticas entre las diferentes especies, por lo que la respuesta inmunológica (RI) que se genere será muy pobre.<sup>42</sup>

### 3.11.3 Complejidad química

Entre mayor complejidad presente una molécula, mayor será su capacidad antigénica. Un péptido sintético, que usa como único bloque de construcción un solo aminoácido (aa), no será inmunógeno, sin embargo, el uso de un segundo aa diferente, para generar un heteropolímero, lo hará inmunógeno. Como regla general, un buen antígeno debe estar compuesto por diferentes bloques de construcción.<sup>42</sup>

### 3.11.4 Peso molecular

Para las proteínas, se considera necesario que tengan un peso molecular (PM)  $\geq$  10 kilodaltones (kDa) para ser inmunógenas; conforme el PM de una proteína aumenta, su complejidad aumenta y más inmunógena será.<sup>42</sup>

### 3.11.5 Conformación estérica

La conformación en el espacio de las proteínas es importante para su especificidad antigénica, ya que proteínas desnaturalizadas tienen una reacción pobre con anticuerpos generados contra moléculas nativas<sup>42</sup> (no desnaturalizadas).

### 3.11.6 Carga

La carga no es requerimiento para la inmunogenicidad, ya que no afecta la cantidad de anticuerpos producido; sin embargo, moléculas cargadas excesivamente son poco inmunogénicas.<sup>42</sup>



### 3.11.7 Presencia de grupos rígidos

En el caso de las proteínas, los grupos rígidos están representados por los aminoácidos llamados aromáticos (todos ellos son cíclicos), como la tirosina, la fenilalanina y el triptófano.<sup>42</sup>

### 3.11.8 Configuración óptica

Se encontró que los polímeros de D-aminoácidos son menos inmunógenos que sus correspondientes isómeros L. La poca inmunogenicidad de los polímeros D se debe a que no hay un completo catabolismo de estas moléculas por parte de las células de los animales que son inmunizados, lo que evita un procesamiento adecuado del antígeno.

Las tres características descritas anteriormente son intrínsecas de los inmunógenos, pero existe otra serie de factores que también son relevantes, como la vía de inoculación, la dosis del antígeno, el número de veces que se inocula el inmunógeno, la edad del individuo receptor y su constitución genética. A continuación se describen estos conceptos.<sup>42</sup>

## 3.12 Naturaleza de los enlaces formados entre antígenos y anticuerpos

Muchas veces una molécula de anticuerpo determinada puede unirse a más de un antígeno y viceversa –un determinado antígeno puede ser reconocido por más de una molécula de anticuerpo-. El hecho de que un anticuerpo concreto pueda interactuar con varios antígenos distintos implica que el anticuerpo en cuestión es específico para ellos. Sin embargo, esto no supone que el anticuerpo se una con la misma fuerza a cada uno de ellos. La fuerza de interacción antígeno-anticuerpo se conoce como **afinidad** de esa unión, y es debida a la suma de todas las fuerzas de atracción y



repulsión, implicadas en dicha interacción. La unión de anticuerpo y antígeno se lleva a cabo por múltiples contactos no covalentes (que dependen en gran medida de la distancia de los grupos que interaccionan) entre el propio antígeno y distintos aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo. Estas fuerzas son, de la más débil a la más fuerte: **punto de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas**. Todas ellas son débiles en comparación con las interacciones de tipo covalente, pero tienen carácter cooperativo. De este modo, la existencia de múltiples interacciones débiles genera una considerable energía de enlace. En general, se puede decir que las interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals se relacionan de forma directa con la complementariedad espacial entre la molécula de antígeno y el sitio de unión del anticuerpo, y que las interacciones electrostáticas y los de puentes de hidrógeno dirigen las características específicas (interacciones muy localizadas entre un aminoácido del antígeno y otro del anticuerpo) que subyacen a la complementariedad de la unión.

Existen moléculas formadas, en parte o en su totalidad, por repetición de una unidad monomérica, lo que implica la existencia de más de un determinante antigénico por molécula. Este tipo de antígenos se dice que se comporta de una forma multivalente y puede interaccionar con varios sitios de unión a antígeno de un mismo anticuerpo o con varios anticuerpos diferentes. Cuando se producen interacciones entre antígenos y anticuerpos multivalentes la fuerza de unión entre ambos es mayor que la simple suma de las afinidades de cada uno de los sitios de unión del anticuerpo al antígeno. Esta fuerza de unión de antígeno- anticuerpo multivalentes se conoce como **avidéz**, y su intensidad es explicable si se tiene en cuenta, que en este tipo de interacciones han de romperse de forma simultánea todos los contactos antígeno-anticuerpo, para conseguir la disociación total del complejo.



Esto implica que las moléculas de anticuerpo de baja afinidad pueden, a pesar de todo, unirse fuertemente al antígeno, ya que muchas interacciones de baja afinidad pueden dar lugar a una interacción de gran avidéz (en el caso de la IgM pentamérica).<sup>36</sup>

### 3.13 Haptenos

El término fue introducido por Landsteiner<sup>46</sup> en 1921 en relación al extracto alcohólico de riñón de caballo, no inmunogénico por sí mismo en el conejo, pero capaz de combinarse con los anticuerpos obtenidos por inmunización de conejos mediante tejido renal triturado. Sin embargo, el extracto alcohólico demostró ser capaz de provocar la producción de anticuerpos después del acoplamiento covalente con un portador.<sup>42</sup> Es un grupo de sustancias, por lo general, de bajo peso molecular, que no son inmunogénicas por sí mismas; cuando se inocula en animales inmucompetentes no son capaces por si solas de inducir una respuesta inmunitaria.<sup>41</sup> Cuando estos se unen covalentemente a proteínas o a otros acarreadores macromoleculares, se producen antígenos conjugados, en donde los haptenos insertados constituyen nuevos determinantes antigénicos de la molécula acarreadora.<sup>38</sup> El conjugado resultante es usualmente inmunogénico, así que entre los anticuerpos producidos contra el conjugado, hay anticuerpos dirigidos contra el hapteno y anticuerpos dirigidos contra los determinantes antigénicos propios del acarreador.

#### 3.13.1 Selección del portador

Las proteínas casi siempre son los portadores que se emplean. Son de fácil preparación en grandes cantidades, muy solubles en agua, resistentes relativamente bien a la desnaturalización y son muy inmunogénicas. Esta última cualidad no es primordial, puesto que pueden utilizar portadores autólogos no inmunogénicos ante los cuales no hay respuesta inmunitaria. De los portadores proteicos más empleados, cabe mencionar las albúminas y las gammaglobulinas xenogénicas. Los portadores particulares, tales como los eritrocitos y los bacteriófagos, también pueden emplearse,



pero de esta manera los sitios portadores están muy mal definidos. El grado de sustitución, que se define por el número de moléculas de hapteno fijas por moléculas de portador, es un parámetro crítico para la obtención de un buen efecto portador. Para seroalbúmina, Landsteiner observó que el efecto máximo se obtenía con 10 grupos hapténicos por moléculas de portador.

De los demás portadores utilizables, conviene señalar los copolímeros sintéticos de aminoácidos y las partículas de agarosa (sefarosa 2B activada por el bromuro de cianógeno, y las sefarosas CH y AH portadoras de funciones COOH y NH<sub>2</sub>, que están formadas por cadenas polisacáridas de galactosa). Esas partículas se utilizan para la fabricación de inmunoabsorbentes.<sup>42</sup>

### 3.14 Técnicas de acoplamiento

La fijación de los haptenos se realiza sobre los grupos reactivos (NH<sub>2</sub>, COOH y SH) sobre ciertos átomos de carbono de las cadenas laterales de las proteínas, por lo general a nivel de la lisina y de los aminoácidos aromáticos o heterocíclicos. La regla es que el acoplamiento se realice por intermedio de agentes de conjugación que unen, mediante una unión covalente estable, el hapteno a uno o varios grupos reactivos, idénticos o no del portador. La elección de la técnica depende básicamente de la naturaleza de los grupos funcionales, presentes sobre la molécula de hapteno.

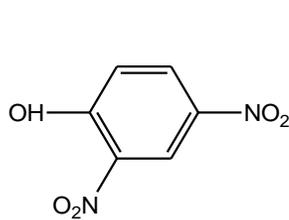
A continuación se verán a detalle las principales técnicas. En efecto, tiene numerosas aplicaciones en inmunología, aun fuera de la preparación de los conjugados hapteno-portador.<sup>41</sup>

#### 3.14.1 Fijación directa

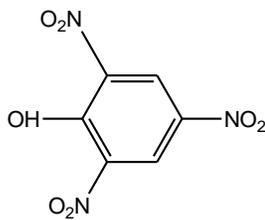
Los derivados nitrofenilados se fijan directamente de manera covalente a proteínas por sustitución nucleofílica sobre el grupo ε-NH<sub>2</sub> de la lisina ó α-NH<sub>2</sub> del aa terminal, y también sobre los grupos SH de la cisteína. El dinitrofenol (DNP) o el



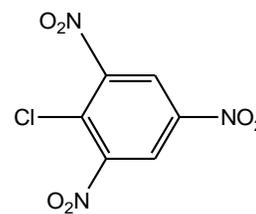
trinitrofenol (TNP) se pueden fijar de esta manera sobre gammaglobulinas o albúmina. De la misma manera, el cloruro de picrilo se fija directamente sobre las proteínas de la piel y da lugar a reacciones de hipersensibilidad retardada:



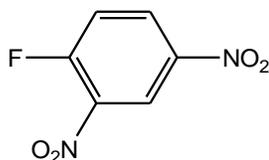
Dinitrofenol (DNP)



trinitrofenol(TNP)



cloruro de picrilo



Fluoro 2-4 dinitrobenzene

Los halógenos que tienen afinidad con los núcleos benzílicos, se pueden fijar sobre residuos tirosina de las proteínas y en menor grado, sobre la histidina y la cisteína. El yodo es el que más se emplea, puesto que es más débilmente electrofílico. El cloro y el bromo también se pueden emplear, pero para ellos se necesita utilizar catalizadores, y la reacción debe tener lugar en la oscuridad. La yodación de las proteínas se emplea para modificar la antigenicidad de algunas proteínas, pero más bien para marcar proteínas (en el  $^{131}_{53}\text{I}$  ó  $^{125}_{53}\text{I}$ ). La penicilina se combina directamente con los grupos  $\text{NH}_2$  y  $\text{SH}$  de las proteínas por uniones amidas (conjugados peniciloil-proteínas) o mediante puentes disulfuros (conjugado ácido penicilínico-proteína). Esas reacciones, que también se observan in vivo, son la causa de las reacciones alérgicas a la penicilina.<sup>41</sup>



### 3.15 2,4-Dinitrofenilhidrazina

La hidrazina  $H_2N-NH_2$  reacciona con los grupos carbonilos de un aldehído o cetonas para generar una hidrazona

El color de la 2,4-dinitrofenilhidrazona puede indicar la estructura de los aldehídos o cetonas de los que deriva. Las dinitrofenilhidrazonas de aldehídos o cetonas en las que el grupo carbonilo no está conjugado, o unidas a un anillo aromático con otro grupo funcional, son amarillas.

La conjugación con un doble enlace, carbono-carbono o con un anillo bencénico, desplaza la máxima de absorción hacia el visible y se revela fácilmente con un análisis espectroscópico de ultravioleta. Este desplazamiento es responsable de un cambio de color: del amarillo al rojo anaranjado.<sup>47</sup>

### 3.16 Adyuvantes, Vías de administración y Dosis del Antígeno

#### 3.16.1 Adyuvante

La palabra adyuvante viene del latín *adyuvare* (ayudar) y se refiere a moléculas que incrementan la respuesta inmunológica (RI) de forma no específica cuando son mezcladas con el antígeno antes de ser inoculadas. Los adyuvantes se dividen en seis categorías:

- a) adyuvantes con base oleosa
- b) sales minerales
- c) polímeros sintéticos
- d) liposomas
- e) sustancias naturales y otros, como la vitamina A y la tapioca.



En general, es la combinación de varios fenómenos, como la formación de un depósito de antígeno en el sitio de inoculación, que permite una liberación lenta, pero constante del mismo, promoviendo la migración de células al sitio de inoculación e incrementado la probabilidad de que exista más interacción entre el antígeno y las células del sistema inmune. Al prolongarse la presencia del antígeno, también se incrementan las señales de coestimulación y algunos adyuvantes como los lipopolisacárido (LPS), tienen un efecto mitogénico, estimulando la proliferación inespecífica de linfocitos. Los adyuvantes, son indispensables en el uso de vacunas.

El adyuvante más conocido es el Freud y se puede emplear de dos formas:

- a) Incompleto: contiene aceite mineral (Drakeoil) y un detergente (Arlacel A) para formar una emulsión.
- b) Completo: contiene lo mismo más bacterias muertas por calor de *M. tuberculosis*.

El antígeno se emulsifica con estos adyuvantes y el adyuvante completo es un inmunoestimulador más potente que el incompleto. Las mejores respuestas inmunes se generan inoculando al antígeno con el adyuvante completo por la vía subcutánea o intradérmica (por lo que generará un granuloma); las siguientes inoculaciones deberán de hacerse con la formulación incompleta.

Dentro de los adyuvantes de sales minerales, los mejores representantes son las sales de sulfato de aluminio con iones  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $NH_4^+$ . Su fórmula es:  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ,  $AlNa(SO_4) \cdot 12H_2O$  o  $AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  y cuando se adicionan a una solución se precipitan; al inocularse, forman un depósito en el sitio de inoculación. Debido a que son seguras, estas sales son los adyuvantes seleccionados para uso en seres humanos. Otras sales incluyen a la sílice, al caolín y al carbón.

Los adyuvantes de polímeros sintéticos incluyen polirribonucleótidos, como los ácidos poliionosínico-policitídílico (poli-IC) y los constituidos por ácidos poliadenílico-poliuridílico (poli-AU). También se emplean los copolímeros de polioxietileno hidrofílico y



polioxipropileno hidrofóbico en proporciones variables. Estos funcionan como surfactantes (tensioactivos), abatiendo la tensión superficial de líquidos.

Los liposomas son vesículas pequeñas que se forman espontáneamente al mezclar fosfolípidos con agua; los fosfolípidos producen bicapas semejantes a las membranas biológicas, dentro pueden encontrarse el antígeno en fase acuosa, o también se puede formar multivesículas concéntricas (liposomas multilaminares), que alternan las bicapas lipídicas y al antígeno.<sup>42</sup>

### **3.16.2 Técnicas para la obtención de anticuerpos anti-haptenos**

El conjugado del hapteno y el portador se separan del hapteno no conjugado y de los productos secundarios de la reacción por diálisis o cromatografía. La inmunización por vía subcutánea, intradérmica (o con menos frecuencia intravenosa), provoca la producción simultánea de anticuerpos anti-hapteno y anti-portador. Comúnmente, es necesario agregar adyuvante completo de Freund y recurrir a inyecciones repetidas para obtener anticuerpos de título alto de especificidad y afinidad elevadas. La purificación de los anticuerpos se realiza haciendo pasar el conjugado sobre el Inmunoabsorbente insoluble seguido de una elución a un pH ácido. La utilización de inmunoabsorbentes con los conjugados del hapteno y de otro portador que no sea empleado para la inmunización, permite obtener anticuerpos antiportadores.<sup>46</sup>

### **3.17 Métodos de laboratorio para la detección de antígeno anticuerpo**

La presencia de un anticuerpo dirigido contra una proteína o compuesto definido depende de la respuesta inmune del individuo; así, la detección de anticuerpos se utiliza para evaluar de manera cuantitativa y cualitativa las respuestas inmunitarias normales y anormales. La detección de antígenos, por lo general, se utiliza para determinar la presencia de proteínas o compuestos extraños. La introducción de los



procedimientos basados en las reacciones inmunológicas ha representado un importante avance en el análisis de estas detecciones. Los principios científicos, que subyacen a tales metodologías siguen siendo los mismos. Fundamentalmente, la detección de anticuerpos y antígenos dependen de la formación de complejos anticuerpo-antígeno. Una de ambas partes (antígeno o el anticuerpo) es susceptible de caracterización y muy a menudo, de marcaje también, para después emplearla como sonda de búsqueda de otra parte del complejo.

El proceso de unión de anticuerpo a un antígeno (formación de complejos inmunitarios) abarca gran parte de los recursos dentro del campo de pruebas inmunológicas. La propiedad que tienen los Ig de unirse a Ag, la especificidad de esta unión y el hecho que pueda ser visualizable por los fenómenos de precipitación, aglutinación, y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas).

Dado que los antígenos y anticuerpos se definen por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. Si disponemos de una solución de un anticuerpo monoclonal, podemos definir su afinidad y especificidad con considerable confiabilidad y, si está en estado puro y en su conformación nativa, conoceremos que la concentración de anticuerpos es la misma que la de inmunoglobulina en mg/mL u otra unidad, (Tabla 2).

**Tabla 2 de los métodos de detección antígeno-anticuerpo<sup>50</sup>**

<b>Trazador</b>	<b>Denominación</b>
<b>Complejo Ag-Ac</b>	Técnicas de inmunoprecipitación (técnica Ouchterlony, inmunoelectroforesis, difusión radial Mancini, nefelometría, etc.)
<b>Aglutinado</b>	Técnica de inmunoaglutinación. (hemaglutinación directa e indirecta y otras técnicas de látex, etc.)
<b>Fluorocromo</b>	Técnicas inmunofluorimétricas
<b>Radioisótipos</b>	Técnicas inmunorradiológicas (radioinmunoensayo-RIA-)
<b>Enzimas</b>	Técnicas inmunoenzimáticas.



Cuando se determina el contenido de anticuerpos en un antisuero, el problema es diferente debido a que la fracción inmunoglobulina está compuesta de una serie enorme de moléculas en cantidades y afinidades variables. Existen diversos métodos basados en procedimientos distintos de visualizar la unión Ag-Ac.

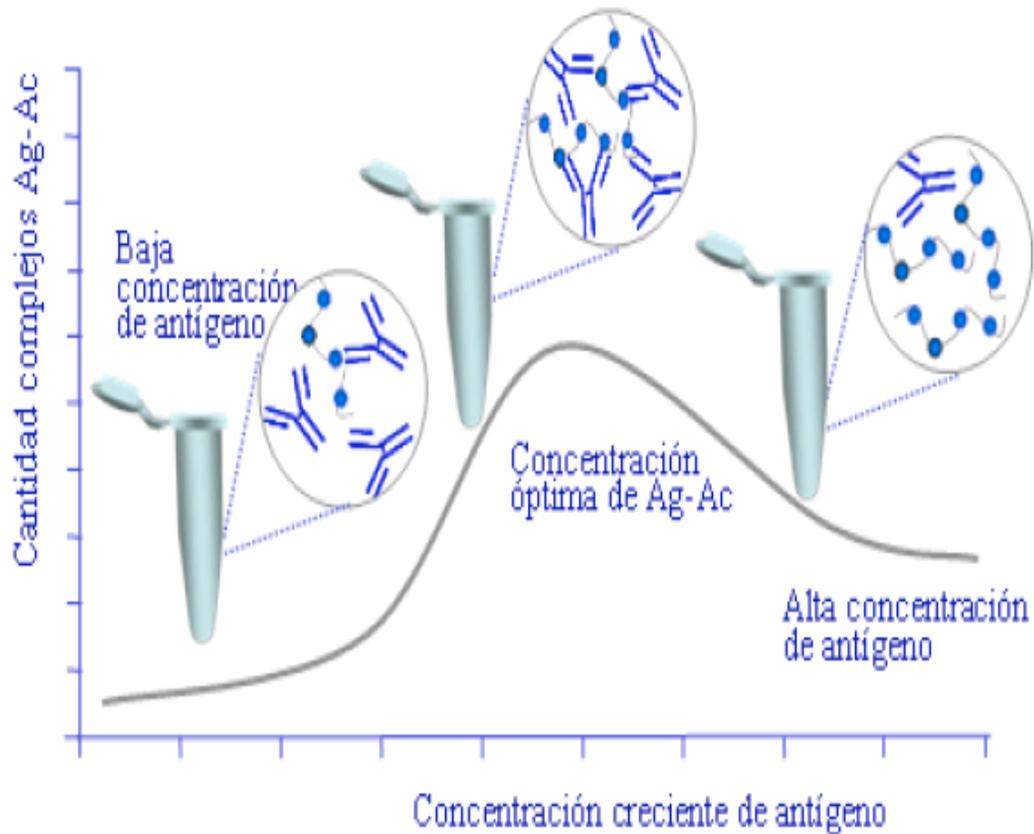
1. Técnicas de aglutinación: cuando el antígeno se encuentra unido o forma parte de las células, bacterias o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado celular o bacteriano formado.
2. Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo: para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.
3. Técnicas de radioinmunoensayo: en estas técnicas, al anticuerpo se une un isótopo radiactivo, siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radioactividad emitida.
4. Cromatografía de afinidad: la especificidad de la unión Ag-Ac puede utilizarse para obtener anticuerpos y antígenos puros.
5. Inmunoprecipitación e inmunoblotting: permite detectar la presencia y cantidad de antígenos y anticuerpos específicos.<sup>44</sup>

### 3.17.1 Técnica de precipitación

El complejo Ag-Ac precipita espontáneamente o por centrifugación cuando la proporción de antígenos y anticuerpos es equivalente. En la fig. 13 se muestra un esquema de los tipos de complejos formados al mezclar, en tubos de ensayo, soluciones con diferentes cantidades de antígenos a las que se les añaden igual cantidad de antisuero. La precipitación máxima allí donde la proporción entre ambos es óptima (parte central), pero va disminuyendo a medida que predomine el anticuerpo o el antígeno (de izquierda a derecha). Este tipo de reacción no es muy utilizado al



requerirse grandes concentraciones de antígeno y anticuerpo para poder medir el precipitado formado, <sup>33-44</sup> (Figura 13.)



**Figura. 13 Curva de precipitación antígeno-anticuerpo<sup>23</sup>**

### 3.17.2 Radioinmunoanálisis (RIA)

Se basa en la competencia que se establece para unirse a anticuerpos específicos entre una sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo. Al establecer esta competición resulta que mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad de sustancia radioactiva que se une al anticuerpo y viceversa y medida por un contador de centelleo, una vez medida la



radioactividad se construye una curva con los resultados obtenidos con las cantidades conocidas de la sustancia marcada y sin marcar, se incuba a una concentración constante de la muestra de la que se desea conocer la concentración del antígeno.

El RIA directo a la fase sólida se une a una cantidad conocida de anticuerpo. A diferentes concentraciones de antígeno marcado se incuba a una concentración constante de la muestra de la que, se desea conocer (la concentración de antígeno). En el RIA de inhibición sucede que en la fase sólida, está unida una cantidad fija de antígeno para el proceso de inhibición se incuba una concentración fija de anticuerpo marcado frente una serie de diluciones de la muestra que contiene el antígeno. Existe una técnica no competitiva<sup>48-49</sup> (Figura 14.)

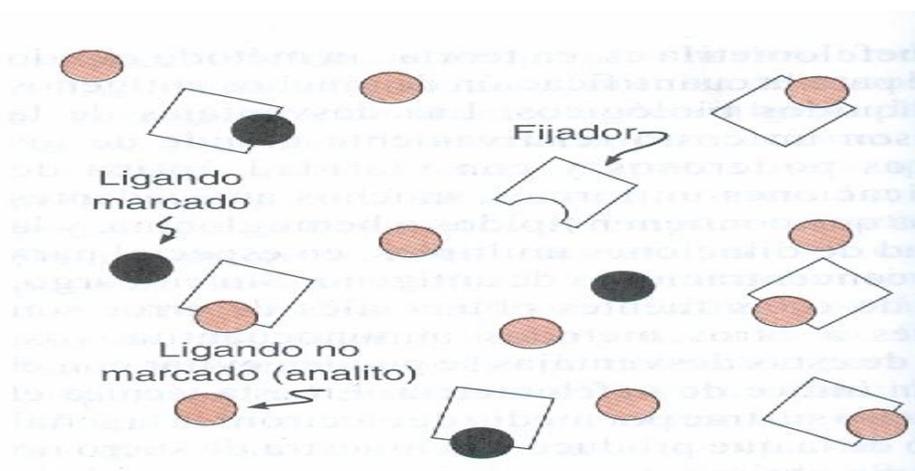


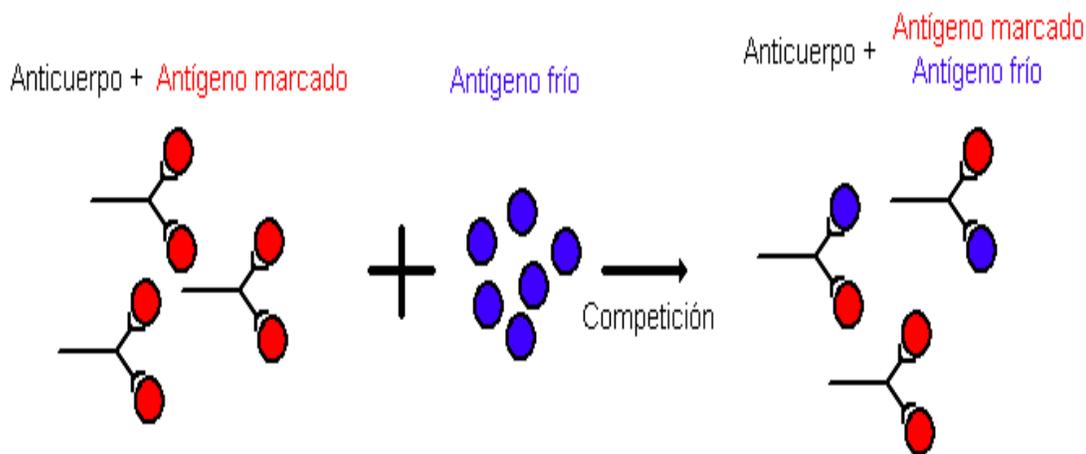
Figura. 14 Reacción de fijador de ligando en radioinmunoanálisis<sup>27</sup>

### 3.17.3 Ensayo de Inmunoabsorbente Ligado a Enzima

El principio de **ELISA** es una variante de la técnica de **RIA** (radioinmunoanálisis); este método se utiliza para la cuantificación de antígenos o de haptenos que pueden ser marcados radiactivamente. Se basa en la competencia por anticuerpos específicos



entre concentraciones de material marcado (conocido) y no marcado (desconocido). Los complejos que se forman entre los antígenos y los anticuerpos pueden separarse y cuantificarse independientemente a partir de la radiación emitida, (Figura 15.)



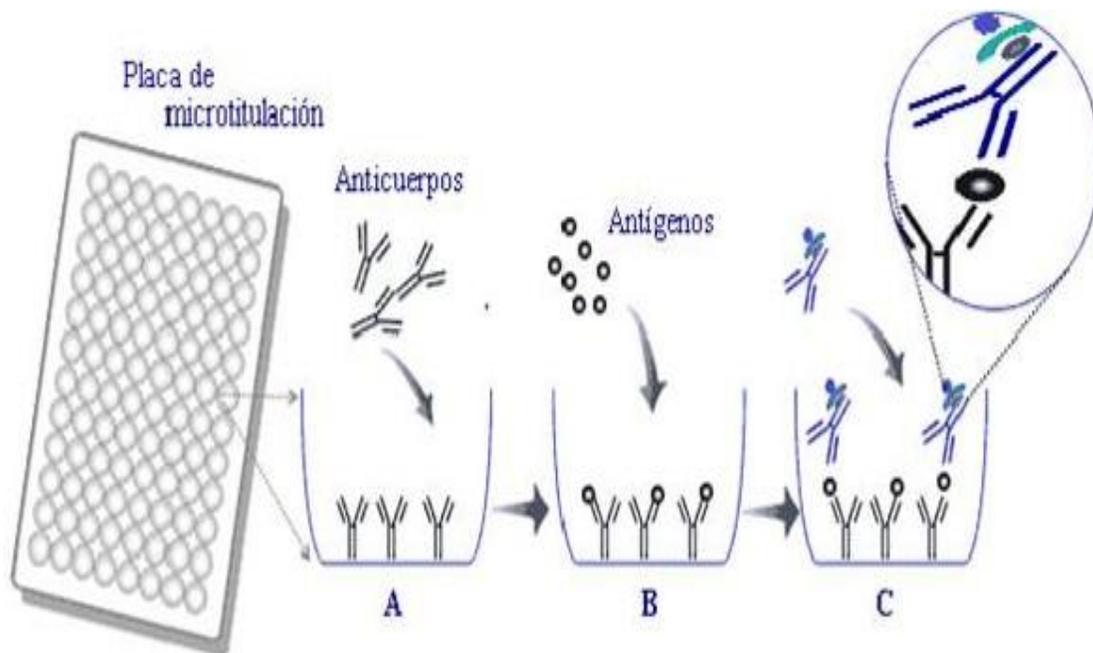
**Figura. 15 Esquema general del método de ELISA<sup>18</sup>**

La técnica de ELISA es un método heterogéneo en donde se tiene un conjugado: anticuerpo-enzima; en una fase sólida (placa) se adhiere el antígeno o el anticuerpo. La enzima reacciona con su sustrato y en la reacción de óxido-reducción el cromógeno origina una reacción colorida que se puede cuantificar colorimétricamente. Este método es tan sensible como RIA y no necesita licencia para trabajar con radiactividad, y las enzimas son más estables que los isótopos.

Las enzimas que dan la reacción colorida son, en la actualidad, los marcadores utilizados con más frecuencia: la peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase- HRP) y la fosfatasa alcalina del intestino de ternero (alkaline phosphatase- AP). La glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, la ureasa de soya y la galactosidasa de *Escherichia coli* son alternativas adicionales. Una ventaja en la amplificación de la reacción de fosfatasa es el uso de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP),



como sustrato para generar NAD, el que ahora actúa como coenzima para un segundo sistema enzimático. (Figura 16.)



**Figura. 16 Principio básico de ELISA directo o no competitivo: se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar. Se añade la muestra donde está presente el antígeno que se requiere medir<sup>18</sup>**

Otros marcadores: La proteína G estreptocócica o la proteína A estafilocócica, marcadas con enzimas, se unen a la IgG. Con frecuencia se utiliza la conjugación con la vitamina biotina; dado que este conjugado puede detectarse con facilidad por su reacción con la avidina o estreptavidina ligada a enzima (esta última da un menor fondo de unión), ambas se unen con una alta especificidad y afinidad.

Los sistemas quimioluminiscentes, basados en la reacción luminol, incrementada por la HRP, donde la luz proveniente del sustrato luminol oxidado se intensifica y la duración de la señal se incrementa por el uso de un reactivo intensificador, provee mayor sensibilidad y variaciones dinámicas. Debe hacerse una mención especial a los



---

ensayos de fluoresceína con resolución en el tiempo basado en quelatos de tierras raras como el europio  $3^+$ , aunque estos tienen un papel más importante en los ensayos para antígenos.<sup>33,42,48,49.</sup>



---

## 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los estuches para el diagnóstico del estrés oxidativo en proteínas se basan en la condensación de los grupos carbonilos con DNPH a través de una reacción de reconocimiento con anticuerpos. Sin embargo estos están dirigidos contra el hapteno y no contra la proteína lo que disminuye la especificidad del ensayo, esto limita la información que se puede obtener, al solo ser posible determinar la presencia de grupos carbonilos y no de proteínas específicas.

Por otra parte el costo de estos es elevado y su uso se restringe solo a un tipo de prueba, limitando el rango de aplicaciones.

Debido a lo anterior este trabajo propone generar anticuerpos dirigidos contra los conjugados de proteína-DNPH, esto permitiría aumentar la especificidad del ensayo al poder reconocer proteínas específicas permitiendo ampliar la información obtenida, a su vez al generar anticuerpos específicos estos podrían ser usados en otros tipos de técnicas Inmunoenzimáticas y no solo en ELISA como en la mayoría de los estuches comerciales.



---

## 5 HIPÓTESIS DEL TRABAJO

A partir de la generación de un antígeno artificial (DNP-Ovoalbúmina) y la inmunización de conejos se obtendrán anticuerpos específicos anti-DNP, los cuales podrán ser utilizados en la determinación de grupos carbonilos en proteínas a través de la técnica de ELISA;



---

## 6 OBJETIVOS

### General

- Elaboración de reactivos biológicos inmunoenzimáticos para la determinación de grupos carbonilos

### Particulares

- Elaborar los antígenos artificiales OVA-DNP y BSA-DNP.
- Obtener un anticuerpo específico anti DNP (Inmunización).
- Purificación del anticuerpo por el método de Inmunoabsorbente.
- Marcar el anticuerpo con peroxidasa de rábano usando glutaraldehído.
- Titulación del conjugado anticuerpo anti DNP-enzima.



## 7 REACTIVOS

2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)	Sigma
Albúmina sérica bovina F-V (BSA)	Sigma
Ovoalbúmina grado II (OVA)	Sigma
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma
Bicarbonato de sodio	Baker
Ácido clorhídrico	EM Science
Glutaraldehído	Baker
Sulfato de amonio	Baker
Lisina	Baker
Formaldehído	Baker
Glicina	Sigma
Borohidruro de sodio	Reasol
Clorohidrato de guanidina	Sigma
Peroxidasa de rábano F VIA	Sigma
Ácido ascórbico	Merck
Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)	Baker
Sulfato de amonio ferroso	Baker
Amortiguador de fosfatos (PBS) pH= 7	
O-fenilendiamina	Sigma
Gelatina U.S.P.	Baker
Peróxido de hidrogeno 30%	Sigma
Tween 20	Sigma



---

## 8 MATERIAL

Matraz balón	Pyrex
Vasos de precipitado	Pyrex
Refrigerante	Pyrex
Homogenizador potter	Thomas Company
Tubos de ensayo	Pyrex
Pipetas	
Micropipetas	Finnpipette / Menarini
Membrana de celulosa	Sigma
Tiras de pH	Whatman
Gradilla	
Placa de 96 pocillos de ELISA	Nunc



---

## 9 EQUIPOS

Parilla de agitación

Corning

Centrifuga

Cole Parmer

Espectrofotómetro

Thermo scientific spectronic 20+

Lector de ELISA

Awareness Tecnology INC



## 10 MÉTODOS

### 10.1 Preparación de conjugados DNP-BSA y DNP-OVA

El BSA y la OVA se conjugaron con el DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina), ambos antígenos fueron preparados de la siguiente manera:

Se pesaron 200-300mg de BSA y OVA, ambas por separado, se disolvieron en una solución de 20mL de bicarbonato de sodio 0.1M a pH=9, se disolvieron 20 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) en 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido), y fue agregada lentamente a la solución de BSA u OVA con agitación, se incubaron durante toda la noche las reacciones a temperatura ambiente.

El hapteno libre fue eliminándose a través de una membrana de celulosa por diálisis 7 veces con PBS (NaCl 8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 g, KCl 0.2 g en 1000 mL de agua destilada) a pH= 7.<sup>53</sup> Se realizó una prueba cualitativa para ver que no quedaran restos del DNP con acetofenona, generándose un precipitado<sup>54</sup> y se evaluaron con un espectro absorción ultravioleta (200-300nm) para observar la conjugación

Valorando, la presencia de cambios significativos en los espectros con respecto a los reactivos de origen tomándose en cuenta que las proteínas absorben a una longitud de onda de 280nm (BSA y OVA) y el DNPH a 310nm. Al conjugado se le realizó una curva estándar para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

### 10.2 Método de Lowry

Para conocerse la concentración de la OVA-DNPH para la inmunización. Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: 2.0g de carbonato de sodio en 100mL de hidróxido de sodio al 0.4%.



Solución B<sub>1</sub>: 1.0g de tartrato de sodio y potasio en 50mL de agua.

Solución B<sub>2</sub>: 0.5g de sulfato de cobre en 50mL de agua.

Solución de trabajo C<sub>1</sub>: 50mL de solución A + 0.5mL solución B<sub>1</sub> + 0.5mL de solución B<sub>2</sub>.

Solución estándar: 0.025g de suero albúmina bovina (BSA) en 100mL de agua.

Se prepararon los tubos, de acuerdo a la tabla 3 se dejaron reposar en un tiempo de 10 minutos, después se añadió la solución de Folin Cicalteau y se dejaron reposar durante 30 minutos, pasando este tiempo se leyeron en el espectrofotómetro a un absorbancia de 600nm.

**Tabla. 3 Esquema de preparación curva de calibración<sup>56</sup>**

Tubo	mL estándar	mL H <sub>2</sub> O	mL sol. C <sub>1</sub>	mL sol. Folin
1	0.1	0.9	3.0	0.1
2	0.2	0.8	3.0	0.1
3	0.3	0.7	3.0	0.1
4	0.4	0.6	3.0	0.1
5	0.5	0.5	3.0	0.1
6	0.6	0.4	3.0	0.1
7	0.7	0.3	3.0	0.1
8	0.8	0.2	3.0	0.1
9	0.9	0.1	3.0	0.1
10	1.0	0	3.0	0.1



En la preparación del tubo problema, se tomaron 0.1mL de la muestra, se añadieron 0.9 de agua más 3mL de solución C<sub>1</sub> se dejó que reposaran por 10minutos y después se agregó la solución de Folin Cicalteau, dejándose reposar y prosiguiendo con la lectura.

Preparación de tubo blanco: 1mL de agua se agregaron 3mL de solución C<sub>1</sub> más 0.1mL solución de Folin Cicalteau.

Conociéndose las lecturas de los tubos (ABS) y se interpolo el resultado para conocerse la concentración real del conjugado OVA-DNPH.<sup>55</sup>

### 10.3 Inmunización

Se preparo un conejo albino obtenido del bioterio para el procedimiento y se continuo con el siguiente procedimiento de inmunización.

En el día cero se preparo 1mL de solución salina más 1mL de adyuvante completo de Freund, se aplicaron en múltiples sitios (lomo del conejo), vía subcutánea; se dejaron pasar 14 días, se reanudo la inmunización con 1mg del antígeno en 1mL de adyuvante incompleto de Freund; siguiendo el mismo procedimiento de aplicación; para el día 35, se aplicó otra inmunización con 0.5mg del antígeno en 1mL de solución salina, mismo procedimiento de aplicación para el día 40, se preparo 0.5mg del antígeno en 1mL de solución salina, misma aplicación (subcutánea y múltiples sitios), para el día 45 se sacrificó, realizándose con la técnica de punción cardíaca, se comenzó anestesiando al animal, limpiándose la zona izquierda del tórax y localizando el corazón y se extrajo lentamente la sangre con jeringa y aguja del número 20 x 30. Se retuvo el coágulo por 24h en refrigeración y después se agregó sulfato de amonio para la precipitación de la gamma globulina (IgG).<sup>56</sup>



#### **10.4 Método Acoplamiento de dos Pasos de Glutaraldehído (Método Avrameas)**

Se disolvieron 10mg de peroxidasa de rábano en 0.2mL de amortiguador de fosfatos 0.1M a pH=6.8 que contiene 1.25% de glutaraldehído, dejándose 18h en agitación a temperatura ambiente. Se eliminó el glutaraldehído por diálisis y se estabilizó con solución salina al 0.85%.

En esta reacción se tomó una muestra se ajustó a un 1mL y se adicionó 1mL de Ig G a 5mg/mL en solución salina y 0.1mL de amortiguador de bicarbonato de sodio 1M a pH= 9.5, se agito suavemente y se dejó 24h a 4°C.

Se prosiguió con la adición de lisina al 0.2M, dejándolo 2h a temperatura ambiente y se dializo con PBS a 4°C.

Se centrifugo a 5000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se desecho para eliminar la enzima libre; en el precipitado esta presente el conjugado; éste se redisolvió en PBS con 0.01 de timerazol o formalina para evitar su contaminación. En esta etapa hay anticuerpo contra el DNP y contra la enzima y se prosiguió con la técnica de Inmunoabsorbente, para obtenerse los anticuerpos anti-DNP.<sup>57</sup>

#### **10.5 Método de Inmunoabsorbente**

Se disolvieron 300mg del precipitado en 16mL de solución reguladora de fosfatos pH=7, se vertieron a la solución anterior, gota a gota, 2.0mL de la solución de glutaraldehído constantemente, y se dejó toda la noche a temperatura ambiente.

Se adiciono al gel un pequeño volumen de solución reguladora de fosfatos y fraccionando con la ayuda del homogenizador Potter-Elvehjem, suspendiendo la proteína insoluble en 8mL de la solución reguladora glicina-HCl pH=2.8 y centrifugando



a 3000 rpm durante 15 minutos y volviendo a suspender la proteína en 80mL de solución reguladora salina-fosfatos y dejándolo sedimentar por 30 minutos y eliminando el sobrenadante con el objetivo de quitar todas las partículas pequeñas.<sup>57</sup>

## 10.6 Método de ELISA

Se diluyó una solución de BSA-DNP haciendo diluciones al doble, partiendo de una concentración inicial de 128µg/mL

Se prepararon 7 tubos que se etiquetaron de la A a la G. En el tubo A colocando 3mL de la solución de BSA-DNP a una concentración de 128µg/mL disuelto en amortiguador de recubrimiento y realizando diluciones al doble con volúmenes de 1.5mL del amortiguador de recubrimiento en los tubos B a la G, de tal manera que, al final, tengan todos los tubos con 1.5mL de volumen, excepto el tubo G, que se queda con 3mL.

Colocando con una pipeta automática 100µL del amortiguador de recubrimiento carbonato-bicarbonato pH=9.6, en la fila H de la placa de poliestireno (testigo negativo del antígeno). Realizando lo mismo con el resto de las filas empezando con la fila G y terminando con la fila A en ese orden y, usando una sola punta, se colocaron siempre 100µL en cada pozo, incubando por 1h a 37°C.

El sobrenadante se elimina y se lava 6 veces con PBS-Tween

Se bloqueó con 1% de gelatina (300µL en cada pocillo), incubando en un periodo de 30 minutos.

Se desechó el sobrenadante de la gelatina, se realizó 6 veces el lavado con PBS-tween, dejando actuar un minuto la solución de lavado antes de tirar los sobrenadantes.



---

Después, se etiquetaron 11 tubos del 1 al 11 y realizaron diluciones al doble en PBS del conjugado de anti-DNP, comenzando de una dilución 1:100 y usando volúmenes de 1mL para hacer las diluciones.

Se colocó en la columna 12 de la placa, 100 $\mu$ L de PBS (testigo de conjugado). Del tubo número 11 a la columna 11 en ese orden hasta llegar al tubo 1, usando una sola punta y colocando en cada pozo 100 $\mu$ L, incubando la placa a 37°C por una hora.

Se lavó 6 veces con PBS-tween.

Se adicionó 100 $\mu$ L del sustrato (peróxido de hidrogeno) con el cromógeno (O-fenilendiamina) en cada pozo e incubo por 15 minutos a 37°C

Se leyó a 450nm en el lector de ELISA.<sup>56</sup>



## 11 RESULTADOS

**Comprobación de las conjugaciones:** Para comprobar las conjugaciones del hapteno (DNPH) con las proteínas antigénicas (OVA y BSA), se recurrió a un análisis cualitativo de espectrofotometría de absorción ultravioleta, realizando un barrido de estas proteínas antigénicas puras en solución salina y observando la absorción de los conjugados en una longitud de onda diferentes. Los resultados indicaron que se encontró del barrido con ovoalbúmina con solución salina (sin conjugar) en un rango de una longitud de onda de 200 a 500nm donde se observa la longitud de onda de los aa presentes en la ovoalbúmina. (Figura 17).

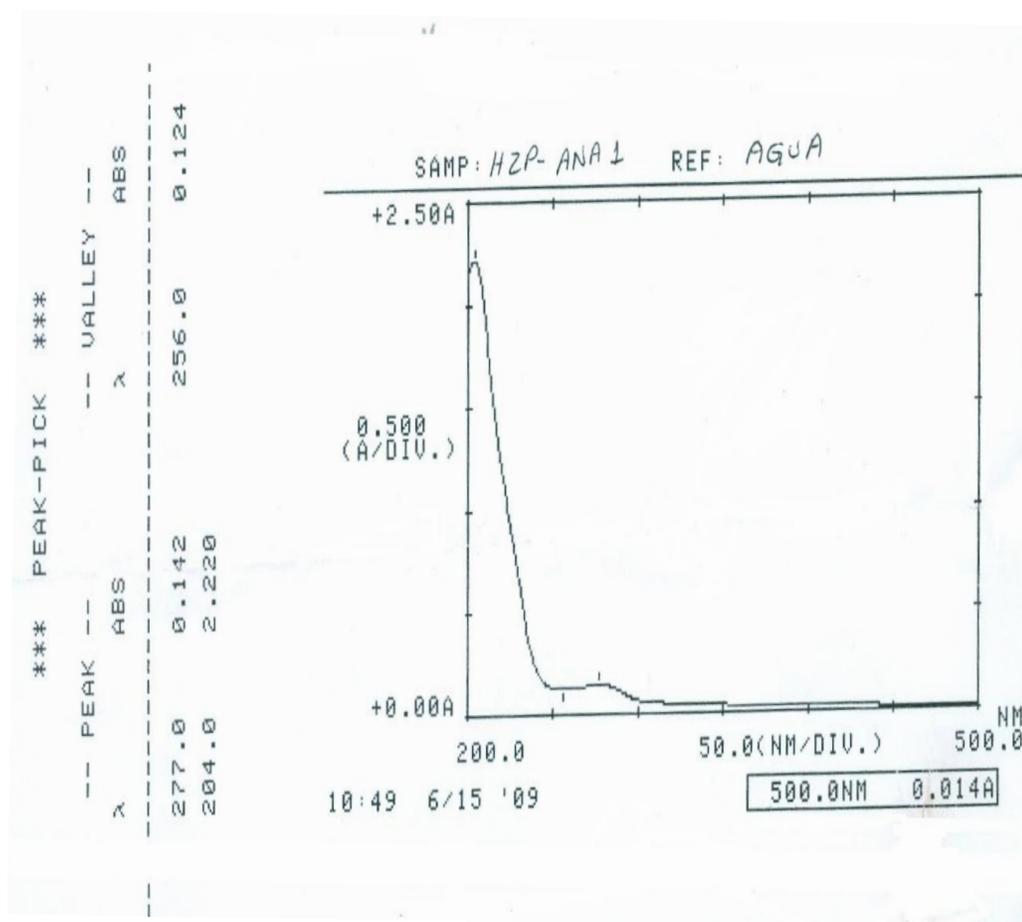


Figura. 17 Espectro de UV de ovoalbúmina



Además se confirmó un cambio después de la conjugación OVA-DNPH, (Figura 18.)

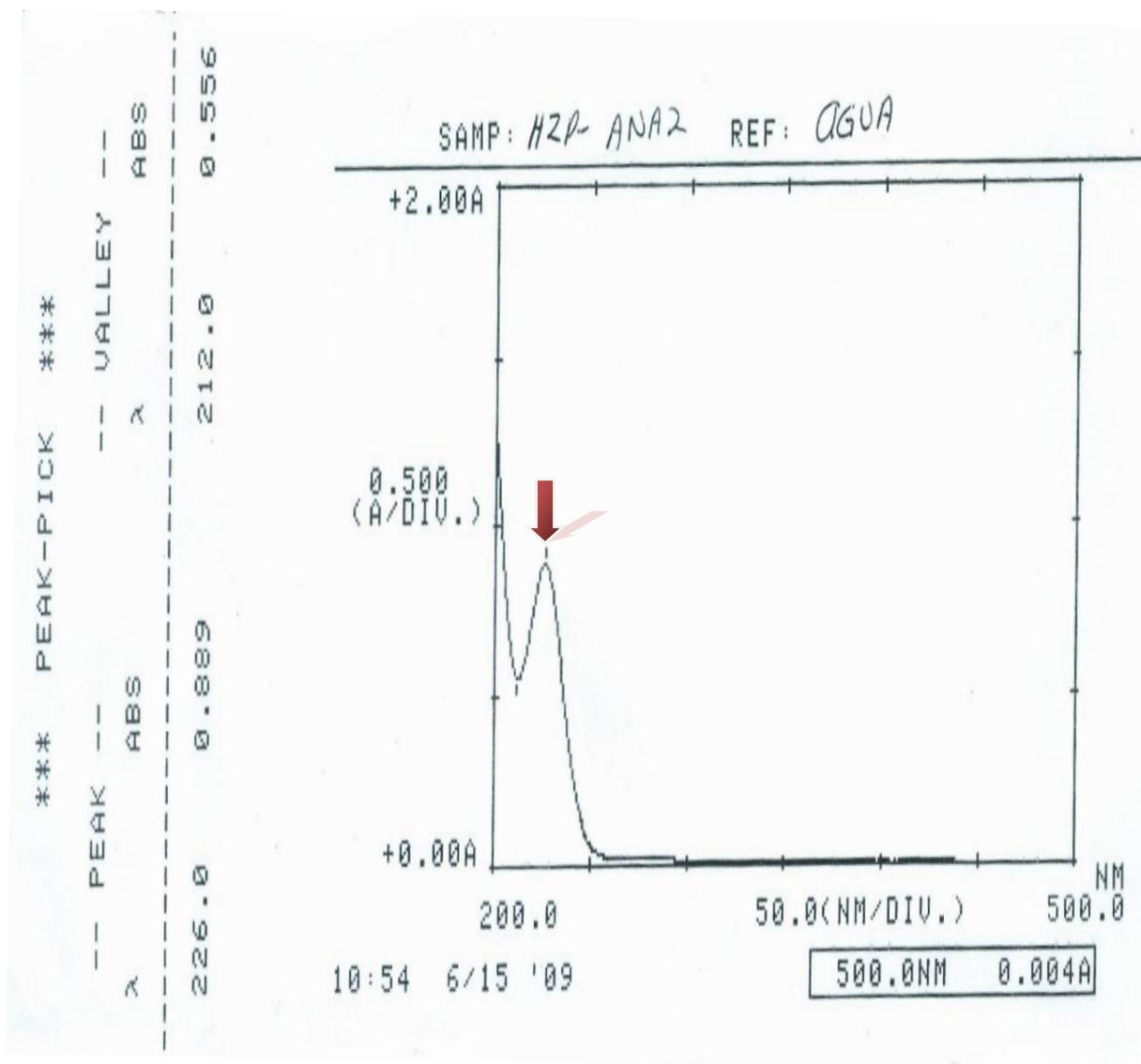


Figura. 18 Espectro de UV del conjugado OVA-DNPH



Se realizaron los mismos estudios para el BSA y nuestros resultados mostraron que en la figura 19 se observó de un barrido de 200-400 nm un pico de los aa presentes en el BSA (sin conjugar)

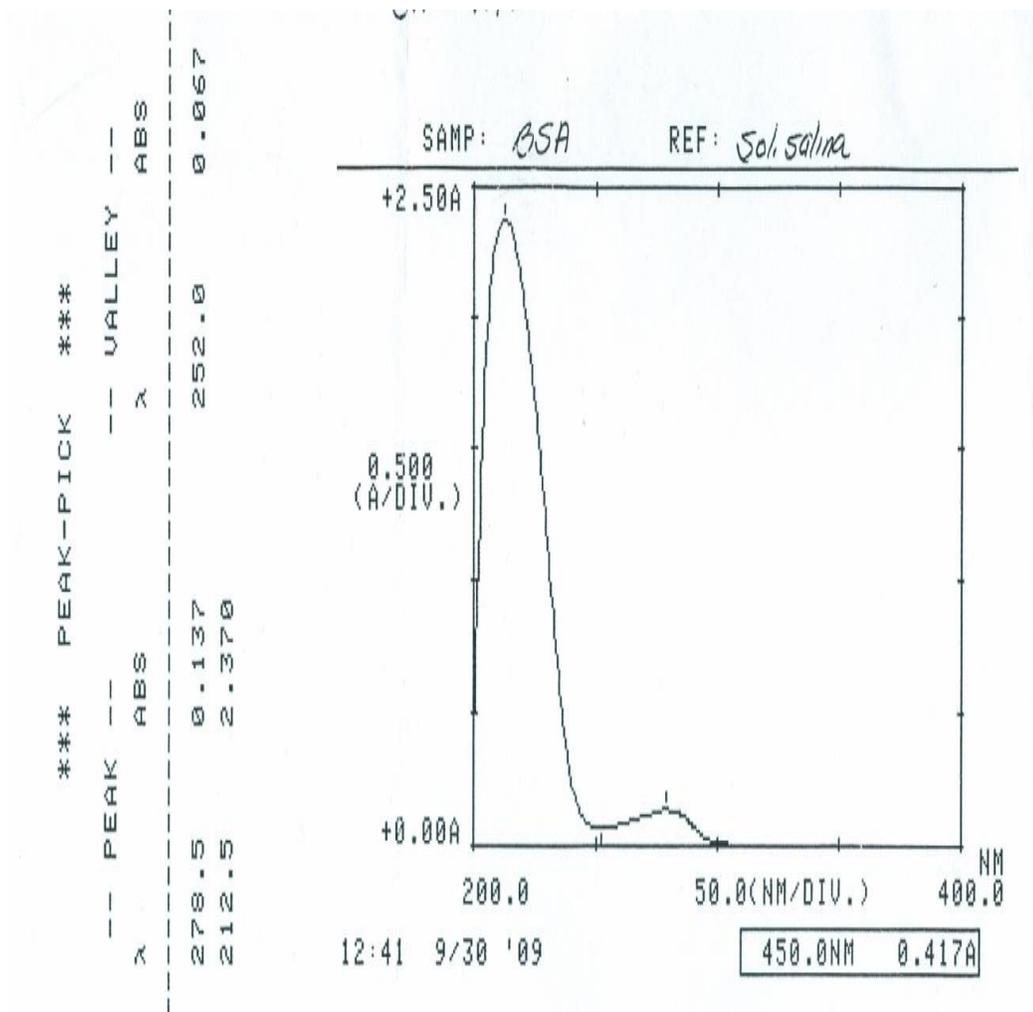


Figura. 19 Espectro de UV de albúmina bovina



Despues del proceso de conjugacion del BSA-DNPH, se realizo un rango de lectura de 200-600nm, se observo el cambio en la longitud de onda comparando con el BSA-solucion salina y comprobando la conjugacion, figura 20.

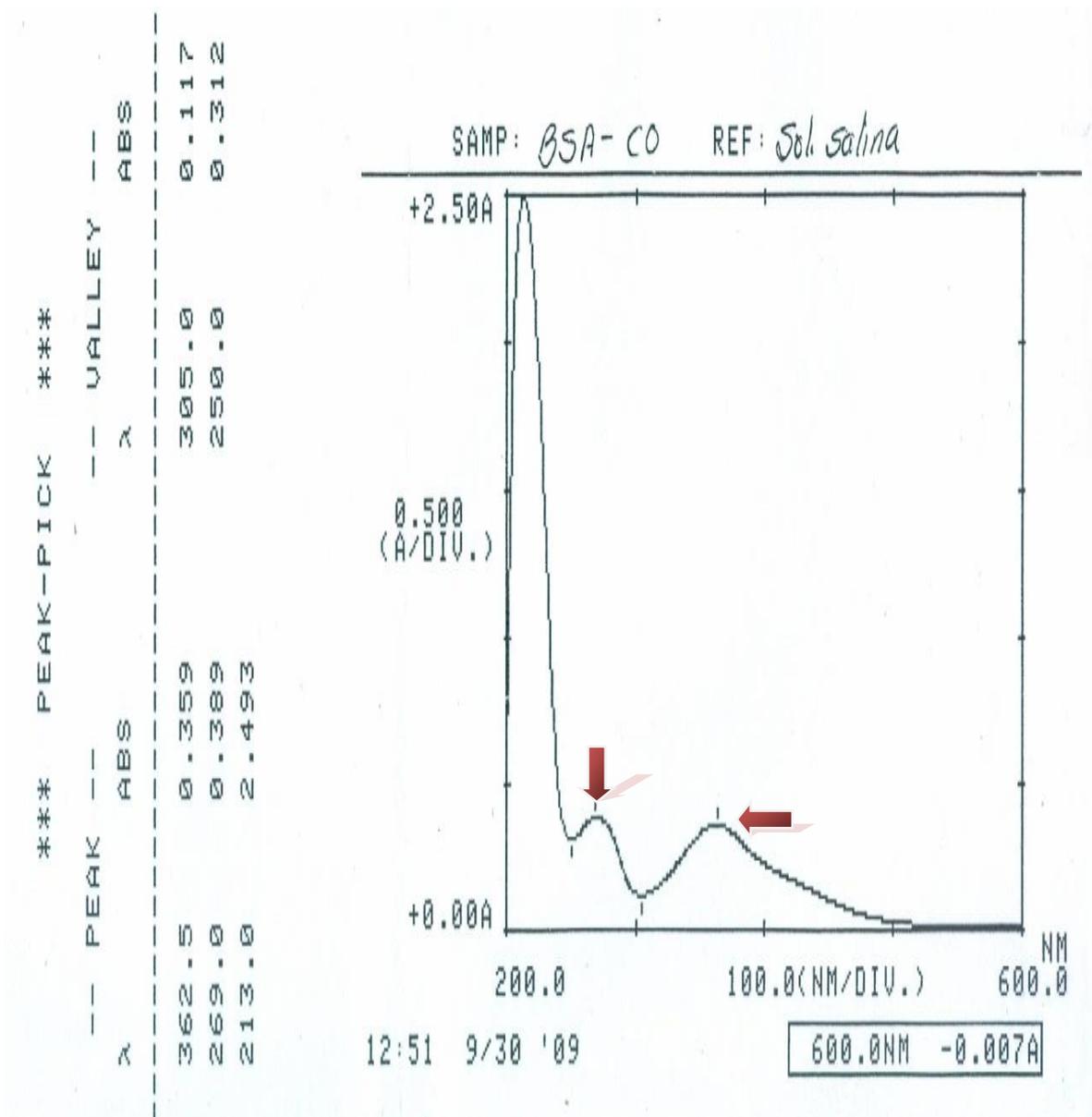


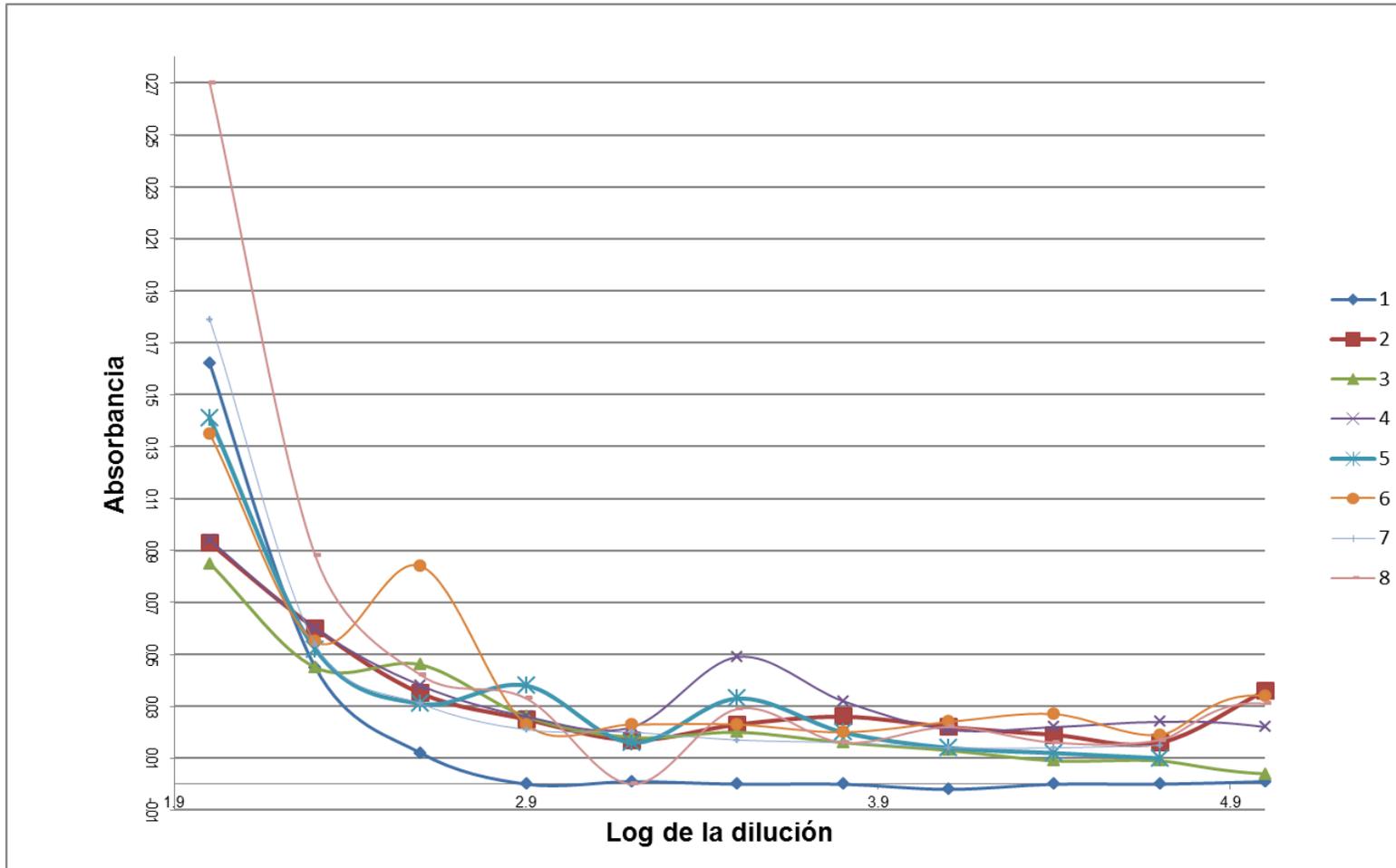
Figura. 20 Espectro de UV de BSA-DNPH



Dilución óptima del anticuerpo. Con la finalidad de encontrar la dilución óptima del anticuerpo se procedió a evaluar una serie de concentraciones decrecientes del mismo a través del ensayo inmunoenzimático (ELISA) y utilizando como agente bloqueador, leche descremada, gelatina en PBS, los resultados indicaron que la dilución óptima de trabajo del anticuerpo es de 1:200. A su vez la concentración del antígeno se fue disminuyendo a razón 1:2 en PBS partiendo de una concentración inicial de 128 µg/mL hasta 1µg/mL, observándose que la concentración de 16 µg/mL da los mejores resultados ( tabla 4 y grafica 1.)

**TABLA.4 ABSORBANCIAS DE ELISA**

Dilución	Conc	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400
Log dilución		2	2.3	2.4	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5
Pocillos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <sup>a</sup>	128	0.485	0.378	0.349	0.336	0.325	0.336	0.332	0.332	0.328	0.337	0.326
1B	64	0.418	0.383	0.360	0.352	0.344	0.353	0.353	0.352	0.341	0.339	0.365
1C	32	0.410	0.371	0.372	0.354	0.348	0.352	0.346	0.342	0.337	0.338	0.333
1D	<b>16</b>	0.423	0.390	0.365	0.356	0.352	0.382	0.359	0.349	0.351	0.350	0.347
1E	8	0.442	0.378	0.358	0.364	0.346	0.364	0.350	0.343	0.342	0.340	0.335
1F	4	0.458	0.384	0.411	0.351	0.359	0.354	0.350	0.356	0.357	0.347	0.358
1G	2	0.508	0.380	0.361	0.349	0.348	0.347	0.344	0.343	0.345	0.346	0.339
1H	1	0.607	0.400	0.368	0.361	0.385	0.357	0.345	0.349	0.346	0.347	0.353



Gráfica.1 Valoración de respuesta antígeno-anticuerpo

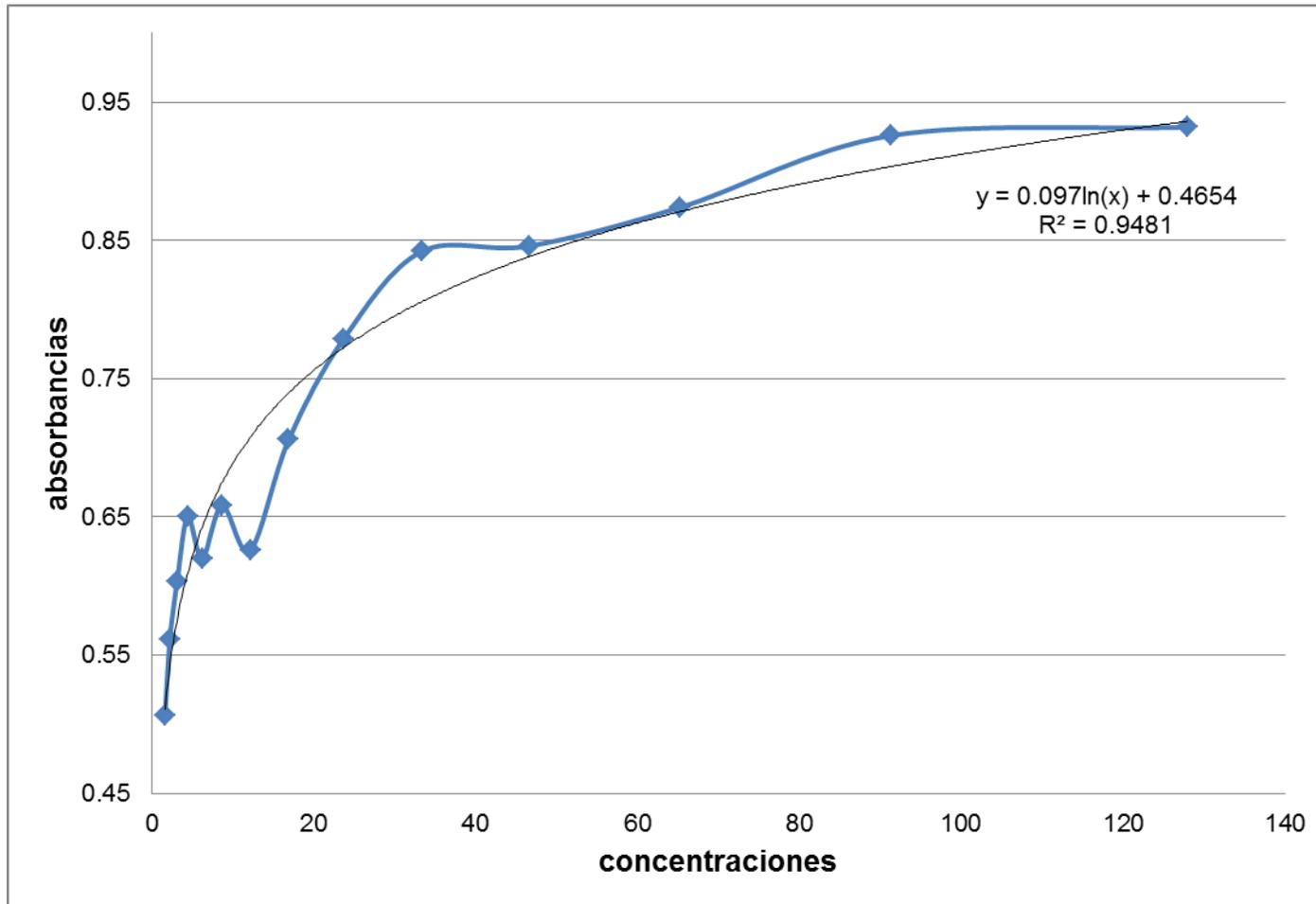


Para la elaboración de la curva de calibración con los datos obtenidos anteriormente se comenzó con la dilución de 512 para el antígeno y la dilución de 1:200 para el anticuerpo como se observa en la tabla 5 y la gráfica 2.

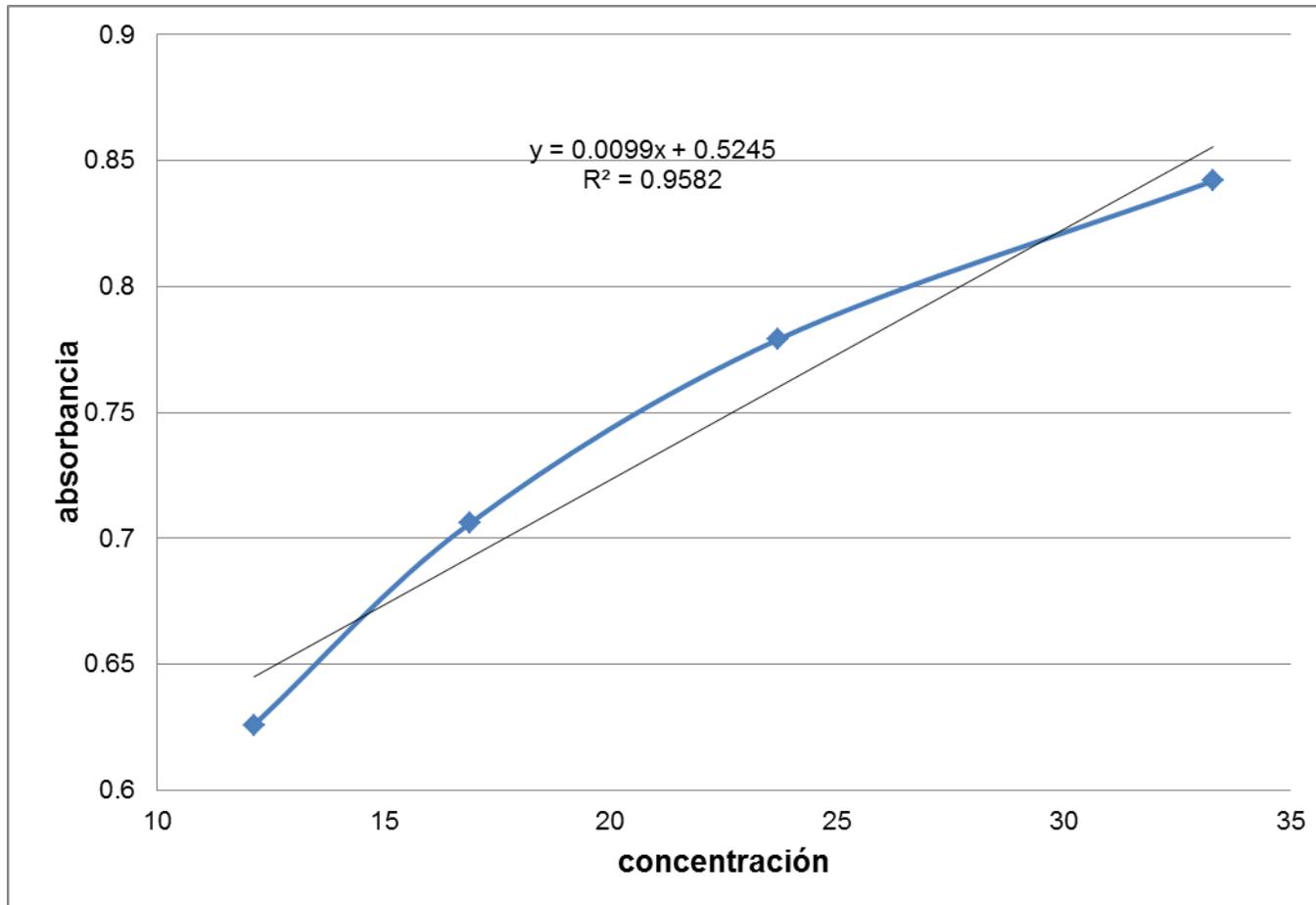
En la tabla 5 que se observa a continuación la linealización de la gráfica 3

**Tabla 5 Resultados de ELISA de curva de calibración**

[ $\mu\text{g/mL}$ ]	absorbancias												Promedios
128	0.868	0.986	0.965	0.941	0.922	0.969	0.916	0.902	0.940	0.954	0.914	0.916	0.932
91.4	1.005	0.919	0.963	0.944	0.930	0.901	0.863	0.926	0.903	0.926	0.919	0.916	0.926
65.3	0.927	0.932	0.861	0.901	0.914	0.856	0.850	0.908	0.873	0.744	0.875	0.856	0.874
46.6	0.896	0.845	0.868	0.885	0.852	0.819	0.859	0.827	0.820	0.799	0.809	0.878	0.846
33.3	0.975	0.916	0.854	0.830	0.834	0.814	0.809	0.810	0.779	0.767	0.821	0.905	0.842
23.7	0.842	0.821	0.783	0.763	0.776	0.788	0.760	0.749	0.769	0.773	0.730	0.801	0.779
16.9	0.754	0.724	0.733	0.704	0.707	0.613	0.669	0.708	0.707	0.702	0.716	0.745	0.706
12.14	0.568	0.663	0.667	0.651	0.613	0.654	0.640	0.619	0.642	0.608	0.577	0.616	0.626
8.67	0.669	0.658	0.684	0.681	0.631	0.624	0.632	0.665	0.681	0.673	0.686	0.614	0.658
6.19	0.619	0.625	0.610	0.635	0.653	0.609	0.599	0.680	0.645	0.567	0.665	0.542	0.620
4.4	0.603	0.618	0.599	0.617	0.599	0.568	0.524	0.536	0.606	0.590	0.601	0.570	0.650
3.1	0.659	0.620	0.639	0.552	0.565	0.590	0.571	0.622	0.582	0.594	0.619	0.629	0.603
2.2	0.600	0.618	0.573	0.530	0.570	0.526	0.527	0.534	0.532	0.555	0.548	0.622	0.561
1.6	0.533	0.548	0.530	0.488	0.497	0.424	0.473	0.495	0.496	0.503	0.561	0.527	0.506



Grafica. 2 Conjugado con enzima-anticuerpo



**Grafica. 3 Extrapolación de conjugado con enzima-anticuerpo**



## 12 ANÁLISIS DE RESULTADOS

La valoración de las reacciones de acoplamiento OVA y BSA con el hapteno de DPNH se llevo a cabo a través de espectroscopia de absorción ultravioleta, la cual detecta compuestos orgánicos a través de la interacción de la radiación de onda corta con los dobles enlaces presentes en los aminoácidos donde se observo un cambio significativo con respecto al valor arrojado por los blancos, se observa que los acarreadores puros en las graficas 17 y 19 se presenta una señal secundaria que se puede interpretar como la reacción de formación del conjugado. Es importante hacer notar que aunque la literatura reporta un tiempo de reacción de 24 horas (técnica reportada por Yang T<sup>53</sup>) nuestro tiempo de reacción tuvo que ser ampliado a 36 hrs debido que al realizar la prueba de acetaldehído todavía existía precipitación de DNP libre.

Una vez obtenido el conjugado y después de haber demostrado efectivamente que se llevo a cabo la reacción de acoplamiento, este se utilizo para inmunizar un conejo de la variedad Nueva Zelanda para obtener un anticuerpo contra el complejo OVA-DNP. El esquema de inmunización propuesto fue el adecuado, ya que el titulo de anticuerpos anti DNP fue alto, determinado mediante precipitación en capilar. La buena respuesta se debe probablemente a que el acarreador usado (OA) es una especie filogenéticamente diferente a la del conejo. Para lograr purificar los anticuerpos obtenidos se opto por el método reportado por Avrameas; el inmunoabsorbente se preparo con la OA y tratamiento con glutaraldehído, este Inmunoabsorbente resulto barato y rápido y se probó su especificidad para OA y con BSA-DNP, donde la reacción fue positiva con la BSA-DNP y no con la OA, lo que nos indica que el Inmunoabsorbente fue eficaz.

Para la elaboración del conjugado anticuerpo anti DNP-Peroxidasa de rábano se siguió el método de Avrameas el cual tiene como ventaja estar diseñado especialmente para la obtención de anticuerpos a partir de antígenos de naturaleza proteica como en nuestro caso (OVA y BSA) este método se basa en la insolubilización del antígeno mediante la formación de un gel con glutaraldehído lo que permite es una mejor purificación de los anticuerpos generados debida a la diferencia de solubilidad con respecto a otras proteínas del suero total

La concentración del antígeno que presenta una mejor absorbancia fue de 16µg/mL y el factor de dilución óptimo para el anticuerpo fue de 1:200. Estos valores permiten llevar a cabo el ensayo sin caer en la prozona que es aquella región en la que la alta



concentración del anticuerpo impide que se lleve a cabo la reacción de reconocimiento.

A partir de la concentración seleccionada del antígeno se valoró el comportamiento del ensayo a través de una curva de calibración de la reacción, modificando el agente bloqueador (usando glicina en vez de gelatina-leche) por que el tiempo de reacción era prolongado y había una respuesta débil por lo que no se podían obtener resultados fiables; por lo anterior se optó a usar glicina como agente bloqueador lo cual disminuye el tiempo de reacción y aumenta la intensidad de la respuesta (gráfica 2), en el cual podemos observar que las concentraciones comprendidas entre los valores de 8.67 y 3.1  $\mu\text{g}$  en la tabla 5, presentan una mejor linealidad para la reacción del conjugado antígeno-anticuerpo. Esto se observa de manera más clara en la gráfica 3 en la cual al ampliar la región evaluada se observa un mejor comportamiento lineal ya que su coeficiente de correlación es alto ( $R^2 = 0.95$ ) por lo tanto se proponen estas condiciones para realizar la curva de calibración.



## 13 CONCLUSIONES

Se obtuvieron los siguientes reactivos biológicos:

1. Se lograron preparar los conjugados OVA-DNP y BSA-DNP
2. Se logro obtener el anticuerpo especifico  $\alpha$ -DNP purificado mediante el método de inmunoabsorción y evaluado por la técnica de ELISA
3. Se obtuvo una reacción especifica cuantificable entre el anticuerpo y el antígeno misma que se corrobora mediante titulación del sistema

## 14 SUGERENCIAS

1. Se propone realizar la validación posterior de la técnica
2. Se deben elaborar nuevas formulaciones y técnicas de obtención para los conjugados y el anticuerpo



## 14 REFERENCIAS

1. Brown T. "Química: la ciencia central". 7ª ed. Edit. Prentice hall. México 2004.
2. Guisado IM. "Oxidación y producción de radicales libres". *Scientia*. 2007; 12: 67
3. McMurry J. "Química orgánica". 7ª ed. Edit. Learning. México 2008.
4. Espinoza O. "Estrés oxidativo y expresión de proteínas relacionadas en enfermedades de alto riesgo cardiovascular: estudio especial de hipertensión arterial". (Tesis Doctoral). Servicio de publicaciones e intercambio. Universidad de Valencia; 2007.
5. Gomberg M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *J. Am. Chem. Soc.* 1900; 22 (11): 757-771.
6. Paneth F, Hofeditz W. Über die darstellung von freiem methyl. *Ber. Deutschen Chem. Ges.* 1929; 62: 1335.
7. Rice F, Herzfeld K. The thermal decomposition of organic compounds from the standpoint of free radicals. The mechanism of some chain reactions. *J. Amer. Chem. Soc.* 1934; 56: 284.
8. Michaelis L. Free radicals as intermediate steps of oxidation-reduction. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1939; 7: 33.
9. Michaelis L, Schubert M, Granick S. The free radicals of the type of wuster's salts. *J. Am. Chem. Soc.* 1939; 61: 1981.
10. Michaelis L, Granick S, Schubert M. The semiquinone radicals of methylene blue and related dyestuff. *Science*. 1939; 90: 422-423.
11. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954; 119: 623-626.
12. Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars. Pharma*. 2005; 46: 85-95.
13. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956; 11: 298-300.



14. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47-95.
15. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 1969; 244: 6049-6055.
16. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 1972; 128: 617-630.
17. Boveris A, Chance B. The mitochondria generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 1973; 134: 707-716.
18. Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS. Lett.* 1975; 54: 311-314.
19. Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 1976; 156: 435-444.
20. Cadenas E, Boveris A, Ragan C, Stoppani A. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondrial. *Arch. Biochem. Biophys.* 1977; 180: 248-257.
21. Mittal CK, Murad F. Activation guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74: 4360-4364.
22. Ignarro L, Kadowitz P. The pharmacological and physiological role cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann. Pharmacol. Toxicol.* 1985; 25: 171-191.
23. Ramdowski M, Palmer R, Moncada S, The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1987; 92: 639-646.
24. Roth S, Dröge W. Regulation of T cell activation and T cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell. Immunol.* 1987; 108: 417-424.



25. Keyse S, Tyrrell R. Heme oxygenase is major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; 86: 99-103.
26. Storz G, Tartaglia L, Ames B. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*. 1990; 248: 189-194.
27. Schreck R, Baeueller P. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *Trend. Cell. Biol.* 1991; 1: 39-42.
28. Kowaltowski A, Souza-Pinto N, Castillo R, Vercesi A. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 47: 334-335.
29. Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T, Xiao H. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50: 903.
30. Zorrilla A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 2002; 21:178-85.
31. Vicedo A, Vicedo Y. Relación del estrés oxidativo con el catabolismo de las proteínas. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 2000; 19: 206-12.
32. Sohal R, Allen R. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp. Ger.* 1990; 25: 499-522.
33. Céspedes E, Rodríguez K, Llópiz N, Cruz N. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 2000; 19:186-90.
34. Guerra E. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna.* 2001; 18: 326-335.
35. Calderón R. Curso de métodos fisicoquímicos en biotecnología: inmunquímica. Morelos: UNAM; 2007. [consultado 25 abril 2012] <http://www.ibt.unam.mx/computo/pafs/met/inmunquimica.pdf>
36. Moreno J. Respuesta inmune y Mecanismos de Autoinmunidad. México: Limusa; 1996.



37. Rojas O. Inmunología. 3<sup>a</sup> ed. México: Medica Panamericana: 2006.
38. Levinson W. Microbiología e inmunología. 8<sup>a</sup> ed.: McGraw-Hill Interamericana. Madrid 2006.
39. Klein J. "Immunology". Edit. Blackwell scientific publications. Boston 1991.
40. Sela M. antigenicity: some molecular aspects. *Science*. 1969; 166: 1365-1374.
41. Sela M. Immunological studies with synthetic peptides. *Advanc. Immunol.* 1966; 5: 29-129.
42. Salinas M. Inmunología Médica. México: McGraw-Hill Interamericana; 2007.
43. Regueiro J, López C. Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune. Madrid: Medica Panamericana; 1996.
44. Bach Jean-Francois. "Inmunología". 1<sup>a</sup> ed. Edit. Limusa. México 1989.
45. Landsteiner K. The specificity of serological reactions. Massachusetts: Harvard University Press; 1945.
46. Aguilar L, García A, Corona T, Rangel R. Antología para el laboratorio de bioquímica celular y de los tejidos I. UNAM; 2008.
47. Friedli G. Interaction of de amidated soluble wheat protein (swp) with other food proteins and metals [friedli.com]. 1996. [consultado 12 febrero 2012] Disponible en <http://www.friedli.com/research/PhD/Chapter5a.html>
48. Walker J. The protein protocols handbook. 2nd. edn. New Jersey: Human Press; 2002
49. Streitwieser A, Heathcock C. Química Orgánica. México: Interamericana; 1979.
50. Parslow T. Inmunologia básica y clínica. 10<sup>a</sup> ed. México: Manual Moderno; 2002.
51. Roitt I, Delves P. Inmunología Fundamentos. 10<sup>a</sup> ed. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires 2003.
52. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. Inmunología de Kuby. 6<sup>a</sup> ed. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México 2007.



53. Yang T, Zhong P, Qu L, Wang C, Yuan Y. Preparation and identification of anti-2,4-dinitrophenyl monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.* 2006; 313: 20-18.
54. Shriner R, Fuson R, David, Curtin. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. México: Limusa-Wiley; 1966.
55. Lowry O, Rousebrough N, Lewis A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
56. Marroquín R. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica. México: UNAM; 2002. p.23-25,59-62.
57. Avrameas S, Ternynck T, Guesdon JL. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand. J. Immunol.* 1978; 8: 7-2