

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PURIFICACIÓN DE DOS ISOENZIMAS DE
PEROXIDASA DE NABO (*Brassica napus* L. var.
Purple top white globe) Y SU USO EN LA
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES
EN CONEJO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

BRISIA VILLALÓN CORONA

DIRIGIDO POR:

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. DE 2001

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ

No Adq. H 655717
No. Título TS
Clas. 547.23
V 714p



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARRERA DE QUÍMICO EN ALIMENTOS

**PURIFICACIÓN DE DOS ISOENZIMAS DE PEROXIDASA
DE NABO (*Brassica napus* L. var. Purple top white
globe) Y SU USO EN LA PRODUCCIÓN DE
ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

BRISIA VILLALÓN CORONA

SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

Director

M. en C. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ

Sinodal Propietario

CAND. DRA. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

Sinodal Propietario

M.C. CARLOS ARROYAVE HERNÁNDEZ

Sinodal Suplente

CENTRO UNIVERSITARIO
SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. MÉXICO 2001

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Alimentos (DIPA. Facultad de Química. UAQ); el bioterio de la Facultad de Medicina (UAQ) y el departamento de Bioquímica del CINVESTAV (México, D.F.)

ÍNDICE

	Pág
Resumen	i
Índice general	iii
Índice de cuadros	iv
Índice de figuras	vi
Índice de apéndices	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Proteínas y enzimas	4
2.1.1 Peroxidasa	6
2.1.1.1 Isoenzimas de peroxidasa	7
2.1.1.2 Actividad de peroxidasa	8
2.1.2 Determinación de proteína	8
2.1.2.1 Métodos que usan el enlazamiento a un colorante	9
2.1.2.2 Método espectrofotométrico	9
2.2 Purificación de proteínas	10
2.2.1 Preparación de extractos enzimáticos	10
2.2.2 Concentración	10
2.2.2.1 Ultrafiltración	12
2.2.2.2 Precipitación	13
2.3 Técnicas cromatográficas	13
2.3.1 Intercambio iónico	14
2.3.2 Filtración en gel	14
2.3.3 Interacción hidrofóbica	15
2.4 Electroforesis	17
2.5 Inmunógenos y antígenos	18
2.6 Inmunoglobulinas	22
2.7 Estructura de la inmunoglobulina G (IgG)	22
2.7.1 Cadenas ligeras	23
2.7.2 Cadenas pesadas	23
2.8 Producción de anticuerpos	25
2.8.1 Anticuerpos policlonales y monoclonales	26
2.8.2 Naturaleza del inmunógeno	26
2.8.3 Elección del animal	27
2.8.4 Rutas de inmunización	27
2.8.5 Dosis del inmunógeno	28
2.8.6 Respuesta inmunitaria	30
2.9 Detección de anticuerpos	30
2.9.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	32
2.9.1.1 Tipos de prueba ELISA	33
2.9.2 Transferencia Western (Western blot)	33
2.9.2.1 Detección de proteínas por quimioluminiscencia	36

3. JUSTIFICACIÓN	39
4. RELEVANCIA DEL ESTUDIO	40
5. OBJETIVOS	41
5.1 Objetivo general	41
5.2 Objetivos específicos	42
6. MATERIALES Y METODOS	42
6.1 Material biológico	42
6.2 Reactivos	43
6.3 Purificación de la enzima peroxidasa	43
6.3.1 Determinación de proteína	43
6.3.2 Determinación de actividad	44
6.3.3 Obtención del extracto crudo	44
6.3.4 Ultrafiltración	44
6.3.5 Precipitación	45
6.3.6 Cromatografía de intercambio iónico	45
6.3.7 Cromatografía de interacción hidrofóbica	45
6.3.8 Electroforesis	46
6.4 Producción de anticuerpos	46
6.4.1 Inmunización	47
6.4.2 Purificación de la inmunoglobulina G del anticuerpo	49
6.5 Inmunodetección	49
6.5.1 Transferencia Western (Western blot)	50
6.5.2 Prueba de ELISA	52
6.6 Diseño experimental	54
7. RESULTADOS	54
7.1 Prepurificación	54
7.1.1 Obtención de extracto crudo	54
7.1.2 Ultrafiltración	54
7.1.3 Precipitación con acetona	57
7.2 Purificación	57
7.2.1 Cromatografía de intercambio iónico	60
7.2.2 Cromatografía de interacción hidrofóbica	63
7.2.3 Isoperoxidasa de brócoli	63
7.3 Producción de los anticuerpos (antisuero)	66
7.4 Transferencia Western	66
7.4.1 Elección de concentración de proteína y dilución de anticuerpo adecuados	67
7.4.2 Reacciones cruzadas	71
7.4.3 Importancia de las cadenas glicosiladas de la peroxidasa en la respuesta inmune	73
7.5 Determinación de la homología y reactividad cruzada mediante técnica ELISA	82
8. CONCLUSIONES	84
9. BIBLIOGRAFÍA	93
10. APÉNDICES	

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Lisis celular de varios tejidos y cultivos de células de plantas, animales o microbianos	11
Cuadro 2. Características de la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales	25
Cuadro 3. Programación de inmunización de conejos con peroxidasa de nabo	49
Cuadro 4. Actividad de peroxidasa del extracto crudo de diferentes vegetales del género <i>Brassica</i>	55
Cuadro 5. Tabla de purificación de dos isoenzimas de nabo.	56
Cuadro 6. Cantidad de proteína y volumen del antisuero obtenido de las inmunizaciones realizadas	66
Cuadro 7. Constantes de afinidad para dos isoenzimas de peroxidasa de nabo y sus respectivos anticuerpos, así como porcentaje de reacción cruzada.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estructura del sulfato dodecílico de sodio	16
Figura 2. Componentes y mediadores principales de la respuesta inmune	20
Figura 3. Descendientes de un linfocito B activado	21
Figura 4. Estructura de la inmunoglobulina G	24
Figura 5. Secuencia de sucesos en la respuesta inmune típica	29
Figura 6. Cinética del desarrollo de anticuerpos como respuesta a la inmunización	31
Figura 7. Tipos de técnica ELISA	34
Figura 8. Reacción para la detección de proteína por quimioluminiscencia	38
Figura 9. Principio del proceso de detección de anticuerpos por transferencia Western mediante quimioluminiscencia.	38
Figura 10. Localización del ganglio poplíteo en conejo	48
Figura 11. Diagrama de flujo del diseño experimental	53
Figura 12. Cromatografía de intercambio iónico del extracto precipitado con acetona	58
Figura 13. Electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras, de los extractos de peroxidasa en diferentes etapas de purificación	59
Figura 14. Cromatografía de interacción hidrofóbica de la fracción no retenida en intercambio iónico	61
Figura 15. Electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras de las dos isoperoxidasas purificadas	62
Figura 16. Electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras de las fracciones colectadas de isoperoxidasa de brócoli que presentaron actividad	64
Figura 17. Transferencia Western para reacciones directas P1:AbP1 y	68

P2:AbP2

Figura 18.	Transferencia Western para reacciones cruzadas P1:AbP2, P2:AbP1, PB:AbP1 y PB:AbP2	70
Figura 19.	Transferencia Western para isoperoxidasas desglicosiladas P1 y P2	72
Figura 20.	Efecto de la dilución de AbP1 en el desarrollo de ELISA	75
Figura 21.	Efecto de la dilución de AbP2 en el desarrollo de ELISA	76
Figura 22.	Representación gráfica del porcentaje de unión P1:AbP1 contra la concentración de P1 libre	77
Figura 23.	Representación gráfica del porcentaje de unión P2:AbP1 contra la concentración de P2 libre	77
Figura 24.	Representación gráfica del porcentaje de unión P2:AbP2 contra la concentración de P1 libre	78
Figura 25.	Representación gráfica del porcentaje de unión P1:AbP2 contra la concentración de P1 libre	78

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág
Apéndice 1 Curva de calibración para la determinación de proteína por el método Bradford.	94
Apéndice 2 Curva de calibración para obtener la presión transmembrana promedio (PTP) en la utilización de la unidad de ultrafiltración	95
Apéndice 3 Cálculos para obtener la constante de afinidad de AbP1 y AbP2	96

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue purificar dos isoenzimas de peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. var. purple top white globe) y utilizando éstas como antígenos, ver la posibilidad de obtener anticuerpos específicos que pudieran ser utilizados en el futuro en columnas de inmovilización que disminuirían el número de etapas involucradas en la purificación de la peroxidasa.

Se purificaron dos isoenzimas de peroxidasa, P1 (39 kDa) y P2 (36 kDa) a partir de nabo (*Brassica napus* L. var. purple top white globe), mediante técnicas cromatográficas, verificando su pureza por electroforesis. Las actividades específicas fueron de 618 U/mg para P1 y 1059 U/mg para P2 con factores de purificación de 118 y 203 respectivamente. El rendimiento de actividad fue de 13 % para P2 y 7.8 % para P1.

Las isoperoxidasas purificadas fueron usadas como antígenos para la inducción de anticuerpos policlonales, AbP1 y AbP2, en conejos de raza New Zealand. Los anticuerpos producidos se detectaron mediante transferencia Western. Usando ensayos inmunológicos, Western y ELISA, se obtuvo un 44.7 % de reacción cruzada entre P1 y AbP2 y 46.3 % entre P2 y AbP1 indicando que la estructura tridimensional de P1 y P2 son muy semejantes.

Se realizaron reacciones cruzadas con una isoperoxidasa de brócoli, corroborando que entre las isoperoxidasas purificadas y la de brócoli existen determinantes antigénicos estructuralmente relacionados, no obstante la diferencia en sus pesos moleculares.

Una remoción del 90 % de la porción glicosídica de las dos isoperoxidasas de nabo, no impidió su reconocimiento inmunológico.

Palabras clave: Peroxidasa, purificación de proteínas, anticuerpos policlonales, transferencia Western, ELISA.

1. INTRODUCCIÓN

La enzimología o ciencia de las enzimas, siempre será un tema de actualidad en la biotecnología, pues éstas son proteínas con muy elevada especificidad para catalizar un gran número de reacciones de interés práctico.

Las peroxidasas se encuentran en bacterias, hongos, plantas y animales (Robinson, 1991) y con base en la similitud de su secuencia de aminoácidos pueden clasificarse dentro de dos superfamilias: la proveniente de hongos, plantas y bacterias, y aquella proveniente de animales (Welinder, 1992).

La enzima peroxidasa (E.C. 1.11.1.7), es una hemoglicoproteína que cataliza reacciones de óxido-reducción, siendo la más estudiada y comercializada de estas glucoproteínas la proveniente de rábano picante, tal peroxidasa se designa con la abreviatura HRP por sus siglas en inglés *horse radish peroxidase* (se usará ésta en lugar de la abreviatura en español).

Esta enzima ha sido de interés en la industria de alimentos debido a su habilidad para desarrollar cambios deseables y algunas veces indeseables; tiene una buena estabilidad a la temperatura y al pH, participa en la pérdida del color, sabor, textura y/o merma en valor nutritivo de algunas frutas y hortalizas (Fils y col., 1985). Debido a su habilidad para catalizar reacciones de óxido-reducción y producir compuestos coloridos a muy bajas concentraciones de sustratos cromogénicos (Krell, 1991) es ampliamente usada en kits para análisis clínicos; en forma altamente purificada es muy útil para la preparación de anticuerpos conjugados como enzima reportera (técnicas ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*); así como en inmunoensayos e inmunohistoquímica.

La principal fuente de peroxidasa es el rábano picante (*Armoracia rusticana* L.), la cual debido a sus condiciones de crecimiento no se desarrolla en nuestro país. Con el fin de tener una mayor disponibilidad de peroxidasa a un menor costo, es preciso encontrar fuentes alternativas y métodos de obtenerla en forma pura de manera más rápida y eficiente que proporcionen un buen rendimiento.

Las técnicas de extracción y purificación de proteínas forman parte de un proceso biotecnológico global. Los requerimientos de pureza de una proteína para una

aplicación específica de alta demanda, reclama la invención de procedimientos más prácticos y económicos en su obtención.

El uso de anticuerpos para la purificación de un extenso número de sustancias, es una valiosa técnica en la investigación biotecnológica. El desarrollo de la cromatografía de inmunoafinidad para la purificación de proteínas constituye un método rápido y simple, permitiendo la eliminación de etapas requeridas en los métodos de purificación convencionales, los cuales pueden tornarse lentos e ineficientes.

La inmunoafinidad es particularmente usada para purificar aquellas proteínas blanco que se encuentran con un alto nivel de proteínas contaminantes, como la peroxidasa; sin embargo, para lograr el objetivo mencionado, primero deben obtenerse anticuerpos altamente específicos y en concentraciones que permitan su uso en la purificación del antígeno.

2. ANTECEDENTES

2.1 Proteínas y enzimas

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células, constituyendo el 50 % o más de su peso seco, participando en su estructura y funciones celulares específicas, por lo que se encuentran en todas partes de ésta. Existen muchas clases de proteínas, cada una de ellas especializada en una función biológica diferente: enzimas, hormonas, de reserva, de transporte, contráctiles, toxinas, protectoras de la sangre de los vertebrados y estructurales (Lehninger, 1993).

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los organismos vivos. Cada reacción que se lleva a cabo en la célula es catalizada por una enzima en particular, por lo que en cada célula se encuentra un gran número de enzimas (Rodríguez-Serrano, 1999).

Tres son las principales características que hacen notables a las enzimas sobre otros catalizadores: el poder catalítico, su especificidad y la capacidad para regular su acción catalítica por una variedad de compuestos naturales. *El poder catalítico* consiste en que la velocidad de la reacción catalizada por una enzima comparada con la de un catalizador químico, se lleva a cabo más rápidamente y a temperaturas más bajas. Como consecuencia de su naturaleza proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción. *La especificidad* de las reacciones catalizadas por enzimas permite modificar selectivamente sustratos individuales sin afectar otros; aunque algunas como las degradativas, presentan una baja especificidad. *La actividad catalítica* puede ser *regulada* por pequeños iones u otras moléculas, como sucede con el mecanismo de acción de la fosforilasa, en donde se necesita Ca^{2+} y hormonas como la adrenalina para llevarse a cabo (Prince y Stevenes, 1989).

Los principales grupos de enzimas son seis (Rodríguez-Serrano, 1999):

1. Oxidorreductasas: catalizan reacciones de óxido-reducción .
2. Transferasas: catalizan reacciones de transferencia de grupo.
3. Hidrolasas: catalizan reacciones hidrolíticas.

4. Liasas: catalizan reacciones de eliminación, en las cuales se forma un doble enlace.
5. Isomerasas: catalizan reacciones de isomerización.
6. Ligasas o sintetasas: catalizan reacciones de unión entre dos moléculas, con un gasto energético (normalmente de adenosina trifosfato, ATP).

2.1.1 Peroxidasa

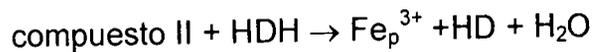
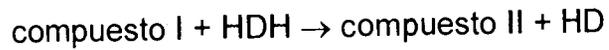
La enzima peroxidasa (EC 1.11.1.7) se clasifica dentro de las óxido-reductasas y es principalmente encontrada como hemoproteína. Dentro de las células vegetales está sobre todo en las paredes celulares, citoplasma y vacuolas (Robinson, 1991).

Se sabe que las peroxidasas son glucoproteínas (Shannon y *col.*, 1966), por ejemplo, la HRP tiene un contenido de carbohidratos de aproximadamente 17%, siendo los más importantes glucosa, N-acetilglucosamina, manosa, xilosa y fucosa. Las cadenas glicosiladas normalmente se encuentran como N-glicosilaciones en los residuos de asparagina (Welinder, 1979), ó como O-glicosilaciones las cuales presentan generalmente una estructura galactosa(β 1-3)N-acetil glucosamina (O-glicano) unida a un residuo de serina o treonina (Gerard, 1990).

La HRP contiene un grupo prostético protoporfirina férrica en el cual el hierro se coordina con un residuo proximal de histidina en la quinta posición y una molécula de agua en la sexta posición. Por la forma en que se dobla la molécula de peroxidasa, aparece una histidina distal cerca del sitio activo. Ambos residuos, el proximal (His-170) y distal (His-42) de histidina situados a corta distancia de la molécula de agua, juegan un papel importante en la actividad catalítica.

El primer paso en la actividad catalítica de la peroxidasa, es la oxidación del grupo prostético ferrihemo de la enzima por parte del H_2O_2 o un hidroperóxido orgánico. Tal reacción da un compuesto intermedio inestable conocido como compuesto I, el cual contiene al grupo hemo en forma de un radical oxiferril π -catiónico ($[Fe^{4+}=O]^+$). Este compuesto I reacciona con un donador de hidrógenos (HDH), el cual pierde un equivalente de oxidación, para dar lugar al compuesto II el cual sustrae un

segundo electrón de otra molécula donadora de electrones para retornar a la forma original:



(Campa, 1991)

Las peroxidasas purificadas de plantas, hongos y levaduras, son homólogas entre ellas mientras que las peroxidasas de animales constituyen una superfamilia aparte en la cual las peroxidasas de la tiroides y mieloperoxidasa son fácilmente alineables e idénticas en un 40-50% (Welinder, 1991). La peroxidasa en plantas, ha sido implicada en numerosos procesos fisiológicos; su actividad se incrementa a la par que otras enzimas como las poligalacturonasas y celulasas cuando inicia la maduración. La respuesta a daño físico por hongos o por virus, también tiene relación con la actividad de peroxidasa, al igual que la pérdida de sabor, color, textura y calidad nutricional de algunos vegetales (Robinson, 1991).

Esta enzima ha sido muy utilizada en la industria alimenticia como un indicador en el proceso de escaldado de algunos vegetales, ya que su termorresistencia es más alta que otras enzimas vegetales como la polifenol oxidasa, lipoxigenasa, lacasa y catalasa. Es ampliamente aprovechada en kits para análisis clínicos, mientras que en forma altamente purificada se utiliza como marcador en inmunoensayos enzimáticos para la detección de microorganismos patógenos en alimentos, en inmunohistoquímica como enzima reportera en pruebas ELISA, por lo que su potencial de mercado es muy alto.

2.1.1.1 Isoenzimas de peroxidasa

Una sola especie de enzimas, puede presentar varias formas de catalizar la misma reacción. Esto puede deberse a una diferencia en la secuencia de aminoácidos de la enzima, algunas modificaciones covalentes o cambios conformacionales. (Rodríguez-Serrano, 1999).

Las peroxidadas de plantas son conocidas por su gran número y variedad de isoenzimas. Los perfiles de isoenzimas son con frecuencia flexibles y pueden originarse por efecto de la diversidad genética, modificaciones postraduccionales, condiciones ambientales y condiciones de extracción (Welinder, 1992).

Con los avances en la ingeniería genética, las bases moleculares de la diversidad entre peroxidadas están ahora en camino de ser elucidadas. En los últimos cinco años, más de cuarenta genes y secuencias de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), enteras o parciales, han sido reportadas para 17 diferentes plantas durante los últimos cinco años y su número se está incrementando (Duarte-Vázquez y *col.*, 1999).

En las células de las plantas las peroxidadas se localizan principalmente en la pared celular, vacuolas y organelos de transporte, además de la membranas que rodean los ribosomas (Robinson, 1991).

La plasticidad de la pared celular en las plantas se encuentra estrechamente relacionada con la naturaleza y el número de enlaces cruzados entre la matriz de polímeros. La presencia de las peroxidadas puede disminuir la plasticidad de la pared celular por los enlaces cruzados de moléculas de extensina (glicoproteínas de la pared celular de las plantas, de importancia estructural) a través de la formación de enlaces intra o inter-covalentes entre los residuos de tirosina para formar isoditirosina (Campa, 1991).

Los enlaces covalentes cruzados también pueden formarse por la acción de las peroxidadas de la pared celular sobre las pectinas o hemicelulosas por formación de puentes diferulato entre los residuos de ferulato (Fry, 1986). Las peroxidadas aniónicas se han identificado como las más importantes en la actividad de peroxidasa de la pared celular; debido a su alta afinidad por los precursores de

lignina, éstas se han asociado con el proceso de lignificación y son además, muy importantes para el buen funcionamiento de la pared (Campa, 1991).

Las peroxidasas moderadamente aniónicas han mostrado tener una alta afinidad por la pared celular especialmente por las áreas ricas en lignina; los niveles de estas isoenzimas se incrementan cuando la planta ha sufrido daño. Las peroxidasas catiónicas tienen poca actividad en la lignificación, pero son capaces de catalizar la formación de peróxido de hidrógeno, utilizable para otras peroxidasas, su presencia en raíces se ha atribuido a una manera de proteger contra patógenos del suelo (Lagrimini y Rothstein, 1987).

La actividad de peroxidasas también ha sido relacionada con la resistencia de las plantas al ataque de los patógenos. El papel preciso de la peroxidasa en las reacciones de defensa de las plantas contra patógenos no se ha entendido de manera clara. Ensayos *in vitro* indican que las peroxidasas en presencia de apropiados donadores de hidrógeno y H_2O_2 pueden producir productos tóxicos, potencialmente letales para microorganismos infecciosos. Adicionalmente, un incremento en los niveles de peroxidasa se asocia con la muerte celular, lo cual evita la multiplicación de virus y su irrigación a otras células. La muerte de la célula es acompañada de un incremento en la actividad de peroxidasa y la inducción de isoenzimas específicas (Doke, 1983). La afinidad de las isoenzimas por los sustratos para la síntesis de lignina sugiere que las peroxidasas pueden ayudar a sintetizar sustancias de barrera que confinen al microorganismo infeccioso al sitio de la inoculación.

2.1.1.2 Actividad de peroxidasa

La actividad de esta enzima se mide indirectamente por la velocidad de transformación de sustratos donadores de hidrógeno; generalmente se utilizan sustratos donadores de hidrógeno que al ser oxidados forman compuestos con grupos cromóforos que son usados para el análisis colorimétrico de la actividad de peroxidasa (Rodrigo y col., 1996).

2.1.2 Determinación de proteína

Un valor indispensable en la cuantificación de la actividad específica de una enzima es la concentración de proteína en la preparación enzimática.

Son cuatro los aspectos importantes para la determinación de proteína (Coligan y *col.*, 1995):

- a) Sensibilidad de la técnica usada.
- b) Compuestos que interfieran con la evaluación.
- c) Remoción de compuestos que interfieren.
- d) Correlación de información entre técnicas.

Existen varios métodos que son usados para determinar el contenido de proteína de una preparación. Entre otros tenemos; método de Kjeldahl, método de Biuret, método de Lowry, método de Bradford, método del ácido bincinconínico, métodos turbidimétricos y basados en fluorescencia y método espectrofotométrico.

2.1.2.1 Métodos que usan el enlazamiento a un colorante

Estos se fundamentan en el cambio de color diferencial de un colorante en respuesta a diferentes concentraciones de proteína.

1. Método de Bradford.

Cuando una solución ácida de Azul de Coomassie G-250 se une a las proteínas se presenta una máxima absorbancia que cambia de 465 a 595 nm (Bradford, 1976).

2. Método de Lowry.

Se basa en el desarrollo de un colorante color azul debido a la reacción de Biuret y la reducción del reactivo de fosfomolibdeno-volframato por aminoácidos como tirosina y triptofano presentes en las proteínas.

Este método ha sido modificado muchas veces. La absorbancia se mide a 750nm (alta sensibilidad) o a 500 nm (baja sensibilidad) para proteínas concentradas. La sensibilidad va desde 0.2 μg hasta 300 μg (Stoscheck, 1990).

3. Método de Biuret.

Es el método sencillo más preciso para la determinación de proteína. Este depende de la reacción de Cu^{2+} en solución alcalina, con los enlaces peptídicos de la proteína para dar una coloración roja que es medida a 540 nm. Se requiere de 1 a 10 mg de proteína por análisis, por lo que existen micrométodos que requieren cerca de un décimo de tal cantidad. En este método solo determina proteína, reduciéndose la interferencia de azúcares (Whitaker, 1994).

2.1.2.2 Método espectrofotométrico

Todas las proteínas tienen al menos dos regiones de absorbancia máxima, una cerca de 280 nm debido a los residuos de aminoácidos aromáticos de tirosina y triptofano, y el segundo a 180 nm debido a los enlaces peptídicos de las proteínas. Otros compuestos también absorben dentro de estas regiones pudiendo interferir en el ensayo. La determinación de proteína por absorbancia a 280 nm tiene las ventajas de no destruir a la enzima, es rápido, y con una sensibilidad razonable (0.1 a 0.5 mg/mL) (Whitaker, 1994).

2.2 Purificación de proteínas

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento. En una serie de etapas independientes, se emplean las diversas propiedades fisicoquímicas de las proteínas que interesan para separarlas progresivamente de las demás sustancias. La idea fundamental, no es necesariamente el reducir las pérdidas de la proteína deseada, sino eliminar selectivamente a los demás componentes de la mezcla de modo que la sustancia que se busca permanezca (Voet y Voet, 1992).

La proteína tiene una conformación espacial dada por las condiciones termodinámicas del sistema biológico en el que se encuentra y ésta puede variar de sistema a sistema. Una vez que el sistema es destruido para recuperar a la proteína, ésta se ve expuesta a condiciones que generalmente provocan la desnaturalización y a veces la hidrólisis. Por esta razón es necesario tener

precaución y tratar de dar condiciones que permitan preservar la estructura de la proteína (García y Navarrete, 1999).

El desarrollo de un procedimiento adecuado y eficaz para la purificación de proteínas requiere del conocimiento previo a cerca de la proteína de interés.

Tres requisitos son necesarios para desarrollar una estrategia de purificación:

- 1) Determinar la cantidad y pureza de la proteína necesaria para su uso posterior.
- 2) Conocer la mayor información relacionada con fuentes y naturaleza de la proteína de interés y contaminantes en la preparación biológica.
- 3) Buscar la mejor fuente de la proteína de interés.

Estos requisitos son interdependientes y a mayor conocimiento de uno, mayor probabilidad de desarrollar una estrategia exitosa (Williams, 1995).

2.2.1 Preparación de extractos enzimáticos

La primera etapa en el aislamiento de una proteína, es conseguir su disolución; para esto debe ser liberada de las células que la contienen. El método elegido para este procedimiento depende de las características mecánicas del tejido de procedencia, así como de su localización en la célula (Voet y Voet, 1992).

Existen diferentes técnicas de homogeneización mediante la lisis de tejidos o cultivos celulares (Cuadro 1).

2.2.2 Concentración

2.2.2.1 Ultrafiltración

Es considerada como uno de los métodos de mayor éxito en la separación de proteínas. Su aplicación es importante sobre todo en productos que se encuentran a muy bajas concentraciones y se sugiere emplear la separación por membranas en las primeras etapas de los procesos de purificación para concentrar la proteína de 10 a 50 veces con el fin de facilitar las siguientes etapas (Rodríguez-Serrano, 1999).

Las ventajas que ofrece como método de concentración sobre otros son las siguientes (Amaya-Llano, 2000):

- a) La precipitación de la proteína seguida por la centrifugación requiere una concentración mínima de 100 µg/mL y frecuentemente resulta en recuperación pobre debida al cambio de fase.
- b) La concentración por diálisis requiere mayor tiempo de proceso y los volúmenes están limitados por la dificultad de manejo.

Cuadro 1. Lisis celular de varios tejidos y cultivos de células de plantas, animales o microbianos (García y Navarrete, 1999).

Técnica	Fuente
Homogenización con navajas	Tejidos animales y vegetales
Homogenización manual	Tejidos suaves
Ultrasonido (sonicación)	Suspensiones celulares
Prensa francesa	Bacterias, levaduras, tejidos vegetales
Molino	Bacterias, levaduras, tejidos vegetales
Vórtex con esferas de vidrio	Suspensiones celulares
Digestión enzimática	Bacterias, levaduras, células vegetales
Solubilización de membranas	
Lisis por detergentes	Cultivos de tejidos
Lisis por solventes orgánicos	Bacterias, levaduras
Lisis osmótica	Eritrocitos, bacterias
Lisis por congelación-descongelación	Microorganismos, tejidos vegetales y animales

- c) El secado por congelación, requiere de tiempos largos de proceso y pueden dar como resultado baja recuperación debido al cambio de fase. Al concentrar proteína, también se concentran sales.

2.2.2.2 Precipitación

Actualmente la precipitación se emplea en los primeros pasos de purificación además de considerarse un método de concentración de proteínas antes del análisis o subsecuentes etapas de purificación. Los métodos de precipitación de proteínas se basan en la disminución de solubilidad, desnaturalización selectiva y precipitación por afinidad (Prado-Barragán, 1999). Los precipitados proteicos son formados por la agregación de las moléculas proteicas inducida por los cambios de pH, fuerza iónica o por la adición de solventes orgánicos miscibles o polímeros (Harris, 1995).

Precipitación por adición de sales.

En la precipitación por insolubilización se emplean sales disociables. Diferentes tipos de sales neutras o ligeramente ácidas han sido utilizadas para la solubilización, precipitación o fraccionamiento de proteínas; a diferentes concentraciones y combinaciones de pH, siendo el sulfato de amonio el más utilizado debido a su bajo costo, alta solubilidad y ausencia de efectos desnaturalizantes (Prado-Barragán, 1999).

Precipitación por solventes orgánicos.

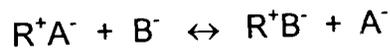
Los disolventes orgánicos, tales como acetona y etanol, son generalmente buenos precipitantes de proteínas ya que por sus constantes dieléctricas pequeñas provocan la disminución del poder de solvatación del disolvente acuoso respecto a los iones disueltos, entre ellos los de las proteínas (Voet y Voet, 1992).

Al implementar esta técnica, la temperatura debe ser menor a 0 °C pues usando mayores temperaturas, la conformación de la proteína se modifica, haciendo posible que las moléculas de solvente accedan al interior de la proteína y ocurran interacciones hidrofóbicas y causen desnaturalización (Harris, 1995).

2.3 Técnicas cromatográficas

2.3.1 Intercambio iónico

En el proceso de intercambio iónico, los iones que están unidos electrostáticamente a una matriz insoluble e inerte químicamente son sustituidos de modo reversible por los iones en disolución:



R^+A^- es un intercambiador aniónico y en la forma A^- y B^- representa a los aniones en la disolución. Los intercambiadores catiónicos, de modo semejante son portadores de grupos con carga positiva que unen cationes de modo reversible. Sin embargo, las proteínas y otros poli-electrolitos que son portadores de cargas positivas y negativas pueden unirse tanto a los cambiadores de cationes como a los de aniones, dependiendo de su carga neta. La afinidad con la que un poli-electrolito concreto se une a un cambiador iónico determinado depende de las identidades y de las concentraciones de los demás iones presentes en la disolución, debido a la competencia entre los diversos iones por los sitios de unión sobre el intercambiador iónico. Las afinidades de unión de los poli-electrolitos portadores de grupos ácido-base dependen también, en gran medida del pH ya que sus cargas netas varían con dicho valor.

Diversas proteínas se unen al intercambiador iónico con afinidades diferentes. A medida que se lava la columna, proceso conocido como elución, las proteínas con afinidades relativamente bajas por el intercambiador iónico se desplazarán en la columna más rápido que las proteínas que se unen al intercambiador iónico con afinidad superior (Voet y Voet, 1992).

Las proteínas son eluidas selectivamente al incrementar sistemáticamente la concentración de sal. Para efectuar la elución de una proteína con una alta densidad de carga, requiere de altas concentraciones de Na^+ que la necesitada para una proteína con una densidad de carga más baja. Otro método de elución de proteínas, se realiza al cambiar el pH de la elución cambiando la carga ya sea de la matriz o de la proteína (de positivo a negativo, o viceversa) (Whitaker, 1994).

2.3.2 Filtración en gel

Haciendo uso de la variación entre los tamaños de las moléculas existentes en la muestra, la cromatografía en columna por permeación en gel o más comúnmente llamada filtración en gel, es utilizada como un medio de purificación de igual manera es empleada en la determinación de pesos moleculares.

En la filtración en gel se utiliza una fase estacionaria sólida que consta de diminutas partículas esféricas de gel que están hechas de sustancias cuya estructura química está entrelazada de modo parecido a una malla; estando entre los materiales utilizados la poliacrilamida, la agarosa, el poliestireno, la agarosa entrecruzada, mezclas de poliacrilamida y agarosa, el vidrio poroso, el polimetilmetacrilato y el dextrano entrecruzado con epiclorhidrina, el cual dio lugar al desarrollo de la serie comercial Sephadex. El dextrano usado es un polisacárido soluble de glucosa producido por el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*. El grado de entrecruzamiento está controlado por la cantidad de epiclorhidrina utilizada, que a su vez controla el grado de hidratación (agua atrapada dentro de la matriz del gel) y por tanto la porosidad (Wiseman, 1991).

El proceso de filtración en gel consiste en el reparto de las moléculas de soluto entre la fase móvil (el solvente) y la fase estacionaria, constituida por los espacios existentes entre las partículas porosas del gel. Al ingresar en la columna del gel, las sustancias de la muestra empiezan a interactuar de modo reversible con los gránulos al entrar y salir de ellos por los poros. El ingreso a los gránulos estacionarios retrasa el movimiento de las sustancias a través de la columna, de modo que las moléculas pequeñas tardan más que las grandes en salir porque ingresan y se permean con mayor facilidad en el interior de los gránulos. Las moléculas cuyas dimensiones son superiores a las de los poros no penetran en ellos y, por tanto, como están disueltos en la fase móvil, pasan con facilidad a través de la columna (Bohinski, 1991).

2.3.3 Interacción hidrofóbica (CIH)

Las interacciones hidrofóbicas son una de las principales fuerzas que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas; estas interacciones pueden ser

explotadas y usadas como un medio para la separación de las mismas. El grado de hidrofobicidad de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos. La capacidad de una proteína para experimentar interacciones hidrofóbicas en su estado nativo depende de sus sitios superficiales hidrófobos los cuales dependen de una estructura terciaria y cuaternaria intacta (Kennedy, 1990).

La cromatografía de interacción hidrofóbica fue desarrollada a raíz de la observación de que algunas proteínas eran retenidas inesperadamente en geles de afinidad que contenían brazos espaciadores hidrofóbicos. Este hallazgo se aplicó a la preparación de familias de adsorbentes hidrofóbicos utilizando cadenas hidrocarbonadas de series homólogas de diferentes longitudes. En la práctica, la mayoría de las proteínas pueden purificarse satisfactoriamente utilizando substituyentes C-8 o fenilo. Las interacciones hidrofóbicas son tanto mayores cuanto mayor sea la fuerza iónica, por lo que la adsorción de la matriz hidrofóbica puede llevarse adecuadamente después de haber precipitado con sales o haber realizado una cromatografía de intercambio iónico. La elución se puede conseguir alterando la fuerza iónica del solvente, el pH y la composición, o usando un modificador de la constante dieléctrica como el etanodiol (Wiseman, 1991).

2.4 Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*, por sus siglas en inglés) es una herramienta para efectuar separaciones, aislamientos, evaluaciones de pureza y cuantificación del peso molecular. Es posible obtener una matriz uniforme del gel de poliacrilamida (no en forma de gránulos) moldeándola ya sea como una delgada capa entre dos vidrios o como un cilindro o barra dentro de un tubo. La estructura química entrelazada de la poliacrilamida forma una trampa porosa, a través de la cual se mueven las partículas cargadas con velocidad proporcional a sus respectivos valores carga de proteína/radio hidráulico (Q/r) (Bohinski, 1991).

La forma más sencilla de realizar una operación de electroforesis es el método de electroforesis de zona. En este método se coloca una pequeña banda de muestra de la solución que contiene el soluto de interés, sobre una matriz generalmente de

celulosa, almidón, agar o poliacrilamida, la cual se encuentra inmersa en un electrolito que sirve como amortiguador. Dichas matrices tienen la propiedad de construir medios porosos altamente hidratados que proporcionan resistencia mecánica, y disminuyen los efectos de calor generado por el paso de la corriente al aplicar el gradiente de potencial (V) a la celda. En electroforesis de zona, cada componente de la mezcla se mueve a diferente velocidad, separándose los componentes de la mezcla sobre la matriz. Cuando esta técnica se utiliza con fines cualitativos, después de un tiempo apropiado para desarrollar la electroforesis, las matrices son teñidas para observar los componentes de la muestra. Durante la electroforesis es necesario considerar cuatro aspectos fundamentales:

- a. La naturaleza de la carga de la partícula que se mueve en el campo eléctrico.
- b. El análisis de los parámetros más importantes para describir la velocidad de migración de la partícula, que es el campo de estudio de la teoría electrocinética.
- c. Los fenómenos de dispersión de la muestra, que se observan en las operaciones electroforéticas.
- d. Las técnicas y diversas formas en que es posible realizar una operación electroforética.

Una variante muy útil del procedimiento ordinario de la PAGE, para el análisis de proteínas, es tratar primero la muestra (sea una proteína pura o una mezcla con sulfato dodecílico de sodio (SDS) (Figura 1) antes de aplicar la electroforesis. El método se conoce como SDS-PAGE. El SDS es un detergente aniónico que se une a los enlaces peptídicos de la proteína.

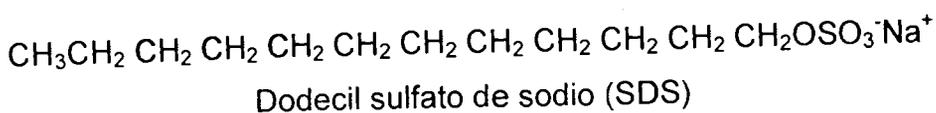


Figura 1. Estructura del dodecil sulfato de sodio

El SDS se enlaza a lo largo de la superficie de la cadena polipeptídica, la adsorción de muchas moléculas de SDS con carga negativa en el polipéptido le confiere una carga negativa neta. Además, los polipéptidos de diferentes tamaños adsorben una cantidad de SDS proporcional a sus dimensiones. Se calcula que se unen aproximadamente 1.4 g de SDS por gramo de proteína. El resultado es que los polipéptidos de distintos tamaños tienen aproximadamente el mismo valor Q/r .

Existe diferente velocidad de migración electroforética, debido a la capacidad de tamizaje de la matriz del gel de poliacrilamida, permitiendo que los polipéptidos pequeños se muevan más rápido que los grandes, aunque tengan el mismo valor Q/r (Bohinski, 1991).

La detección de bandas de proteína, se realiza con ayuda de colorantes que se unen a la proteína. Para la tinción con azul de Coomassie el límite de detección es de 0.3-1.0 μg por cada banda de proteína. La detección de bandas en un gel teñido con plata depende de la unión de la plata a varios grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos (sulfhidrilo, carboxilo), siendo su límite de detección de 2.0-5.0 ng por banda de proteína (Ausubel y *col.*, 1995)

2.5 Inmunógenos y antígenos

Los inmunógenos son sustancias que, cuando son administradas de la forma adecuada en un animal, inducen una respuesta inmune. La respuesta inmune puede suponer la producción de anticuerpos ó la activación de células inmunológicamente competentes específicas (llamadas células T activadas) o ambas cosas.

Los antígenos son sustancias que reaccionan con anticuerpos o con receptores específicos de antígeno denominados receptores de las células T (TCRs), que se encuentran en las células T. La mayoría de los antígenos son inmunógenos. Sin embargo, algunas sustancias reconocidas por el sistema inmune no son auténticos inmunógenos, como los haptenos, que son sustancias de bajo peso molecular que se combinan con moléculas de anticuerpo específico, pero que por sí mismas no inducen la formación de anticuerpos. Los haptenos incluyen moléculas como azúcares, aminoácidos y pequeños polímeros.

Una enorme variedad de macromoléculas que son extrañas al hospedero pueden actuar como inmunógenos, entre ellas todas las proteínas y lipoproteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y determinados ácidos teicoicos. Un requerimiento importante, es que las moléculas deben tener un peso molecular generalmente superior a 10 kDa. Sin embargo, el anticuerpo o el TCR no interactúan con toda la macromolécula de antígeno sino sólo frente a ciertas partes de la molécula que se denominan determinantes antigénicos o epítopes (Roit y *col.*, 1993).

La especificidad de los anticuerpos es comparable a la de las enzimas que son igualmente capaces de distinguir entre sustancias estrechamente relacionadas. Sin embargo, la especificidad no es absoluta y un anticuerpo puede reaccionar al menos hasta cierto punto, con otros epítopes ó con el mismo epítape presente en otras moléculas. El antígeno inductor del anticuerpo se denomina antígeno homólogo, y los otros antígenos que reaccionan con el anticuerpo se llaman antígenos heterólogos. La interacción entre un anticuerpo y un antígeno heterólogo se denomina una reacción cruzada (Madigan y *col.*, 1998).

2.6 Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son proteína globulares que contienen carbohidratos, capaces de combinarse con determinantes antigénicos. Se hallan presente en el plasma, suero y en otros líquidos corporales como las secreciones gástricas y la leche. El suero que contiene anticuerpos de antígenos específicos se denomina habitualmente antisuero. Las inmunoglobulinas pueden dividirse en cinco clases principales basándose en sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Las inmunoglobulinas son estructuras tetrapeptídicas las cuales pueden encontrarse bajo forma de monómeros, como ocurre con la IgG, IgD e IgE; de pentámeros, como el caso de la IgM; o de monómero, dímero y trímero, como la IgA.

Las inmunoglobulinas son sintetizadas por células B, ninguna otra célula expresa estas proteínas. Cada inmunoglobulina se fija específicamente y con gran afinidad, a su pequeño ligando molecular particular, que puede ser cualquiera de un gran

número de determinantes químicos que se encuentran en proteínas, carbohidratos, lípidos u otras macromoléculas.

La comunicación entre células del sistema inmune se realiza a través de proteínas solubles denominadas citocinas. Muchas de ellas se denominan interleucinas (ILs) porque median interacciones entre los leucocitos.

Los macrófagos secretan una potente citocina denominada IL-1 que actúa sobre diferentes tipos de células (Figura 2). La unión de IL-1 a sus receptores en las células auxiliares (T_H , que estimulan a los linfocitos B para que produzcan grandes cantidades de inmunoglobulinas) actúan como una señal de activación y hace que las células T_H se dividan produciendo réplicas clonales (Figura 2). En esta fase de activación, las células T_H estimuladas comienzan a producir IL-2 que a su vez estimula a otros precursores T_H . IL-2 junto con otras citocinas como IL-4 estimulan a las células B activadas por el antígeno para que proliferen y den lugar a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Figura 2) (Madigan y *col.*, 1998).

Las células B maduras pueden expresar inmunoglobulinas de dos modos distintos, cada uno de los cuales sirve para realizar funciones singulares. En los linfocitos B en reposo (vírgenes o de memoria), las inmunoglobulinas se expresan sólo en la superficie celular, donde actúan como receptores unidos a membrana para antígenos específicos. Cada linfocito B en reposo puede expresar decenas de millares de inmunoglobulinas unidas a membrana en su superficie. En contraste, las células efectoras de línea celular B (llamadas células plasmáticas) están especializadas de modo singular para secretar grandes cantidades de proteínas (inmunoglobulinas), en su medio circundante. Las inmunoglobulinas secretadas conservan sus característica de reconocer y fijar sus ligandos específicos, y a estas se les conocen como anticuerpos (Figura 3).

En condiciones normales las inmunoglobulinas no están presentes en la superficie de la célula plasmática, pero se producen grandes cantidades en el citoplasma, y cuando se requiere se secretan al espacio extracelular (Stites y *col.*, 1996).

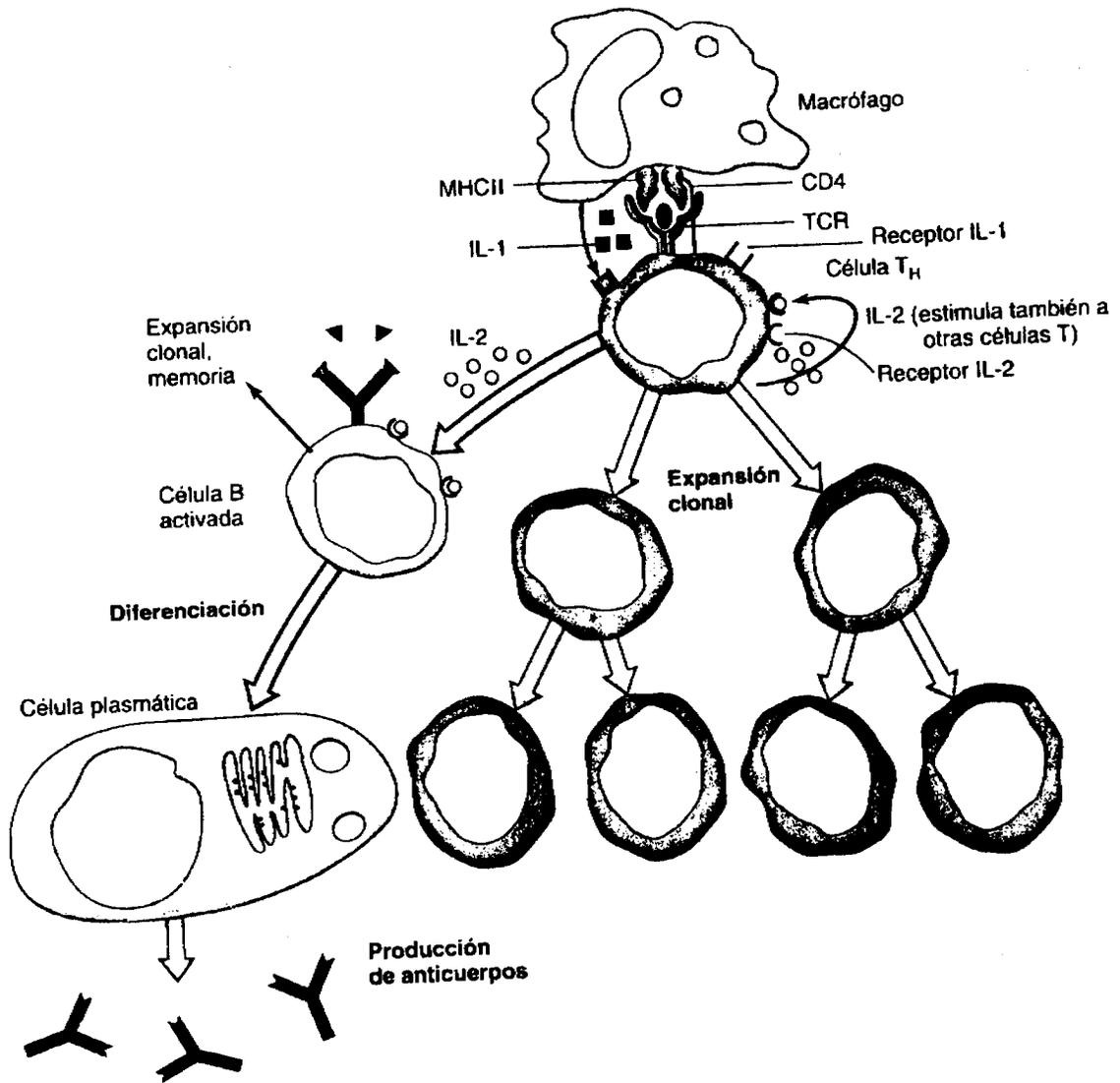


Figura 2. Componentes y mediadores principales de la respuesta inmune (Madigan y col., 1998).

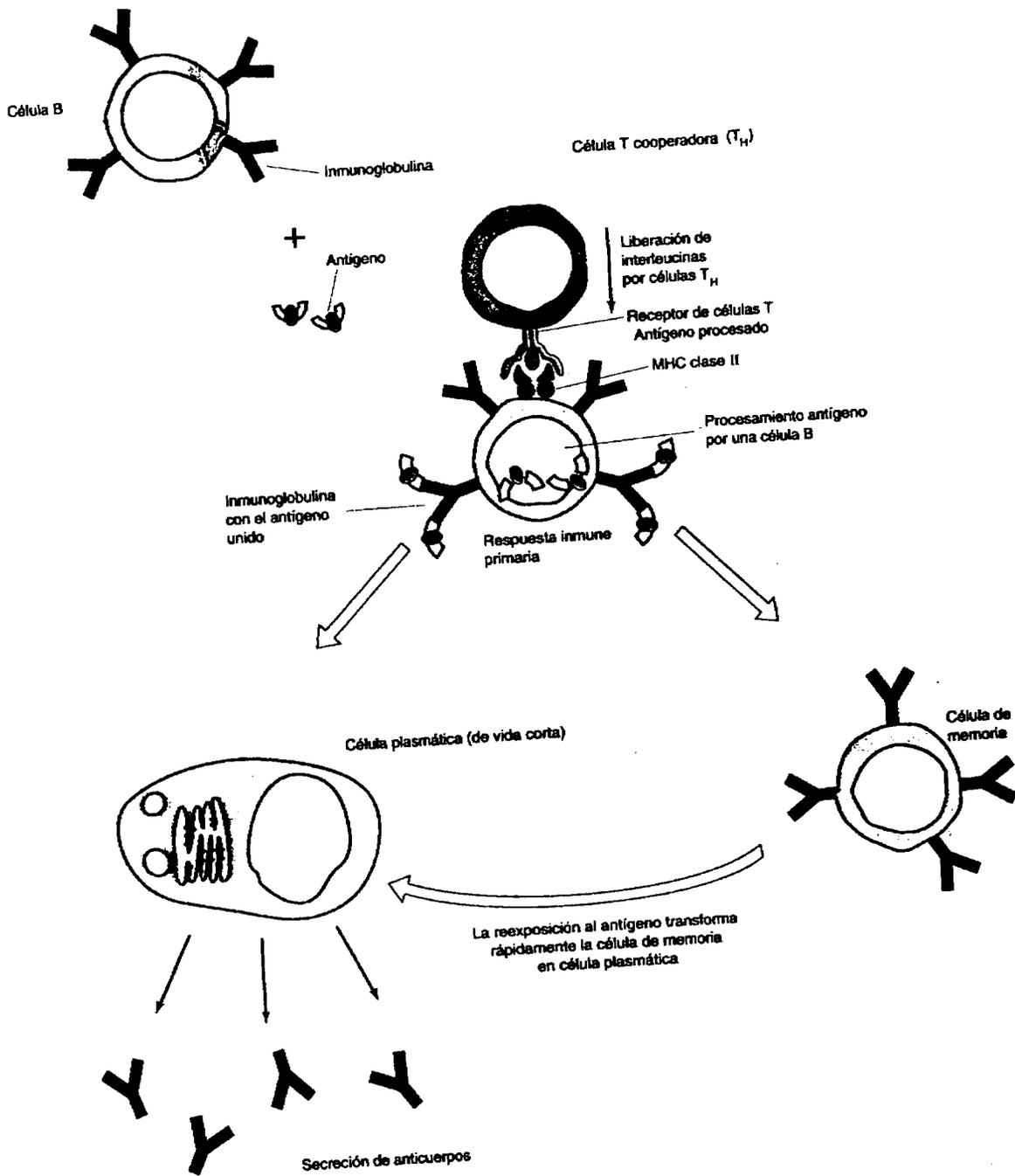


Figura 3. Descendientes de un linfocito B activado (Madigan y col., 1998).

2.7 Estructura de la inmunoglobulina G (IgG)

La inmunoglobulina G es el anticuerpo circulante más abundante, tiene un peso molecular de unos 146 kDa y está compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas. Contienen puentes disulfuro intracatenarios e intercatenarios. Las dos cadenas ligeras son idénticas en su secuencia de aminoácidos, y lo mismo ocurre con las dos cadenas pesadas. La molécula en conjunto es simétrica. Cada cadena ligera posee unos 212 aminoácidos y cada cadena pesada unos 450 aminoácidos.

Al tratar la IgG con papaína se rompe en varios fragmentos (Figura 4). Dos de los fragmentos contienen una cadena ligera más la mitad aminoterminal de la cadena pesada. Estas partes se combinan con el antígeno y se denominan fragmentos *Fab* (del inglés, *fragment of antigen binding*). El fragmento que contiene la mitad carboxiterminal de ambas cadenas pesadas, llamado fragmento *Fc* (del inglés, *fragment crystallizable*), no se combina con el antígeno pero fija al complemento. El sitio de unión al antígeno se halla en las porciones aminoterminales de las cadenas pesada y ligera (Madigan y col., 1998).

2.7.1 Cadenas ligeras

Todas las cadenas ligeras de IgG contienen dos dominios de aminoácidos, el dominio variable y el dominio constante. Generalmente la secuencia de aminoácidos en la porción principal de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas de la clase IgG son idénticas. Ello se debe a que la secuencia aminoacídica en la mitad carboxiterminal de la cadena ligera representa una de las dos secuencias específicas y constantes, a las que se conoce como secuencia *lambda* (λ) y secuencia *kappa* (κ). Por el contrario, las regiones variables de las cadenas ligeras que se localizan en la mitad aminoterminal, siempre difieren en la secuencia aminoacídica de una molécula de IgG a otra, salvo en el caso de que ambas moléculas sean producidas por la misma célula o el mismo clon de células (Myrvik y Weiser, 1984).

2.7.2 Cadenas pesadas

Todas las cadenas pesadas de IgG contienen cuatro dominios (regiones aminoacídicas), uno variable y tres constantes. Cada dominio tiene una longitud aproximada de 110 aminoácidos. Al igual que sucede con la cadena ligera, todas las inmunoglobulinas de la clase IgG, poseen una porción de su cadena pesada (los tres dominios carboxiterminales) en los que la secuencia aminoacídica entre las distintas moléculas de IgG es idéntica. Todas las cadenas pesadas tienen una región en el dominio aminoterminal con gran variación en la secuencia de aminoácidos de una IgG a otra. La exquisita especificidad de una molécula dada de anticuerpo para un antígeno concreto reside en la singular estructura tridimensional del sitio de unión antigénico, que está formado por una combinación de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras (Myrvik y Weiser, 1984).

2.8 Producción de anticuerpos.

La producción y alta disponibilidad de un anticuerpo de afinidad y especificidad deseada y/o determinada reactividad cruzada son fundamentales en el desarrollo de sensibilidad, precisión y especificidad de inmunoensayos.

Casi todos los aspectos en la programación para la producción de anticuerpos son arbitrarios, pues la utilización final que se le da a los anticuerpos puede ser lograda de varias formas; en la práctica es muy difícil mostrar que algún esquema o estrategia es superior a otra, debido a que la naturaleza variable de la respuesta inmunológica puede demandar el manejo de grandes grupos de animales y su control apropiado.

Para obtener la producción deseada de anticuerpos, se debe tener en cuenta (Deshpande, 1996):

- a) Tipo de anticuerpos a desarrollar, monoclonales o policlonales.
- b) Tipo de inmunógeno y animal hospedero.
- c) Programa de inmunización a seguir.
- d) Inmunoensayo a utilizar para detección del anticuerpo.
- e) Técnica de purificación y almacenamiento del anticuerpo.

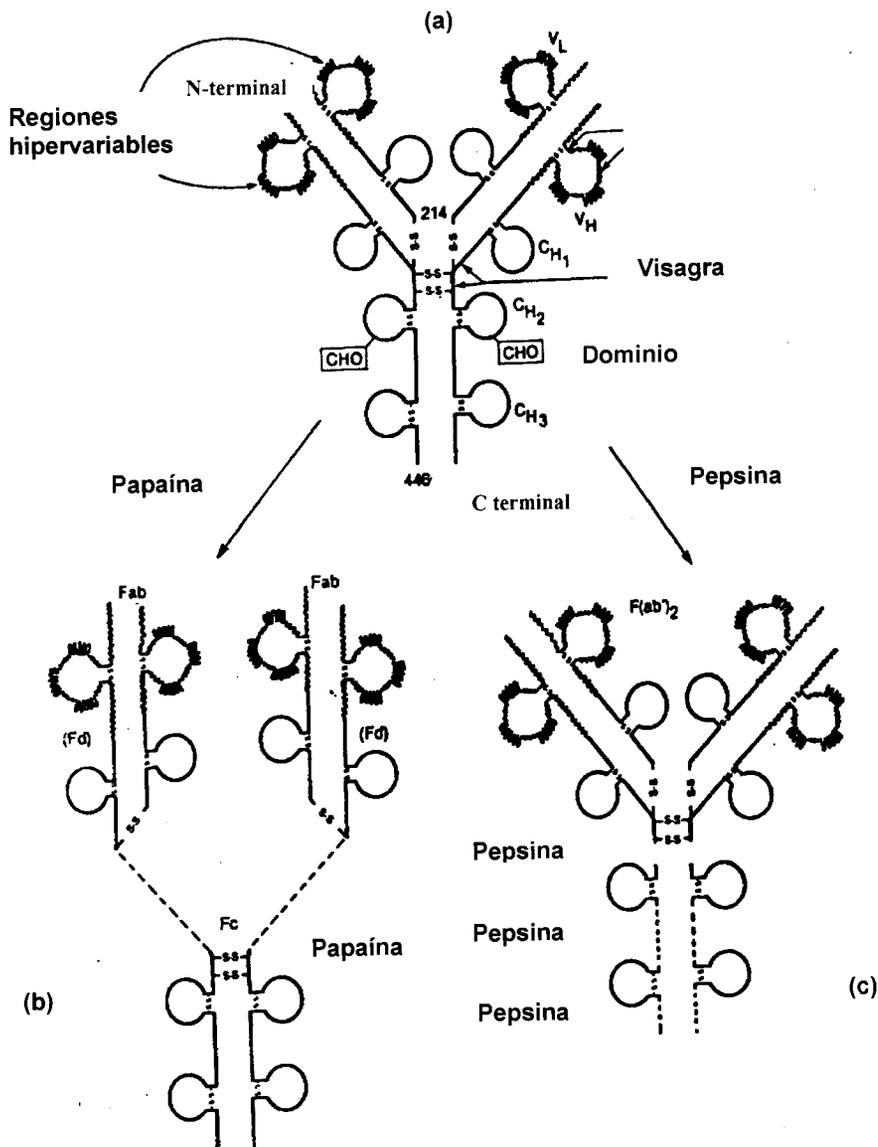


Figura 4. (a) Estructura de la inmunoglobulina G. (b) Efecto del tratamiento con papaína sobre la inmunogloulina G. (c) Efecto del tratamiento con pepsina sobre la inmunoglobulina G. (Mirvik y Weiser, 1984).

2.8.1 Anticuerpos policlonales y monoclonales

Una respuesta inmune típica en el animal da como resultado la producción de un amplio espectro de inmunoglobulinas de distintas clases, afinidades y especificidades para los determinantes antigénicos. Las inmunoglobulinas dirigidas contra un determinante concreto representan sólo una parte del reservorio total de anticuerpos. Cada inmunoglobulina está producida por un solo clon que es el resultado de la proliferación por un estímulo antigénico; un antisuero que contenga una mezcla de dichos anticuerpos se denomina por tanto antisuero policlonal. Sin embargo, es posible producir anticuerpos de una especificidad única, a partir de un solo clon de células B; siendo estos anticuerpos monoespecíficos se denomina anticuerpos monoclonales (Cuadro 2) (Madigan y col., 1998).

Cuadro 2. Características de los anticuerpos monoclonales y policlonales (Madigan y col., 1998).

Anticuerpos policlonales	Anticuerpos monoclonales
Contienen muchos anticuerpos que reconocen muchos determinantes antigénicos	Contienen un único anticuerpo que reconoce solamente un determinante único
Existen varias clases de anticuerpos (IgG, IgM, etc.)	Se produce una sola clase de anticuerpos
Para fabricar un anticuerpo específico utilizando un antígeno no purificado	Se puede fabricar un anticuerpo específico utilizando un antígeno no depurado
La reproducibilidad y estandarización son difíciles	Muy reproducible

2.8.2 Naturaleza del inmunógeno.

La inmunogenicidad de una molécula, es decir, su propiedad para inducir una respuesta inmune, se encuentra relacionada en parte con su peso molecular. Los antígenos son compuestos que reaccionan con un anticuerpo, pero no son necesariamente inmunógenos por sí mismos, por ejemplo los haptenos. Debido a su alto grado conformacional y rigidez estructural, las moléculas con pesos moleculares mayores a 5 kDa son generalmente buenos inmunógenos tanto como extrañas para el animal receptor (Deshpande, 1996).

La mayoría de las proteínas y polipéptidos de alto peso molecular, son naturalmente inmunógenos y pueden ser inyectados sin modificaciones estructurales. Igualmente poseen distintos determinantes antigénicos. De igual forma ciertos polisacáridos complejos se comportan de manera similar, sin embargo su naturaleza inmunitaria es frecuentemente debida a pequeñas cantidades de proteína asociadas a su estructura (Burrin y Newman, 1991).

Las estructuras terciaria y cuaternaria de los determinantes antigénicos se verán afectadas en presencia de reactivos como el ditioneitol, mercaptoetanol, y agentes altamente caotrópicos (urea y cloruro de guanidino), que rompen su conformación nativa, por lo cual no deben ser usados durante la preparación y purificación de ciertos inmunógenos (Deshpande, 1996).

2.8.3 Elección del animal.

La elección del animal depende principalmente de la conveniencia, costo, la naturaleza el antígeno y su disponibilidad, facilidad de manejo del animal, y del volumen del anticuerpo requerido (Burrin y Newman, 1991).

Excelentes anticuerpos policlonales pueden ser producidos en varios animales, no obstante ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, cabras y borregos son frecuentemente usados. Ratones y ratas son preferidos para la producción de anticuerpos monoclonales. El uso de especies grandes como las cabras y borregos es apropiado cuando es necesaria una alta cantidad de antisuero en corto tiempo (Catty y Raykundalia, 1988).

La edad de los animales es una consideración importante, pues los mamíferos recién nacidos así como los más viejos sintetizan menor cantidad de antígeno. Ratones y ratas de 2-4 meses y conejos de 3-6 meses son ideales (Deshpande, 1996).

2.8.4 Rutas de inmunización

La ruta de inmunización se rige principalmente por tres factores:

- a) El volumen de inmunógeno a inyectar.
- b) Los amortiguadores y otros componentes a inyectar con el inmunógeno.
- c) La rapidez con que el inmunógeno puede ser liberado en el sistema linfático o circulación.

Grandes volúmenes son normalmente inyectados vía subcutánea en varios sitios en conejos, sólo inyecciones intraperitoneales son posibles en ratones. Inmunógenos conteniendo adyuvantes no deben inyectarse vía intravenosa, sin embargo este método es ocasionalmente preferido debido a que la liberación del inmunógeno es inmediata. En contraste, las vías intramuscular e intradérmica son usadas si la liberación del inmunógeno se prefiere lenta. Los inmunogenos pueden ser administrados por varias vías incluyendo intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, e intravenosa; la elección es influenciada por la naturaleza física de la inyección, la especie animal a manejar y de la programación de inmunización (Deshpande, 1996).

2.8.5 Dosis del inmunógeno.

La cantidad de inmunógeno capaz de inducir respuesta inmune depende de la naturaleza del antígeno y del animal hospedador. Para determinar la dosis apropiada de inmunógeno, dos criterios son necesarios: la dosis óptima para lograr la respuesta máxima y la mínima dosis para inducir la producción de un antisuero policlonal.

Una primera dosis para conejos y conejillos de india es de 100 μg , no obstante se han utilizado dosis mayores a 500-1000 μg . Dosis mayores a 500-1000 μg son

usadas para especies grandes. Para un segundo y subsecuentes refuerzos, tradicionalmente se recomienda del 10-50% de la cantidad de la primera dosis (Deshpande, 1996).

2.8.6 Respuesta inmunitaria.

La respuesta inmunitaria es una secuencia de procesos compleja e intrincadamente regulada, que afecta varios tipos celulares. Se desencadena cuando un antígeno ingresa al cuerpo y encuentra un tipo especializado de células que se llaman células presentadoras del antígeno (APC, del inglés, antigen presenting cells). Estas APC capturan una cantidad diminuta del antígeno y la exhiben, de manera que pueden ser reconocida por linfocitos T cooperadores específicos del antígeno. Las células T cooperadoras se activan y a su vez, promueven la activación de otros tipos de linfocitos, como las células B o las células T citotóxicas. A continuación, los linfocitos activados proliferan y realizan sus funciones secretoras específicas; en la mayoría de los casos, éstos inactivan o eliminan exitosamente al antígeno. En cada etapa de este proceso, los linfocitos y las APC se comunican entre sí a través de contacto directo o mediante la secreción de citocinas reguladoras.

Las respuestas inmunitarias pueden ser tanto localizadas como sistemáticas, pero casi siempre son específicas en gran medida, y centran su fuerza total contra el antígeno mientras originan poco o ningún daño a los tejidos normales del huésped. Las respuestas también se controlan de manera precisa y terminan normalmente poco después de que se elimina el antígeno en cuestión (Figura 5) (Stites y col., 1996).

Un incremento en células B trae consigo anticuerpos específicos para el antígeno 5-6 días después de la primer inmunización. La especificidad del anticuerpo es usualmente detectada en el suero alrededor del séptimo día posterior a la primer inyección del inmunógeno, manteniéndose en bajos niveles por pocos días hasta el décimo. El primer anticuerpo producido es IgM, caracterizado por una alta avidéz, pero baja afinidad por el antígeno; éste es seguido por IgG cuyo título es mayor al

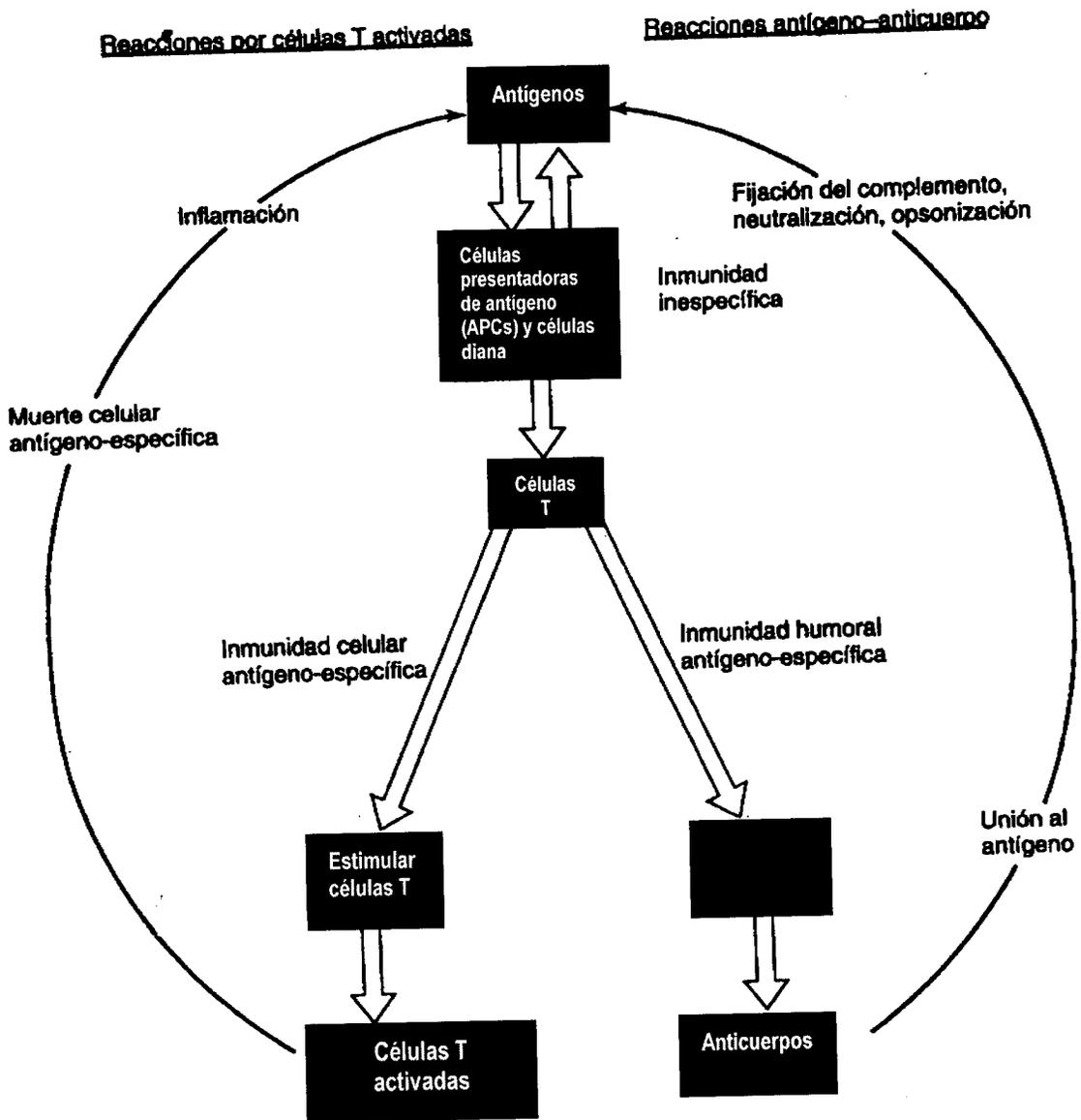


Figura 5. Secuencia de sucesos en la respuesta inmune típica (Madigan y col., 1998)

de IgM. Los anticuerpos de IgG desarrollan baja avidéz, pero son caracterizados por una alta afinidad por el antígeno (Figura 6).

La respuesta primaria del anticuerpo es ocasionalmente débil, especialmente para antígenos solubles y prontamente catabolizables. La respuesta a los refuerzos es caracterizada por un rápido incremento en los títulos de anticuerpo, en esta etapa la IgG predomina. Como una regla general, un mínimo de 3-4 semanas siguientes a la primera inmunización es recomendable una segunda inyección. Días después se observan grandes títulos de anticuerpos (10-14 días). La respuesta inmune para la tercera y subsecuentes refuerzos, se desarrolla en forma semejante a la observada en la segunda inmunización (Deshpande, 1996).

2.9 Detección de anticuerpos.

La calidad del antisuero es importante para los inmunoensayos, por lo que es necesario revisar su título, es decir, la concentración de anticuerpo presente, su afinidad, avidéz y su especificidad.

Las muestras de suero deben ser tomadas 7-14 días después de los refuerzos, este tiempo aproximadamente corresponde con la obtención del mayor título para la mayoría de las rutas de inmunización (Figura 6) (Deshpande, 1996). Pequeñas muestras son colectadas hasta que los niveles del título deseado sean obtenidos. Las muestras obtenidas son probadas contra el inmunógeno, normalmente por una o varias técnicas, siendo las más comunes los inmunoensayos incluyendo los inmunoblots.

2.9.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

El análisis de la enzima ligada a un inmuoabsorbente inerte, corresponde a un análisis inmunoenzimático (EIA) heterogéneo. En el que el antígeno o anticuerpo primero se fija a un soporte inerte y luego se hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente, que estará marcado con una enzima (conjugado). Se lava el conjugado que no reaccionó y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato. Generalmente se determina el grado de

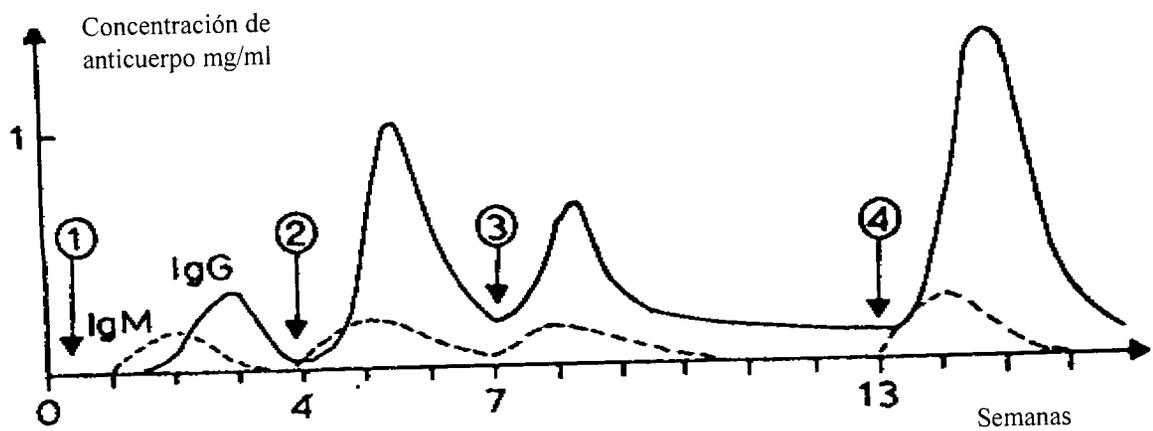


Figura 6. Cinética del desarrollo de anticuerpos como respuesta a la inmunización. Las inmunizaciones efectuadas se indican por las flechas numeradas (Deshpande, 1996).

transformación de un sustrato incoloro a un producto coloreado por medio de espectrofotometría.

Las técnicas de ELISA pueden ser clasificadas en competitivas y no competitivas, dependiendo de que el antígeno libre y el antígeno ligado a una enzima o fijado a una fase sólida compita por un número limitado de sitios activos de anticuerpos; o depende si al antígeno o anticuerpo a medir se le permite reaccionar con un exceso de reactante inmune (Morilla y Bautista, 1986).

2.9.1.1 Tipos de técnicas ELISA

1. Método indirecto

El método más fácil de ELISA es el indirecto o sándwich. El antígeno es inmovilizado en exceso, posteriormente se incubaba con un control o muestra en la que se presume existe el anticuerpo; después de lavar el complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado, se incubaba con un exceso de anticuerpo conjugado con la enzima, que se une a los sitios antigénicos remanentes. Este segundo anticuerpo se puede usar sin marcar y en este caso se usaría un tercer anticuerpo específico para la inmunoglobulina de la especie animal del segundo anticuerpo. En ambas variantes la concentración del producto, producido por la hidrólisis de la enzima, es directamente proporcional a la concentración del estándar o antígeno a probar (Kemeny y Chantler, 1988) (Figura 7a).

2. Método de dos sitios

La concentración del antígeno puede ser determinada usando un ELISA de dos sitios. En este ensayo el anticuerpo inmovilizado es usado para capturar el antígeno en estudio. La unión del antígeno es detectada usando un segundo anticuerpo conjugado a una enzima. Esto provee un rápido y fácil método para detección de antígeno, particularmente si la muestra y el conjugado pueden ser adicionados simultáneamente. Es preferible, más no esencial, que los dos anticuerpos provengan de la misma especie, para reducir la posibilidad de reacciones cruzadas entre especies (Kemeny y Chantler, 1988) (Figura 7b).

3. Captura de una clase específica de inmunoglobulina

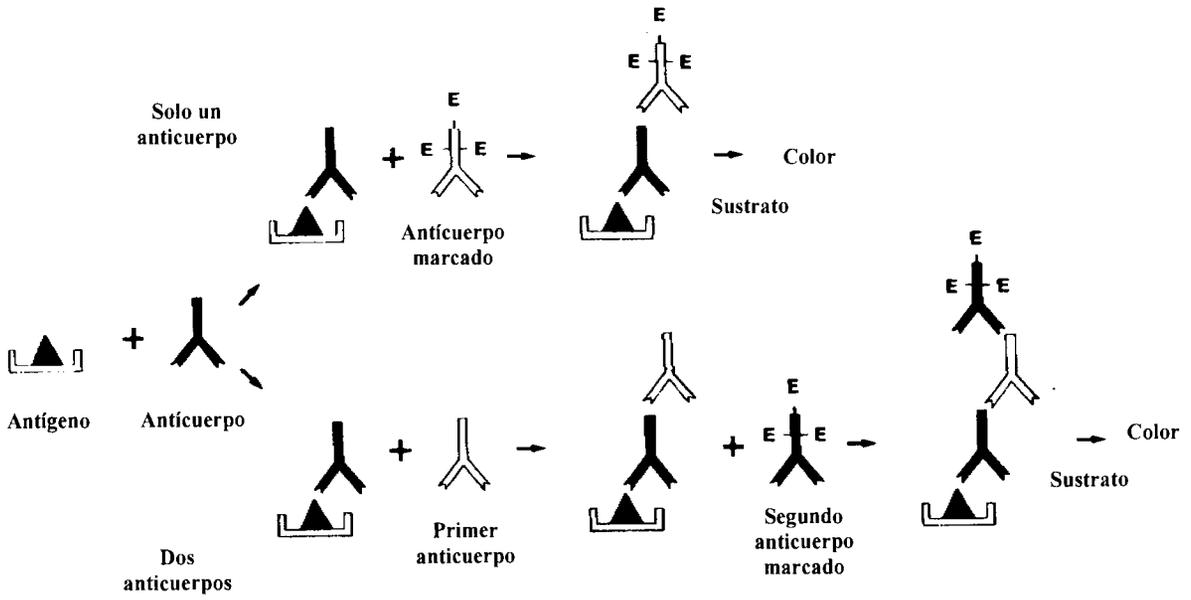
En determinadas circunstancias se desea separar una clase particular de inmunoglobulina de una muestra de suero o secreción. Una clase específica de anti-inmunoglobulina es inmovilizada y usada para capturar la inmunoglobulina de interés. La unión del anticuerpo es identificada con la subsecuente adición de un antígeno marcado o sin marcar seguido por un anticuerpo específico marcado (Kemeny y Chantler, 1988) (Figura 7c).

4. Método competitivo

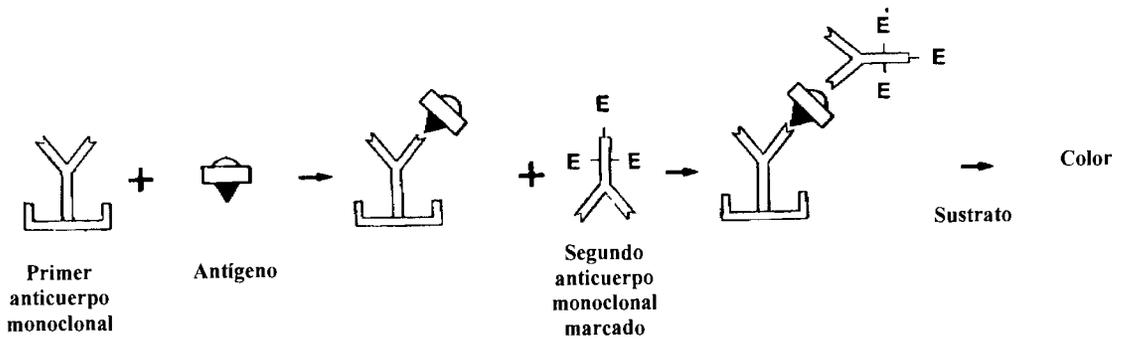
En este método el anticuerpo es inmovilizado en un soporte de fase sólida. Se adiciona una solución que contenga antígeno y antígeno conjugado con la enzima, se incuban y se lavan; la cantidad de antígeno conjugado con la enzima que reaccionó con el anticuerpo es medido por la hidrólisis del sustrato. Mientras más antígeno se encuentre en la solución desconocida, menos antígeno marcado reaccionará con el anticuerpo (Morilla y Bautista, 1986) (Figura 7d).

2.9.2 Transferencia Western (Western blot)

La electroforesis en geles de poliacrilamida se ha convertido en una de las técnicas más ampliamente usadas para el análisis y caracterización de mezclas complejas de proteínas. Estos geles pueden ser teñidos directamente y visualizar las proteínas. Sin embargo debido a que el paso de las proteínas por la matriz es limitado, la información obtenida a cerca de los componentes individuales es usualmente restringido por su peso molecular y punto isoeléctrico (pI). La transferencia de proteínas separadas por SDS-PAGE sobre la superficie de una membrana donde son inmovilizadas, las hace más accesibles para varios reactivos y pruebas siendo así fáciles de caracterizar. Además de teñirse las proteínas directamente, pueden ser expuestas a lectinas que se unen a fracciones específicas de carbohidratos en glucoproteínas, mientras que otros sitios de la proteína pueden enlazar anticuerpos para identificar y caracterizar determinantes antigénicos (Timmons y Dunbar, 1990).

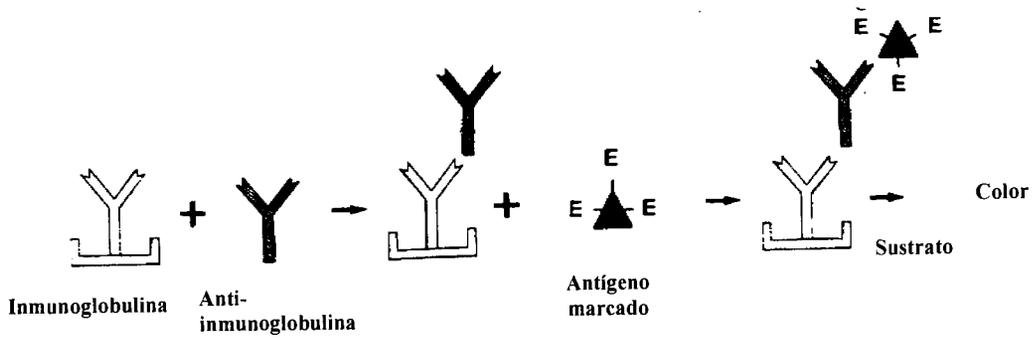


a). Método indirecto

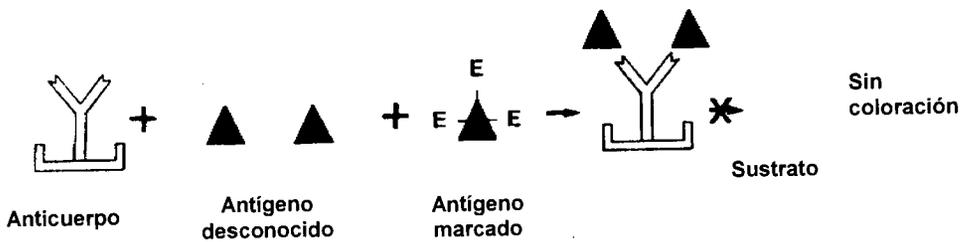


b). Método de dos sitios

Figura 7. Tipos de técnica ELISA. (Kemeny y Chantler, 1988)



c). Captura de una clase específica de inmunoglobulina



d). Método competitivo

Figura 7 (cont.). Tipos de técnica ELISA.

Una gran aplicación de las proteínas transferidas es la identificación y caracterización de un antígeno mediante el uso de anticuerpos, lo cual puede ser visualizado por anticuerpos radiomarcados o anticuerpos secundarios conjugados a enzimas para dar reacción con un adecuado sustrato cromógeno, que puede identificarse y/o medirse espectrofotométricamente ó con un sustrato quimioluminiscente.

El procedimiento total es sintetizado en cuatro puntos básicos (Durrat y Fowler, 1994):

- Transferencia e inmovilización de las proteínas de interés (proteínas blanco).
- Bloqueo de los sitios no específicos en la membrana.
- Unión del anticuerpo específico a las proteínas blanco, seguido por la unión de un segundo anticuerpo anti-especie ligado a un marcador o a una enzima.
- Detección del marcador por una reacción enzimática apropiada.

2.9.2.1 Detección de proteínas por quimioluminiscencia.

Tradicionalmente, los radiomarcadores eran utilizados para el proceso de detección, en particular I^{125} . Este método tenía suficiente sensibilidad y permitía la reproducibilidad de resultados sobre películas de rayos X, pero el tiempo de exposición era prolongado además de existir algunas restricciones a cerca del manejo y disposición del material radiactivo. Por lo tanto, se concentró en el desarrollo de procedimientos con uso de detección colorimétrica en donde la molécula del anticuerpo final es marcado con una enzima como grupo reportero. Uno de los métodos más sensibles y rápidos al de radiomarcadores utilizaba fosfatasa alcalina como enzima y nitroazul de tetrazolio (NBT) y bromocloroindolil fosfato (BCIP) como sustratos, pero este no era tan reproducible. En respuesta a tal inconveniente, se desarrollo un sistema de detección basado en la emisión de luz. El sistema luminiscente ofrecido por la peroxidasa de rábano picante (HRP), en donde luz azul es generada al ser oxidado el luminol, brinda una excelente señal, es extremadamente rápido y es posible que sea el sistema existente más sensible (Durrat y Fowler, 1994).

En presencia de peróxido de hidrógeno y NaBO_3 , la peroxidasa de raíz picante cataliza la oxidación de diacilhidrazidas como el luminol, los radicales de luminol formados pasan de un nivel mayor a uno menor de energía emitiendo luz. Cuando se coloca un potenciador como el 4-iodofenol este reacciona con el grupo hemo de la peroxidasa en lugar del luminol, la formación de los radicales del potenciador a su vez producen radicales de luminol y la luz es emitada de igual manera como se describió para la reacción básica (Figura 8).

Un esquema general del proceso de inmunodetección de proteínas (transferencia Western), se muestra en la figura 9.

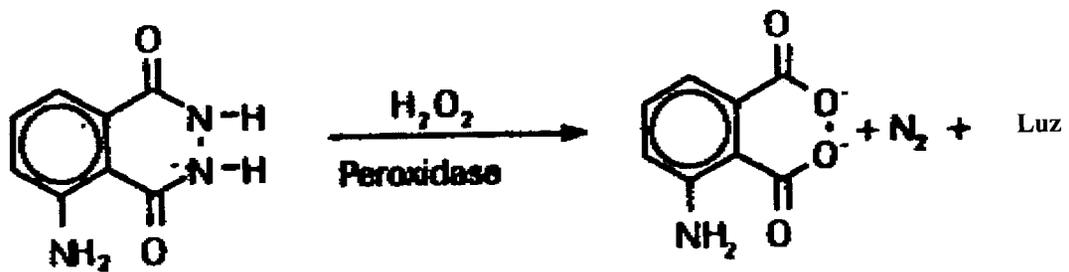


Figura 8. Reacción que se lleva a cabo para la detección de proteína por quimioluminiscencia

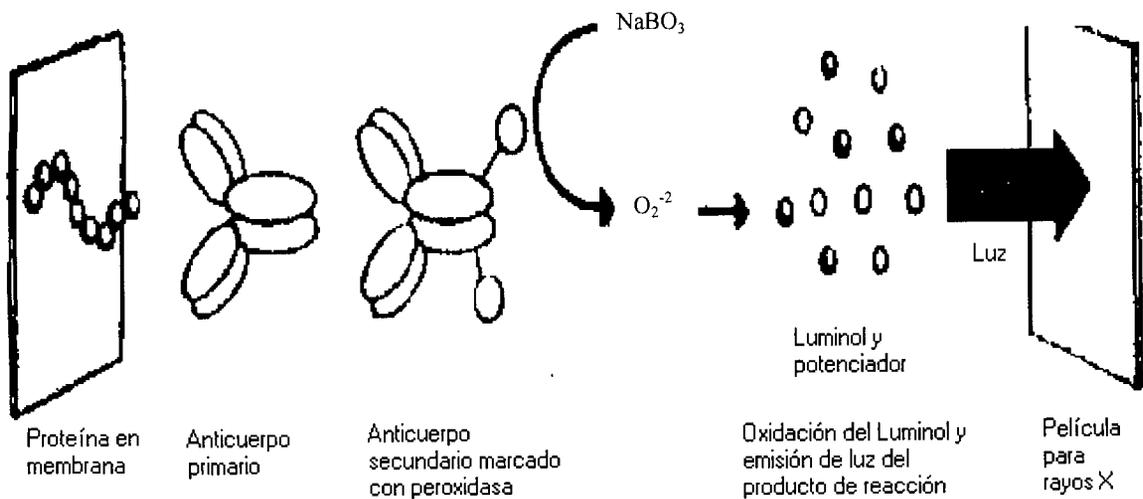


Figura 9. Principio del proceso de detección de proteína en transferencia Western mediante quimioluminiscencia. (Roche Molecular Biochemicals, 2000)

3. JUSTIFICACIÓN

Considerando la utilidad que tiene en uso de la enzima peroxidasa en kits para análisis clínico, preparación de anticuerpos conjugados como enzima reportera, así como en inmunoensayos e inmunohistoquímica y que dichos productos no se producen en nuestro país sino que deben ser importados debido a que su principal fuente es el rábano picante el cual no se desarrolla en nuestro país debido a sus condiciones de crecimiento, es deseable poder aislar dicha enzima de algún vegetal de origen nacional. Así mismo, se debe desarrollar un método de aislamiento que sea de bajo costo. Con metodología inmunológica, es posible producir anticuerpos específicos que faciliten el aislamiento de peroxidasa utilizando columnas de inmunoafinidad.

4. RELEVANCIA DEL ESTUDIO.

La peroxidasa puede ser purificada de fuentes vegetales, generalmente por métodos cromatográficos que incluyen las cromatografías de afinidad seguida de una de filtración en gel. No obstante, en algunos extractos vegetales, en donde existe una actividad importante de peroxidasa y de los cuales se tiene una buena disponibilidad en el centro del país, ya sea como desperdicio ó en fresco, la cromatografía de afinidad utilizando concanavalina A-sefarosa no ha dado buenos resultados (Regalado y *col.* 1999). Esto se ha atribuido a la presencia de otras glucoproteínas contaminantes presentes en los extractos, además antes de las separaciones cromatográficas se requiere de una precipitación inicial que en conjunto requiere mucho tiempo. Se ha reportado que anticuerpos policlonales contra una peroxidasa presentan reacción cruzada con otras isoenzimas de la misma o de otras fuentes (Lang y *col.*, 1990). Es así que una posible alternativa para purificar esta enzima sería la utilización de técnicas inmunológicas mediante anticuerpos policlonales contra peroxidasa de nabo, purificada y caracterizada y unir éstos a una resina activada para utilizarla como una columna de inmunoafinidad. Dicha columna podría utilizarse para aislar con una alta especificidad la peroxidasa de otras fuentes vegetales que se encuentran ampliamente disponibles en la región central de México, como el brócoli, nabo y col de Bruselas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Purificar dos isoenzimas de peroxidasa de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe), y utilizarlas en la inducción de anticuerpos policlonales en conejo.

5.2. Objetivos específicos

1. Purificar dos isoenzimas de peroxidasa a partir de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe).
2. Producir anticuerpos policlonales para dichas isoenzimas utilizando conejos de la raza New Zealand.
3. Verificar, mediante transferencia Wester, la presencia de los anticuerpos para las dos isoenzimas y realizar reacciones cruzadas de éstos con la peroxidasa de brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica cv. maratón)
4. Realizar reacciones cruzadas entre las dos isoperoxidasas purificadas de nabo después de su proceso de desglicosilación y los anticuerpos obtenidos.
5. Determinar el grado de homología desde el punto de vista inmunológico entre las dos peroxidases purificadas a través del porcentaje de reacción cruzada y constantes de afinidad entre las isoperoxidasas de nabo purificadas y los anticuerpos obtenidos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe) de 7 semanas desde su siembra, proporcionado por Orgánicos de México, S. A. en Miguel de Allende, Gto. Los conejos utilizados fueron de la raza New Zealand de 3 meses de edad.

6.2 Reactivos

Membranas de ultrafiltración con punto de corte 10 kDa (Millipore)	Adyuvante completo de Freund (Sigma)
Membranas de diálisis de celulosa con punto de corte de 12 kDa (Sigma)	Adyuvante incompleto de Freund (Sigma)
Polivinilpirrolidona (PVP, Sigma)	BM Chemiluminescence (Roche)
Columna de intercambio iónico DEAE-Celulosa (Sigma)	Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad)
Columna de hidrofobicidad metilHIC (Bio-Rad)	10x TBS (Bio Rad)
ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-sulfónico) (Sigma)	Tween-20 (Sigma)
Reactivo de Bradford (Bio-Rad)	X-ray cassette (Amersham)
Acetona grado reactivo analítico (Baker)	X-Omat AR (Kodak)
Marcadores de bajo peso molecular (16-66 kDa) (Sigma)	Solución reveladora 6BX (Kodak)
Marcadores de bajo peso molecular (21-110 kDa) (Bio-Rad)	Solución fijadora 6BX (Kodak)
Reactivos para electroforesis (Bio-Rad)	IgG de cabra anti-conejo ligada a HRP (Zymed)
	IgG de cabra anti-conejo ligada a AP (Zymed)
	ELISA plates (Falcon)
	Sigma fast p-Nitrofenil fosfato-tabletas (Sigma)

Las sales utilizadas para amortiguadores y otros reactivos utilizados fueron grado analítico.

Se utilizó agua grado HPLC para preparar todas las soluciones acuosas.

6.3 Purificación de la enzima peroxidasa

La purificación se efectuó de acuerdo al protocolo modificado de Duarte-Vázquez y col., (2000).

Las determinaciones que a continuación se describen se realizaron en cada uno de los pasos de la purificación de la enzima con el objetivo de descartar fracciones que no presenten cantidad de proteína o actividad necesaria.

6.3.1 Determinación de proteína

Con el objeto de conocer la concentración de proteína en cada una de las fracciones, así como en los pasos intermedios del aislamiento de la enzima se midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Lambda2 UV-Vis (Perkin Elmer).

También se hizo por el ensayo de Bradford. Se realizó una curva de calibración utilizando una proteína patrón, que fue seroalbúmina bovina (BSA) en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de ésta se hicieron diluciones que conteniendo diferentes concentración de la proteína, 2 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Apéndice 1).

El microensayo a realizar con el reactivo de Bradford consistió en mezclar 800 μL de la solución de proteína y 200 μL del reactivo de Bradford; la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se leyó absorbancia a 595 nm.

6.3.2 Determinación de actividad

La actividad fue determinada espectrofotométricamente por el cambio de absorbancia a 414 nm usando ABTS como sustrato (Childs y Bardsley, 1975). La mezcla final de reacción contenía 1 mM de ABTS, 50 μL de la enzima, 5 mM H_2O_2 y 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio pH 6.0, en un volumen de 1.5 mL.

Se utilizó un coeficiente de absortividad molar $\epsilon = 36 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para convertir después a μg de sustrato (ABTS) consumido de acuerdo a la estequiometría de la reacción.

Una unidad de actividad se define como los μg de ABTS consumidos por minuto.

6.3.3 Obtención del extracto crudo

El extracto crudo se obtuvo por homogenización del tejido vegetal, en donde se colocarán los trozos del nabo y amortiguador de fosfatos 20 mM pH 5.0 hasta obtener una pulpa homogénea. Esta pulpa se hizo pasar a través de manta de cielo para eliminar bagazo y restos celulares. El sobrenadante se conservó a 4 °C usando un baño de hielo, en todas las operaciones de extracción y precipitación.

Al sobrenadante se le añadió PVP al 3 % (p/v) (Sigma) con el objeto de eliminar algunos fenoles que pudieran inactivar a la peroxidasa. Se centrifugó a 12,000 g durante 15 min, a 4 °C y el sobrenadante se filtró en papel filtro (Whatman 5) para obtener el extracto crudo.

6.3.4 Ultrafiltración

A la unidad de ultrafiltración Minitan II (Millipore) le fueron colocadas nueve membranas de celulosa regenerada (Millipore) de punto de corte de 10 kDa, las cuales se prepararon haciendo circular a través de las mismas NaOH 0.1 M y después H₂O grado HPLC.

La calibración del sistema se realizó con H₂O grado HPLC; tomando tiempos y presiones tanto de entrada como de salida para construir una gráfica donde se conoce el flux adecuado con el que debe manejarse el equipo para tener una mayor eficiencia en la concentración.

Una vez calibrado el sistema se hizo pasar la solución amortiguadora en que se encontraba el extracto, en este caso fosfatos 20 mM, pH 5.

Enseguida se ultrafiltró el extracto crudo para su concentración, según las presiones de entrada y salida que se encontradas en la gráfica anterior.

6.3.5 Precipitación

El extracto crudo se sometió a precipitación con acetona en frío (-20 °C) utilizando una relación 2:1 de acetona : extracto crudo, relación óptima descrita por Duarte-Vázquez y col., (2000) para la purificación de peroxidasas de nabo var. esculenta. Después de 2 h de agitación, se centrifugó a 12, 000 g durante 15 min, a 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5804R; resuspendiendo el precipitado en 10 % del

volumen de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.6. El precipitado resuspendido se dializó contra el mismo amortiguador donde se resuspendió por 48 h a 4°C, con cambios de solución amortiguadora cada 8 h.

6.3.6 Cromatografía de intercambio iónico

La muestra dializada se filtró por una membrana de 0.45 μm (Millipore) de tamaño de poro, utilizando una unidad Swinnex (Millipore), y fue inyectada (25 mL) a una columna (2.5 cm X 39 cm) de intercambio aniónico DEAE-celulosa previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8.6. La proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 20 mL con un flujo de aproximadamente 5 mL/min.

Para la preparación de la resina utilizada (DEAE-celulosa, Sigma), primero se hidrató ésta con la solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, pH 8.6 durante 2 h; después se lavó de acuerdo al siguiente protocolo: se inicia el lavado con NaOH 0.1 N, posteriormente con la solución amortiguadora y por último con HCl 0.1 N, para equilibrarse finalmente con la solución amortiguadora.

6.3.7 Cromatografía de interacción hidrofóbica

Las muestras que se obtuvieron de la elución de la fracción sin sal de la cromatografía de intercambio aniónico se liofilizaron (Virtis 5L). Estas fueron disueltas en la mínima cantidad de un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7 e inyectadas en una columna (1.5 cm X 20 cm) de interacción hidrofóbica metilHIC acoplada a un equipo Gradifrac (Pharmacia) con detector de UV (unidad UV1), colector de fracciones, graficador y bomba P-50. Se utilizó el mismo amortiguador para eluir la muestra en fracciones de 4 mL con un gradiente de 1 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La velocidad de flujo se mantuvo en 0.5 mL/min

6.3.8 Electroforesis

Se realizaron electroforesis desnaturalizante y nativa para determinar el grado de pureza que se tenía en cada una de las diferentes etapas de la purificación.

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara vertical Hoeffer SE 250 con una fuente de poder Hoeffer PS 500XT.

Tanto la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), como la nativa se efectuaron en geles de poliacrilamida, utilizando el principio de geles discontinuos de Laemmli (1970). El gel utilizado para la electroforesis fue al 10 % T (acrilamida en la mezcla acrilamida-bisacrilamida (p/v)), pH 8.8 para el gel de separación y para el gel de alineamiento 4 % T, pH 6.8. Las muestras se calentaron en un baño de agua a 94 °C por un minuto, inyectando 15 µL de las mismas por carril; para verificar su peso molecular después de la tinción por plata fueron utilizados marcadores de bajo peso molecular (Sigma).

Al gel le fue aplicada una corriente constante de 10 mA para alinear las muestras, y de 15 mA para su separación. La electroforesis se finalizó cuando el azul de bromofenol quedó a 1 cm antes del borde inferior del gel.

La tinción se realizó con plata según la técnica descrita por Ausubel y *col.* (1995).

También se hizo una tinción específica para glicoproteínas, basado en la oxidación de los oligosacáridos por ácido periódico y un teñido mediante el reactivo de Schiff (Sigma).

Para realizar la tinción por actividad de la electroforesis nativa se añadió al gel los reactivos en las mismas concentraciones descritas para la determinación de actividad identificando así a la enzima de interés.

6.4 Producción de anticuerpos

6.4.1 Inmunización

Las dos isoenzimas purificadas denominadas P1 y P2, se sometieron a una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), solo un carril de los inyectados fue teñido por plata, sirviendo éste como patrón al cortar el gel sobrante a la misma altura donde apareció la banda que es única pues la enzima se encuentra purificada a homogeneidad. La banda cortada después de molerse se colocó en 400 µL de PBS (amortiguador de fosfatos salino, pH 7.3), y se mezcló con adyuvante

completo de Freund (Sigma) en relación 1:1 para la primer inmunización y con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) en la misma relación para los refuerzos. La primer inmunización se realizó vía linfática inyectando 2.25 μg de P1 y 4.6 μg de P2 en el ganglio poplíteo (Figura 10) de conejos raza New Zealand (Arroyave, 2001). Los refuerzos de las inmunizaciones se efectuaron inyectando 2 μg de proteína para P1 y 4.1 μg para P2, vía subcutánea en la espalda del conejo. Las inmunizaciones y desangrados se realizaron de acuerdo a la programación del cuadro 3.

La sangre de los conejos se extraía de su vena marginal de la oreja para cuando se realizaron los títulos y del corazón en el desangrado total.

Se tomaron muestras de suero preinmune de cada uno de los cuatro conejos como control negativo antes de iniciar con las inmunizaciones.

6.4.2 Purificación de IgG del anticuerpo.

Una vez obtenida la sangre de los conejos esta se colocaba en refrigeración (4 °C) hasta su centrifugación a 3, 600 g durante 5 min para la obtención del suero.

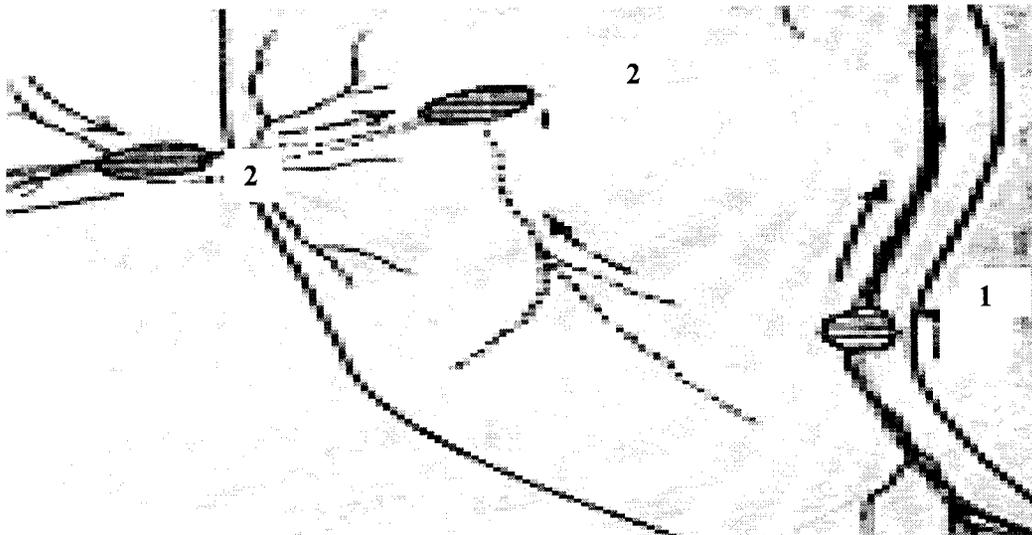
Debido a que el suero no solo tiene IgG, (anticuerpo de interés), es preciso eliminar todo aquel material que podría traer algún problema para el uso posterior del suero. De acuerdo con Ausubel y *col.* (1995), la precipitación de IgG se hizo con solución saturada de sulfato de amonio pH 7.0 en relación 1:2, solución saturada de sulfato de amonio pH 7.0:suero, a 4 °C, con agitación constante durante 4 h. Después de centrifugar a 12, 000 g por 20 min.

El precipitado se lavó con un volumen igual al original de sulfato de amonio al 33 %, se resuspendió en 5-10 % de PBS pH 7.3 y por último se dializó contra el mismo amortiguador a 4 °C, durante 48 h.

El suero semipurificado se mezcló con glicerol en concentración final del 10 % para su conservación a -20 °C.



a)



b) 1: linfático poplíteo; 2: linfáticos linquiales superficiales (Getty y Saar, 1990)

Figura 10. Localización del ganglio poplíteo en conejo.

Cuadro 3. Programación de inmunización de conejos con peroxidasa de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe)

Días	Inmunización	Desangrar
Inicio	1º	Suero preinmune
10 días	2º	
25 días	3º	Suero para título
40 días	4º	
50 días		Totalmente

6.5 Inmunodetección

6.5.1 Transferencia Western (Western blot)

Se realizó la transferencia de las dos isoperoxidasas purificadas, P1 y P2, a membranas PVDF (Bio Rad), después de haber realizado una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Se probaron dos concentraciones de proteína a transferir; 2.5 µg y 1 µg por carril.

Una vez terminada la electroforesis, se removió el gel de alineamiento, y el gel de separación se equilibró durante 20 min, con un cambio a los 10 min, en amortiguador de transferencia Tris-glicina (Tris 0.58% (p/v), glicina 0.29% (p/v)). De igual forma la membrana en donde fueron transferidas las enzimas se sumergieron en metanol y equilibraron en el amortiguador de transferencia por 10 min.

La transferencia se realizó en una unidad de transferencia semiseca Trans blot SD-Dry (Bio Rad), durante 75 min con una corriente constante de 15 V.

Transcurrido el tiempo de la transferencia las membranas se colocaron en solución bloqueadora, utilizando caseína como agente bloqueante, durante toda la noche a 4 °C. Después se incubó durante 3 h a temperatura ambiente con los anticuerpos producidos en diluciones seriadas en razón 2 a partir de 1:500 hasta 1:16000. Se hicieron 4 series de lavados de 5 min cada uno con TTBS (solución 1x TBS (Bio Rad) y Tween-20 al 0.5 %). Se incubó con el segundo anticuerpo IgG de cabra anti-conejoligada a HRP (peroxidasa de nabo picante) en dilución de 1:5000

durante 50 min a temperatura ambiente, realizando posteriormente una segunda serie de 8 lavados de 5 min y dos últimos de 10 min con TTBS. Por último sin permitir que se seque la membrana se colocó durante 1 min la mezcla de reactivos, luminol y 4-iodofenol, que dió reacción de quimioluminiscencia.

Finalmente se expuso la membrana a la película fotográfica (Kodak) (sensible a la luz) y por lo tanto si existe el anticuerpo deseado, la película quedará marcada en donde se encuentre el anticuerpo ya que solo es ahí donde habrá reacción de luminiscencia.

El revelado de la película se realizó al pasarla primeramente por solución reveladora 6BX (Kodak) durante 3 min aproximadamente, posteriormente por agua 1 min y finalmente por solución fijadora 6BX (Kodak).

6.5.2 Prueba de ELISA

Para facilitar la descripción del desarrollo de la misma se expone en los siguientes puntos:

1. Inmovilización del antígeno. Se colocaron diluciones seriadas en razón 2 (iniciando en 4 ng/ μ L hasta 7.8 pg/ μ L) de P1 y P2 en una solución de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.5 en cada una de los pozos. Se incubó durante toda la noche a 4 °C.
2. Lavado. Se lavó la placa 4 veces con solución de lavado, solución salina amortiguadora de fosfatos PBS y 0.1 % de Tween-20 (PBST).
3. Bloqueo. Se saturó la placa con leche descremada al 3 % en PBS y se incubó durante 1 h a 37 °C.
4. Lavado. Se lavaron 6 veces la placa con la solución de lavado.
5. Incubación con el primer anticuerpo. Se incubó con los anticuerpos producidos en dilución 1:250 durante 1h a 37 °C.
6. Lavado. Se lavaron 6 veces la placa con la solución de lavado .
7. Incubación con el segundo anticuerpo. Se incubó con IgG de cabra anti-conejo conjugada con PAP (fosfatasa alcalina) en dilución 1:5000.
8. Lavado. Se lavaron 8 veces la placa con la solución de lavado. Se realizaron 2 lavados adicionales de PBS + 10 mM dietanolamina y 0.5 mM MgCl₂.

9. Revelado. Se colocan 50 μL por pozo de la solución que contiene el sustrato, p-nitrofenil fosfato e incubó a 37 °C hasta que se desarrolló un color amarillo brillante.
10. Lectura de absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA FL600 Microplate Fluorescence Reader Bio-Tek

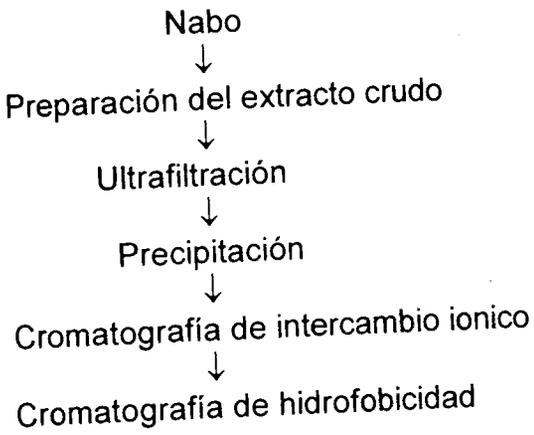
6.6 Diseño experimental

El nabo de donde se extrajo la peroxidasa se obtuvo de la cosecha (después de 7 semanas de sembrado) de un único lote. La purificación se realizó como se indica en la figura 11, en cada una de las etapas se determinó la cantidad de proteína y la actividad a las fracciones por triplicado obteniendo el promedio y su respectiva desviación estándar.

En la parte de inmunización se usaron conejos raza New Zealand y se trabajó con ellos en el Bioterio de la Facultad de Medicina, los cuales fueron manejados bajo las mismas condiciones.

En la figura 11 se muestra el diagrama de flujo general del diseño experimental.

I. Purificación



Proveniente de un solo lote

Cuantificación de proteína por método Bradford (triplicado).
Curva de calibración para proteína utilizando como estándar BSA
Cuantificación de actividad enzimática para peroxidasa (triplicado).

2. Inmunización



Dos grupos conformados por dos conejos, uno por cada isoenzima de la que se crearán anticuerpos

3. Inmunodetección

Transferencia Western

Triplicados

ELISA

Triplicados

Figura 11. Diagrama de flujo del diseño experimental

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Prepurificación

7.1.1 Obtención de extracto crudo.

Después de haber obtenido el extracto crudo de nabo se realizaron análisis de actividad y proteína observándose una buena actividad específica, 5.20 U/mg, comparable con la de otras fuentes como col de Bruselas, brócoli y nabo variedad esculenta (Cuadro 4) (Cordova-Delgado, 1999, Duarte-Vázquez y *col.*, 2000, García-Padilla, 2000, Pérez-Arvizu, 1999). Estas concentraciones sugieren ser adecuadas como para ser una fuente alternativa de purificación de peroxidasa.

7.1.2 Ultrafiltración.

El extracto crudo obtenido se ultrafiltró en una unidad de ultrafiltración Minitan II (Millipore) usando membranas de corte nominal de 10 kDa lo que nos aseguró que en el retentado se encuentra nuestra enzima de interés, pues de acuerdo a Vamos-Vigazo (1981) las peroxidasas provenientes de frutas y vegetales se encuentran de 30 a 54 kDa.

Además de la eliminación de algunas proteínas contaminantes, el extracto crudo se concentró aproximadamente 9 veces facilitando su manejo, y disminuyendo el volumen de acetona utilizada para su posterior precipitación.

La actividad de peroxidasa en este paso disminuyó un 22 % comparada con la del extracto crudo por la posible acción de proteasas.

7.1.3 Precipitación con acetona.

De acuerdo al protocolo de purificación propuesto por Duarte Vázquez y *col.* (2000) para nabo variedad esculenta, la primer etapa de prepurificación realizada fue la precipitación con acetona en una relación 2:1 acetona:extracto crudo.

El factor de purificación se incremento 2 veces y se conservó el 49 % de actividad enzimática original (Cuadro 5). Se lograron eliminar algunas proteínas contaminantes además del color que podría afectar la elución de peroxidasa al momento de realizar la cromatografía de intercambio iónico.

Cuadro 4. Actividad de peroxidasa del extracto crudo de diferentes vegetales del género *Brassica* (adaptado de Cordova-Delgado, 1999, Duarte-Vázquez y col., 2000, García-Padilla, 2000, Pérez-Arvizu, 1999).

Vegetal	Actividad específica (U/mg)	Actividad por gramo de materia fresca (U/g)
Espárrago	0.12	0.289
Col de Bruselas	0.4	7.9
Brócoli (var. itálica)	0.5	7.4
Rábano	1.63	1.2
Brócoli (var. Maratón)	2.61	3.5
Nabo (var. purple top white globe)	5.2	5.32
Nabo (var. esculenta)	6.5	10.8

Cuadro 5. Resumen de la purificación de dos isoperoxidasas de nabo, con base a 5 kg de vegetal fresco^a

Muestra	Proteína (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de Purificación	Rendimiento de actividad
Extracto crudo	5044	26600	5.20	1	100
Ultrafiltración	2565	20871	8.00	1.50	78.0
Precipitación ^b	1265	13000	10.2	1.90	49.0
Intercambio aniónico ^c	33.8	6100	180.5	35.0	23
Interacción hidrofóbica ^d					
P1	3.35	2073	618	118	7.8
P2	3.4	3600	1059	203	13.0

a Promedio de tres corridas con coeficiente de variación menor a 5 %.

b Con acetona

c (DEAE-Celulosa). Fracción no retenida

d (metil HIC)

7.2 Purificación

7.2.1 Cromatografía de intercambio iónico

El siguiente paso de purificación llevada a cabo fue la cromatografía de intercambio iónico en la cual se utilizó una columna de DEAE-Celulosa. El perfil de elución se presenta en la figura 12. Se observa que la actividad de la peroxidasa se distribuyó en tres picos, aparentemente dos de ellos corresponden a isoenzimas básicas (no retenidas, I1 e I2) y el tercero (I3) a una mezcla de isoenzimas neutras, ácidas y ligeramente básicas con una alta actividad (502 U/mg, eluidas con una concentración de NaCl aproximada de 0.4 M). Para verificar la pureza de las proteínas, se realizó una electroforesis desnaturante en condiciones reductoras de la fracción no retenida (fracciones 7 a 14) y su posterior tinción con reactivos específicos para glicoproteínas. Solo se observaron dos bandas, una a 39 kDa y otra a 36 kDa (carril f, figura 13) correspondientes a los picos 1 y 2 de la fracción no retenida del cromatograma (Figura 12). Este es el rango de peso molecular donde se encuentran las peroxidasas provenientes de frutas y vegetales. Vamos-Vigiazio en 1981 reportó que el peso molecular de las peroxidasas de plantas se encuentra en el rango de 30-54 kDa. Esta diferencia en peso molecular (PM) se ve grandemente influenciada por la composición de carbohidratos y otro tipo de modificaciones postraduccionales. Además de que la tinción hecha para glicoproteínas para esta fracción mostró que probablemente se trataba de peroxidasa ya que diversos trabajos han demostrado la naturaleza glicoproteica de esta enzima en la cual los carbohidratos pueden constituir hasta el 30% del PM total de la enzima (Shannon y *col.*, 1966). Para comprobar que tales bandas correspondían a peroxidasa se practicó una electroforesis no desnaturante. El gel se tiñó por actividad, como se describe en la sección 6.3.8, y el color verde que se desarrolló debido al sustrato utilizado (ABTS) cuando se presentó actividad, mostró el mismo peso molecular (36 y 39 kDa) que cuando el mismo gel se tiñó con plata.

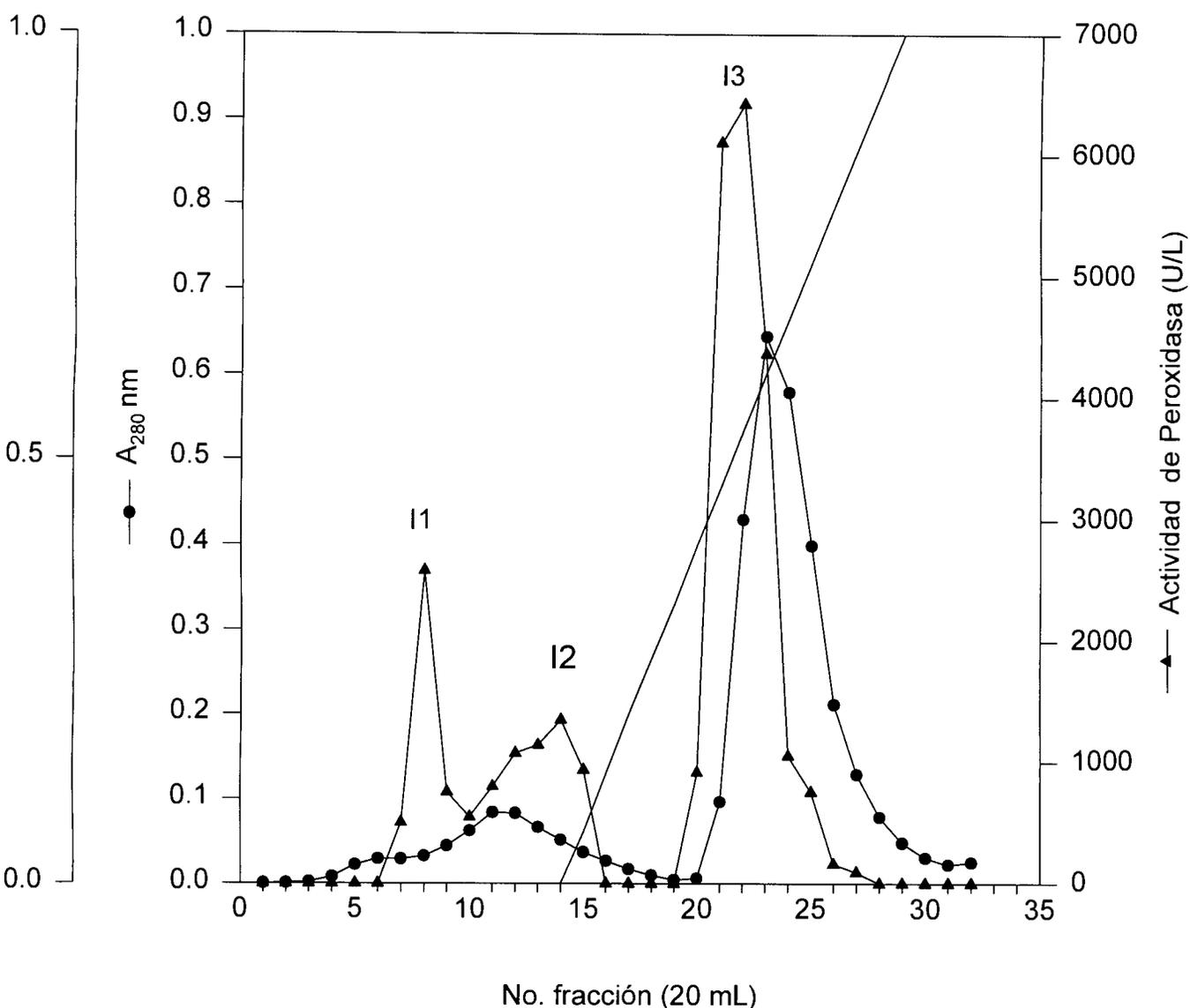


Figura 12. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa) del extracto precipitado con acetona. Amortiguador A: Tris HCl 50 mM, pH 8.60; amortiguador B: A + 1 M de NaCl. Velocidad de flujo 5 mL/min

kDa

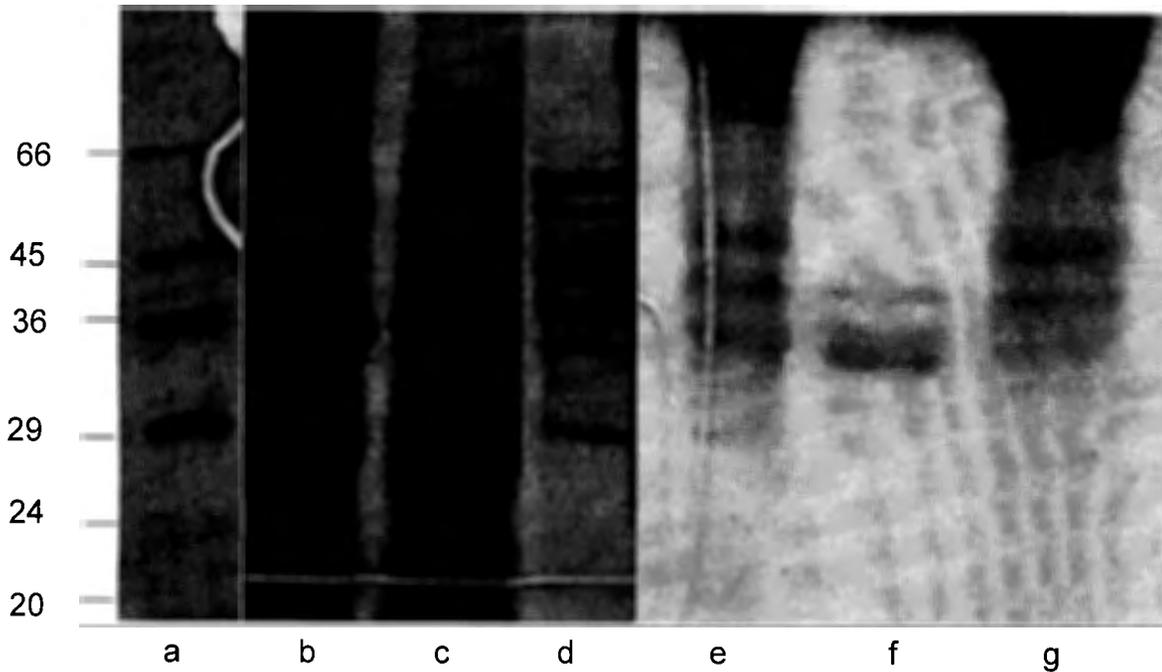


Figura 13. Electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras de los extractos de peroxidasa en diferentes etapas de purificación. *Tinción con plata*. a: marcadores de bajo peso molecular 20-66 kDa (Sigma); b: extracto crudo precipitado con acetona 1:2; c: extracto crudo ultrafiltrado; d: fracción retenida en intercambio aniónico (DEAE-celulosa). *Tinción para glicoproteínas*. e: extracto crudo precipitado con acetona 1:2; f: fracción no retenida en intercambio aniónico (DEAE-celulosa); g: fracción retenida en intercambio aniónico.

Por su parte, la fracción retenida (I3) al someterse a electroforesis (SDS-PAGE reductora) y a tinción para glicoproteínas, mostró varias bandas de proteínas contaminantes (carril g, figura 13). La fracción elegida para los posteriores experimentos de este trabajo fue la no retenida la cual mostró una actividad específica de 180 U/mg, siendo aparentemente la de mayor pureza. Por otro lado, la fracción retenida fue utilizada para experimentos de biorremediación de aguas contaminadas con compuestos fenólicos (Ortega-Tovar, 2001).

7.2.2 Cromatografía de interacción hidrofóbica

La fracción no retenida en la cromatografía de intercambio aniónico (I1+I2), fue dializada contra un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 durante 48 h a 4 °C, con cambios de amortiguador cada 8 h, y posteriormente inyectadas en una columna de interacción hidrofóbica metil HIC.

Según el cromatograma (Figura 14) la actividad de peroxidasa se distribuyó únicamente en dos picos, P1 y P2.

Como se muestra en la tabla de purificación (Cuadro 5), P1 tiene una actividad específica de 618 U/mg y un factor de purificación de 118, mientras que para P2 su actividad específica es de 1059 U/mg y factor de purificación de 203, lo cual nos indica que esta última fracción tiene probablemente mayor pureza que P1, o bien, un contenido de isoenzimas más activas.

Después de realizar una electroforesis (SDS-PAGE reductora) de las fracciones donde se presentaron P1 (fracción 20) y P2 (fracción 26) (Figura 15), se puede concluir que la fracción P2 fue purificada a homogeneidad ya que la tinción con plata mostró solo una banda con un peso molecular de aproximadamente 36 kDa. Para la fracción P1 se observaron dos bandas, la más definida de ellas con un PM de 39 kDa. Esto indica que existe al menos otra proteína más que pudiera tratarse de una isoenzima de peroxidasa; de aquí también puede determinarse que es por esta razón que su actividad específica y factor de purificación son menores a los de la fracción P2.

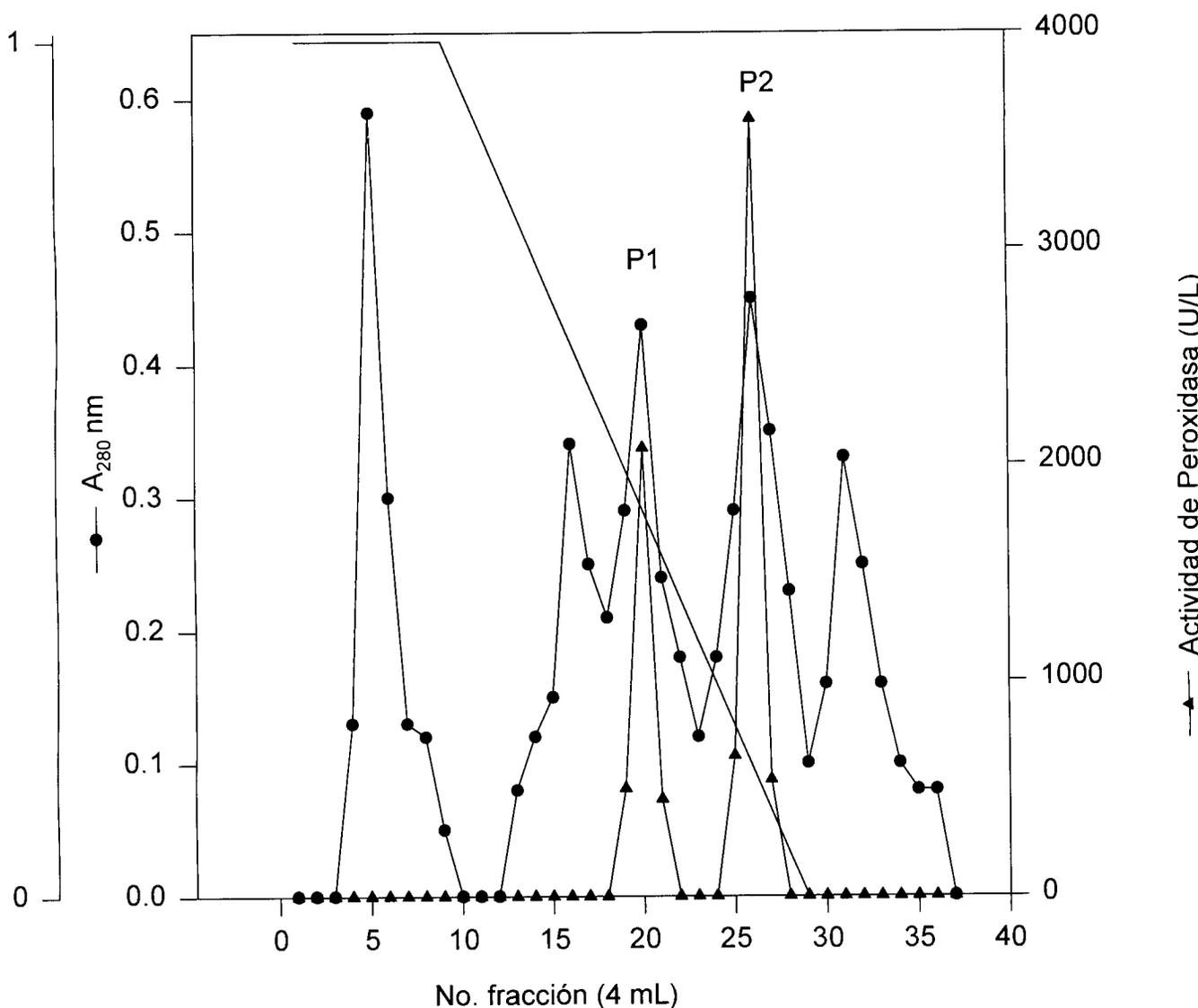


Figura 14. Cromatografía de interacción hidrofóbica de la fracción no retenida en intercambio aniónico. Amortiguador A: KH_2PO_4 50 mM + 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0; amortiguador B: KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0. Velocidad de flujo 0.5 mL/min

KDa

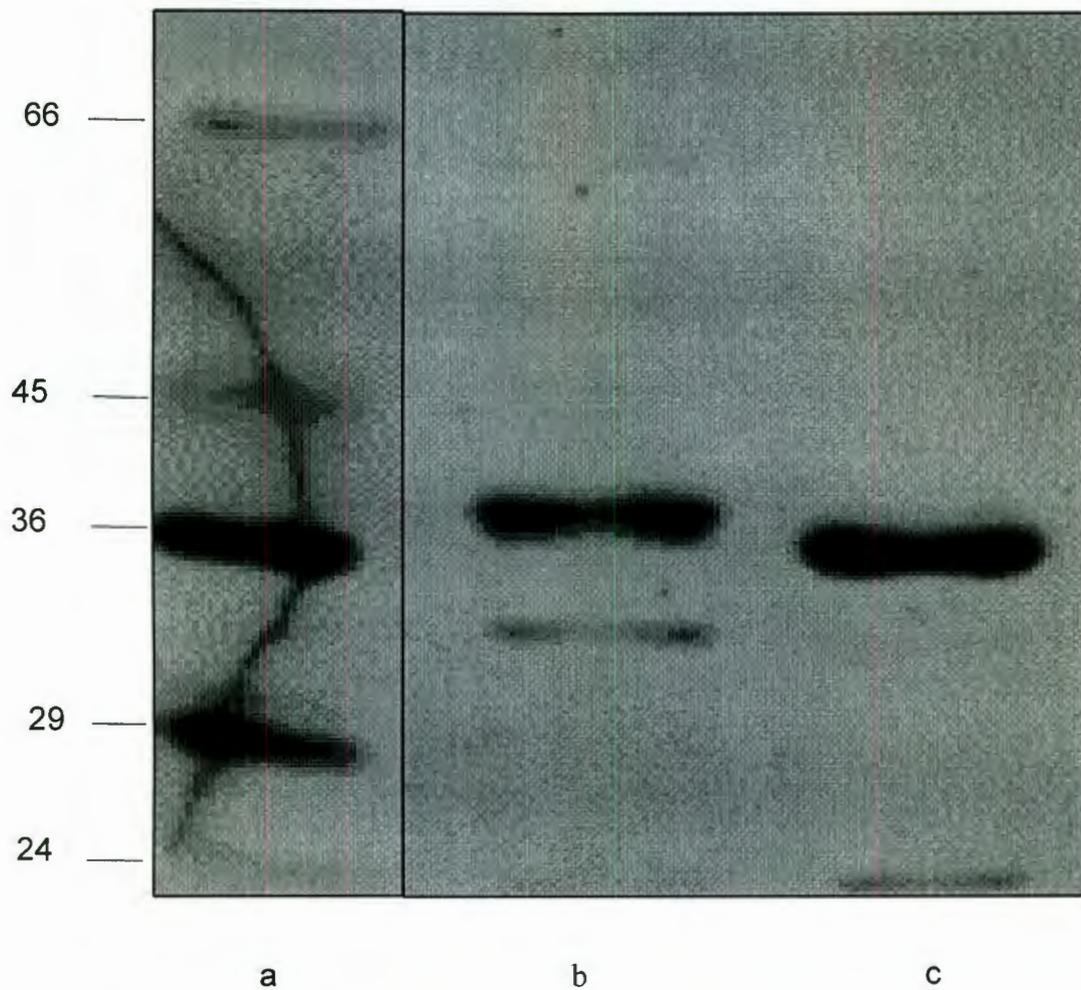


Figura 15 . Electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras de las peroxidasas purificadas. *Tinción con plata*. a: marcadores de bajo peso molecular 20-66 kDa (Sigma). b: isoperoxidasa P1; c: isoperoxidasa P2

7.2.3 Isoperoxidasa de brócoli

Esta isoperoxidasa se purificó de acuerdo a una modificación del protocolo descrito por García-Padilla (2000), usando brócoli (*Brassica oleraceae* var. maratón) suministrada por la compañía Exportadora de hortalizas (ExpoHort). El extracto crudo concentrado por ultrafiltración (aproximadamente 9 veces) se precipitó con acetona en relación volumétrica 3:1 (acetona:extracto concentrado). La pastilla resuspendida y dializada se pasó por una columna de intercambio aniónico utilizando un amortiguador de dietanolamina 20 mM a pH 9.0 eluyendo la fracción retenida con un gradiente de NaCl 0-1 M. Se colectaron 75 fracciones de 20 mL comenzando el gradiente en la número 35 hasta alcanzar la concentración 1 M de NaCl. Las fracciones que presentaron actividad de peroxidasa se dializaron contra buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0 durante 48 h a 4 °C con cambios de amortiguador cada 8 h. La muestra se pasó por una columna de hidrofobicidad metilHIC (Bio Rad) utilizando como fase móvil el mismo buffer contra el cual se dializó. La fracción eluida con un gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.25-0 M fue la única que mostró actividad. Una electroforesis desnaturalizante en condiciones de calentamiento suave con el SDS y el amortiguador muestra (60 °C–1 min) se efectuó para separar las bandas y poder efectuar medición de actividad de la peroxidasa. La tinción por actividad, mostró una única banda de peroxidasa a 49 kDa la cual también se mostró en la tinción hecha por plata (Figura 16).

7.3 Producción de los anticuerpos (antisuero)

Las dos isoenzimas de peroxidasa (P1 y P2), previamente purificadas, se sometieron a electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida, las bandas correspondientes a cada isoenzima fueron cortadas directamente del gel y se solubilizaron con 1 mL de adyuvante completo de Freund. De esta manera se administró a conejos New Zealand una primera inmunización en dosis de 2.2 ± 0.3 μg de P1 y 4.6 ± 0.3 μg de P2.

La desnaturalización sufrida por las proteínas generalmente disminuye la respuesta inmune en comparación con las nativas, no obstante, la acrilamida en donde se

kDa

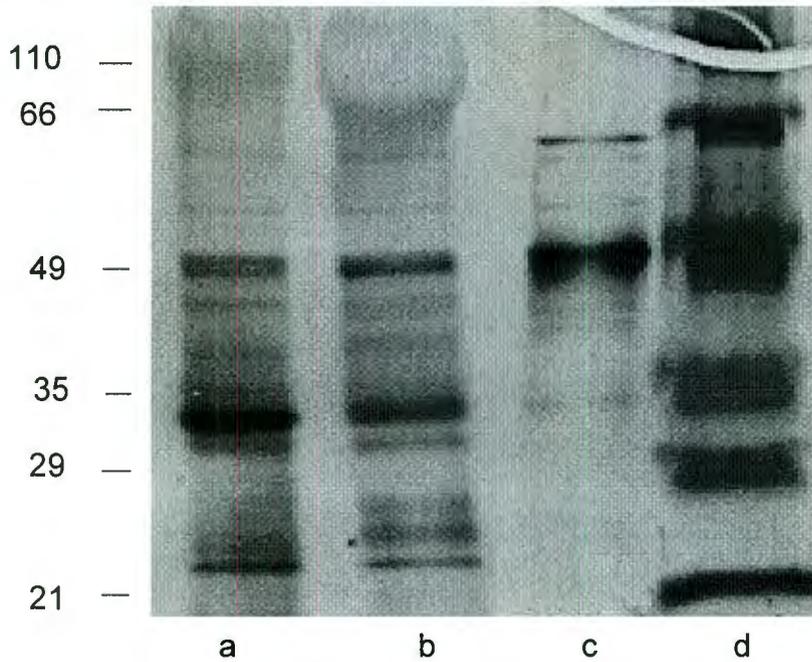


Figura 16. Electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras de las fracciones colectadas de isoperoxidasa de brócoli que presentaron actividad. *Tinción con plata* a y b: fracción retenida en intercambio iónico (DEAE-Celulosa); c: fracción retenida en intercambio hidrofóbico (metilHIC); d: marcadores de bajo peso molecular 21-110 kDa (Bio Rad)

encuentran actúa como acarreador y puede ayudar a intensificar la respuesta inmune en algunos casos (Dunbar y Schwoebel, 1990).

Se tomaron muestras de suero preinmune, de cada uno de los conejos, como control negativo antes de iniciar con las inmunizaciones.

Se efectuaron tres inmunizaciones posteriores (quincenalmente) vía subcutánea cuyas dosis fueron de $2.0 \pm 0.3 \mu\text{g}$ de proteína para P1 y $4.1 \pm 0.3 \mu\text{g}$ para P2, mezclándose con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund.

La inmunización de los conejos se llevó a cabo de la siguiente manera. Se inyectó azul de bromofenol en la planta de una de las patas traseras del conejo. Se dejó pasar 5 min y se aplicó anestesia general por vía endovenosa. Una vez dormido, se rasuró el pelo de la región poplíteica de la pata que fue inyectado con bromofenol y se hizo la asepsia adecuada. Acto seguido se llevó a cabo la disección de esta área para encontrar el ganglio linfático de ésta región que se visualizó fácilmente por el color azul resultado de la inyección inicial. Se expuso el ganglio y se introdujo dentro de este con jeringa y una aguja fina, $150 \mu\text{L}$ del antígeno incorporado en gel de poliacrilamida. Se cerró la piel y se indicaron antibióticos orales por dos días.

El título del anticuerpo no pudo obtenerse debido a limitaciones de equipo por lo cual el momento de desangrado fue a los 50 días después de la primera inmunización de acuerdo al diagrama descrito por Ausubel y *col.* (1995). Cabe aclarar que el título de los anticuerpos extraídos al final del experimento se midió mediante técnicas de ELISA en las instalaciones del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV (México.)

En el cuadro 6 se presentan los volúmenes y cantidad de proteína para cada uno de los sueros obtenidos después de haber sido purificados parcialmente por precipitación con sulfato de amonio al 33.3 % de saturación a pH 7.

Los anticuerpos utilizados para experimentos posteriores se identificaron como AbP1 y AbP2 pertenecientes a los conejos R1 y R2 los cuales habían sido inmunizados con P1 y P2 respectivamente.

Los anticuerpos se conservaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en una concentración final de 10 % de glicerol.

Cuadro 6. Cantidad de proteína y volumen del anticuerpo obtenido después de las cuatro inmunizaciones realizadas en conejos raza New Zealand (sangrado final).

Conejo (Anticuerpo)	Proteína (mg/mL)	Volumen (mL)
R1 (AbP1)	3.44	15
R2 (AbP2)	5.69	16.5
R3 (AbP1)	4.55	7

7.4 Transferencia Western

7.4.1 Elección de concentración de proteína y dilución de anticuerpo adecuadas.

Después de una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y reductora, en la cual se inyectaron 2.5 µg de proteína por carril, se realizó la transferencia de P1 y P2 sobre membranas de difloruro de polivinideno (PVDF). Se efectuaron posteriormente reacciones directas incubando las membranas durante 3 h a temperatura ambiente con diluciones de 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000 de sus respectivos anticuerpos, AbP1 y AbP2. Las membranas se lavaron inmediatamente para retirar los anticuerpos que no se unieron, se incubaron con un segundo anticuerpo [IgG de cabra anti-conejo ligada a HRP (peroxidasa de rábano picante)], en una dilución de 1:5000 para finalmente detectar las proteínas, mediante una reacción de quimioluminiscencia. Transcurrido el tiempo necesario para que se llevará a cabo la reacción (≈ 1 min) se expuso la película fotográfica a la membrana y se reveló como se indica en la sección 6.5.1. Al final de la reacción se observó que la reacción de la quimioluminiscencia decayó rápidamente, en el orden de menor a mayor dilución en un tiempo no mayor a 10 min. Además, se presentó bastante fondo, lo cual sugería que se había realizado un inadecuado bloqueo de los sitios de unión en la membrana o bien un lavado incorrecto (Timmons y

Dunbar, 1990), dando como resultado una alta concentración de anticuerpos unidos a la membrana.

Por lo anterior, se disminuyó la cantidad de proteína a transferir a 1 μ g; realizándose además dos diluciones extra de los anticuerpos producidos: 1:8000 y 1:16000. Se incubó y reveló bajo las condiciones ya descritas; obteniéndose la mejor señal en la dilución de 1:16000 (Figura 17, carriles c y g).

Como control negativo se realizó una incubación, bajo las mismas condiciones, con el suero preinmune de ambos conejos. No se observó señal para ninguno de ellos (Figura 17, carriles d y h), lo cual aseguró que la producción de anticuerpos por parte del sistema inmunológico de los conejos fue debido a las isoperoxidasas administradas.

7.4.2 Reacciones cruzadas

Existen varios reportes en los cuales se ha hecho uso de herramientas inmunológicas para la determinación de homología entre isoenzimas de peroxidasa de diferentes fuentes e incluso de la misma fuente (Gaudreault y *col.*, 1986; Hu y van Huystee, 1989a).

La existencia de homología entre las isoenzimas P1, P2 y la peroxidasa de brócoli pudo realizarse cualitativamente mediante reacciones cruzadas en transferencia Western. A este respecto Lang y *col.* (1990) utilizaron este tipo de inmunoensayo solo como un control de la respuesta a las reacciones cruzadas entre el anticuerpo creado contra isoperoxidasas de tabaco y otras de la misma fuente, con el fin de determinar homologías en la secuencia de aminoácidos usando inmunoafinidad.

La concentración de proteína y dilución de los anticuerpos en que se desarrolló la transferencia Western para estas reacciones fueron iguales a las descritas para las reacciones directas.

Tanto las isoperoxidasas de nabo, P1 y P2, como la peroxidasa de brócoli, PB, desarrollaron señal contra los anticuerpos AbP1 y AbP2; mostrándose en común la

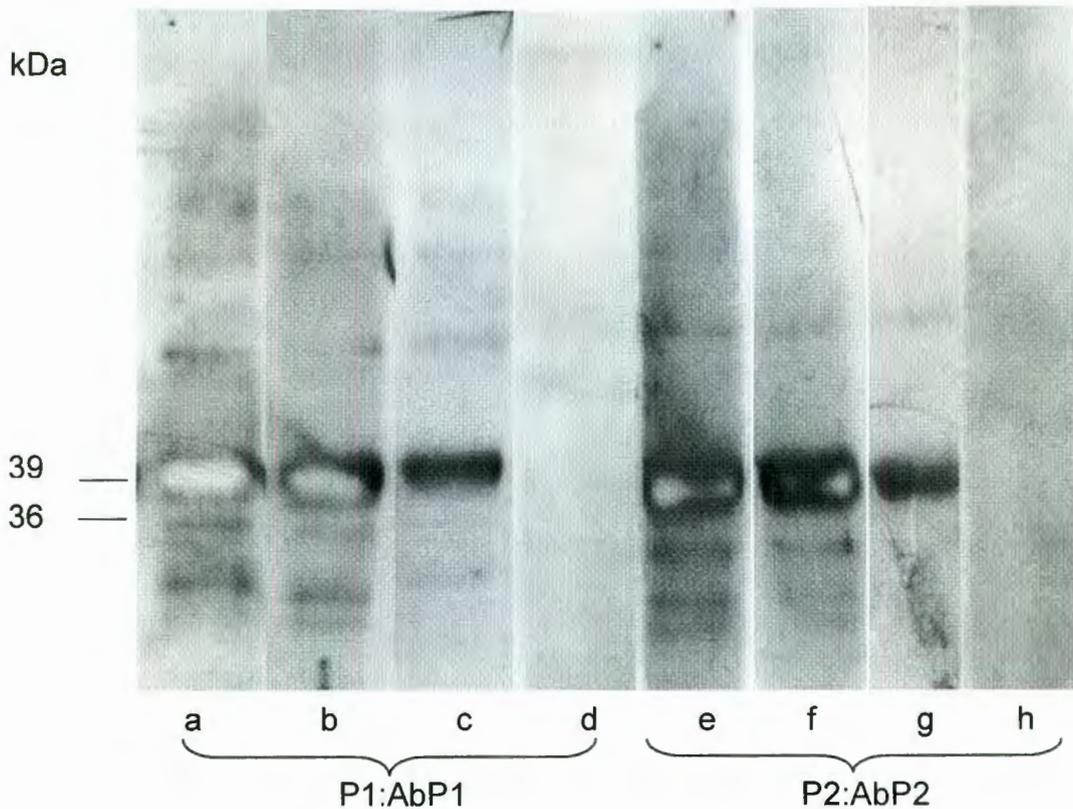


Figura 17. Transferencia Western. Reacciones directas P1:AbP1 y P2:AbP2. a, b, c: reacción directa de isoperoxidasa P1 con AbP1 en diluciones 1:4000, 1:8000 y 1:16000, respectivamente; d: reacción directa de isoperoxidasa P1 con suero preinmune AbP1 (control negativo). e, f, y g: reacción directa de isoperoxidasa P2 con AbP2 en diluciones 1:4000, 1:8000 y 1:16000, respectivamente; h: reacción directa de isoperoxidasa P2 con suero preinmune AbP2 (control negativo). Tiempo de exposición 3 seg.

banda que corresponde al PM de las peroxidases contra las que se desarrolló el anticuerpo: 39 kDa para P1 y 36 kDa para P2. Para la PB se observó una débil señal a un valor similar de PM siendo más intensa la que se presentó a 49 kDa, peso molecular al cual tal enzima presenta actividad apreciable de peroxidasa después de realizar un zimograma. Por lo tanto, las bandas con menor intensidad para PB podrían tratarse de alguna proteína contaminante ó con menor homología y actividad (Figura 18). La presencia de bandas al realizarse las reacciones cruzadas con los dos anticuerpos, nos indican que P1, P2 y PB comparten determinantes antigénicos estructuralmente relacionados, indicando de manera indirecta cierta homología en sus estructuras.

En un trabajo similar Conroy y *col.* (1982) produjeron anticuerpos policlonales contra una isoperoxidasa básica de rábano picante practicando reacciones cruzadas, por inmunodifusión doble, con dos isoperoxidasas ácidas de la misma fuente y peroxidases básicas de rábano, nabo y zanahoria, obteniendo como conclusión principal de este estudio que estructuralmente se encuentran más relacionadas las isoperoxidasas básicas de diferentes fuentes que una isoperoxidasa básica y una ácida de la misma fuente. Estudios posteriores que apoyan tal aseveración fueron desarrollados por Clark y Conroy, (1984) quienes al generar anticuerpos policlonales de una isoperoxidasa ácida de rábano picante y luego de realizar reacciones cruzadas con las mismas isoenzimas, encontraron que el antisuero producido da reacciones de identidad con isoperoxidasas ácidas provenientes de rábano y nabo y de identidad parcial con una isoperoxidasa básica de rábano picante.

Lo anterior sugiere que las isoperoxidasas básicas y ácidas se conservan fuertemente durante la evolución de una fuente vegetal a otra, e indican que pueden catalizar reacciones involucradas en funciones de especialización celular (Conroy y *col.*, 1982).

Debido a que la detección de proteínas por quimioluminiscencia es muy sensible (umbral de detección 10 pg), hasta este punto no se pudo saber el porcentaje de homología entre las isoperoxidasas estudiadas.

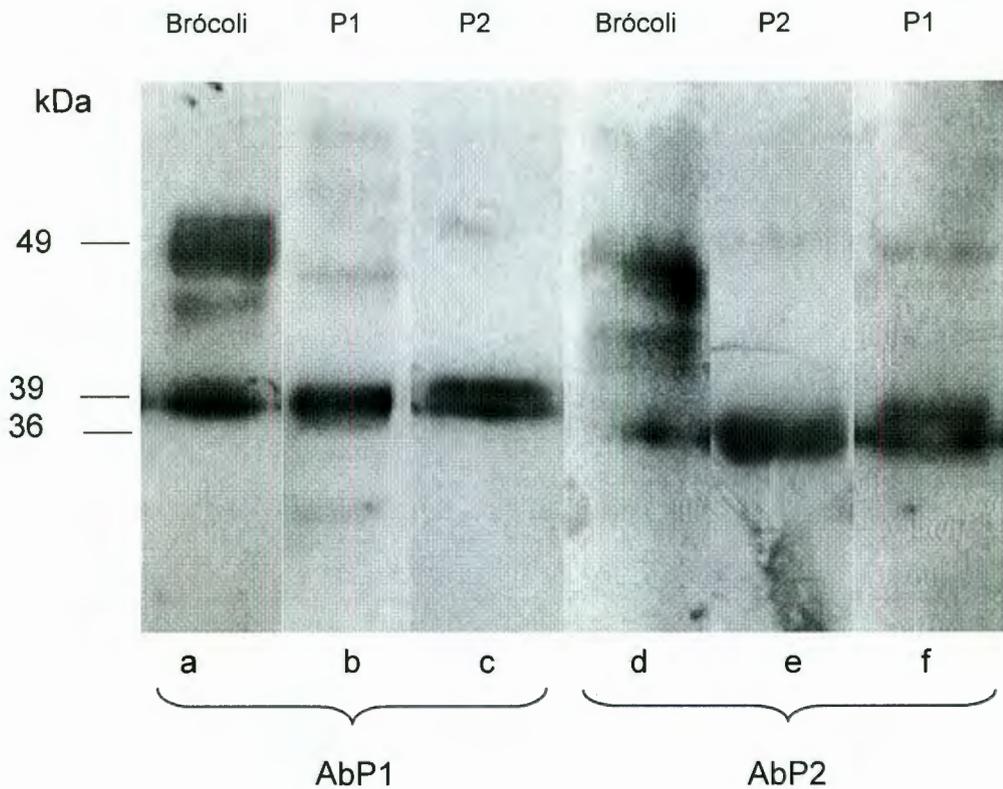


Figura 18. Transferencia Western. Reacciones cruzadas P1:AbP2, P2:AbP1, PB:AbP1 y PB:AbP2. a y d: peroxidasa de brócoli (PB); b y f: Isoperoxidasa P1; c y e: Isoperoxidasa P2. a y c: reacción cruzada con AbP1; d y f: reacción cruzada con AbP2; b: reacción directa con AbP1; e: reacción directa con AbP2. Tiempo de exposición 3 seg.

7.4.3 Importancia de las cadenas glicosídicas de la peroxidasa en la respuesta inmune.

Las dos isoperoxidasas purificadas fueron desglicosiladas en el laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ, siguiendo el procedimiento propuesto por Yasuda y *col.* (1971). Las enzimas fueron incubadas durante 20 h a 4 °C en la oscuridad con metaperyodato de sodio 10 mM en buffer de acetato de sodio 50, mM pH 4.5.

La reacción se detuvo a intervalos de tiempo específicos por adición de etilenglicol en una coconcentración final de 16%. La mezcla fue dializada contra amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 4.5.

La desglicosilación fue del 90 % medido por el método del fenol-sulfúrico (Dubois, 1956) y después de SDS-PAGE, la tinción para oligosacáridos no fue detectable, ya que no aparecieron bandas en tono rojo o rosa típicas de una prueba positiva.

De la misma forma a la descrita anteriormente en la realización de transferencia Western (sección 7.4.1), se llevó a cabo dicha transferencia para las dos muestras desglicosiladas (P1D y P2D).

Tanto, P1D como P2D mostraron bandas en la película expuesta a la membrana, indicando la presencia de sitios de unión dentro de la cadena peptídica (Figura 19). Estos resultados concuerdan con Schmitz, y *col.* (1997) quienes observaron reacción cruzada entre una peroxidasa de soya desglicosilada y anticuerpos de peroxidasa catiónica de cacahuete. No obstante, existe controversia acerca del papel que desempeñan los carbohidratos como mediadores de la respuesta inmune, ya que en algunos trabajos el análisis inmunológico de una gran variedad de glicoproteínas utilizando anticuerpos producidos contra ellas mismas, ha demostrado que los oligosacáridos son el principal sitio de reconocimiento antigénico de éstas (Hu, y van Huystee, 1989b). Mientras que estudios realizados por Tigier y *col.* (1991), utilizando una isoperoxidasa de semilla de durazno parcialmente desglicosilada al ser incubada con su propio antisuero demostraron que la desglicosilación no afecta al reconocimiento de los sitios de unión. En otro estudio Wan y van Huystee (1994) señalaron que la parte glicosilada de las peroxidases fue importante para realizar reacciones antígeno-anticuerpo.

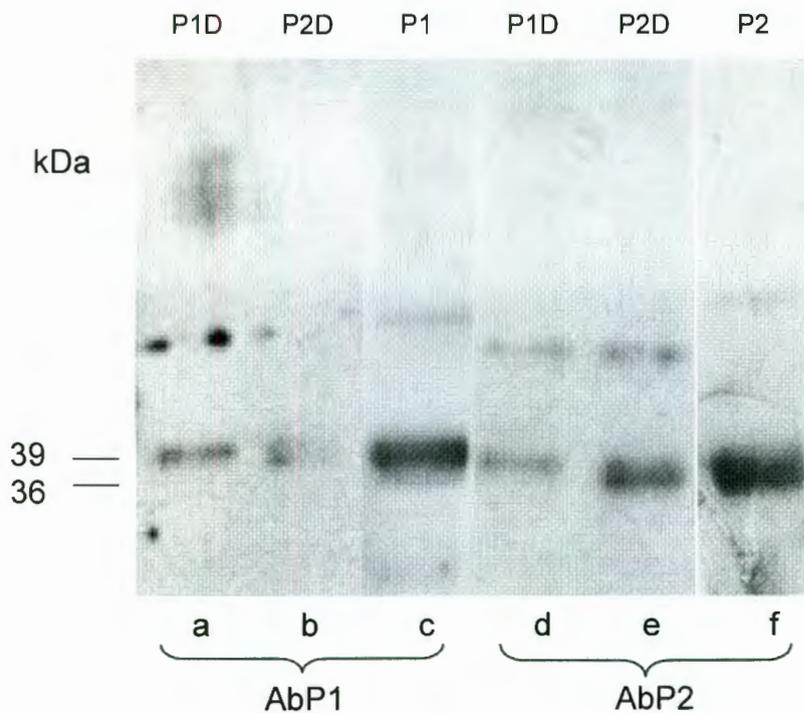


Figura 19. Transferencia Western. Isoperoxidasas desglicosiladas P1 y P2. a y d: isoperoxidasa P1 desglicosilada; c: isoperoxidasa P1 sin desglicosilar; b y e: isoperoxidasa P2 desglicosilada; f: isoperoxidasa P2 sin desglicosilar; a y b: reacción cruzada con AbP1; c: reacción directa con AbP1; d y e: reacción cruzada con AbP2, f: reacción directa con AbP2. Tiempo de exposición 3 seg.

Ellos produjeron anticuerpos para tres *N*-glicanos de peroxidasa catiónica de cacahuete y observaron que la inhibición, al desarrollar una ELISA competitiva hecha por diferentes monosacáridos, es menor a la que resulta de una incubación con los *N*-glicanos; apoyándose en los resultados de Hu y van Huystee (1989b) quienes demostraron que el anticuerpo contra peroxidasa catiónica de cacahuete tuvo reacción cruzada con la aniónica de la misma fuente, debido a las parte glicosilada de la proteína.

Por lo tanto, debido a los resultados contradictorios a este respecto es difícil generalizar sobre el papel funcional de los carbohidratos en la respuesta inmune, sin embargo en las peroxidasas de nabo estudiadas aquí, después de su destrucción se conservó el reconocimiento antigénico.

7.5 Determinación de la homología y reactividad cruzada mediante técnica ELISA

De acuerdo a los datos obtenidos en la transferencia Western (sección 7.4.2) es evidente que las isoperoxidasas P1 y P2, tienen en sus estructuras determinantes antigénicos similares. La determinación cuantitativa de esta homología se llevó a cabo mediante reacciones cruzadas en ELISA, debido a que esta técnica inmunológica al igual que el radioinmunoensayo y precipitación se basan en la interacción de los múltiples determinantes antigénicos de una proteína con anticuerpos específicos (Clark y Conroy, 1984).

Con el objeto de encontrar la dilución óptima del anticuerpo producido con la cual se podía trabajar, alícuotas de 50 μ l de diluciones seriadas en razón de 2 (iniciando en 4 ng/ μ L hasta 1.95 pg/ μ L) fueron inmovilizadas en microplatos, incubando aproximadamente 12-14 h. Se lavaron posteriormente los pozos con PBST y se agregó la solución de bloqueo. Transcurrido el tiempo de bloqueo (1 h) de los sitios no específicos de la proteína, se incubó con el anticuerpo en diferentes diluciones 1:250, 1:500 y 1:1000. Nuevamente se lavó la placa para posteriormente colocar IgG de cabra anti-conejo ligada a AP (fosfatasa alcalina) y después de 1 h de incubación a 37 °C las placas fueron lavadas y finalmente se agregó p-nitrofenil

fosfato como sustrato. Las mezclas se incubaron 1 h a 37 °C hasta la aparición de color amarillo brillante deteniendo la reacción con NaOH 3 N. La medición del color desarrollado se hizo a 405 nm en un lector de ELISA.

De las tres diluciones ensayadas, 1:250 fue la concentración en la cual existió lectura para las diferentes diluciones de la proteína y la curva se encuentra mejor definida, ya que las diluciones 1:500 y 1:1000 en concentraciones de proteína menores a 0.25 ng/ μ L y 1 ng/ μ L la absorbancia fue muy baja (Figuras 20 y 21).

Para calcular la constante de afinidad (K_a) y por tanto de el porcentaje de homología de las peroxidasas en estudio, solo doce de la diluciones (a partir de 16 ng/ μ L hasta 7.8 pg/ μ L) de tales isoenzimas fueron tomadas en consideración ya que las dos mayores a 7.8 pg/ μ L proporcionaron una lectura igual a la producida por ésta. Finalmente se trazó la gráfica de las absorbancias a 405 nm, tomando la máxima de las lecturas como el 100% de la formación del complejo antígeno: anticuerpo (Ag:Ab), contra el log de antígeno libre de las isoperoxidasas colocadas en cada pozo (Figuras 22, 23, 24 y 25).

La constante de afinidad para anticuerpos policlonales, representa el volumen en el cual un mol de anticuerpo puede ser diluido para unir el 50% de antígeno. Según la ley de acción de masas, esta constante es igual al inverso de la concentración del antígeno ya que a una saturación media de los sitios de unión en un anticuerpo la concentración del complejo antígeno:anticuerpo es igual a la concentración del anticuerpo (Apéndice 3). Por lo tanto en el gráfico, el inverso de la concentración en la cual se presenta el 50% de la formación del complejo Ag:Ab da la constante de afinidad K_a .

La constante de afinidad o constante de asociación en el equilibrio, es definida como el recíproco de las unidades de concentración molar M^{-1} o litros por mol (L/mol). Entre mayor sea K_a mayor es la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

En el cuadro 7 se presenta el porcentaje de la actividad cruzada de los antisueros con cada una de las peroxidasas al igual que su constante de afinidad.

Se encontró un 44.7 % de reacción cruzada entre P1 y AbP2 y de 46.3 % entre P2 y AbP1. Dada la similitud en el porcentaje de homología de la reacción cruzada

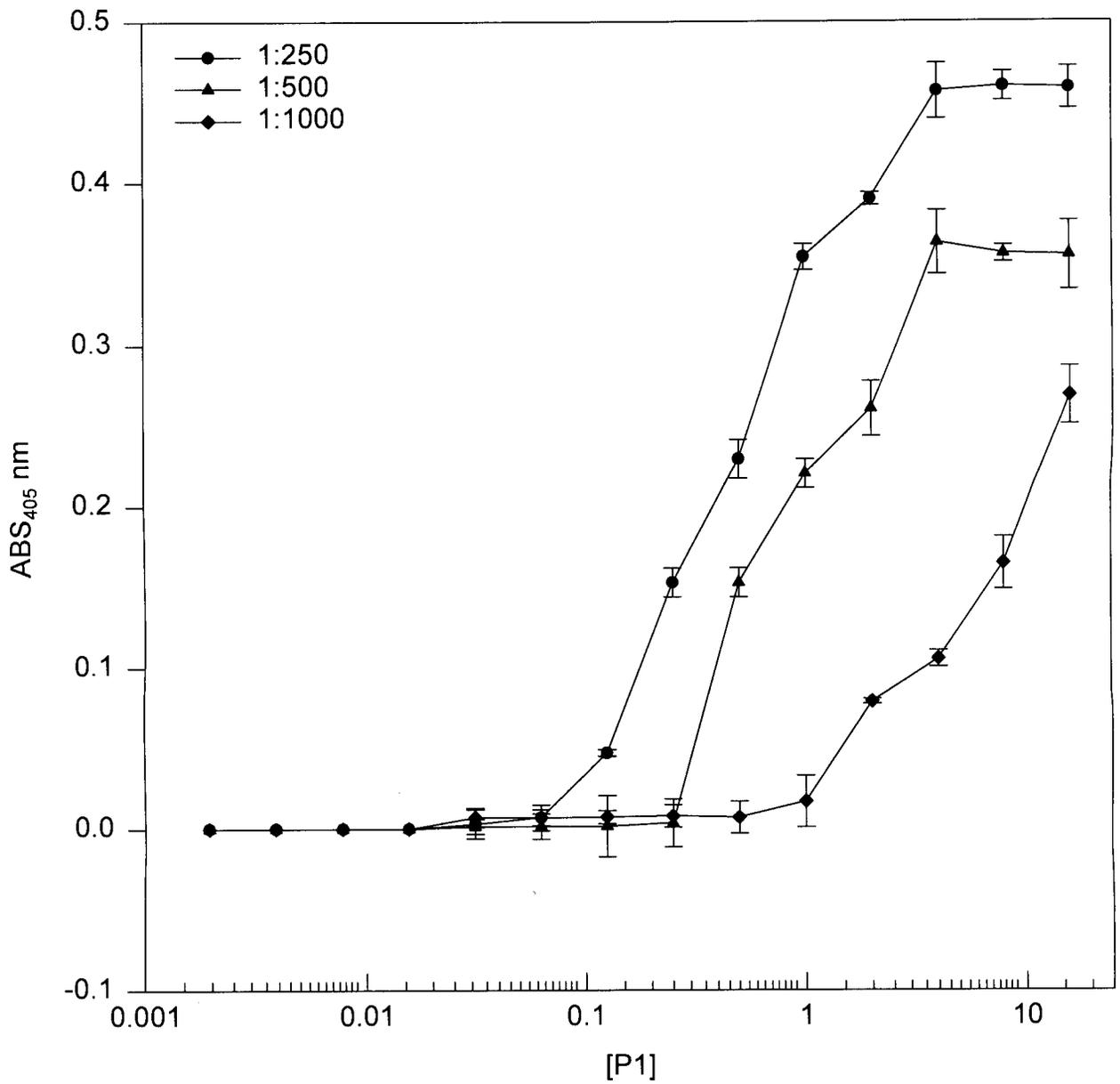


Figura 20. Efecto de la dilución de AbP1 en el desarrollo de ELISA

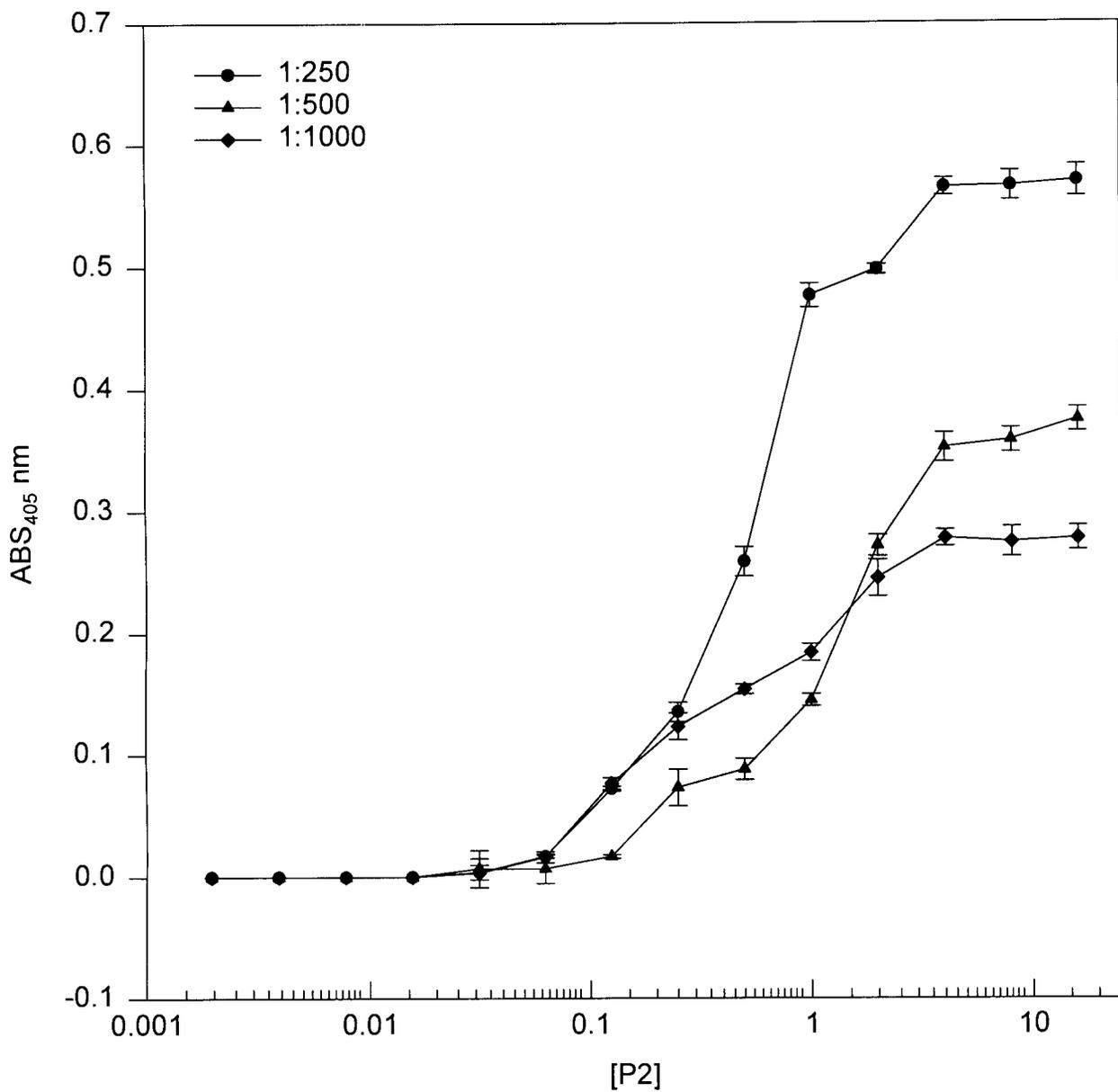


Figura 21. Efecto de la dilución de AbP2 en el desarrollo de ELISA

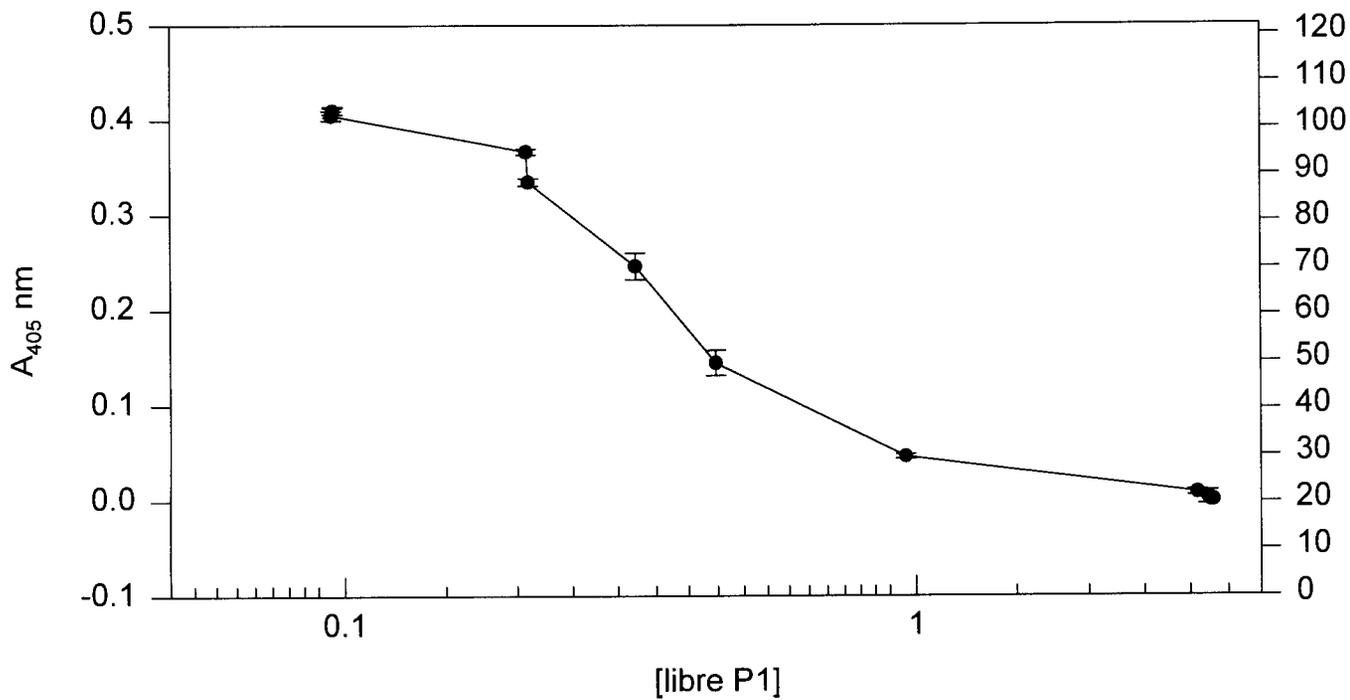


Figura 22. Representación gráfica del porcentaje de unión P1:AbP1 contra la concentración de P1 libre

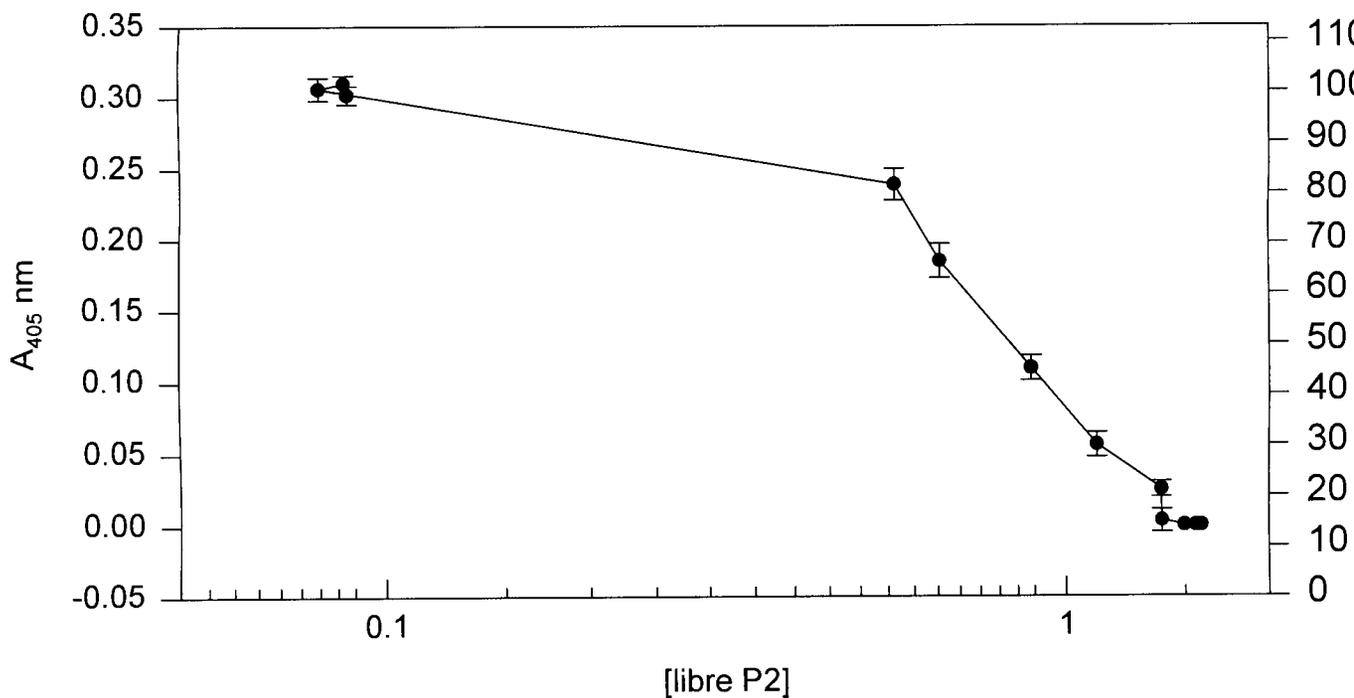


Figura 23. Representación gráfica del porcentaje de la reacción cruzada P2:AbP1 contra la concentración de P2 libre

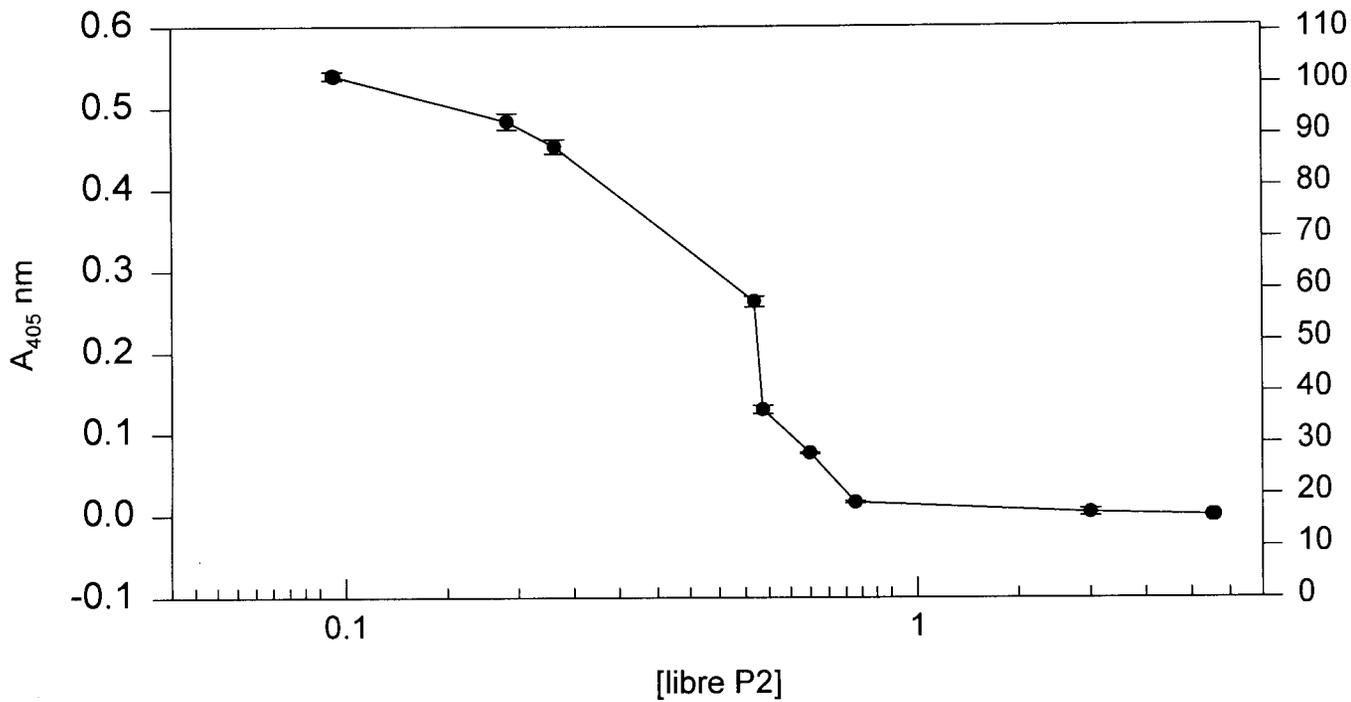


Figura 24. Representación gráfica del porcentaje de unión P2:AbP2 contra la concentración de P2 libre

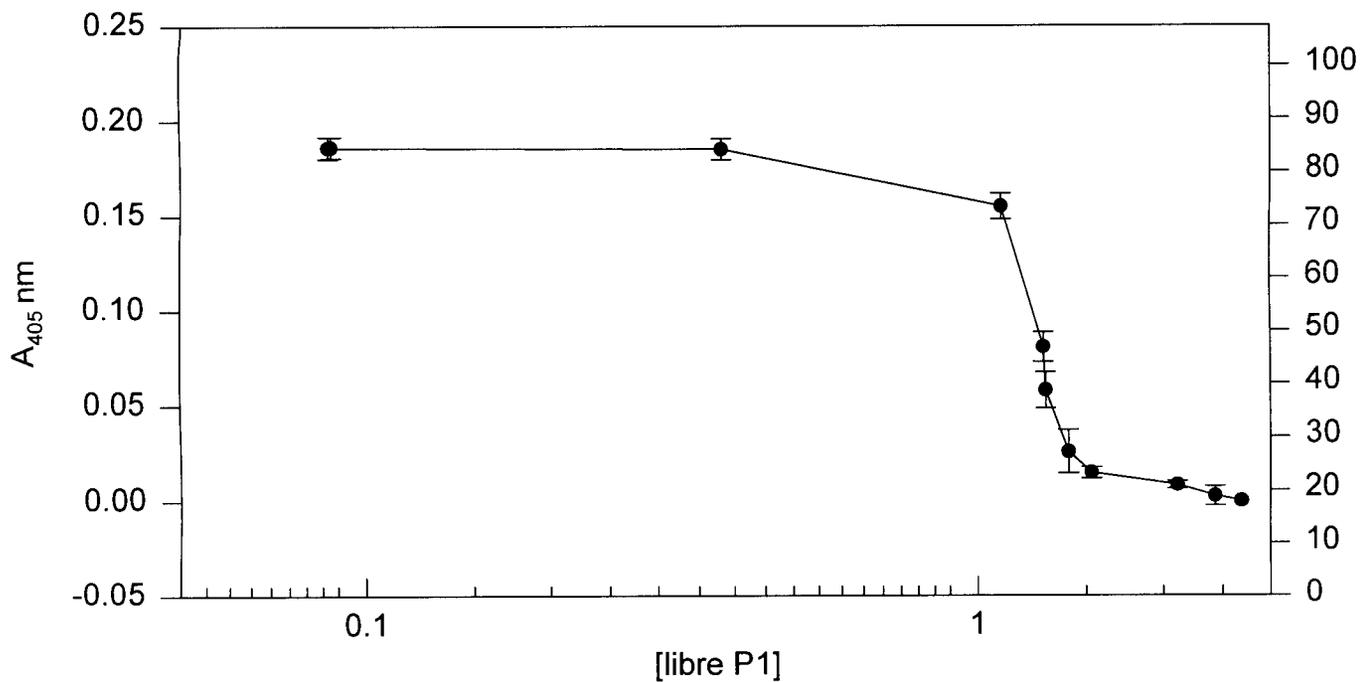


Figura 25. Representación gráfica del porcentaje de la reacción cruzada P1:AbP2 contra la concentración de P1 libre

Cuadro 7. Constantes de afinidad ($= K_a \times 10^{-6}$ (L/mol) para dos isoenzimas de peroxidasa de nabo y sus respectivos anticuerpos, así como porcentaje de reacción cruzada

	AbP1	AbP2
P1	100 ($K_a = 102.6$)	44.7 ($K_a = 30.9$)
P2	46.3 ($K_a = 47.56$)	100 ($K_a = 69.2$)

puede concluirse que la estructura tridimensional es muy semejante. Estos valores son muy similares a los presentados por Conroy y *col.* (1982), en donde dos isoenzimas básicas de nabo y zanahoria tuvieron una reacción cruzada con una peroxidasa básica de raíz picante del 51.5 % y 46 % respectivamente; y menores a la reacción cruzada entre una isoperoxidasa básica de rábano picante e isoperoxidasa básica de rábano con 77 % y una homología del 73 %. De la misma forma Clark y Conroy (1984) realizaron estudios sobre reacciones cruzadas en donde dos isoenzimas ácidas de rábano picante (VII y VIII) dan una actividad cruzada del 57 % entre VII y el anticuerpo de VIII y del 87 % entre VIII y el anticuerpo de VII.

Sin embargo tanto los resultados de este trabajo como los citados son contrastantes a los reportados por Lang y *col.* (1990) en donde el porcentaje máximo de reacción cruzada entre dos isoperoxidasas ácidas de tabaco fue del 13% con una homología del 10 %; atribuyéndolo a que los anticuerpos son mayormente los que se encuentran en la parte peptídica central donde se contiene el sitio activo y el canal de acceso para el sustrato (Welinder, 1985).

Lo anteriormente descrito se confirmó al comparar los porcentajes de homología, por caracterización inmunológica, con los obtenidos al secuenciar los aminoácidos de las isoperoxidasas básicas de nabo y rábano picante existiendo un 49 % de identidad (Mazza y Welinder, 1980). De la misma forma con la secuenciación del ADNc de dos peroxidases ácidas de tabaco se observó 52 % de homología con una peroxidasa catiónica de rábano picante y 46 % con una peroxidasa catiónica de nabo (Lagrimini y *col.*, 1987). Estos estudios indican que las peroxidases de diferentes fuentes se encuentran estructuralmente relacionadas y que en algunas investigaciones tal relación es mayor entre isoperoxidasas básicas de diferentes fuentes que isoperoxidasas básica y ácida de la misma fuente.

En cuanto a las constantes de afinidad estas se encuentran dentro del rango de baja afinidad ya que valores típicos para constantes de afinidad K_a de la mayoría de los anticuerpos va de 10^5 a 10^{12} L/mol; presentándose entre 10^5 a 10^7 L/mol aquellos de baja afinidad (Deshpande, 1996). Cabe señalar que las inmunizaciones fueron hechas con la enzima desnaturalizada y el ensayo de ELISA con la

isoperoxidasa nativa, lo que puede explicar en parte las diferencias. La desnaturalización pudo influir en el sitio de reconocimiento y por tanto en la formación del complejo Ag:Ab. De acuerdo a Dunbar y Schwoebel (1990), tanto, el nivel de respuesta inmune (inmunogenicidad) como el tipo de reconocimiento del epítope (conformacional y secuencial) pueden ser modulados por el método de purificación del inmunógeno. Inmunógenos purificados por métodos bioquímicos no desnaturalizantes tienden a dar una fuerte respuesta dirigida hacia la conformación del epítope presente en la molécula. Procedimientos donde es desnaturalizado el inmunógeno tienden a dar anticuerpos que se dirigen hacia los determinantes secuenciales.

8. CONCLUSIONES

Se logró la purificación de dos isoenzimas de peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. var. purple top white globe), P1 (39 kDa) y P2 (36 kDa), mediante técnicas cromatográficas. Las actividades específicas fueron 618 U/mg para P1 y 1059 U/mg para P2, las cuales son comparables con la peroxidasa comercial de rábano picante (tipo VI, Sigma) por lo que se considera al nabo como una buena fuente de esta enzima.

La utilización de bajas dosis (2-4 μ g de proteína) de estas dos isoperoxidasas, P1 y P2, como antígenos para la producción de anticuerpos policlonales se consiguió mediante la ruta de inmunización directa al sistema linfático (ganglio poplíteo).

Se obtuvo un buen rendimiento de anticuerpos dada la alta relación de mg de proteína obtenida (por precipitación del suero), por μ g de proteína inyectada; 23 para P1 y 21.5 para P2.

Se logró detectar la producción de anticuerpos contra P1 y P2, mediante transferencia Western, obteniéndose una buena señal de quimioluminiscencia usando una dilución de 1:16000 de los anticuerpos producidos. No se observó la presencia de anticuerpos contra las isoperoxidasas purificadas en los sueros preinmunes usados como control negativo.

La reacción cruzada entre P1 y P2 además de PB sugiere que comparten determinantes antigénicos estructuralmente relacionados, debido probablemente a la homología de sus secuencia de aminoácidos. Siendo las estructuras tridimensionales de P1 y P2 muy semejantes ya que existe un 44.7 % de homología de la reacción cruzada entre P1 y AbP2 y de 46.3 % entre P2 y AbP1.

Las isoenzimas P1 y P2 sometidas a desglicosilación usando metaperiodato de sodio, P1D y P2D, presentaron reacción cruzada con los anticuerpos producidos; lo

que sugiere que aún después de la destrucción de las cadenas glicosídicas de las isoperoxidasas purificadas se conservó el reconocimiento antigénico.

Los anticuerpos obtenidos fueron de baja afinidad (10^{-6} M^{-1}), no obstante han sido sugeridos como los más adecuados para una eficiente unión y su posterior elución en columnas de inmutioafinidad.

9. BIBLIOGRAFÍA

Amaya-Llano, S., 2000. Concentración y desmineralización del suero lácteo y evaluación del daño a la proteína como resultado del procesamiento. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. PROPAC. UAQ.

Arroyave, 2000. Comunicación personal.

Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D.; Seidman, J.G.; Smith, J. A. y Struhl, K. 1995. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York. 10.38, 11.26-11.27.

Bohinski, R. 1991. Bioquímica. Addison-Wesley Iberoamericana. México 4:117-120.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Burrin, J., y Newman, D.J. 1991. Principles and Practice of Immunoassay. Stockton Press. New York . 2:19-52.

Campa, A. 1991. Biological roles of plant peroxidase: known and potential function. En: L. Everse, K. E. Everse y M.B. Grisham, (Eds). Peroxidases in Chemistry and Biology. CRC Press. Boca Raton. 2:26-43.

Catty, D. y Raykundalia, C. 1988. Production and quality control of polyclonal antibodies. En: D. Catty (Eds). Antibodies. A Practical Approach. IRL Press. Oxford. 2:19-80.

Clark, S. y Conroy, H. 1984. Homology of plant peroxidases: Relationships among acidic isozymes. *Physiol. Plant.* **60**:294-298

Childs, R. E. y Bardsley, W. G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* **145**:93-103.

Coligan, J.; Dunn, B.; Ploegh, H.; Speicher, D. y Wigfield, P. 1995. Manipulación enzimática. En: S. Huerta, L. Prado, G. Rodríguez, G. Saucedo. (Eds). *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología*. UAM-Iztapalapa. México. **3**:71-72.

Conroy, J.; Borzelleca, D. y McDonell, L. 1982. Homology of plant peroxidases: an immunochemical approach. *Plant Physiol.* **69**:28-31

Córdova-Delgado, E. B. 1999. Purificación y caracterización de peroxidasa de rábano (*Raphanus sativus parvus*) utilizando métodos bioquímicos convencionales y el método de micelas inversas. Tesis de licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Guanajuato.

Deshpande, S.S. 1996. *Enzyme Immunoassays from Concept to Product Development*. Chapman and Hall. New York. **5**:117-154.

Doke, N. 1983. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* **23**:359-367.

Duarte-Vazquez, M.; García-Almendárez, B. y Regalado, C., 1999. Peroxidasa de vegetales: Función, propiedades bioquímicas y aplicaciones. En: S. Huerta, L.

Prado, G. Rodríguez, G. Saucedo. (Eds). Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. UAM-Iztapalapa. México. **5**:351-364.

Duarte-Vazquez, M.; García-Almendárez, B.; Regalado, C. y Whitaker, J. R. 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. esculenta D.C.) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* **48**:1574-1579.

Dubois, M.; Gilles. K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.

Dunbar, B. y Schwoebel, E. 1990. Preparation of polyclonal antibodies. En: Deutscher, M. (Eds). Guide to Protein Purification. Academic Press. San Diego. **49**: 663-670.

Durrat, I. y Fowler, S. 1994. Chemiluminescent detection system for protein blotting. En: B. Dunbar (Ed) Protein blotting. A practical approach. New York. **11**:141-152.

Fils, B.; Sauvage, F. X. y Nicolas, J. 1985. Tomato peroxidase, purification and some properties. *Sci. Aliments.* **5**:217-232.

Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of Angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**:165-186.

García, C. y Navarrete, A. 1999. Métodos generales de manipulación enzimática. En: S. Huerta, L. Prado, G. Rodríguez, G. Saucedo. (Eds). Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. UAM-Iztapalapa. México. **3**:67-86.

García-Padilla, S. 2000. Extracción, purificación, caracterización parcial de peroxidasa de brócoli (*Brassica oleraceae* L. var. maratón) y estudios de termoestabilidad. Tesis de Licenciatura de Químico en Alimentos. UAQ.

Gaudreault, P.; Tyson, H. y Fields, M. 1986. Immunochemical characteristics of isoperoxidases from two environmentally-induced flax genotrophs (*Linum usitatissimum*). *J. Exptl. Bot.* **37**:1180-1188.

Gerard, C. 1990. Purification of glycoproteins. En: Deutscher, M. (Ed). *Guide to Protein Purification*. Academic Press. San Diego. **40**:529-539.

Getty, R. y Saar, L.I. 1990. Sistema linfático. En: Sisson, J.D. y Grossman, H. (Eds). *Anatomía de los animals domésticos*. Salvat. México. **56**:1821-1826.

Harris, E. L .V. 1995. Concentration of the extract En: E. L. V. Harris y S. Angal (Eds). *Protein Purification Methods. A Practical Approach*. IRL Press. Oxford. pp. 125-174

Hu, C., y van Huystee, R. 1989a. Immunochemical relatedness of two peroxidase isozymes from peanut cell culture. *Biochem. Cell Biol.* **67**:371-376.

Hu, C., y van Huystee, R. 1989b. Role of carbohydrates moieties in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidases. *Biochem. J.* **263**:129-135.

Kemeny, D. M. y Chantler, J. 1988. *ELISA and Others Solid Phase Immunoassays*. John Wiley and sons. **1**:1-29.

Kennedy, M. 1990. Hydrophobic chromatography. En: Deutscher, M. (Ed). *Guide to Protein Purification*. Academic Press. San Diego. **27**:339-343.

Krell, H. W. 1991. Peroxidase: an important enzyme for diagnostic test kits. En: Lobarzewsky, J., Greppin, H., Penel, C., Gaspar T. (Eds). *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University M. Curie and University of Geneva. pp. 469-478.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **5259**:680-685.

Lagrimini, L.M. y Rothstein, S. 1987. Tissue-specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*. **84**:438.

Lagrimini, M.; Burkhardt, W.; Moyer, M. y Rothstein, S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco. Molecular analysis and tissue specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **84**:7542-7546.

Lang, S.; Hilgenfeldt, U. y Mäder, M. 1990 Purification and immunological characterization of peroxidase-isoenzymes from *Nicotiana tabacum*. *L. J. Plant Physiol*. **136**:494-498.

Lehninger, A. 1993 *Bioquímica*. Omega. España. **3**:59-72.

Madigan, M. T.; Parker, J. y Martin, J. M. 1998. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall. Madrid. **20**:813-864.

Mazza, G. y Welinder, K. G. 1980. Covalente structure of turnip peroxidase 7: cyanogen bromide fragments complete structure an comparation to HRC. *Eur. J. Biochem*. **108**:481-489.

Morilla, A. y Bautista, C., 1986. Manual de inmunología. Diana Técnico. México. 11:128-145.

Myrvik, Q. y Weiser, R. 1984. Fundamentals of immunology. Lea and Febiger. Philadelphia. Cap. 5:52-71.

Ortega-Tovar, M. 2001. Eliminación de compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. var. purple top white globe). Tesis de Licenciatura de Químico en Alimentos. UAQ.

Pérez-Arvizu, O. 1999. Extracción de peroxidasa de col de Bruselas (*Brassica oleraceae* L. var. Itálica) usando micelas inversas y estudios sobre su purificación y caracterización parcial. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. PROPAC. UAQ.

Prado-Barragán, L. A. 1999 Precipitación. En: S. Huerta, L. Prado, G. Rodriguez, G. Saucedo. (Eds). Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. UAM-Iztapalapa. México. 4:89-100.

Prince N.C. y Stevens. 1989. Fundamentals of enzymology University Press. New York. 3:25-42.

Regalado, C.; Pérez-Arvizu, O.; García-Almendárez, B. E. y Whitaker, J. R. 1999. Purification and properties of two acidic peroxidases from Brussels sprouts (*Brassica oleraceae* L). *J. Food Biochem.* 23:435-450.

Robinson, D. 1991. Oxidative Enzymes in Foods. Manual Applied Science. London. 1:3-7.

Roche Molecular Biochemicals. 2000. Manual de usuario de Chemiluminiscense kit.

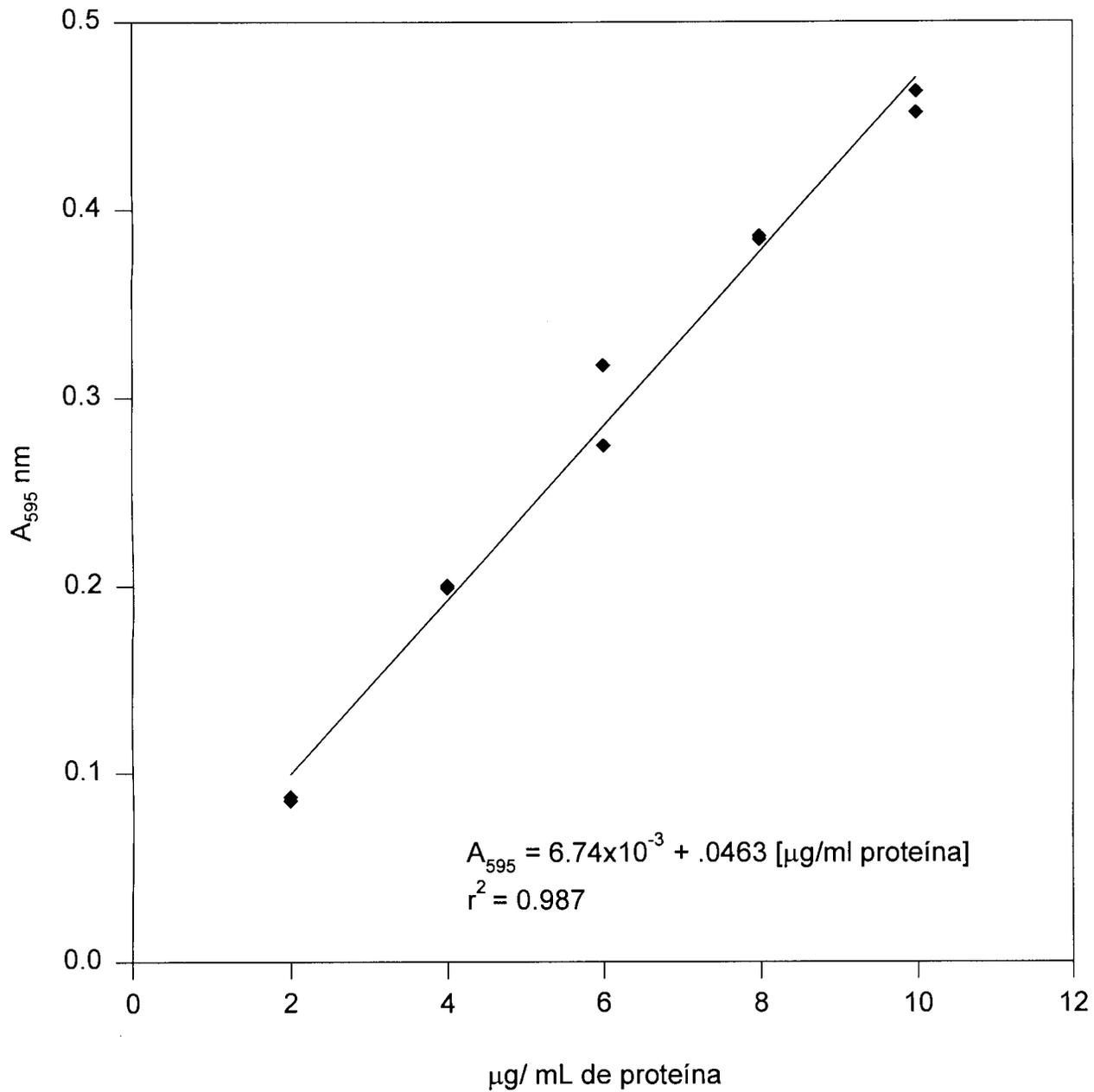
- Rodrigo, C.; Rodrigo, M.; Alvarruiz, A. y Frigola, A. 1996. Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase. *J. Food Protect.* **59**:1065-1071.
- Rodríguez-Serrano, G. 1999. Características generales de las enzimas. En: S. Huerta, L. Prado, G. Rodriguez, G. Saucedo. (Eds). *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología*. UAM-Iztapalapa. México. **1**:15-22.
- Rodríguez-Serrano, G. 1999. La tecnología de membranas. En: S. Huerta, L. Prado, G. Rodriguez, G. Saucedo. (Eds.). *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología*. UAM. México. **4**:101-110.
- Roit, I.; Brostoff, J. y Male, D. 1993. *Immunology*. Mosloy. St. Louis. 2.5-2.7
- Schmitz, N.; Gijzen, M. y van Huystee, R. 1997. Characterization of anionic soybean (*Glycine max*) seed coat peroxidase. *Can. J. Bot.* **75**:1336-1341
- Shannon, L. M.; Kay, E. y Lew J. Y. 1966. Peroxidase isozyme from horseradish roots. *J. Biol. Chem.* **241**:2166-2171.
- Stites, D.; Terr A. y Parslow, T. 1996. *Inmunologia Basica y Clínica*. Manual Moderno. México. **3**:51-63.
- Stoscheck, C.M. 1990. Quantitation of protein. En: Deutscher, M.P. (Ed). *Guide to Protein Purification*. Academic Press. San Diego. pp. 57-59.
- Tigier, H. A.; Quesada, A.; Heredia, A. y Valpuesta, V. 1991. Partial desglycosylation of an anionic isoperoxidase from peach seeds-effect on enzyme activity, stability an antigenicity. *Physiol. Plant.* **83**:144-148.

- Timmons, M. T. y Dunbar, B. S. 1990. Protein Blotting and Immunodetection. En: Deutscher, M. (Eds). Guide to Protein Purification. Academic Press. San Diego. **51**: 679-689.
- Vamos-Vigazo, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**:49-127.
- Voet, D. y Voet, J.G. 1992. Biochemistry. John Wiley. Nueva York. **2**:71-105.
- Wan, L. y van Huystee, R. 1994 Immunogenicity of *N*-glycans of peanut peroxidase. *Phytochemistry.* **37**:933-934.
- Welinder, K. G. 1979. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **96**:483-502.
- Welinder, K.G. 1985. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **151**:497-504.
- Welinder, K.G. 1991. Molecular Biology and Biosynthesis. En: Lobarzewsky, J., Greppin, H., Penel, C., Gaspar T. (Eds.) Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University M. Curie and University of Geneva. pp. 3-13.
- Welinder, K.G. 1992. Superfamily of plants, fungal an bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**:388-393.
- Whitaker, J. R., 1994. Principles of Enzymology for the Food Science. Marcel Deker. New York. **3**:107-109.
- Williams, A. 1995. Overview on conventional chromatography. En: Current Protocols in Protein Science. John Wiley and Sons. pp. 8.1-8.10.

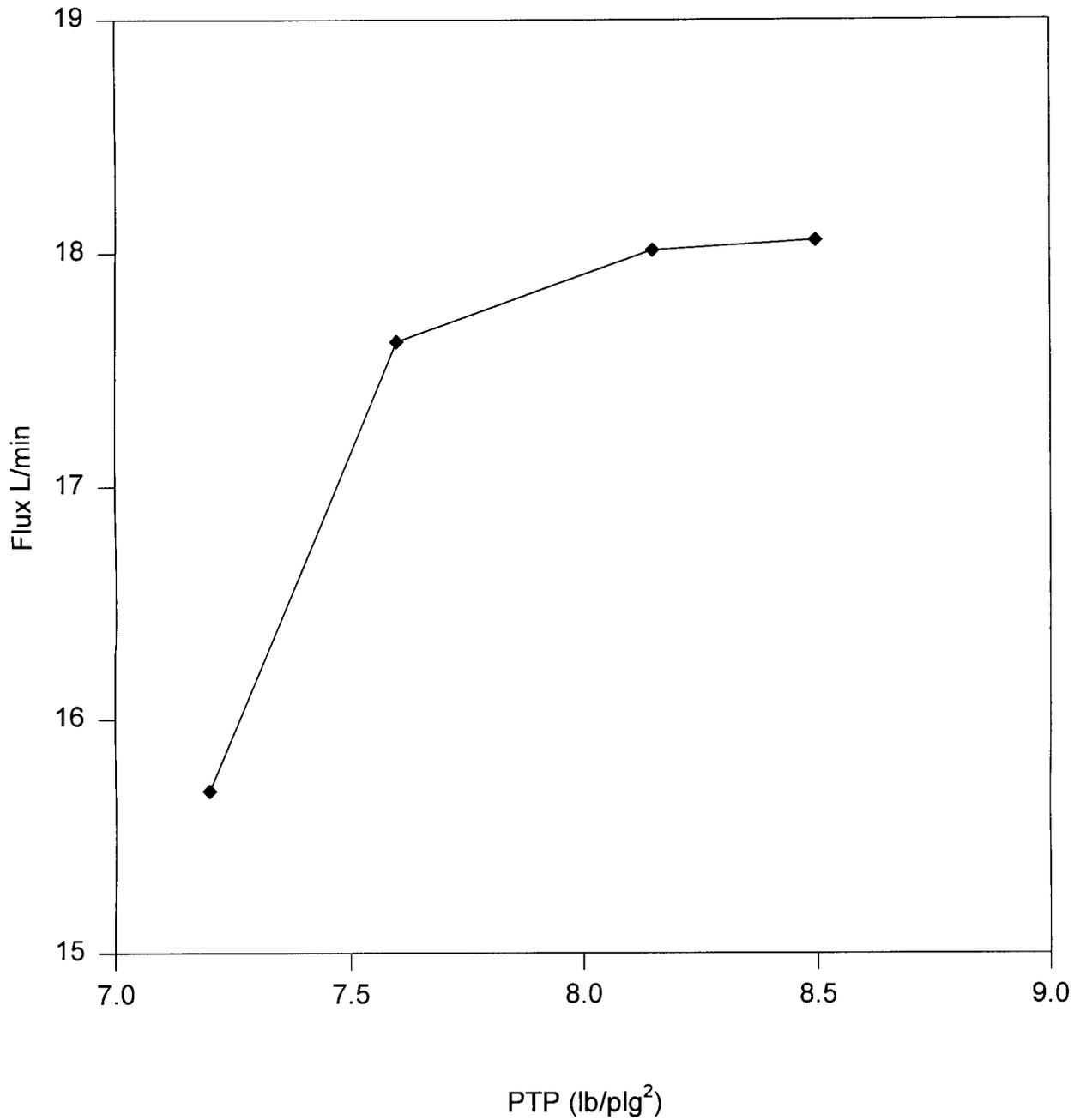
Wiseman, A. 1991. Manual de Biotecnología de los Enzimas. Acribia. España. 2:23-37.

Yasuda, Y.; Takahashi, N. y Murachi, T. 1971. Periodate oxidation of carbohydrate moiety of stem bromelain without much alteration in activity. *Biochem J.* 10:2624-2630.

Apéndice



Apéndice 1. Curva de calibración para la determinación de proteína por el método de Bradford. Seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.



Apéndice 2. Curva de calibración para obtener la presión transmembrana promedio (PTP) en la utilización de la unidad de ultrafiltración.

Apéndice 3. Cálculos para obtener la constante de afinidad de AbP1 y AbP2.

Las reacciones antígeno (Ag):anticuerpo (Ab) son reversibles, y pueden ser descritas conforme a la ley de acción de masas bajo condiciones de equilibrio como sigue:



rearrreglando,

$$K_a = k_a / k_d = [\text{Ag:Ab}]/[\text{Ag}]\cdot[\text{Ab}] \quad (2)$$

Donde k_a y k_d son respectivamente la constante de asociación y disociación del complejo unido, $[\text{Ab}]$ es la concentración de el anticuerpo no unido o libre, $[\text{Ag}]$ es la concentración del antígeno no unido y $[\text{Ag:Ab}]$ lo es del complejo antígeno:anticuerpo.

Considerando que el anticuerpo es homogéneo y solo tiene un sitio de unión que solo reconoce un epítipo del antígeno con la misma afinidad:

De la ecuación 2, si Ab_T representa la concentración total del anticuerpo en el sistema, entonces la concentración de anticuerpo libre es:

$$\text{Ab} = \text{Ab}_T - [\text{Ag:Ab}] \quad (3)$$

Si se usa B y F para denotar el complejo unido $[\text{Ag:Ab}]$ y el antígeno libre $[\text{Ag}]$, respectivamente, de la ecuación 2 se tiene:

$$K_a = B/(\text{Ab}_T - B) * F \quad (4)$$

rearrreglando,

$$B/F = K_a \cdot (Ab_T - B) \quad (5)$$

o

$$B/F = K_a \cdot Ab_T - K_a \cdot B \quad (6)$$

La ecuación 6 indica una relación lineal entre la relación de antígeno unido/libre y la coconcentración de el antígeno unido. La representación gráfica de esto es conocida como la gráfica de Scatchard.

Lo anterior solo es posible para anticuerpos monoclonales, ahora para policlonales: K_a puede obtenerse por dos medios. El primero aproximando K_a a la saturación media de los sitios de unión del anticuerpo, por lo tanto de la ecuación 2 y cuando se encuentran los sitios de unión del anticuerpo a saturación media:

$$K_a = 1/[Ag] \quad (7)$$

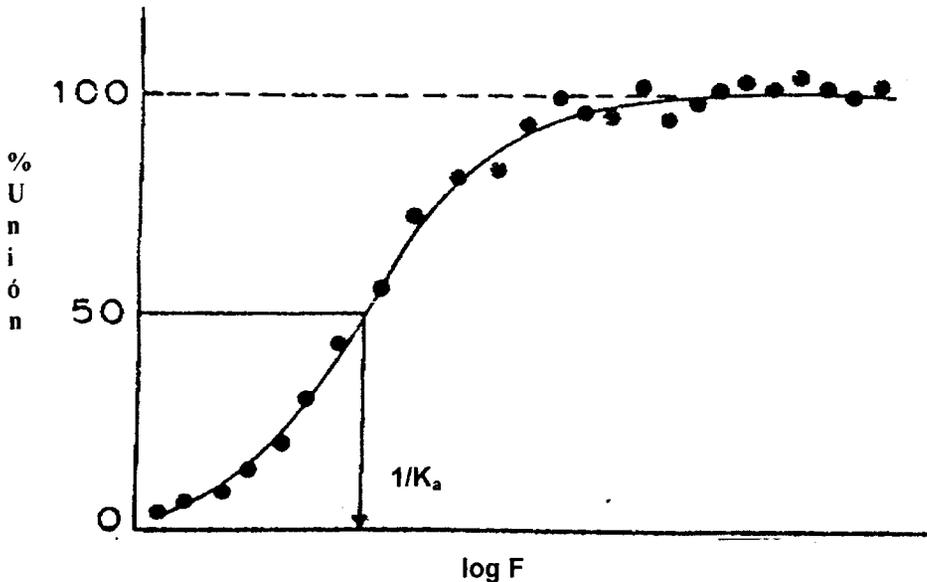


Figura A3. Representación gráfica del porcentaje de formación del complejo Ag:Ab contra la concentración de Ag libre

Del gráfico de B contra log F, una línea recta puede ser dibujada en la media máxima de unión (Figura A3). El punto del eje x donde corresponda a la intersección con la curva proveerá de una estimación de $1/K_a$.

Como puede observarse en la figura A3, la curva corresponde a una ELISA competitiva ya que a mayor cantidad de antígeno libre existe el 100% de formación de complejo Ag:Ab; no así para nuestro caso en donde la ELISA utilizada fue indirecta o sándwich en donde a menor antígeno libre mayor es la formación del complejo Ag:Ab.

En el siguiente cuadro se colocan las intercepciones que se obtuvieron en el eje de las abscisas para los gráficos de reacciones directas y cruzadas para determinar la constante de afinidad.

Reacción	Concentración de antígeno libre (ng/ μ L)	Constante de afinidad (= K_a) $\times 10^{-6}$ (M^{-1})
P1:AbP1	0.38	102.6
P2:AbP2	0.52	69.2
P2:AbP1	8.2	47.5
P1:AbP2	1.26	30.9

El inverso del cociente del antígeno libre entre el peso molecular de las isoperoxidasas, 39 kDa para P1 y 36 kDa para P2, es igual a la constante de afinidad (K_a).