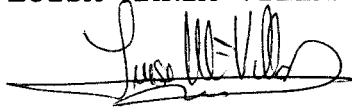


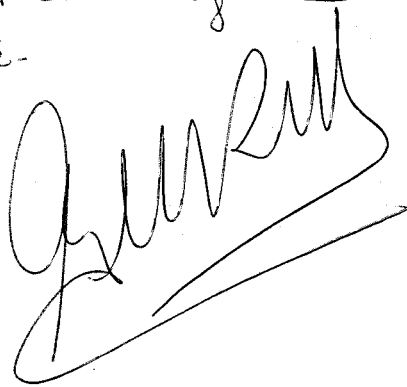
MEMORIA QUE PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA  
EN FARMACIA PRESENTA:

LUISA MARIA VILLAR GUIMERANS.



v.º B.º director - 

v.º B.º ponente -



FACULTAD DE FARMACIA.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

MADRID, SEPTIEMBRE DE 1984.

PURIFICACION DE  $\beta_2$ -MICROGLOBULINA Y

PUESTA A PUNTO DE METODOS PARA SU

DETECCION POR ENZIMOINMUNOENSAYO.

El presente trabajo ha sido realizado en el Ser-  
vicio de Inmunología del Centro Ramón y Cajal de Madrid,

Quiero hacer constar mi agradecimiento a las si-  
guientes personas:

Al Dr. D. Alfredo Bootello Gil, Jefe del Servi-  
cio de Inmunología, que continuamente ha apoyado mi traba-  
jo.

Al Dr. D. Pedro González Porqué, Director de es-  
ta tesina, cuyo conocimiento, interés y estímulo, han he-  
cho posible su realización.

A todos mis compañeros de Servicio, y en espe--  
cial, al laboratorio de Inmunoquímica, que de una forma u  
otra, me han prestado su valiosa ayuda.

Deseo agradecer al Catedrático Dr. D. Angel M.  
Relimpio Relimpio su amabilidad al aceptar ser ponente de  
esta tesina.

## ABREVIATURAS Y DEFINICIONES.

HLA.-Antígenos de histocompatibilidad humanos de clase

I, HLA-A, HLA-B y HLA-C.

$\beta_2$ m.- $\beta_2$ microglobulina, cadena pesada de los antígenos

HLA-A, HLA-B y HLA-C.

Cadena  $\alpha$ .-Subunidad pesada de los antígenos de histocompatibilidad

HLA-A, HLA-B y HLA-C.

L.C.R.-Líquido cefalorraquídeo.

ELISA.-Enzimoimmunoensayo.

M<sub>HLA</sub>.-Anticuerpo monoclonal de ratón, de la clase IgG<sub>2a</sub>

que reconoce antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C.

CoAH/ $\beta_2$ m.-Anticuerpo policlonal de conejo, de la clase

IgG, anti- $\beta_2$ m humana.

CaACo-PO.-Anticuerpo policlonal de cabra, de la clase

IgG, anti-IgG de conejo y marcado con peroxidasa.

dasa.

OPD.-Orto-fenilen diamina.

PBS-Tween.-Tampón fosfato 0.01 M pH 7.2 , ClNa 0.15 M

con Tween 20 a 1:1.000

SDS-PAGE.-Geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

SDS.-Dodecil sulfato sódico.

Unidad de Absorbancia(D.O.280 nm).-Cantidad de proteína

que en solución posee una absorbancia de

1.

Actividad específica de  $\beta_2$ m.-Resultado del cociente en

tre: mg de  $\beta_2$ m(cuantificados por ELISA)

Proteína total(mg o unidades de D.O.)

## INDICE,

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Purificación.....	2
1.3. Métodos de detección.....	5
1.3.1. Métodos de detección de $\beta_2^m$ en las membranas celulares.....	5
1.3.2. Métodos de detección de $\beta_2^m$ en fluidos biológicos.....	6
1.4. Características estructurales.....	8
1.5. Función.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Puesta a punto de un método de detección de $\beta_2^m$ .....	12
2.2. Obtención de un antisuero específico de conejo anti $\beta_2^m$ humana.....	12
2.3. Puesta a punto de métodos para la detección y cuantificación de $\beta_2^m$ por enzimoimmunoensayo.	13
3. MATERIALES Y METODOS.....	14
3.1. Materiales.....	14
3.1.1. Materiales usados en la purificación de $\beta_2^m$ .....	14
3.1.2. Materiales usados en la obtención de CoAH/ $\beta_2^m$ .....	14

3,1,3, Materiales utilizados en la detección de $\beta_2m$ .....	15
3,2, Métodos.....	16
3,2,1, Enzimoimmunoensayo.....	16
3,2,2, Cromatografía sobre DEAE-celulosa.....	19
3,2,3, Filtración sobre gel.....	21
3,2,4, Cromatografía de afinidad.....	21
3,2,5, Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	22
3,2,6, Determinación de proteínas.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Purificación de $\beta_2m$ .....	26
4.1.1, Esquema de purificación.....	26
4.1.2, Ultrafiltración XM50.....	27
4.1.3, Ultrafiltración UM2.....	27
4.1.4, Filtración sobre Sephadex G-50.....	27
4.1.5, Cromatografía sobre DEAE-celulosa.....	28
4.1.6, Concentración.....	29
4.1.7, Análisis por electroforesis sobre geles de poliacrilamida.....	30
4.1.8, Tabla de rendimientos.....	32
4.2. Obtención de antisuero de conejo anti $\beta_2m$ humana.....	33
4.2,1, Pauta de inmunización.....	33
4.2,2, Titulación de sangrados.....	33
4.2,3, Aislamiento de la fracción G del suero de conejo inmunizado.....	34

4.2.4.	Titulación del anticuerpo purificado,...	35
4.3.	Detección de $\beta_2^m$ por enzimoimmunoensayo,....	37
4.3.1.	Esquema de los métodos utilizados,....	37
4.3.1.1.	"ELISA" representado en la figura 4.5,.....	38
4.3.1.2.	"ELISA" descrito en la figura 4.6,...	39
4.3.2.	Purificación de HLA para su utilización en estos enzimoimmunoensayos,.....	40
4.3.3.	Curvas de calibrado de los ensayos,....	42
4.3.3.1.	Curva de calibrado de $M_{HLA}$ ,.....	42
4.3.3.2.	Curvas de calibrado para HLA,.....	44
4.3.3.2.1.	Curva de calibrado de HLA para el "ELISA" descrito en 4.3.1.1,....	44
4.3.3.2.2.	Curva de calibrado de HLA para el "ELISA" descrito en 4.3.1.2.	
4.3.3.3.	Curva de calibrado del CoAH/ $\beta_2^m$ ,.....	48
4.3.3.4.	Curva de calibrado del CaCo-PO,.....	50
4.3.3.5.	Curva de proporcionalidad de la reacción con respecto al tiempo,.....	52
4.3.4.	Condiciones de estandarización de los ensayos,.....	54
4.3.4.1.	Condiciones de estandarización del "ELISA" descrito en 4.3.1.1,.....	54
4.3.4.1.	Condiciones de estandarización del "ELISA" descrito en 4.3.1.2,.....	54
4.3.5.	Cuantificación de $\beta_2^m$ ,.....	55
4.3.5.1.	Cuantificación mediante el "ELISA" descrito en 4.3.1.1,.....	55

4,3,5,2,Cuantificación mediante el "ELISA" descrito en 4,3,1,2,.....	57
4.3.6,Aplicaciones de estos enzimoinmunoensayos,.....	58
4.3.6,1.Seguimiento de $\beta_2m$ en su purificación,.....	58
4.3.6,2,Cuantificación de $\beta_2m$ en distintos fluidos biológicos,.....	58
4.3.6,2,1.Cuantificación de $\beta_2m$ en orina,....	58
4.3.6,2,2.Cuantificación de $\beta_2m$ en L.C.R. de pacientes con enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias,.....	59
5. DISCUSION,.....	61
5.1.Purificación de $\beta_2m$ ,.....	61
5.2.Obtención de antisuero de conejo anti $\beta_2m$ ,....	63
5.3.Enziminmunoensayos para la detección de $\beta_2m$ ,.64	
6. CONCLUSIONES,.....	72
BIBLIOGRAFIA,.....	75



## 1. INTRODUCCION.

### 1.1. Generalidades.

La  $\beta_2^m$  es una proteina de unos 11,600 daltons de peso molecular. Está constituida por una sola cadena polipeptídica con cien residuos de aminoácidos(1).

Dicha proteina se encuentra presente en la mayoría de las células de mamíferos(2) excepto en eritrocitos maduros y en las células de linfoma de la línea celular Daudi(3).

La  $\beta_2^m$  puede ser detectada tanto en la superficie celular(4,5), como en distintos fluidos biológicos tales como suero, orina, L.C.R., saliva y calostro (1,6).

Esta proteina se ha convertido en sujeto de interés para diversos autores debido a que por un lado está estructuralmente relacionada con los dominios constantes de las inmunoglobulinas(7,8) y por otro se ha demostrado su identidad con la subunidad ligera de los antígenos de histocompatibilidad de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C en humanos(9,10,11,12).

También resulta interesante el que los niveles séricos de  $\beta_2^m$  estén aumentados en ciertas enfermedades. Por ejemplo, altos niveles séricos de  $\beta_2^m$  son un indicador sensible de fallo renal(13,14). La  $\beta_2^m$  también está aumentada en el suero de pacientes con enfermedades neoplásicas y autoinmunes(15). Así mismo se detecta un aumento de la excreción de  $\beta_2^m$  en la orina de pacien

tes con deficiencias renales tubulares y en la de los que se encuentran en el postoperatorio de un transplante renal (16).

Para conseguir mas información sobre la función y evolución de la  $\beta_2m$  se hizo necesario trabajar con sistemas animales. Así se han aislado homólogos de  $\beta_2m$  en perros (17), conejos (18), ratones (19), cerdos de Guinea (20), vacas (21), pollos (22) y ratas (23), demostrándose que los antígenos mayores de histocompatibilidad de algunas de estas especies está asociados con la  $\beta_2m$ . En el ratón la  $\beta_2m$  no sólo está asociada con los antígenos mayores de histocompatibilidad, sino con los estructural y genéticamente relacionados TLA (24) y Qa-2-A (25) y con el antígeno H-Y (26).

### 1.2. Purificación.

Para el aislamiento de  $\beta_2m$  pueden usarse como material de partida distintos fluidos biológicos tales como orina, suero, calostro, fluido seminal y otros. Por ser la orina el mas asequible de todos ellos, ha sido el mas generalmente usado.

La primera purificación de  $\beta_2m$  fue realizada por Berggard y Bearn a partir de orina de pacientes con daño renal tubular (enfermedad de Wilson y envenenamiento crónico por cadmio) (1). El seguimiento de  $\beta_2m$  en las distintas etapas de purificación se realizó mediante la técnica de Ouchterlony, usando un antisuero policlonal de conejo anti  $\beta_2m$ . El rendimiento de la pu-

rificación fue del 11-13%.

El esquema de esta purificación es el siguiente:

I-Concentración de la fracción proteica de la orina mediante ultrafiltración.

II-Diálisis.

III-Electroforesis de zona realizada con tampón barbital, pH 8.6.

IV-Elución de los picos que contienen  $\beta_2m$ , concentración mediante ultrafiltración y diálisis.

V-Electroforesis de zona realizada con tampón borato pH 8,9.

VI-Elución de los picos que contienen  $\beta_2m$  y concentración mediante ultrafiltración.

VII-Filtración sobre gel en una columna de Sephadex G-100 equilibrada con Tris-ClH 0.1 M, pH 8.0, 1M ClNa.

VIII-Diálisis.

IX-Cromatografía de intercambio iónico a través de una columna de DEAE-celulosa equilibrada con Tris-ClH 0.01M pH 7.85 que se eluye mediante gradiente 0-0.2M ClNa en el mismo tampón.

X-Cromatografía de intercambio iónico a través de una columna de sulfoetil-Sephadex equilibrada con tampón fosfato sódico 0.04M pH 5.9. La elución se realiza mediante gradiente 0.04-0.2M de fosfato sódico al mismo pH.

XI-Diálisis, liofilización.

El material liofilizado constituye la  $\beta_2m$  purificada.

Tras esta primera purificación de  $\beta_2m$  varios autores han ido desarrollando otros métodos. Seguidamente exponemos aquí un método de purificación puesto a punto recientemente por M.D.Poulik.

El material de partida utilizado en esta purificación está constituido por orina de pacientes que se encuentran en el postoperatorio de un trasplante renal.

La purificación fue realizada siguiendo el siguiente esquema;

a-Diálisis y posterior liofilización de la orina.

Los sólidos urinarios se redisuelven en tampón fosfato 0.1M pH 7.3-7.4 , 0.1M ClNa.

b-Filtración sobre gel realizada a través de una columna de Biogel P-100 equilibrada con el mismo tampón.

c-Diálisis de las fracciones que contienen  $\beta_2m$ , liofilización y redisolución en tampón Tris-ClH 0.01M pH 7.8.

d-Cromatografía de intercambio iónico sobre columna de DEAE-celulosa equilibrada con el mismo tampón. La columna se eluye mediante gradiente lineal entre 0 y 0.2M ClNa disuelto en Tris-ClH 0.01M pH 7.8.

e-Isoelectroenfoque en una columna LKB con un gradiente de pH 3-8 y un gradiente de sacarosa 0-50%. La  $\beta_2m$  se eluye a pH 5.4-5.6, dándose así por

terminada la purificación.

Seguidamente citaremos los materiales de partida que han ido usando otros autores en sus purificaciones, para las cuales han seguido uno u otro de los métodos descritos con algunas modificaciones:

Bernier y Conrad (1969) usaron orina de pacientes con enfermedad de Wilson, anemia refractaria y glomerulonefritis crónica; Smithies y Poulik (1972) usaron orina de pacientes con leucemia monocítica y mieloma; Hall et al. (1972) usaron orina de pacientes con nefropatía de los Balcanes; Poulik et al. y Nakamuro et al.; ambos en 1973, la aislaron de sobrenadantes de cultivos viejos de linfocitos y Poulik en 1980 la aisló del fluido seminal de donantes sanos.

### 1.3. Métodos de detección.

#### 1.3.1. Métodos de detección de $\beta_2^m$ en las membranas celulares.

Para la detección de  $\beta_2^m$  en las membranas celulares, Poulik puso a punto una técnica de inmunofluorescencia indirecta de doble anticuerpo (5), observándose una intensa fluorescencia que puede ser totalmente abolida absorbiendo el antisuero específico anti- $\beta_2^m$  con  $\beta_2^m$  cromatográficamente pura.

Evrin et al. pusieron a punto un método para cuantificarla mediante radioinmunoensayo, tratando previamente las células por varios procedimientos (sonica

ción, urea, etc.) (27),

Otro método de detección de  $\beta_2^m$  fue puesto a punto por Grey et al. (28). Consiste en marcar las proteínas de la superficie celular con  $I^{125}$  tratando seguidamente las células con detergentes. Los lisados se precipitan con un antisuero específico de conejo anti- $\beta_2^m$  humana, potenciándose la precipitación mediante coprecipitación con anti-IgG de conejo. Los precipitados se reducen y alquilan y se someten a electroforesis sobre geles de poliacrilamida en presencia de SDS, investigándose la presencia de radiactividad en los geles.

### 1.3.2. Métodos de detección de $\beta_2^m$ en fluidos biológicos.

La cantidad de  $\beta_2^m$  presente en distintos fluidos biológicos fue medida por primera vez por Berggard y Bearn mediante técnicas de inmunodifusión radial (1), usando un antisuero policlonal de conejo anti- $\beta_2^m$ . La sensibilidad de este método es adecuada para medir la concentración de  $\beta_2^m$  en fluidos en que ésta es elevada, por ejemplo en semen, calostro y suero de pacientes con trastornos linfoproliferativos, pero deja que desear en los casos en que la concentración de  $\beta_2^m$  es menor, por ejemplo en suero y orina de sujetos normales y en líquidos cefalorraquídeos.

Posteriormente Evrin et al. pusieron a punto un método de mayor sensibilidad, útil para detectar

y cuantificar  $\beta_2^m$  en distintos fluidos normales y patológicos (29). Este método ha sido comercializado por Pharmacia con el nombre de "Phadebas  $\beta_2$ -micro Test" y es el que mas se ha venido utilizando hasta ahora. Se trata de un radioinmunoensayo competitivo. A continuación pasamos a describirlo

La  $\beta_2^m$  de las muestras a ensayar compete con una cantidad fija de  $\beta_2^m$  marcada con  $I^{125}$ , por los sitios de unión a anticuerpos anti  $\beta_2^m$  unidos a partículas de sephadex. La  $I^{125}$ - $\beta_2^m$  unida a las partículas de sephadex se mide en un contador  $\delta$ , siendo la radiactividad resultante inversamente proporcional a la cantidad de  $\beta_2^m$  fría de la muestra.

La concentración de  $\beta_2^m$  presente en la muestra se calcula interpolando los resultados obtenidos con nuestra muestra en una recta de calibrado obtenida con patrones de concentraciones conocidas de  $\beta_2^m$ .

La sensibilidad de este método para detectar  $\beta_2^m$  es de 0.0003  $\mu\text{g/ml}$ .

Usando este método se ha descrito que los valores normales de  $\beta_2^m$  en distintos fluidos biológicos son los siguientes:

- Suero.....1.5mg/l
- orina.....0.973mg/24h.
- Calostro.....19mg/l
- L.C.R.....1.3mg/l

Con el mismo fundamento, Pharmacia ha puesto a punto un enzimoimmunoensayo competitivo en el que la

$\beta_2m$  de la muestra compete con  $\beta_2m$  marcada con fosfata-sa alcalina.

#### 1.4. Características estructurales.

La  $\beta_2m$  es una proteína de unos 11,600 dal-  
tons de peso molecular(1) que está codificada por el  
cromosoma 15 en humanos(30). Su molécula no contiene car-  
bohidratos y está constituida por una sola cadena poli-  
peptídica formada por 100 aminoácidos(31). Ha sido se-  
cuenciada en humanos (32), así como en algunas especies  
de mamíferos(33,34) observándose alta homología entre e-  
llas. Así mismo esta proteína presenta notable homolo-  
gía con las frcciones constantes de las cadenas lige-  
ras y pesadas de las inmunoglobulinas(7), habiéndose  
postulado que dicha homología pudiera deberse a la pro-  
cedencia de los genes que codifican a ambas cadenas de  
un gen ancestral común que en estadios primarios de la  
evolución pudo haber sufrido una duplicación y poste-  
rior diferenciación.

Mediante estudios de dicroísmo circular se  
ha estudiado la estructura secundaria de esta proteína  
resultando que presenta un 90% de estructura en hoja  
plegada .

La estructura terciaria de esta proteína es  
globular formándose un puente disulfuro entre los res-  
tos de cisteína situados en las posiciones 25 y 81 de  
la cadena, que se encuentran contiguos en el espacio.

Así mismo la  $\beta_2m$  constituye la subunidad



ligera de los antígenos de histocompatibilidad de clase I también llamados HLA-A, B y C (9, 10, 11, 12). Dichos antígenos están constituidos por dos subunidades unidas no covalentemente, la cadena  $\alpha$ , con un peso molecular de 44.000 daltons y la  $\beta_2m$ .

En cuanto a la cadena  $\alpha$ , está codificada por el complejo mayor de histocompatibilidad, región genética situada en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos (35). Es una glicoproteína donde residen las diferencias en las secuencias de aminoácidos, que se supone dan lugar, a las distintas especificidades de HLA serológicamente definidas (36). Dichas diferencias se localizan en regiones determinadas, presentando la mayor parte de la molécula, un alto grado de homología entre los distintos HLA secuenciados (37).

Esta proteína se inserta en la membrana plasmática, orientando hacia el exterior las 3/4 partes de su molécula. La región extracelular consta de unos 270 aminoácidos y, de la misma manera que ocurre con las inmunoglobulinas, está tridimensionalmente organizada en dominios que vienen definidos por cisteínas que están contiguas en el espacio formando puentes disulfuro (38). Se ha encontrado homología entre el dominio carboxiterminal y los dominios constantes de las inmunoglobulinas.

La unión entre la cadena  $\alpha$  y la  $\beta_2m$  se produce entre esta región carboxiloterminal y una zona de la  $\beta_2m$  situada cerca del centro de la molécula, residuos

61-71, rica en residuos aromáticos(39),

En la actualidad se tienen muy pocos datos sobre como se produce la asociación entre las subunidades, sin embargo una cosa es clara, y es que en ausencia de  $\beta_2m$ , la especificidad antigénica de HLA y la expresión de estos antígenos en la superficie celular, se ven drásticamente modificadas. Gran parte de esta información ha sido proporcionada por los estudios realizados en células DAUDI. La línea celular DAUDI ha sido establecida a partir de un linfoma de Burkitt, sus células no expresan en su membrana antígenos HLA-A, B y C y se ha demostrado que son incapaces de sintetizar  $\beta_2m$ . Sin embargo, si se realizan híbridos de estas células con otras células, humanas o de ratón, capaces de producir  $\beta_2m$ , tiene lugar la expresión de antígenos HLA en su superficie(40), lo que indica que para que la expresión de HLA se produzca, ha de producirse anteriormente la asociación con  $\beta_2m$ (41).

#### 1.5. Función.

La misión biológica de estas moléculas continúa siendo una incógnita a pesar de los estudios que se vienen realizando para dilucidarla(42,43,44,45), lo único que se conoce con certeza es que su presencia es necesaria para la expresión de antígenos HLA-A, B y C en la superficie celular tal y como se describe en el apartado anterior.

En cuanto a su significación clínica, se han

potenciado últimamente los estudios sobre esta proteína, dado que se ha observado que su concentración en distintos fluidos biológicos está aumentada sobre los valores normales en algunas enfermedades. Seguidamente citaremos algunos de estos casos.

La excreción de  $\beta_2^m$  urinaria está aumentada en casos de nefropatía tubular y se ha propuesto la medida de este aumento como marcador de daño renal en cirrosis hepática(46), litiasis renal(47), envenenamiento por metales(1,48,49), enfermos que están siendo tratados con litio(50) y enfermos que están siendo tratados con gentamicina(51).

En cuanto a los niveles en suero se ha observado que están aumentados en pacientes con rechazo a un transplante renal, siendo el aumento mucho mayor en casos de rechazo agudo(51). También se ha observado una  $\beta_2$ -microglobulinemia aumentada, en varios desordenes de naturaleza benigna, inflamatoria y degenerativa, pero donde se han visto aumentos espectaculares es en algunas enfermedades malignas, principalmente en las de naturaleza linfoproliferativa. En particular, se han detectado aumentos significativos en mieloma múltiple y leucemia monocítica. La enfermedad de Hodgkin constituye una notable excepción puesto que en los casos estudiados de la misma los niveles de  $\beta_2^m$  sérica siempre estuvieron dentro de los valores normales(52).

## 2. OBJETIVOS.

Los objetivos principales que se han perseguido en este trabajo son tres:

- 1.-Puesta a punto de un método de purificación de  $\beta_2^m$ .
- 2.-Obtención de un antisuero específico de conejo anti $\beta_2^m$  humana de alto título.
- 4.-Puesta a punto de un ensayo inmunoenzimático para la detección y cuantificación de  $\beta_2^m$ .

2.1. Puesta a punto de un método de purificación de  $\beta_2^m$ .

Debido a la laboriosidad y larga duración de los métodos descritos hasta ahora, hemos intentado poner a punto un nuevo método de purificación de  $\beta_2^m$ , basándonos en los ya descritos.

Se eligió la orina como material de partida por ser entre los fluidos biológicos que contienen  $\beta_2^m$  el más asequible para nosotros en cantidades relativamente elevadas.

Se realizó un muestreo entre distintas orinas en las que estaba descrito un aumento de  $\beta_2^m$ , eligiéndose la de un paciente que había sufrido recientemente un trasplante renal.

2.2. Obtención de un antisuero específico de conejo anti $\beta_2^m$  humana.

Con la  $\beta_2m$  obtenida en la purificación, se intentó inmunizar a un conejo con el fin de obtener un antisuero policlonal anti $\beta_2m$  humana de alto título que nos permitiera poner a punto un enzimoimmunoensayo para la detección y cuantificación de  $\beta_2m$ .

### 2.3. Puesta a punto de métodos para la detección y cuantificación de $\beta_2m$ por enzimoimmunoensayo.

Debido al alto coste de los métodos comerciales usados hasta ahora y a lo engorroso del uso la radiactividad, requerido en la mayoría de ellos, se han puesto a punto dos métodos de enzimoimmunoensayo para detectar  $\beta_2m$  en distintos fluidos. Ambos tienen una sensibilidad comparable a la del radioimmunoensayo descrito por Evrin et al.

Son métodos de enzimoimmunoensayo indirecto competitivo.

### 3. MATERIALES Y METODOS.

#### 3.1. Materiales.

##### 3.1.1. Materiales usados en la purificación de $\beta_2m$ .

Acido acético (Carlo Erba).-Acrilamida (L.K.B.).-Agitador magnético (Agimatic).-Azul de bromofenol (Kallestad).-Azul de Coomasie (Bio-Rad).-Colector de fracciones (L.K.B.).-Columnas de cromatografía (Pharmacia).-DE-52 (Whatman).-Cámara de ultrafiltración (Amicon).-Dodecil sulfato sódico (Bio-Rad).-Espectrofotómetro PMQ 3 (Zeiss).-Fuente de tensión (Buchler Instruments).-Glicerina Carlo Erba).-Glicina (Sigma).-Liofilizador (Virtil).-Membranas de ultrafiltración Diaflo XM50 (Amicon).-Membranas de ultrafiltración Diaflo UM2 (Amicon).-Membranas de diálisis (Visking).-N,N'metilen bisacrilamida (Bio-RAD).-Orina de donante humano.-Patrones de peso molecular (Sigma).-PHmetro (C.R.M.).-Persulfato amónico (Bio-Rad).-Sephadex G-50 (Pharmacia).-Tampones: Tris-ClH pH 7.6, Trizma base 10 mM (Merck)-Acido clorhídrico (Merck).-Tris-ClH 10 mM pH 7.6, ClNa 0.2 M (Merck).-Tris-Glicina-SDS pH 7.5, Trizma base 10 mM-Glicina 0.33 M-SDS 3 mM.-Temed (Bio-Rad).

##### 3.1.2. Materiales utilizados en la obtención de

CoAH/ $\beta_2m$ .

Antisuero anti $\beta_2m$  (Nordic).-Adyuvante completo

de Freund (Difco),  $\beta_2m$  (Apartado 4,1), Centrifuga RC-3 (Sorvall), Conejos, DEAE-Affigel azul (Bio-Rad), Etanol (Carlo Erba), Tampón fosfato 10 mM pH 7,0, fosfato potásico-dipotásico 10 mM (Merck), Xilol (Carlo Erba).

### 3.1.3. Materiales utilizados en la detección de $\beta_2m$ .

Acido sulfúrico (Merck), Agua oxigenada (Foret), Anticuerpo monoclonal de ratón IgG<sub>2a</sub> anti HLA especificidad común (BRL), Antisuero policlonal de conejo IgG anti  $\beta_2m$  humana (Apartado 4,2), Antisuero policlonal de cabra IgG anti-IgG de conejo, marcado con peroxidasa (Nordic),  $\beta_2m$  (Apartado 4.1), Fotómetro de ocho canales Titertek multiscan (Flow), HLA (Apartado 4.3,2), Líquidos cefalorraquídeos de pacientes con distintas enfermedades, Orinas de pacientes con distintas enfermedades, Ortofenilendiamina (Merck), Placas microelisa Dynatech modelo 129 B (Dynatech), Suero normal de ratón, Suero normal de caballo (Flow), Tampones: Carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,0 (Merck), Citrato/citrato sódico 0,1 M pH 5,5 (Merck), PBS-Tween, ClNa 0,15 M (Merck), fosfato potásico/dipotásico 0,01 M pH 7,2 (Merck) y Tween 20 (monolaurato de polioxietilen sorbitan) 1/1.000 (Sigma).

### 3.2.Métodos.

#### 3.2.1.Enzimoimmunoensayo.

El enzimoimmunoensayo es un método que nos permite la detección y cuantificación de diferentes muestras. Se basa en la capacidad que tiene un conjugado (enzima-antígeno o enzima-anticuerpo) inmovilizado en un soporte sólido, de mantener sus propiedades inmunológicas (reacción antígeno-anticuerpo) y enzimáticas. De este modo, al actuar sobre un substrato se produce una reacción enzimática que podemos objetivar mediante su lectura en un espectrofotómetro, siendo ésta proporcional a la cantidad de conjugado unido a la muestra inmovilizada al soporte, por la reacción antígeno-anticuerpo.

El hecho capital para la puesta a punto de este método fue el acoplamiento de enzimas a proteínas (54) aunque el nombre de "ELISA" (Enzyme-linked immunosorbent assay) no fue empleado hasta que Engvall y Perlman utilizaron el enzimoimmunoensayo en la cuantificación de inmunoglobulinas (55, 56).

En la realización del ensayo resultan de especial interés dos factores:

- La unión del antígeno o anticuerpo a un soporte.
- La naturaleza del conjugado.

En cuanto al primer punto, tenemos que decir que esta unión a un soporte sólido, va a permitir la fácil separación de los reactivos, unidos a él o no, en las diferentes etapas.



Esta unión al soporte puede ser de diferentes tipos, por un lado se puede conseguir una unión de tipo covalente a soportes de celulosa o poliacrílamida, pero sin lugar a dudas las uniones más empleadas en la actualidad se consiguen por medio de adsorciones pasivas a soportes de poliestireno, polivinilo y polipropileno (57) de distinta geometría (discos, bolas, microplacas y tubos).

En cuanto a la naturaleza del conjugado, lo primero que tenemos que decir es que resulta ser el principal reactivo del ensayo (58,59), y como tal debe mantener sus propiedades inmunológicas y enzimáticas.

Las propiedades inmunológicas son las propias de la reacción antígeno-anticuerpo.

Entre las propiedades enzimáticas son de gran interés: las características del enzima, su tipo, los métodos usados en su conjugación y la clase de sustrato empleado.

El enzima empleado debe reunir una serie de características como son: una actividad elevada, un alto grado de pureza, un costo bajo y una reacción con el sustrato fácilmente medible. Entre los enzimas que reúnen estas características, los más empleados hoy día son; glucosa oxidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, catalasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa (60).

Una vez realizada la elección del enzima se procede a su conjugación con la molécula de antígeno o anticuerpo, para ello se han usado principalmente tres

métodos, que a continuación pasamos a describir esquemáticamente:

1-Método del glutaraldéhid (60).-En este método, se realiza la activación del enzima añadiendo glutaraldéhid en exceso, para posteriormente acoplar el enzima activado a antígenos o anticuerpos.

2-Método del peryodato (61).-Este método se basa en que ciertos enzimas que tienen oligosacáridos con grupos  $\alpha$ -diol, en presencia de metaperyodato sódico se oxidan a grupos aldehidos, los cuales pueden reaccionar con grupos amino del antígeno o anticuerpo para formar una base de Schiff, reduciéndose posteriormente con borohidruro sódico para dar una unión mas estable.

3-Método de la dimaleimida (61).-Este método utiliza grupos sulfidrilos del enzima para su acoplamiento a antígenos o anticuerpos tratados previamente con N,N'orto-fenilen dimaleimida.

Tras la elección del enzima y la conjugación del mismo, sólo nos resta la elección del substrato que dependerá de la estabilidad del mismo antes y después de la reacción enzimática.

En cuanto a su clasificación, los enzimoimmunoensayos se pueden dividir en directos e indirectos, dependiendo de que la detección se haga en una o en varias etapas, y dentro de cada uno de estos dos tipos, en competitivos y no competitivos, dependiendo de que la muestra se detecte por medio de inhibiciones o no.

Nuestro método, según se verá en el apartado

de resultados de tipo indirecto y competitivo.

Utilizamos:

-Como soporte: Placas de microelisa Dynatech M 129 B de poliestireno de fondo plano.

-Como tampones de adsorción: En uno de nuestros ensayos, carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,0 y en el otro, fosfato monopotásico-fosfato dipotásico 50 mM pH 7,0 .

-Como tampón de dilución y lavado: PBS-Tween.

-Como conjugado: CaACO-PO.

-Como sustrato: 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mas 10 mM OPD.

La reacción se detiene con SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> .

### 3.2.2. Cromatografía sobre DEAE-celulosa.

Un intercambiador iónico es un material insoluble que tiene unidos covalentemente grupos cargados e iones móviles de signo contrario.

Si aplicamos a este intercambiador una proteína a un pH determinado, se produce un intercambio de los iones móviles por las cargas de igual signo de la proteína

Posteriormente, la proteína adsorbida puede eluirse, bien por cambios de pH del tampón, al afectar las cargas de las proteínas, o por incremento de la molaridad del mismo, lo cual da lugar a un número mayor de iones que compiten con la proteína por los grupos cargados unidos covalentemente al soporte (62).

Nosotros hemos usado DEAE-celulosa, intercambiador aniónico que está formado por una matriz de celu

losa a la que se ha unido un grupo funcional dietil-amino-etil (DEAE) que actúa como intercambiador.

El tratamiento que se lleva a cabo con la resina consiste en:

- Pesar la cantidad deseada de DEAE-celulosa.
- Mantenerla 30 minutos en 0,5 N ClH.
- Lavar con agua destilada hasta pH 4,0 .
- Mantenerla 30 minutos en 0.5 N NaOH.
- Decantar y repetir 30 minutos en 0,5 N NaOH.
- Lavar con agua destilada hasta pH 8.0.

Para realizar la cromatografía, se equilibra el DEAE-celulosa en el tampón de adsorción deseado. Para esto procedemos como sigue:

-Lavamos con un tampón de igual pH pero de mayor concentración.

-Montamos la columna,

-Lavamos con el tampón de adsorción hasta que el pH y la conductibilidad del eluido de la columna, sean iguales a los del eluyente.

Una vez conseguido esto, se puede aplicar la muestra.

En la purificación de  $\beta_2$ microglobulina (apartado 4.1) hemos empleado:

-Tampón de adsorción: 10 mM Tris pH 7.6 .

-Elución mediante gradiente de ClNa desde 0 hasta 0.2 M, en Tris 10 mM.

### 3.2.3. Filtración sobre gel.

La filtración sobre gel separa las moléculas por su tamaño. El gel está compuesto por pequeñas esferas, que tienen poros de tamaño variable, así las moléculas mayores que el tamaño de los poros, no pueden penetrar en las partículas del gel y son eluidas en primer lugar, pasando con la fase líquida, por fuera de estas bolas. Las moléculas más pequeñas, penetran en los poros y son retenidas más tiempo. Esta retención es mayor o menor, dependiendo del mayor o menor tamaño de estas moléculas (63, 64).

Nosotros hemos utilizado Sephadex G-50.

El Sephadex G-50 es un polímero de dextrano que al contener un elevado número de grupos hidroxilos, resulta extremadamente hidrofílico, con lo cual se hincha en agua y soluciones electrolíticas.

Su rango de separación para proteínas está comprendido entre pesos moleculares que van desde 1.500 hasta 30.000 daltons.

### 3.2.4. Cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad es un tipo de cromatografía de adsorción en la cual, la molécula que se quiere separar, es específica y reversiblemente adsorbida por un ligando inmovilizado sobre un soporte insoluble.

Nosotros hemos utilizado una cromatografía

sobre DEAE-Affigel azul,

El DEAE-Affigel azul actúa como material bifuncional al estar formado por la unión covalente a agarosa de dos grupos funcionales, Cibacrom azul F3GA y DEAE. De esta forma, actúa adsorbiendo sustancias que interactúan tanto con el Cibacrom como con los grupos DEAE.

El Cibacrom azul F3GA es un colorante que interactúa con proteínas que tengan en su estructura nichos de reconocimiento para dinucleótidos. Su gran afinidad por la albúmina (capacidad-11 mg/ml de gel) nos ha permitido su utilización para depleccionar muestras de la misma.

Nosotros hemos usado el DEAE-Affigel azul para purificar en un solo paso, IgG de conejo anti  $\gamma_2$  humana, como veremos en el apartado 4.2.

El tratamiento previo, requiere el equilibrado de la columna y la diálisis de la muestra frente a tampón fosfato 10 mM pH 7.0.

### 3.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Un gel de poliacrilamida, es el resultado de la polimerización y reencadenamiento del monómero de acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) y del comonómero N,N'-metilen bisacrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

Las concentraciones de ambos y el grado de polimerización y reencadenamiento, determinan la densidad, viscosidad, elasticidad y consistencia del gel (65).

La polimerización es iniciada desde el monómero acrilamida, cuyos radicales libres reaccionan con los oxígenos libres del persulfato amónico. Dicha polimerización ha de realizarse en presencia de TEMED (N,N,N',N'tetrametil etilendiamina) que es un acelerador de la polimerización. La luz ultravioleta también actúa como acelerador de la polimerización mientras que la baja temperatura la detiene.

En nuestro caso usamos un gel al 10% de acrilamida y al 0.2% de bisacrilamida, según el método de Laemmli (66) que usa en proporciones estudiadas, persulfato amónico, temed y como tampón de gel; 0.12 M Tris, 0.1 M glicina y 0.1% SDS en solución acuosa.

Con esta solución se llenan los tubos de vidrio en que se van a preparar los geles ( 10 cm de longitud y un diámetro interno de 5 mm ) y se dejan polimerizar añadiendo una pequeña cantidad de agua destilada en la parte superior del tubo para evitar la formación de menisco.

Una vez producida la polimerización, se trasladan los geles al aparato de electroforesis, el cual se llena con tampón de electroforesis ( 9 mM Tris, 0.4 M glicina y 0.1% SDS pH 7.5 ).

Para preparar las muestras para la electroforesis, se toman 25  $\mu$ l de tampón de muestra ( glicerol 25%, SDS 0.25%, mercaptoetanol 0.1 M y una gota de azul de bromofenol 0.5% en solución acuosa ) y se mezclan con 25  $\mu$ l de solución acuosa de proteína ( 25-50  $\mu$ g ). Las

muestras se hierven durante 5-10 minutos para eliminar el efecto de las proteasas y facilitar la desnaturalización de las proteínas. Acto seguido se colocan encima del gel y se aplica una corriente de 150 voltios que proporciona una intensidad de 6 miliamperios por tubo.

La muestra migra en dos horas aproximadamente al cabo de las cuales se tiñe con 0,25% de Coomassie azul brillante disuelto en metanol-ácido acético-agua ( 5:1:5 ) durante un tiempo de dos horas . Pasado este tiempo se destiñen en 7.5% acético, 5% metanol, en solución acuosa, repetidas veces hasta completar el proceso.

Para el cálculo de pesos moleculares, utilizamos el método de Shapiro y cols(67). En presencia de SDS ( compuesto de carga negativa ), las proteínas se separan en un campo eléctrico sólo en base a su peso molecular. En estas condiciones, la movilidad viene definida como:

$$\text{Movilidad} = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{Longitud del gel tras destiñir}} \times \frac{\text{Longitud del gel antes de teñir}}{\text{Distancia de migración del frente}}$$

Así se obtienen movilidades de cada proteína dentro del gel y utilizando patrones de pesos moleculares conocidos, se construye una recta patrón mediante la cual se puede calcular el peso molecular de la proteína problema.



### 3.2.6. Determinación de proteínas,

En la determinación de proteínas utilizamos los siguientes métodos:

#### 3.2.6.1. Método de Biuret (68).

La reacción de Biuret es característica del enlace peptídico y está basada en la cuantificación colorimétrica del complejo purpúreo formado entre el ión cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ) y el enlace peptídico en un medio fuertemente alcalino. La lectura se realiza en un colorímetro a longitud de onda de 540 nm.

La sensibilidad del método oscila entre 1 y 10 mg.

#### 3.2.6.2. Medida de la absorbancia a 280 nm.

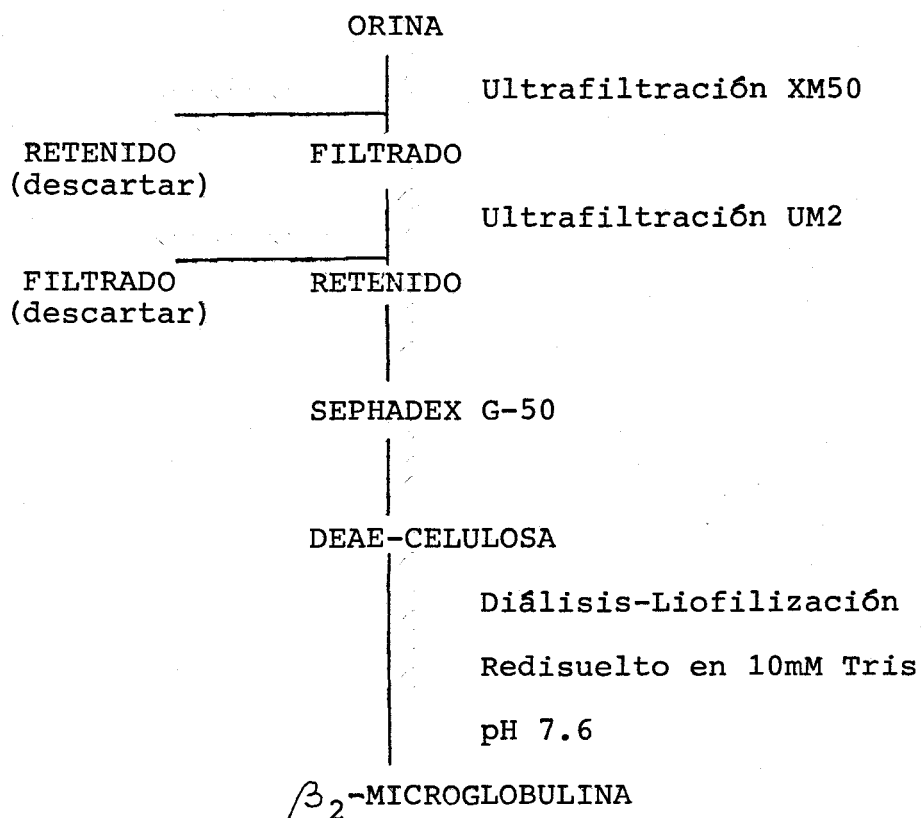
Para mayor comodidad, hemos determinado la concentración de proteínas en solución midiendo su absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben los aminoácidos triptófano y tirosina.

Arbitrariamente hemos definido la unidad de densidad óptica (OD) como la cantidad de proteína que en solución posee una absorbancia de 1, cuando se mide en cubetas de 1 cm de paso de luz.

4. RESULTADOS

4.1. PURIFICACION DE  $\beta_2$ m.

4.1.1. Esquema de purificación.



#### 4.1.2. Ultrafiltración XM50.

Se parte de 250 ml. de orina de un paciente que se encuentra en periodo postoperatorio tras haber sufrido un trasplante renal. Dicha orina presenta discreta proteinuria (0.35g/l) y alta concentración de  $\beta_2^m$  (0.1g/l), calculada según "ELISA" descrito en 4.3.

Se procede a la ultrafiltración de la orina sobre una membrana Diaflo XM50 bajo presión. Dicha membrana no puede ser atravesada por sustancias de peso molecular superior a 50.000 daltons. El material retenido se desecha y se recoge el filtrado, libre de contaminaciones de alto peso molecular.

#### 4.1.3. Ultrafiltración UM2.

El filtrado del XM50 se somete a una nueva ultrafiltración sobre una membrana Diaflo UM2 bajo presión. Dicha membrana sólo puede ser atravesada por sustancias de peso molecular inferior a 2.000 daltons. Se desecha el filtrado con impurezas de bajo peso molecular y se recoge el retenido que tiene un volumen total de 20 ml.

#### 4.1.4. Filtración sobre Sephadex G-50.

A una columna de un litro (6 cm x 36 cm.) equilibrada en 10mM Tris pH 7.6, se aplica el retenido del UM2. El flujo de la columna se ajusta a 1ml./min. y se recogen fracciones de 10 ml.

En la figura 4.1 se representan en ordenadas la absorbancia a 280 nm. y la absorbancia a 492 nm. medida

para inhibición de  $\beta_2m$  según lo descrito en el apartado 4.

3.1. En abscisas se representa el número de fracciones. El perfil de absorbancia a 280 nm. se representa en trazo continuo y el perfil de absorbancia a 492 nm. en trazo discontinuo.

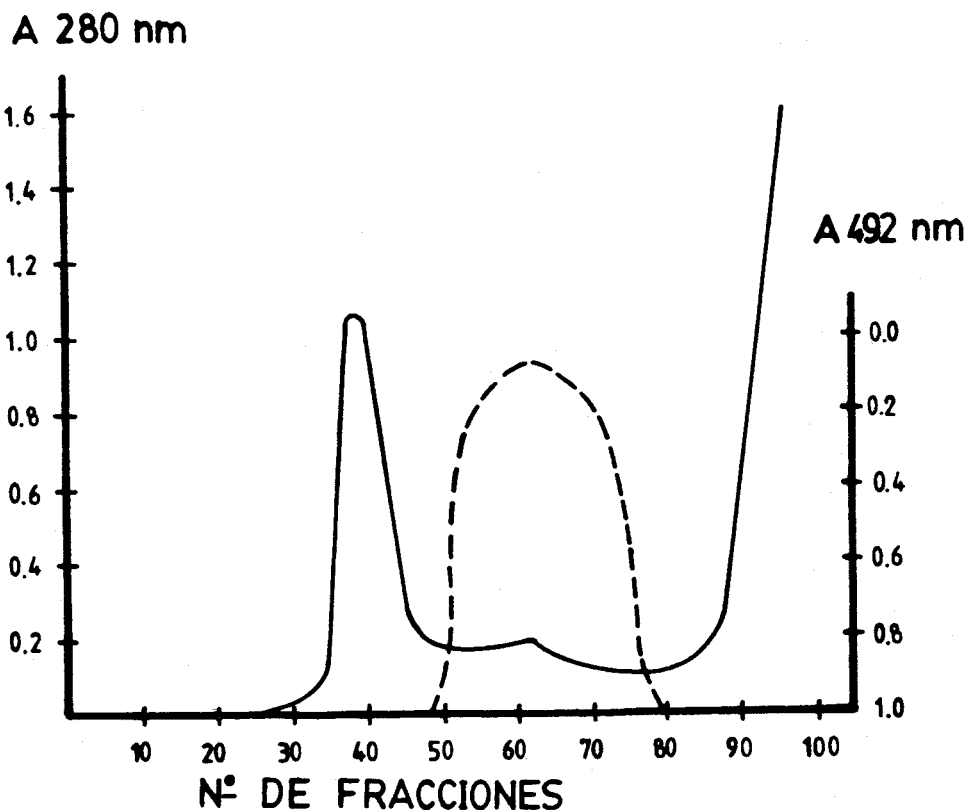


Figura 4.1

Se recogen las fracciones desde la 54 a la 73 y se mezclan, de lo que nos resulta un volumen final de 220 ml. con actividad  $\beta_2m$ .

#### 4.1.5. Cromatografía sobre DEAE-celulosa.

La fracción activa de la etapa anterior (220 ml) es cromatografiada sobre una columna de DEAE-celulosa de 25ml. (2 cm. x 8 cm.) equilibrada en 10mM Tris pH 7.6.

La columna se eluye mediante un gradiente lineal

de 250 ml. de 10 mM Tris pH 7.6 y 250 ml. de 10 mM Tris pH 7.6, ClNa 0.15 M. Se recogen fracciones de 5 ml. bajo un flujo de 0.5 ml./min.

La figura 4.2 muestra el cromatograma obtenido, figurando en ordenadas la densidad óptica a 280 nm. y la inhibición de  $\beta_2m$  a 492 nm. y en abscisas el número de fracciones. El perfil de absorbancia a 280 nm. se representa en trazo continuo. El perfil inhibición de  $\beta_2m$  se representa en trazo discontinuo.

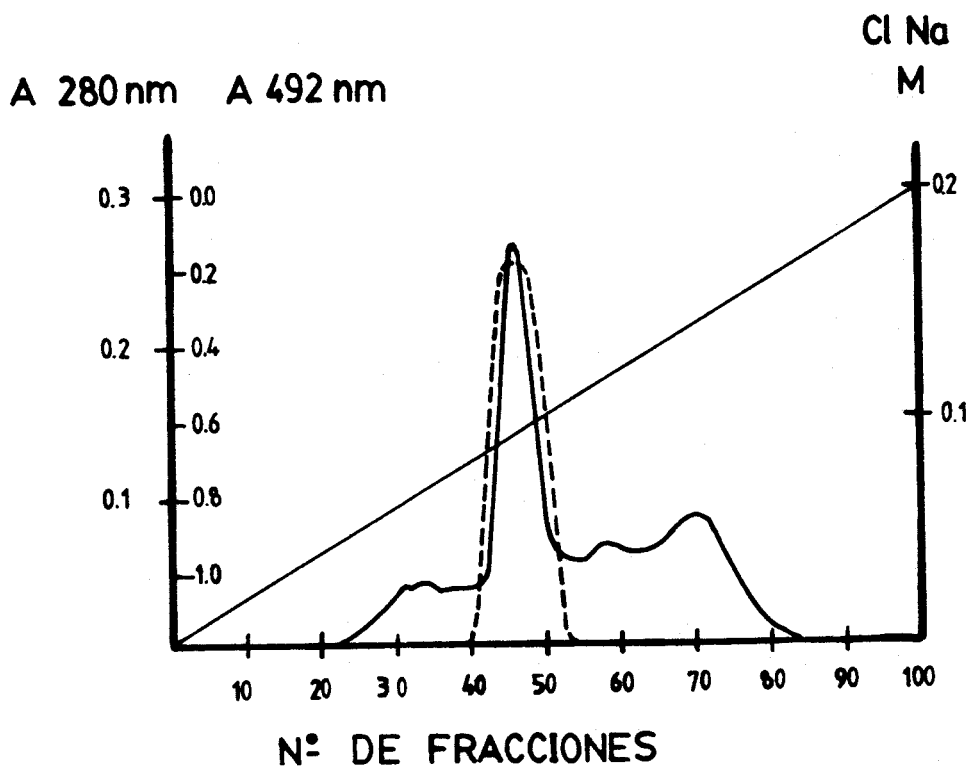


Figura 4.2

Las fracciones con actividad  $\beta_2m$  (de la 44 a la 48), se recogen y se mezclan, obteniendose un volumen total de 20 ml.

#### 4.1.6. Concentración.

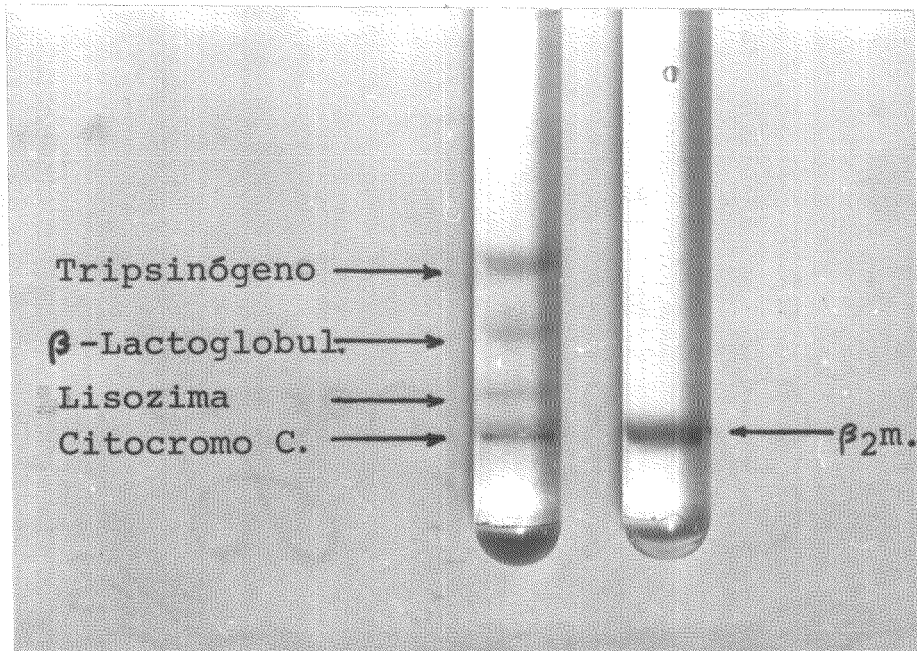
Con el fin de liofilizar los 20 ml. de la etapa

anterior, éstos se dializan frente a 10 mM Tris pH 7.6. El dializado se liofiliza, resuspendiéndose posteriormente el liofilizado en 10 ml. de agua destilada.

#### 4.1.7. Análisis por electroforesis sobre geles de poliacrilamida.

Este análisis se lleva a cabo como criterio de pureza. Para ello se realizan geles de poliacrilamida (10% acrilamida; 0.2% N,N'metilen bisacrilamida) y sobre ellos se efectúa una electroforesis de la muestra en presencia de SDS (0.1%) y mercaptoetanol ( $5 \times 10^{-2}$  M). Una vez realizada dicha electroforesis, se tiñen los geles con azul de Coomassie, colorante específico de las proteínas. Al destañir se ve que la muestra de la etapa anterior nos da en los geles una sola banda, cuyo peso molecular corresponde a la  $\beta_2$ m, según se averigua comparando este gel con otro sobre el que se han corrido patrones de peso molecular conocido, tal como se explica en materiales y métodos.

De este modo, como se puede apreciar en la fotografía, obtenemos una proteína ( $\beta_2$ m) de una pureza superior al 95%, que mantiene la actividad  $\beta_2$ m al testarla mediante "ELISA" tal como se describe en el apartado 4.3.5. y que tiene un peso molecular calculado de unos 12.000 daltons.



Tripsinógeno.....	24.000 daltons
β-Lactoglobulina..	18.400 daltons
Liozima.....	14.300 daltons
Citocromo C.....	12.000 daltons

ETAPA	VOLUMEN ml	D.O.280-310	D.O.total	mg totales	%	ACTIVIDAD ESPECIFICA	PURIFICACION
ORINA	250	1.440	360	25	100	0.069	1
DIAFLO XM50	250	0.920	230	22	88	0.096	1.39
DIAFLO UM2	20	6.100	122	18	75	0.147	2.13
SEPHADEX G-50	220	0.095	21	13	52	0.619	8.97
DEAE-celulosa	20	0.530	10.6	7.5	30	0.707	10.25

4.1.8. Tabla de rendimientos.



#### 4.2. OBTENCION DE ANTISUERO DE CONEJO ANTI $\beta_2$ M HUMANA.

##### 4.2.1. Pauta de inmunización.

La  $\beta_2$ m purificada según el apartado 4.1 se utiliza en parte para inmunizar a un conejo con el fin de obtener un antisuero anti  $\beta_2$ m humana.

Las condiciones de inmunización son las siguientes:

se inyectan en la región glútea del conejo tres dosis a tiempos de 0, 15 y 30 días; cada dosis consta de 500  $\mu$ g. de  $\beta_2$ m en 0.3ml. de 10 mM Tris pH 7.6, mas 0.5 ml. de adyuvante completo de Freund; posteriormente al conejo se le inyectan tres dosis de recuerdo a los 2, 4 y 4.5 meses de la dosis inicial. Estas dosis están constituidas por 250  $\mu$ g. de  $\beta_2$ m en 0.3 ml de Tris 10 mM pH 7.6, mas 0.5 ml. de adyuvante completo de Freund.

##### 4.2.2. Titulación de sangrados.

Los sangrados, de alrededor de 30ml., se efectúan en la vena marginal de la oreja del conejo a los 2, 3, 4, 5 y 6 meses de la dosis inicial.

Para titular la producción de anticuerpo con respecto al tiempo se utiliza el ensayo de inmunodifusión descrito en 4.3.1.2 manteniéndose las condiciones como se describen en 4.3.4.2 excepto en la etapa tres en la que se sustituye el antisuero de conejo anti  $\beta_2$ m humana (CoAH/ $\beta_2$ m) por sueros de los distintos sangrados cuya dilución se ajusta a 1/200.

En la figura 4.3 podemos ver la relación entre la actividad anti/ $\beta_2$ m y el tiempo de inmunización.

En ordenadas figura la densidad óptica 492 nm. y en abscisas el tiempo de inmunización en meses. Las flechas indican cuando se inyectaron las dosis de inmunización.

**A 492 nm**

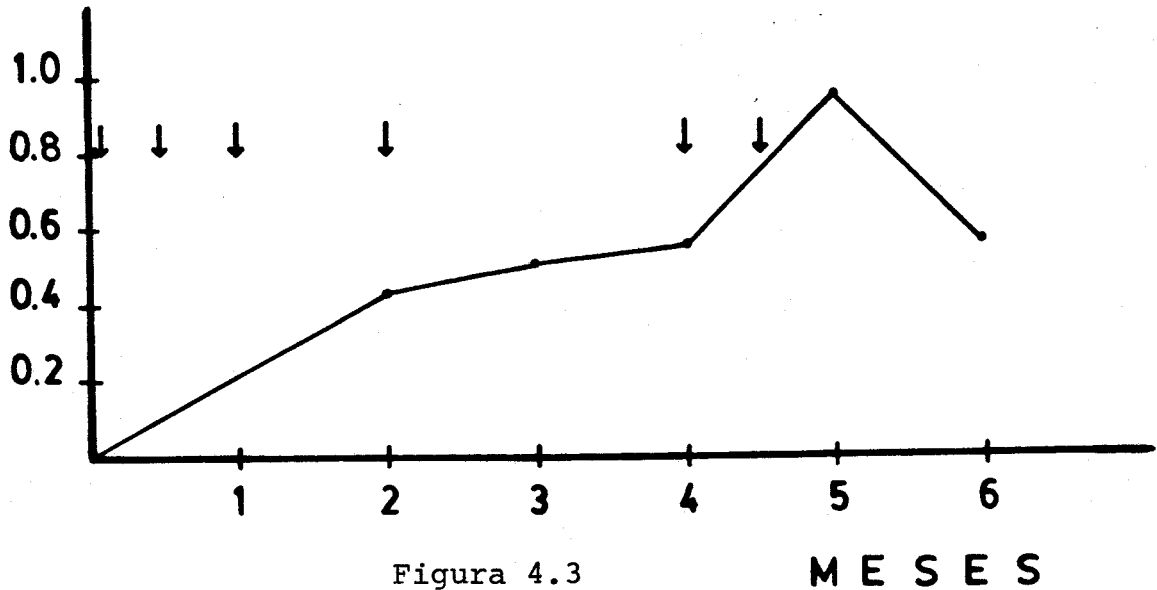


Figura 4.3

**M E S E S**

Como se observa en la figura, la actividad anti  $\beta_2$ m humana aumenta en los distintos sangrados, proporcionalmente al tiempo de inmunización, hasta un máximo que se alcanza al quinto mes, para decrecer a partir de ese momento

#### 4.2.3. Aislamiento de la fracción G del suero de conejo inmunizado.

A una columna de 10 ml. (1.2 cm. x 10 cm.) de DEAE Affigel azul equilibrada en 10 mM fosfato pH 7.0, se aplica 1 ml. del suero de conejo obtenido al quinto mes de haber inyectado al conejo la primera dosis de inmunización. Dicho suero previamente ha sido dializado frente al mismo

tampón .

Se recoge la fracción que no se adsorbe a la columna junto con el lavado de la misma con el mismo tampón. Se lee su absorbancia en un espectrofotómetro a 280 nm. y se determina su actividad anti $\beta_2$ m por el "ELISA" descrito en 4.3.1.2. Las fracciones con actividad anti $\beta_2$ m se unen y mediante inmunolectroforesis se comprueba que no existe contaminación por Ig A, Ig M ni albúmina.

Esta fracción G es la que se utiliza en los ensayos de inmunoenzimas descritos en el apartado 4.3.1.

#### 4.2.4. Titulación del anticuerpo purificado.

La actividad anti $\beta_2$ m del anticuerpo se titula según el "ELISA" descrito en 4.3.1.2, bajo las condiciones establecidas en 4.3.4.1, salvo en la etapa tres en la que se utilizan diluciones de nuestro anticuerpo que van desde 1/50 hasta 1/6400.

Se compara nuestro anticuerpo con uno comercial para el que se realizan idénticas diluciones.

Los resultados se exponen en la figura 4.4 . En ordenadas viene representada la densidad óptica a 492 nm. y en abscisas las diluciones de los anticuerpos ensayados representadas como  $1/\text{dil.} \times 10^4$ .

El trazo con puntos representa los resultados obtenidos con el anticuerpo purificado y el trazo con cuadrados los que se obtuvieron con el anticuerpo comercial.

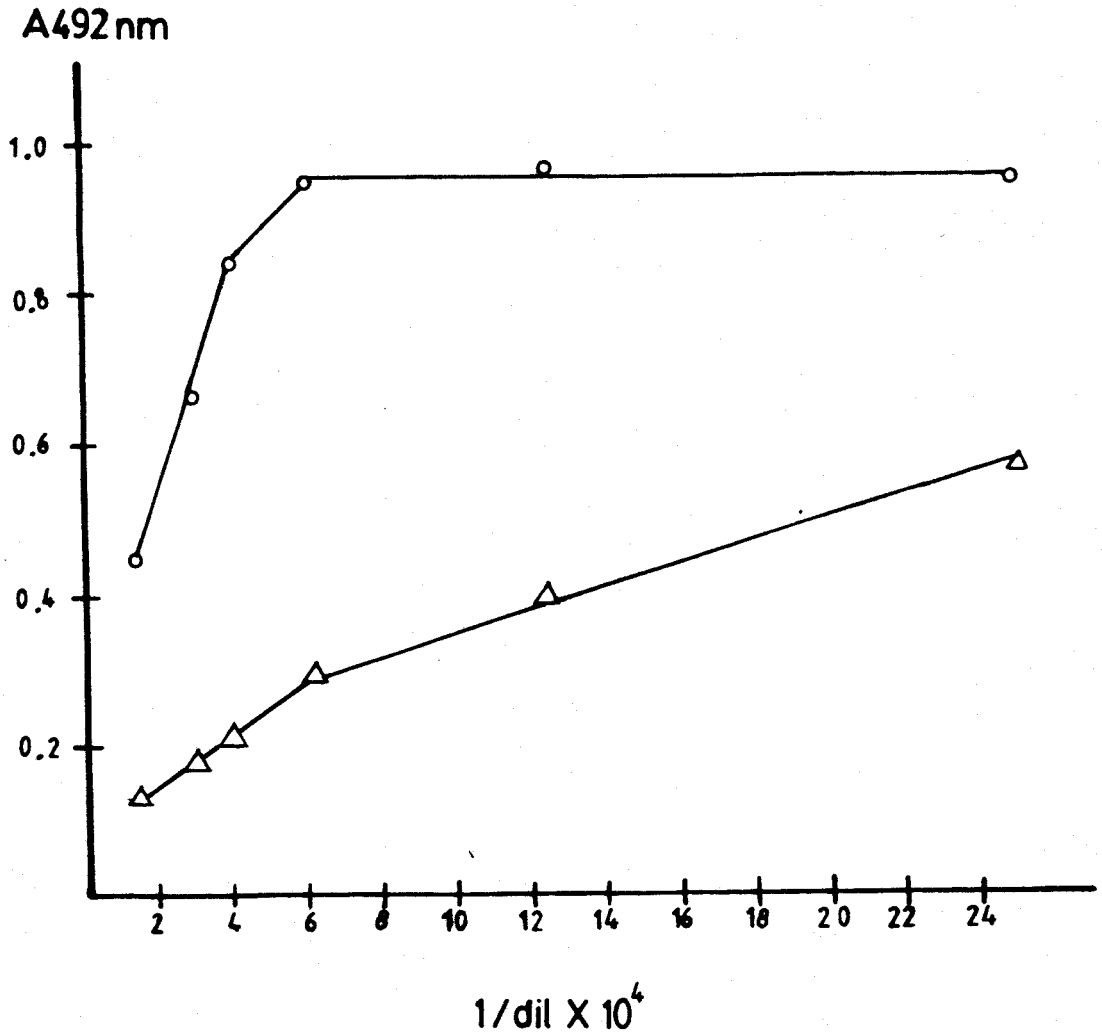


Figura 4.4

Como se puede apreciar por las curvas de titulación, el anticuerpo purificado posee un título considerablemente superior al comercial, llegando a saturación para diluciones de 1/2000 e inferiores.

Esta dilución de 1/2000 es la que se utiliza en los "ELISA" para la detección de  $\beta_2m$  que describiremos en el siguiente apartado.

4.3. DETECCIÓN DE  $\beta_2$ M POR ENZIMOINMUNOENSAYO.

4.3.1. Esquema de los métodos utilizados.

Se han puesto apunto dos "ELISA" para detectar  $\beta_2$ m libre. Sus esquemas se representan en las figuras 4.5 y 4.6.

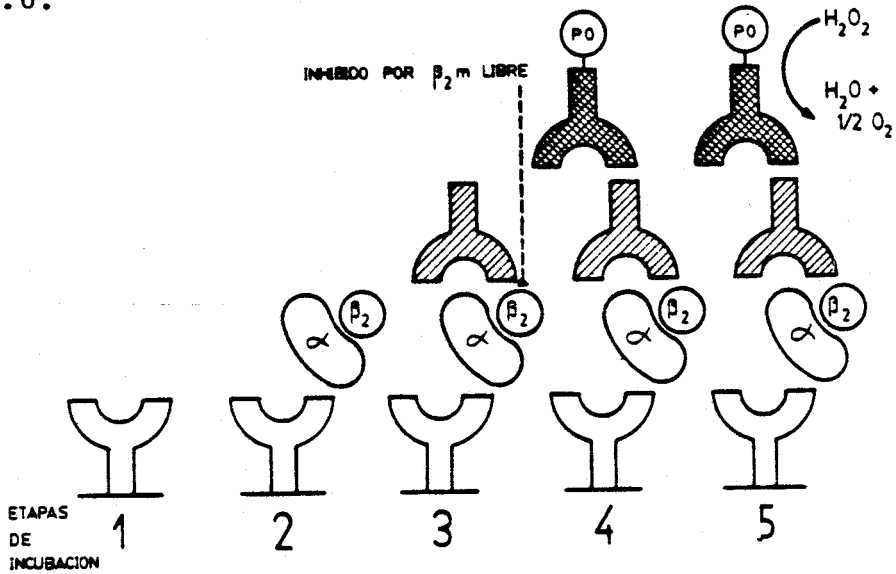


Figura 4.5

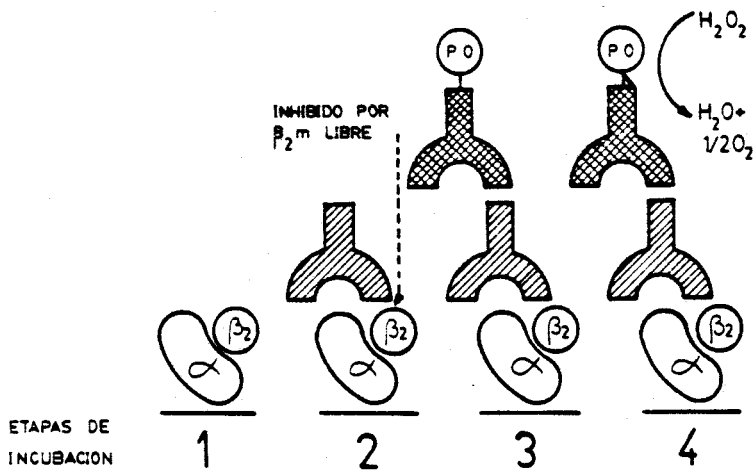


Figura 4.6

4.3.1.1. "ELISA" representado en la figura 4.5.

ETAPA 1: Unión a la placa de microelisa de un  $M_{HLA}$  (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce un determinante antigénico presente en la cadena pesada de los antígenos de histocompatibilidad HLA A, B y C) mediante incubación a 4°C durante 18 horas.

ETAPA 2: Incubación con una cantidad constante de HLA.

ETAPA 3: Adicción de la muestra a ensayar, que puede contener  $\beta_2m$ , seguidamente se incuba con CoAH/ $\beta_2m$  (anticuerpo policlonal de conejo obtenido según 4.2). De este modo la  $\beta_2m$  presente en la muestra a ensayar, compete con la  $\beta_2m$  de la molécula de HLA inmovilizada en la placa, por el CoAH/ $\beta_2m$ , produciéndose una inhibición de la unión del CoAH/ $\beta_2m$  con la  $\beta_2m$  de la molécula de HLA.

ETAPA 4: Incubación con CaACo-PO (anticuerpo policlonal de cabra de la clase IgG, marcado con peroxidasa, con especificidad anti IgG de conejo).

ETAPA 5: Incubación con la solución de substrato (3 mM  $H_2O_2$  mas 10mM OPD como cromógeno).

Después de un tiempo de incubación la reacción se detiene añadiendo 1N  $SO_4H_2$  para posteriormente determinar la densidad óptica resultante a 492 nm. La presencia de  $\beta_2m$  se pone de manifiesto por un descenso

de absorbancia que se observa en la lectura de la placa al comparar los pocillos que tienen  $\beta_2m$  con un control al que no se ha añadido la muestra a ensayar.

Los anticuerpos policlonales de las etapas 3 y 4 (CoAH/ $\beta_2m$  y CaACo-PO) son absorbidos antes de usarlos con suero de ratón (1:1 v/v). Las diluciones finales de estos antisueros llevan un 10% de suero de caballo. Estas absorciones con suero de ratón y caballo se realizan para estabilizar el anticuerpo diluido y bajar el fondo que pudiera tener el ensayo por pegada inespecífica de los antisueros a la placa.

Las incubaciones de las etapas 2,3 y 4 son de 30 minutos pasados los cuales se realizan lavados (de 8 a 12 veces) con PBS-Tween.

Los anticuerpos de las etapas 3 y 4, el HLA de la etapa 2 y las muestras de la etapa tres están disueltos en PBS-Tween.

#### 4.3.1.2, "ELISA" descrito en la figura 4.6.

Este "ELISA" sólo se diferencia del anterior en que en lugar de incubar en una primera etapa con  $M_{HLA}$  y en una segunda con HLA que se une específicamente al monoclonal por la cadena pesada, ahora en una primera etapa se une HLA directamente a la placa de microelisa. Las etapas 2,3 y 4 de este "ELISA" son en todo semejantes a las etapas 3,4 y 5 respectivamente del "ELISA" descrito en 4.3.1.1, a saber:

ETAPA 2: Adicción de la muestra a ensayar seguida

de incubación con CoAH/ $\beta_2$ m.

ETAPA 3: Incubación con CaACO-PO.

ETAPA 4: Incubación con la solución de sustrato.

El desarrollo de la reacción se corta después de un tiempo de incubación con 1N  $\text{SO}_4\text{H}_2$  para leerse seguidamente la absorbancia de la placa a 492 nm. La presencia de  $\beta_2$ m se pone de manifiesto por una disminución de la absorbancia de la placa a 492 nm, en relación con la absorbancia de un control al que no se ha añadido la muestra a ensayar.

Las curvas de titulación de CoAH/ $\beta_2$ m y CaACO-PO nos dan resultados semejantes en ambos ensayos, debido a esto, estos anticuerpos se utilizan a la misma dilución en uno u otro ensayo. También se usa la misma concentración de sustrato.

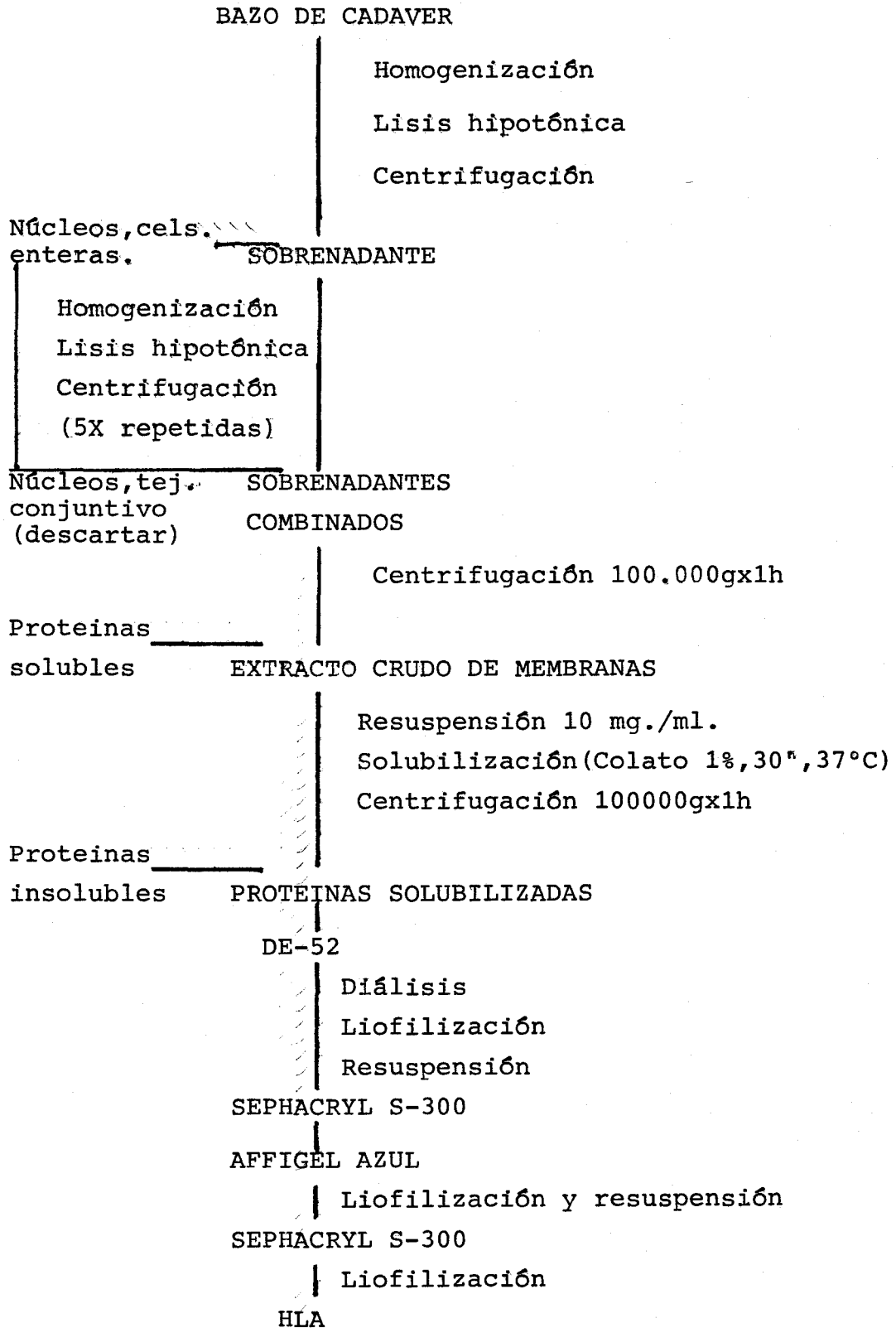
Los tiempos de incubación en este "ELISA" son de 18 horas a 4°C para la primera etapa y de 30 minutos a temperatura ambiente para las etapas 2 y 3.

El HLA de la etapa 1 va disuelto en tampón fosfato 50mM pH 7.0.

4.3.2. Purificación de HLA para su utilización en estos enzimoinmunoensayos.

El HLA utilizado en ambos ensayos fue purificado en nuestro laboratorio según el siguiente esquema:





El HLA obtenido fue analizado por electroforesis sobre geles de poliacrilamida, observándose en éstos, dos bandas mayoritarias de pesos moleculares correspondientes a los de la cadena  $\alpha$  y de la  $\beta_2$  microglobulina. La pureza de este HLA resulto ser del 60%. El rendimiento de la purificación fue del 37%. Se partió de un bazo de 126 g y se obtuvieron 10.7 mg de proteína.

#### 4.3.3. Curvas de calibrado de los ensayos.

Con el fin de conocer las condiciones generales en las que se deben realizar los ensayos, realizamos las curvas de calibrado de los distintos antisueros que intervienen en los mismos.

Al realizar estas curvas se omite añadir  $\beta_2m$ , con lo cual el resultado del ensayo será siempre un máximo de lectura para las condiciones dadas.

##### 4.3.3.1. Curva de calibrado de $M_{HLA}$ .

Para realizar esta curva incubamos durante 18h a 4°C en tampón carbonato 0.1 M pH 9.0, cantidades crecientes de  $M_{HLA}$ , desde 25 a 800 nanogramos, en un volumen de 100  $\mu$ l. por pocillo.

El resto de las etapas se realiza en condiciones de saturación, a saber;

ETAPA 2: HLA a concentración de 50ng por pocillo.

ETAPA 3: CoAH/  $\beta_2m$  a una dilución de 1/500.

ETAPA 4: CaACO-PO a una dilución de 1/500.

ETAPA 5: 3mM  $H_2O_2$  mas 10mM OPD como cromógeno.

La reacción se para a los 10 minutos, obtenien la curva representada en la figura 4.7.

En ordenadas viene representada la absorban--  
cia a 492 nm y en abscisas los nanogramos de  $M_{HLA}$  añadi  
dos por pocillo.

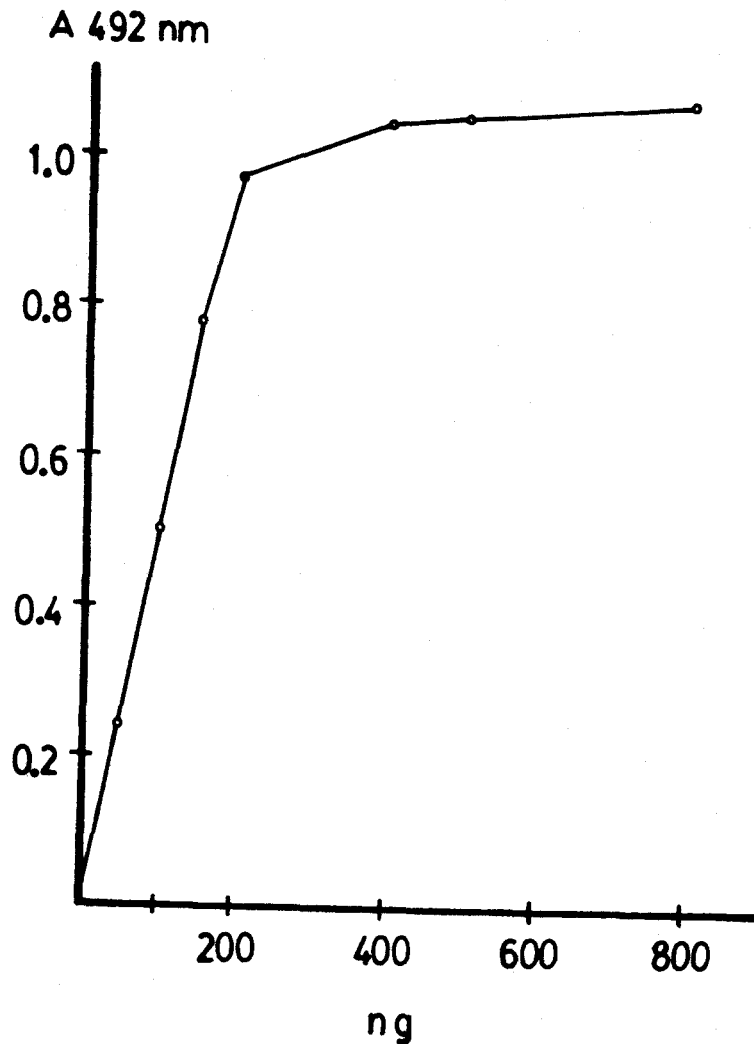


Figura 4.7

Como se puede observar, en las condiciones de saturación establecidas, el pocillo se satura a partir de 400 ng de  $M_{HLA}$ . Desde este momento estableceremos la concentración de  $M_{HLA}$  en 400 ng por pocillo.

#### 4.3.3.2. Curvas de calibrado para HLA,

##### 4.3.3.2.1. Curva de calibrado de HLA para el "ELISA" descrito en 4.3.1.1,

Se procede a realizar el "ELISA" bajo las siguientes condiciones:

ETAPA 1:  $M_{HLA}$  a una concentración de 400 ng por pocillo.

ETAPA 3: CoAH/ $\beta_2m$  a una dilución de 1/500 (en saturación.)

ETAPA 4: CaACO-PO a una dilución de 1/500 (en saturación).

ETAPA 5: 3mM  $H_2O_2$  mas 10mM OPD como cromógeno.

Tiempo de desarrollo de la reacción de 15 minutos, al cabo de los cuales se detiene ésta añadiendo 1 N  $SO_4H_2$  (100  $\mu$ l por pocillo).

En la etapa 2 ensayamos cantidades crecientes de HLA purificado (4.3.2). que van desde 1.5 hasta 24 nanogramos por pocillo, obteniéndose una curva que puede verse en la figura 4.8.

Como se puede apreciar en la figura , a partir de 18 ng de HLA por pocillo , alcanzamos condiciones de saturación.

En adelante se establecerá la concentración de 20ng de HLA por pocillo en esta etapa.

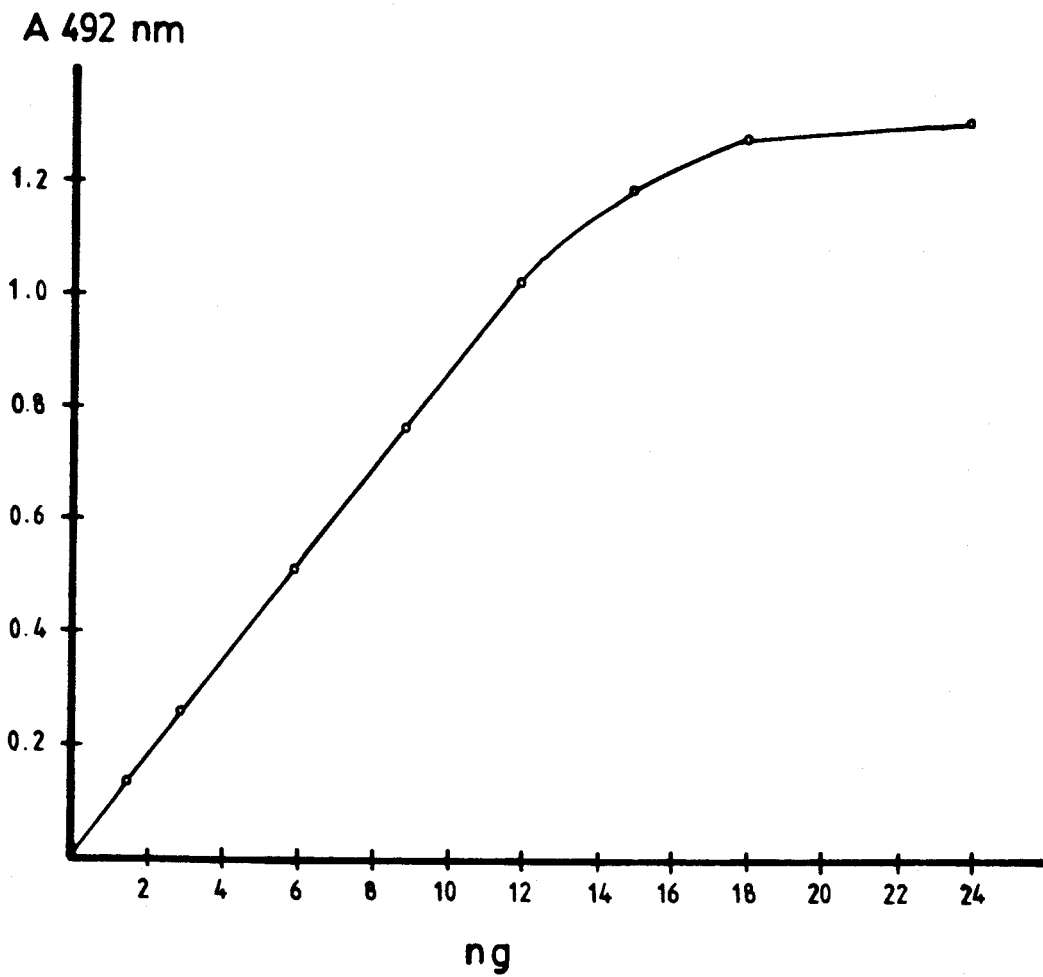


Figura 4.8

4.3.3.2. Curva de calibrado de HLA para el  
"ELISA" descrito en 4.3.1.2.

Para realizar esta curva incubamos durante 18 horas a 4°C en tampón fosfato 50mM pH 7.0, cantidades crecientes de HLA , desde 5 a 200 ng , en un volumen de 100  $\mu$ l por pocillo.

El resto de las etapas se realizan en condiciones de saturación , a saber:

ETAPA 2: CoAH/ $\beta_2$ m a una dilución de 1/500.

ETAPA 3: CaACO-PO a una dilución de 1/500.

ETAPA 4: 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mas 10 mM OPD como cromógeno.

El desarrollo de la reacción se interrumpe a los 15 minutos, obteniendose la curva representada en la figura 4.9.

En abscisas están representados los nanogramos de HLA por pocillo y en ordenadas la densidad óptica a 492 nm.

Como se puede observar , para las condiciones de saturación establecidas, el pocillo se satura con cantidades de HLA desde 20 ng.

A partir de este momento establecemos la concentración de HLA en 20 ng por pocillo para esta etapa.

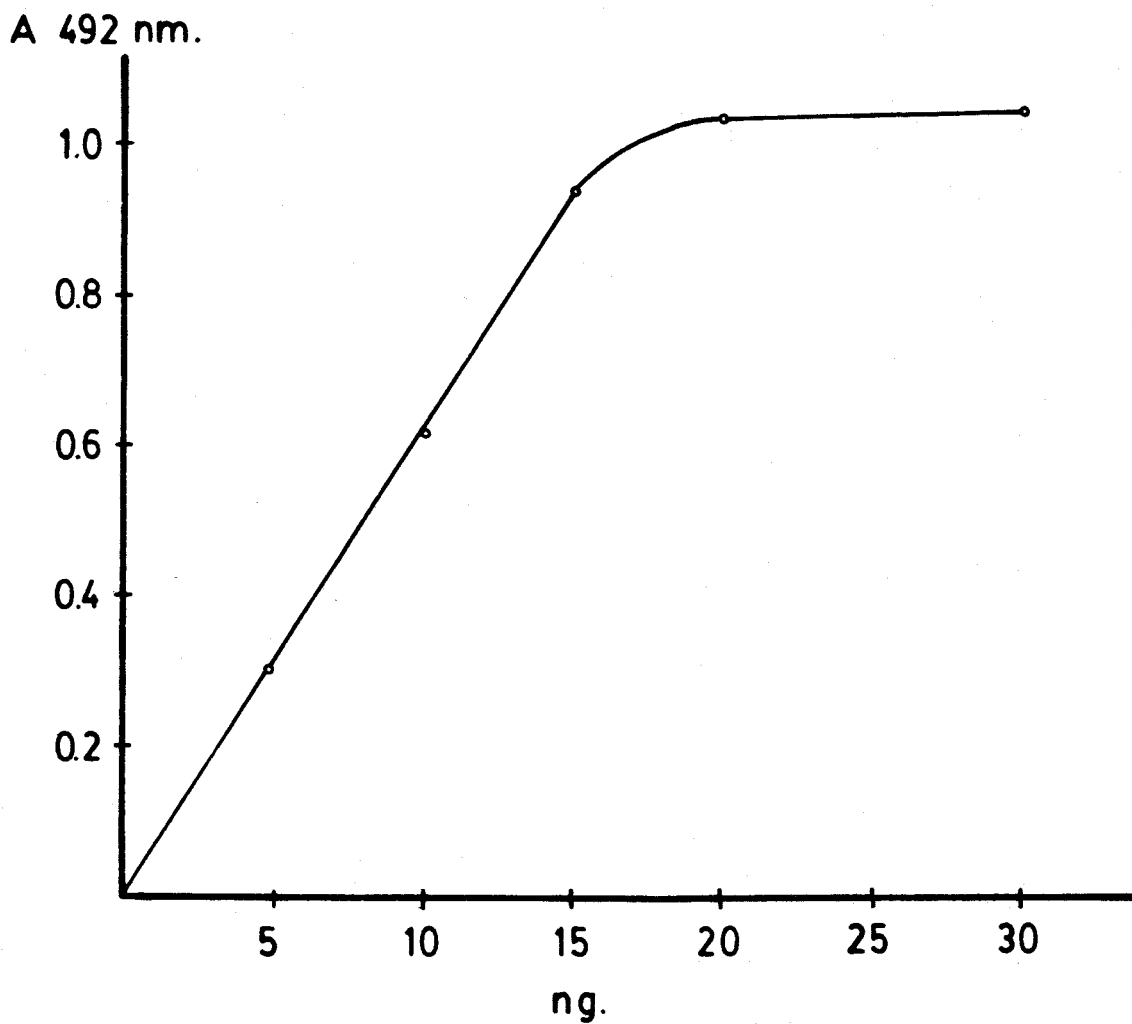


Figura 4.9

#### 4.3.3.3. Curva de calibrado del CoAH/ $\beta_2$ m.

Esta curva se realizó independientemente para los dos enzimoimmunoensayos descritos, observandose que las condiciones de saturación del anticuerpo eran las mismas para ambos casos, por tanto sólo describiremos a quí el ensayo realizado según el "ELISA" descrito en 4.3.1.1.

ETAPA 1: M<sub>HLA</sub> a una concentración de 400 ng por pocillo.

ETAPA 2: HLA a una concentración de 20 ng por pocillo.

ETAPA 4: CaCo-PO a una dilución de 1/500.

ETAPA 5: 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mas 10 mM OPD como cromógeno.

El desarrollo de la reacción se detiene a los 15 minutos.

En la etapa 2 incubamos con distintas diluciones de CoAH/ $\beta_2$ m que van desde 1/100 hasta 1/20.000, obteniendose la curva representada en la figura 4.10.

En ordenadas se representa la densidad óptica a 492 nm y en abscisas las diluciones del CoAH/ $\beta_2$ m añadido en cantidad de 100  $\mu$ l por pocillo. Estas diluciones se expresan en la figura como 1/dil. X 10<sup>4</sup>.



Como se puede observar, para diluciones desde 1/2.000 del antisuero e inferiores, se llega a la saturación en el ensayo. Así pues establecemos la dilución de 1/2.000 para nuestro CoAH/ $\beta_2^m$  en esta etapa, añadiendo 100  $\mu$ l por pocillo de la misma.

A 492 nm

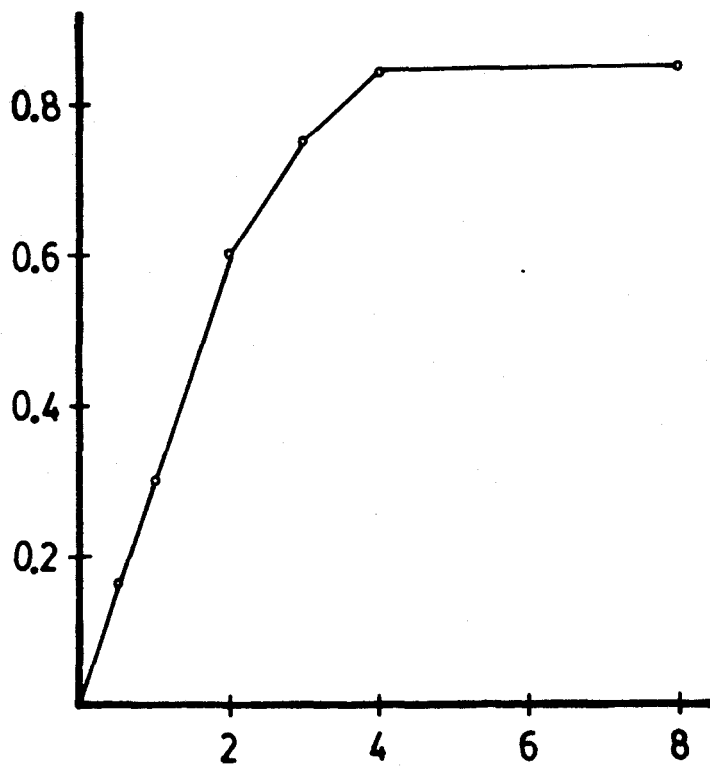


Figura 4.10

#### 4.3.3.4, Curva de calibrado del CaACo-PO.

realizada esta curva independientemente para los dos enzimoimmunoensayos descritos resultó dar valores semejantes para ambos, por tanto describiremos aquí únicamente el ensayo realizado según el "ELISA" descrito en 4.3.1.1.

ETAPA 1:  $M_{HLA}$  a una concentración de 400 ng por pocillo.

ETAPA 2: HLA a una concentración de 20 ng por pocillo.

ETAPA 3: CoAH/ $\beta_2m$  a una dilución de 1/2000.

ETAPA 5: 3 mM  $H_2O_2$  mas 10 mM OPD como cromógeno.

El desarrollo de la reacción se detiene a los 15 minutos, añadiendo 100  $\mu$ l de 1 N  $SO_4H_2$  por pocillo.

En la etapa 4 incubamos con diluciones crecientes de CaACo-PO desde 1/100 hasta 1/20,000, en un volumen de 100  $\mu$ l por pocillo.

Una vez realizado el "ELISA" se obtuvo la curva representada en la figura 4.11.

En ordenadas se representa la absorbancia a 492 nm y en abscisas las diluciones del CaACo-PO expresadas como  $1/dil.X 10^4$ .

Como se puede apreciar, para diluciones de 1/2.000 e inferiores se consigue una saturación del anticuerpo en esta etapa del ensayo.

A partir de ahora, en esta etapa se añaden 100  $\mu$ l por pocillo de CaACo-PO a una dilución de 1/2000.

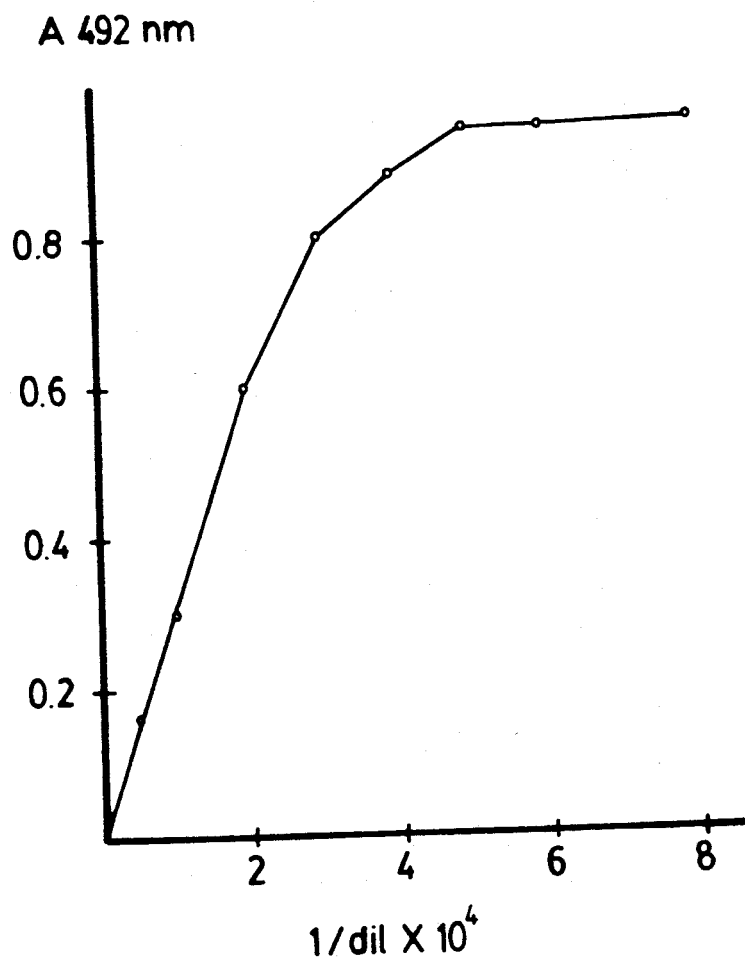


Figura 4.11

4.3.3.5. Curva de proporcionalidad de la reacción con respecto al tiempo.

Esta curva fue realizada independientemente para los dos enzimoimmunoensayos descritos, resultando como en los dos apartados anteriores, dos curvas semejantes, por tanto describiremos también aquí únicamente las condiciones en que se realizó la curva para el "ELISA" descrito en 4.3.1.1.

ETAPA 1:  $M_{HLA}$  a una concentración de 400 ng por pocillo.

ETAPA 2: HLA a una concentración de 20 ng por pocillo.

ETAPA 3:  $CoAH/\beta_2m$  a una dilución de 1/2,000.

ETAPA 4:  $CaCo-PO$  a una dilución de 1/2,000.

ETAPA 5: 3 mM  $H_2O_2$  mas 10 mM OPD como cromógeno.

Realizado el ensayo bajo estas condiciones se procedió a detener el desarrollo de la reacción cada cinco minutos, obteniendose los resultados expresados en la figura 4.12.

En ordenadas se representa la densidad óptica a 492 nm y en abscisas el tiempo de desarrollo de la reacción.

Como se puede observar en la figura, la absor**u** bancia a 492 nm aumenta de manera lineal en nuestro en-  
sayo hasta tiempos de 30 minutos. Nosotros escogemos un  
tiempo de 15 minutos como condición de desarrollo de la  
reacción.

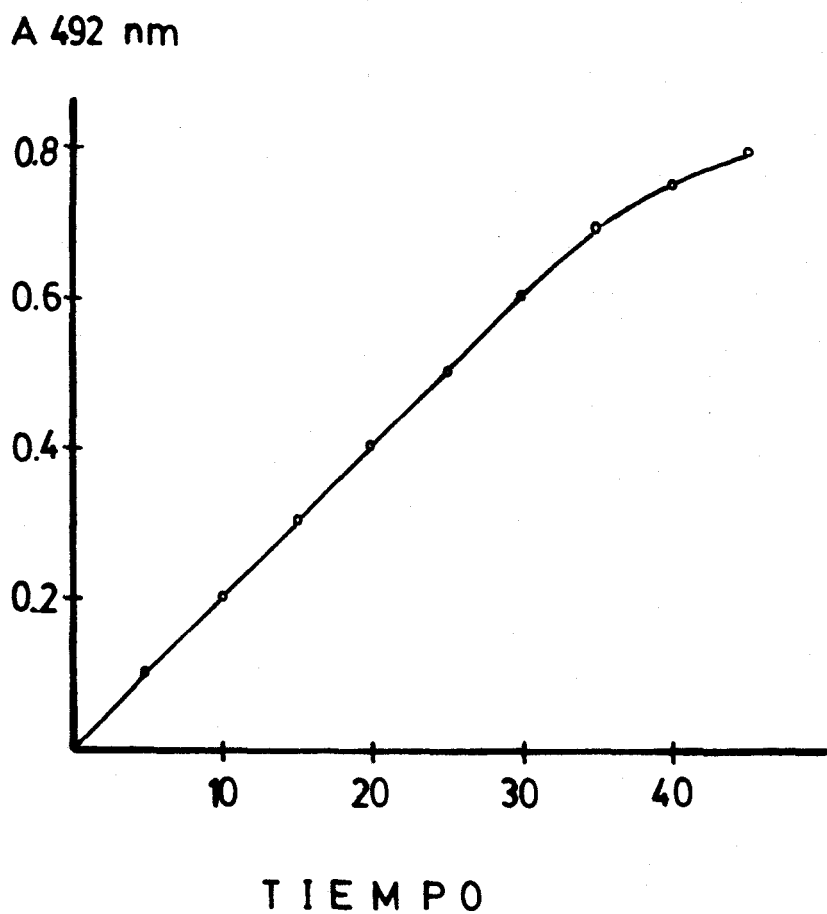


Figura 4,12

#### 4.3.4. Condiciones de estandarización de los ensayos.

##### 4.3.4.1. Condiciones de estandarización del "ELISA" descrito en 4.3.1.1.

Las condiciones generales de este ensayo se establecen como sigue:

ETAPA 1:  $M_{HLA}$  a una concentración de 400ng por pocillo.

ETAPA 2: HLA a una concentración de 20 ng por pocillo.

ETAPA 3: CoAH/ $\beta_2m$  a una dilución de 1/2.000.

ETAPA 4: CaACO-PO a una dilución de 1/2.000.

ETAPA 5: 3 mM  $H_2O_2$  mas 10 mM OPD como cromógeno.

Tiempo de desarrollo de la reacción de 15 minutos, al cabo de los cuales se detiene ésta añadiendo 100  $\mu$ l de 1N  $SO_4H_2$  y se lee la absorbancia a 492 nm.

##### 4.3.4.2. Condiciones de estandarización del "ELISA" descrito en 4.3.1.2.

Se establecen las siguientes condiciones generales para este ensayo:

ETAPA 1: HLA a una concentración de 20 ng por pocillo.

ETAPA 2: CoAH/ $\beta_2m$  a una dilución de 1/2.000.

ETAPA 3: CaACO-PO a una dilución de 1/2.000.

ETAPA 4: 3 mM  $H_2O_2$  mas 10 mM OPD como cromógeno.

Tiempo de desarrollo de la reacción de 15 minutos, al cabo de los cuales se detiene ésta añadiendo

100  $\mu$ l de 1N  $\text{SO}_4\text{H}_2$  por pocillo y se lee la absorbancia a 492 nm.

#### 4.3.5. Cuantificación de $\beta_2\text{m}$ .

##### 4.3.5.1. Cuantificación mediante el "ELISA" descrito en 4.3.1.1.

El ensayo se realiza según las condiciones generales expuestas en 4.3.4.1.

Para obtener una curva patrón de inhibición, se añaden en la etapa 3, antes de comenzar la incubación con el CoAH/ $\beta_2\text{m}$ , cantidades crecientes de  $\beta_2\text{m}$  purificada (según lo expuesto en el apartado 4.1) que van desde 2 a 30 ng por pocillo.

En la figura 4.13 se muestra el resultado obtenido.

En ordenadas se representa la absorbancia a 492 nm y en abscisas los nanogramos de  $\beta_2\text{m}$  purificada añadidos por pocillo.

Como se puede observar, este ensayo es cuantitativo para valores de  $\beta_{2m}$  que van desde 2 a 30 nanogramos por pocillo. Para realizar la cuantificación procedemos con la muestra problema de la misma manera que con la  $\beta_{2m}$  pura. La densidad óptica resultante se lleva a la recta patrón, obteniéndose los nanogramos de  $\beta_{2m}$  presentes en la muestra ensayada.

A 492 nm

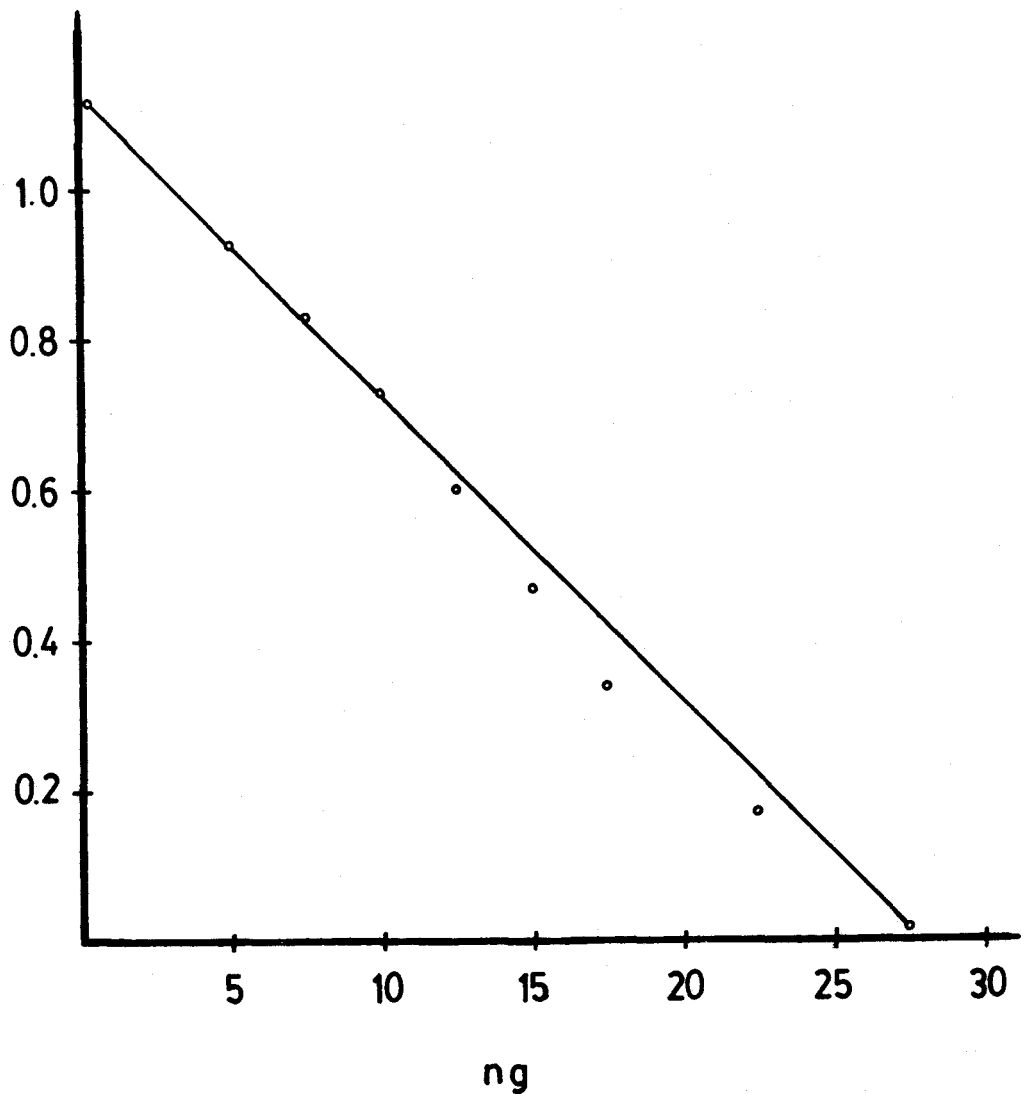


Figura 4,13



4.3.5.2. Cuantificación mediante el "ELISA" descrito en 4.3.1.2.

Las condiciones generales del ensayo son las descritas en 4.3.4.2.

Para obtener una curva patrón de inhibición se añaden en la etapa 2, antes de la incubación con el CoAH/ $\beta_2m$ , cantidades crecientes de  $\beta_2m$  purificada (según se explica en el apartado 4.1) que van desde 2 hasta 30 nanogramos por pocillo.

La figura 4.14 nos muestra el resultado obtenido.

En abscisas se representa la absorbancia a 492 nanómetros y en ordenadas los nanogramos de  $\beta_2m$  por pocillo.

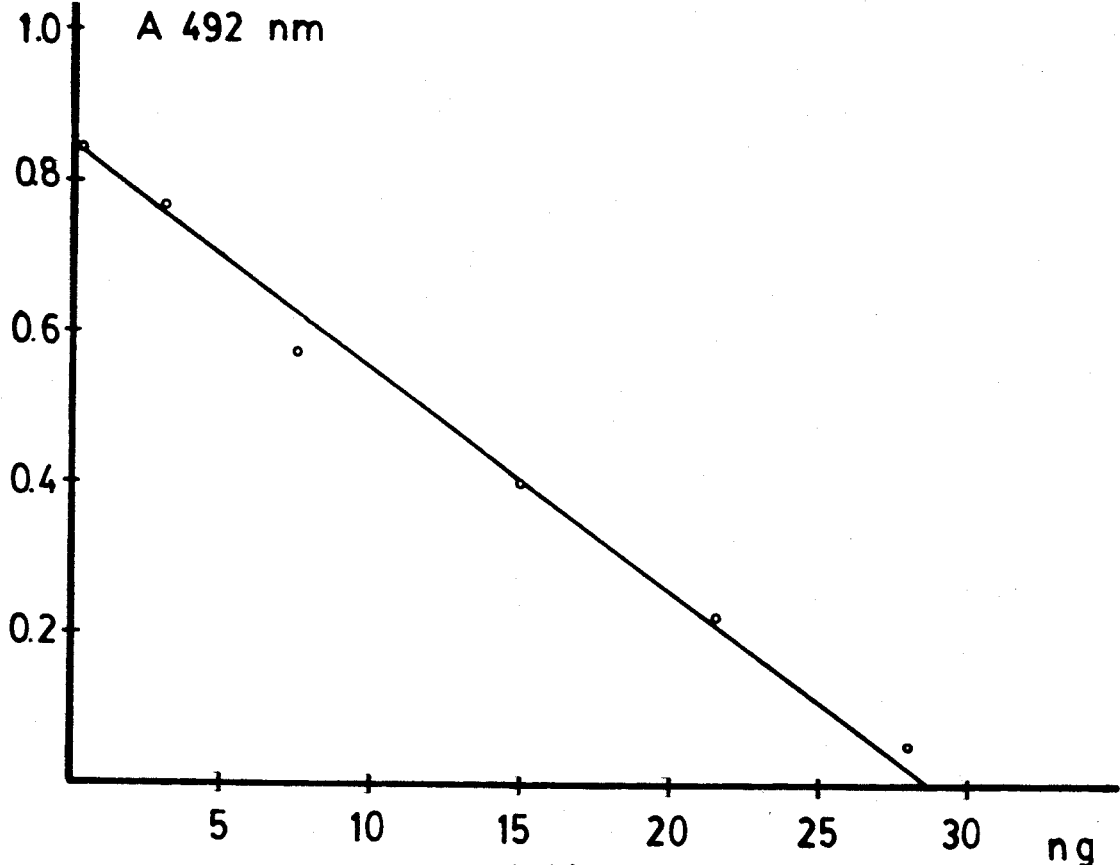


Figura 4.14

Como se puede apreciar, la sensibilidad de este método para cuantificar  $\beta_2m$  va desde 2 a 20 ng por pocillo.

Para cuantificar  $\beta_2m$  en distintas muestras problema, procedemos de la misma forma que en el apartado anterior.

#### 4.3.6. Aplicaciones de estos enzimoimmunoensayos.

Los enzimoimmunoensayos descritos pueden ser utilizados con los siguientes fines:

4.3.6.1. Seguimiento de la  $\beta_2m$  en las distintas etapas de su purificación y posterior cuantificación de la misma para el cálculo de rendimientos.

4.3.6.2. Cuantificación de  $\beta_2m$  en distintos fluidos biológicos, normales y patológicos.

A continuación citaremos dos ejemplos de este tipo de cuantificaciones:

##### 4.3.6.2.1. Cuantificación de $\beta_2m$ en orina.

Con el fin de conseguir una orina rica en  $\beta_2m$  que nos sirviera como material de partida en nuestra purificación, se realizaron muestreos entre distintas orinas de pacientes en los que está descrito un aumento de la excreción de  $\beta_2m$  urinaria, a saber:

distintos tipos de mieloma, síndrome nefrótico y postoperatorio de transplante renal.

La concentración de  $\beta_2m$  en estas orinas se determinó según se describe en 4.3.5.2 , usando distintas diluciones de las mismas . En todas ellas se observó un aumento sobre los valores normales de excreción de  $\beta_2m$ . El aumento era máximo en los casos de trasplante renal reciente. Debido a esto, elegimos la orina de uno de estos pacientes, como material de partida de nuestra purificación. Dicha orina presentaba una excreción urinaria de  $\beta_2m$  de 100 mg/l frente a una proteinuria de 350 mg/l.

#### 4.3.6.2.2. Cuantificación de $\beta_2m$ en L.C.R. de pacientes con enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias.

Estos métodos nos han permitido realizar unos estudios preliminares sobre un posible aumento de la concentración de  $\beta_2m$  en los L.C.R. de los pacientes con enfermedades neurológicas inflamatorias.

La concentración de  $\beta_2m$  en los distintos L.C.R. se determinó según se describe en 4.3.5.2, añadiendo en la etapa 2 , antes de incubar con el CoAH/ $\beta_2m$  , 2, 5, 10 y 20  $\mu$ l de cada L.C.R.

Aunque el número de casos estudiados aún no es lo suficientemente extenso como para elaborar unos datos concluyentes, apuntamos aquí los resultados obtenidos hasta ahora:

Concentración media de  $\beta_2m$  en L.C.R. de pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias:  $1,1 \pm 0,3$  mg/l.

Concentración media de  $\beta_2m$  en L.C.R. de pacientes con enfermedades neurológicas inflamatorias:  $2,8 \pm 0,7$  mg/l.

En el momento actual continuamos con estas determinaciones en nuestro laboratorio, con el fin de determinar si el aumento de  $\beta_{2m}$  que se detecta en estos L. C.R. puede constituir un marcador inespecífico para este tipo de enfermedades.

## 5. DISCUSION.

### 5.1. purificación de $\beta_2m$ .

Las primeras purificaciones de  $\beta_2m$  se realizaron a partir de la orina de pacientes con enfermedad de Wilson, envenenamiento con cadmio, síndrome oculo-cerebro-renal, acidosis tubular, cistinosis y mieloma múltiple (1).

Posteriormente se comprobó que pacientes con discrasias de células plasmáticas, frecuentemente presentaban excreción urinaria de  $\beta_2m$  muy elevada (112), lo cual permitió su purificación usando estas orinas como material de partida.

Debido a las importantes lesiones renales presentes en estos enfermos, su proteinuria es a menudo muy elevada, lo que implica un proceso de purificación muy laborioso. Por este motivo, hemos elegido para nuestra purificación la orina de pacientes que se encuentran en el postoperatorio de un transplante renal. Estos pacientes suelen presentar sólo moderada proteinuria, con alta excreción renal de  $\beta_2m$ , lo que simplifica considerablemente el proceso de purificación.

La realización de estudios estructurales y fisicoquímicos, comparando la  $\beta_2m$  de la orina con la plasmática, demostraron que ambas proteínas eran iguales, no apreciándose polimorfismo entre ellas (70).

Nosotros nos propusimos aislar  $\beta_2m$  con los siguientes fines:

1-Realizar inmunizaciones (apartado 4,2) para la obtención de un antisuero policlonal anti $\beta_2$ m altamente específico que nos sirva para poner apunto un enzimoimmunoensayo para detectar y cuantificar  $\beta_2$ m.

2-Realizar estudios de cuantificación de la misma.

La primera etapa del proceso consistió en una ultrafiltración de la orina sobre un diaflo XM50 para eliminar contaminaciones de alto peso molecular. El resultado es la filtración de prácticamente la totalidad de la  $\beta_2$ m acompañada de moléculas de pesos moleculares inferiores a 50.000daltons.

Con el fin de reducir el volumen del filtrado realizamos una nueva filtración sobre un diaflo UM2 eliminando las impurezas de peso molecular inferior a 1000 daltons, que pasan al filtrado. En el retenido se recoge la práctica totalidad de la  $\beta_2$ m.

Para obtener una  $\beta_2$ m de mayor pureza, realizamos una filtración sobre G-50, cuyo resultado (figura 4.1) muestra un pico de actividad  $\beta_2$ m precedido de un pico de impurezas.

El material activo, se aplica a una columna de DEAE-celulosa, eluyendola mediante un gradiente lineal de ClNa (figura 4.2) cuyo resultado muestra cuatro picos, siendo el mayoritario el que contiene la actividad  $\beta_2$ m. Esta fracción contiene 7.5 mg de  $\beta_2$ m. La purificación con respecto al material de partida es de 10 veces.

Para analizar la pureza de este material realizamos geles de SDS-PAGE (apartado 4.1.7). El resultado según se aprecia en la fotografía es una  $\beta_2m$  de una pureza superior al 95%.

Según observamos en la tabla de rendimientos (apartado 4.1.8), el rendimiento final de la purificación es de un 30%. Otros autores han descrito rendimientos inferiores (1,69), aunque esto depende de las impurezas y de la riqueza en  $\beta_2m$  del material de partida.

#### 5.2. Obtención de antisuero de conejo anti- $\beta_2m$ .

Hemos elegido el conejo como animal para inmunizar debido a que tanto él como la cabra y el caballo, son las mejores especies para la producción de anticuerpos precipitantes.

Empleamos para la inmunización una mezcla de  $\beta_2m$  con adyuvante completo de Freund (71), debido a que éste produce una liberación lenta del antígeno, lo que da lugar a una inmunización constante que implica una mayor producción de anticuerpos.

La vía de inmunización empleada fue la intradérmica, por ser la más idónea para la inyección del antígeno con adyuvante. Otras vías utilizadas para la inyección del antígeno en adyuvante completo de Freund (intradérmica, subcutánea y en almohadilla plantar), producen en el animal ulceraciones y abscesos.

Las pautas de inmunización varían de unos autores a otros, nosotros hemos obtenido una buena respuesta

con la pauta referida en el apartado 4,2.

Al proceder a la titulación de nuestro antisuero y compararlo con uno comercial, obtenemos que el producido por nosotros tiene un título diez veces superior al comercial (figura 4,4).

Para la purificación de la fracción G del antisuero, hemos utilizado una cromatografía de afinidad sobre DEAE-Affigel Azul, que permite la obtención de fracción G pura en un solo paso, lo cual simplifica en gran manera el proceso.

### 5.3. Enzimoinmunoensayos para la detección de $\beta_2$ m.

Como vimos en la introducción, los métodos mas empleados para la detección de  $\beta_2$ m hasta el momento, han sido el "Phadebas  $\beta_2$ -microtest" y el "Phadezym", comercializados por Pharmacia. Estos métodos tienen la ventaja de su gran sensibilidad y los inconvenientes de su alto precio y en el primero de los casos el disponer de la infraestructura necesaria para la utilización de isótopos.

También se ha usado el método de inmunodifusión radial puesto a punto por Berggard y Bearn, pero éste presenta el inconveniente de su poca sensibilidad, que hace que no sea fiable para cuantificar valores bajos de  $\beta_2$ m.

Los métodos que hemos desarrollado para cuantificar  $\beta_2$ m son enzimoinmunoensayos y presentan las siguientes ventajas:



~Sensibilidad comparable al "Phadebas  $\beta_2$  ~microtest (RIA),

~Posibilidad de analizar 96 muestras en una sola determinación.

~Rapidez.

~Costo relativamente bajo.

El esquema del primero de los enzimoimmunoensayos que hemos desarrollado, está representado en la figura 4.5. Consta de cinco etapas cuya puesta a punto discutimos a continuación.

ETAPA 1.-Unión del  $M_{HLA}$  a una placa de microelisa.

Las proteínas se unen a la superficie del plástico formando una monocapa (57), siendo la cantidad adsorbida dependiente del tipo de proteína y de la placa utilizada (72).

Nosotros hemos utilizado placas de Dynatech 129 A y B, Inotech microelisa, Nunc Immunoplate I y II y Limbro titertek. Los mejores resultados se han obtenido con la placa Dynatech 129 B, que fue la que mostró mayor capacidad de unión, además de dar un fondo menor en el ensayo.

Otro punto importante en esta etapa resulta ser el tampón en el que se realiza la adsorción a la placa de microelisa.

Los tampones mas utilizados para este fin son el de carbonato/bicarbonato 0.1 M pH 9.0 y el PBS pH7.2 (73). En nuestro caso, usando el tampón carbonato/bicarbonato, se ha obtenido una mayor eficacia de pegada, por

tanto, ha sido el que hemos elegido como tampón de adsorción en este ELISA.

Con respecto al tiempo de pegada a la placa del  $M_{HLA}$ , los resultados óptimos se obtienen para periodos de 18 horas a 4°C, sin embargo, con tiempos de incubación considerablemente menores, del orden de 2 horas a temperatura ambiente, se puede llegar a valores de alrededor del 80% del óptimo.

La figura 4.7 muestra la curva de saturación con respecto a la cantidad de  $M_{HLA}$ , indicando que para valores de 400 ng/pocillo, la placa queda saturada.

#### ETAPA 2.-Incubación con HLA.

Con el fin de que el material adsorbido deficientemente a la placa se separe de ella y de esta forma no interfiera en el ensayo compitiendo con el anticuerpo inmovilizado, las placas se lavan durante 30 minutos en PBS-Tween antes de añadir la muestra que contiene HLA al pocillo.

La adicción de detergente en los lavados y en las muestras que contienen HLA, tiene como fin la disminución de interacciones específicas de la proteína con la placa.

La figura 4.8 muestra la curva de saturación de HLA en esta etapa, observándose que para valores de 20 ng/pocillo la placa queda saturada.

### ETAPA 3.-Incubación con CoAH/ $\beta_2m$ ,

El principal problema que se presenta en esta etapa, es la aparición de fondos elevados que interfieren en la cuantificación de  $\beta_2m$  debido a interacciones inespecíficas del antisuero CoAH/ $\beta_2m$  utilizado.

Para obviar este problema, se realizan absorciones previas del antisuero con seroalbúmina bovina, suero de ratón, suero de ternera fetal, suero de caballo y combinaciones de ellos, como ya ha sido descrito en otros sistemas (72,73).

El resultado obtenido indica que con una absorción previa con suero de ratón (1:1, v/v) del CoAH/ $\beta_2m$  y posterior dilución del mismo en un 10% de suero de caballo en PBS-Tween, se disminuye el fondo del ensayo hasta valores que no interfieren con el mismo.

La absorción con suero de ratón, tiene como fin la reducción de la unión inespecífica con el  $M_{HLA}$  inmovilizado a la placa. El uso del suero de caballo estabiliza el anticuerpo diluido y disminuye las interacciones inespecíficas del CoAH/ $\beta_2m$  con la placa, obteniéndose fondos mas bajos.

La figura 4.10 muestra la curva obtenida al ensayar el CoAH/ $\beta_2m$  en distintas diluciones, desde 1:100 hasta 1:20.000, obteniéndose que el ensayo está saturado para este antisuero cuando éste se utiliza a diluciones de 1:2.000 y menores.

Estos valores se refieren al CoAH/ $\beta_2m$  obtenido según el apartado 4.2, puesto que cuando se utiliza

el CoAH/ $\beta_2m$  comercial no se llega nunca a saturación debido a su bajo título.

#### ETAPA 4.-Incubación con CaACO-PO.

En esta etapa tuvimos el mismo problema que en la anterior en cuanto a fondos del ensayo, por tanto realizamos las mismas absorciones que se han descrito en dicha etapa.

La figura 4.11 muestra la curva de calibrado para el CaACO-PO, en ella se puede observar que para diluciones de 1:2.000 e inferiores, el ensayo está saturado para este anticuerpo.

#### ETAPA 5.-Reacción con el sustrato.

A cada pocillo se añaden 100  $\mu$ l de solución de sustrato (3mM  $H_2O_2$ , 10 mM OPD) en 0,1 M citrato sódico pH 5.5. Después de un tiempo de desarrollo variable, la reacción se detiene por la adicción de 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 N.

La figura 4.12 muestra que el desarrollo del color es lineal durante 30 minutos, por lo que el tiempo de reacción lo hemos fijado en 15 minutos.

El color desarrollado se lee a 492 nm.

#### Detección de $\beta_2m$ .

En la etapa 3, la muestra que contiene  $\beta_2m$  libre, se añade justo antes de la adicción del CoAH/ $\beta_2m$ ,

compitiendo por tanto con la  $\beta_2^m$  presente en la molécula de HLA unida al monoclonal, por la unión al antisuero.

La presencia de  $\beta_2^m$  libre en la muestra, se traduce en una disminución de la intensidad del color desarrollado en el último paso del ensayo. Esta disminución es proporcional a la cantidad de  $\beta_2^m$  libre presente en la muestra, cuando esta cantidad está comprendida entre 2 y 30 ng, como se puede apreciar en la figura 4.13.

La cantidad de  $\beta_2^m$  presente en una muestra problema, puede ser valorada interpolando los valores de inhibición obtenidos con la misma, en una recta patrón obtenida con cantidades crecientes de  $\beta_2^m$ , desde 2 hasta 30 ng.

Este fue el primer ELISA puesto a punto en nuestro laboratorio para detectar  $\beta_2^m$ .

Posteriormente, debido a los inconvenientes derivados del uso del  $M_{HLA}$ , que al no ser producido en nuestro laboratorio, nos hacía depender de un mercado internacional para su obtención, intentamos simplificar el método, poniendo a punto un ELISA en el que se pegara HLA directamente a una placa de microelisa. El esquema de dicho método puede verse en la figura 4.6. A continuación discutiremos las distintas etapas del mismo.

#### ETAPA1.-Unión del HLA a una placa de microelisa.

En este ELISA, al igual que en el anterior, la placa que mejores resultados nos ofreció entre todas las que se probaron, fue la placa Dinotech 129 B, por lo que

continuamos usando dicha placa.

En cuanto al tampón utilizado para realizar la adsorción a la placa de microelisa, hubo que desechar el uso del tampón carbonato/bicarbonato pH 9,0, debido a que a ese pH se produce la disociación del HLA en sus subunidades. Para este ensayo, hemos encontrado que el tampón fosfato 50 mM pH 7,0 no interfiere en la estabilidad del HLA y presenta gran eficacia de pegada, por lo que ha sido el elegido como tampón de adsorción.

Con respecto al tiempo de pegada a la placa del HLA, los resultados óptimos se obtienen para tiempos de 18 horas a 4°C, sin embargo, al igual que ocurre en el ensayo anterior, con tiempos de incubación menores, del orden de 2 horas a temperatura ambiente, se puede llegar a valores de alrededor del 80% del óptimo.

La figura 4.7 muestra la curva de saturación con respecto a la cantidad de HLA, indicando que para valores de 20 ng de HLA por pocillo, la placa queda saturada.

Las etapas 2 , 3 y 4 de este ELISA son idénticas a las etapas 3 , 4 y 5 del ELISA descrito anteriormente, observándose que las diluciones a las que se saturan los antisueros son las mismas en ambos.

La detección de  $\beta_2m$  se realiza tal y como vimos en el ensayo anterior, añadiendo las muestras que contienen  $\beta_2m$  libre, justo antes de la adicción del CoA H/ $\beta_2m$ . La  $\beta_2m$  de las muestras compite con la  $\beta_2m$  unida al HLA, por la unión al anticuerpo.

La sensibilidad de este método para detectar  $\beta_2^m$  libre, está entre 2 y 30 ng por pocillo, como se puede observar en la figura 4.14.

Dado que ambos métodos presentan una sensibilidad semejante, es este último el que actualmente usamos en nuestro laboratorio, con lo que se simplifica el ensayo y se evita el uso del  $M_{HLA}$ .

Aplicaciones de estos enzimoensayos.

Estos enzimoensayos pueden utilizarse en el seguimiento de  $\beta_2^m$  en las distintas etapas de purificación de la misma.

También pueden ser útiles para la cuantificación de  $\beta_2^m$  en distintos fluidos biológicos tales como orina, suero y L.C.R. y para la medida de sus alteraciones en distintos estados patológicos.

En esta línea actualmente estamos intentando comprobar si una concentración de  $\beta_2^m$  aumentada en L.C.R. puede constituir un marcador de enfermedades neurológicas inflamatorias tal y como parece deducirse de los resultados hasta ahora obtenidos (apartado 4.3.6.2.2).

## 6. CONCLUSIONES.

1.- Se ha puesto a punto un método de purificación de  $\beta_2m$  a partir de la orina de un paciente en el postoperatorio de trasplante renal mediante ultrafiltración sobre un DIAFLO XM50 y un DIAFLO UM2, filtración sobre Sephadex G-50 y cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa.

El rendimiento obtenido ha sido del 30%.

2.- El material obtenido presenta una sola banda al realizar electroforesis sobre geles de poliacrilamida en presencia de SDS, de un peso molecular aproximado de 11,500 daltons.

3.- Con la  $\beta_2m$  obtenida, se ha procedido a la inmunización de conejos, obteniéndose un antisuero de alto título frente a  $\beta_2m$ .

4.- Del antisuero obtenido se purifica la fracción IgG mediante cromatografía sobre DEAE-Affigel Azul.

5.- Hemos puesto a punto dos ensayos de inmunoenzimas para la detección de  $\beta_2m$  en fluidos biológicos.

A.-El primero de estos ensayos consta de las siguientes etapas:

1-Unión a la placa de microelisa de un  $M_{HLA}$  (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce un determinante antigénico presente en la cadena pesada de los antígenos de histocompatibilidad HLA A, B y C).

2-Incubación con una cantidad constante de HLA.



- 3-Adición de la muestra a ensayar, que puede contener  $\beta_2m$ , seguida de incubación con CoAH/ $\beta_2m$  (antisuero policlonal de conejo anti $\beta_2m$  humana, obtenido en nuestro laboratorio).
- 4-Incubación con CaACo-PO (anticuerpo policlonal de cabra de la clase IgG, marcado con peroxidasa, con especificidad anti-IgG de conejo).
- 5-Incubación con la solución de sustrato (3mM  $H_2O_2$  mas 10mM OPD como cromógeno).

El desarrollo de la reacción se corta con 1N  $SO_4H_2$  y se lee la absorbancia a 492 nm.

Realizadas las curvas de calibrado de todos los antisueros, se obtiene una curva de calibrado para la  $\beta_2m$  comprendida entre valores de 2 y 30 ng por pocillo.

B.-El segundo enzimoimmunoensayo puesto a punto, consta de las siguientes etapas:

- 1-Unión a la placa de microelisa de una cantidad constante de HLA.
- 2-Adición de la muestra a ensayar, que puede contener  $\beta_2m$ , seguida de incubación con CoAH/ $\beta_2m$  (antisuero policlonal de conejo anti  $\beta_2m$  humana, obtenido en nuestro laboratorio).
- 3-Incubación con CaACo-PO (anticuerpo policlonal de cabra de la clase IgG, marcado con peroxidasa, con especificidad anti IgG de conejo).
- 4-Incubación con la solución de sustrato (3mM  $H_2O_2$  mas 10mM OPD como cromógeno).

El desarrollo de la reacción se corta con 1N  $\text{SO}_4\text{H}_2$  y se lee la absorbancia a 492 nm.

Realizadas las curvas de calibrado de todos los antisueros, se obtiene una curva de calibrado para la  $\beta_2\text{m}$ , comprendida entre valores de 2 y 30ng por pocillo.

- 6.- Estos enzimoimmunoensayos pueden ser aplicados en la detección y cuantificación de  $\beta_2\text{m}$  en distintos fluidos biológicos. Frente a los métodos comerciales, presentan como ventajas una mayor rapidez y un costo mucho menor.

BIBLIOGRAFIA,

- 1.-Berggard I. & Bearn A.G.; Isolation and properties of a low mol. wt.  $\beta_2$ -globulin occurring in human biological fluids. J. biol. Chem. 243,4095-4103, 1968.
- 2.-Nilsson K., Evrin P. E., Berggard I. & Ponten J.; Involvement of lymphoid and non-lymphoid cells in the production of  $\beta_2$ -microglobulin - a homologue of the constant domains of IgG. Nature, New Biol. 244,44-45, 1973.
- 3.-Nilsson K., Evrin P. E. & Welsh K.; Production of  $\beta_2$ -microglobulin by normal and malignant cell lines and peripheral lymphocytes. Transplantation Rev. 21,53-84, 1974.
- 4.-Peterson P.A., Sege K. & Anundi H.;  $\beta_2$ -microglobulin on the cell surface. Acta Clin. Belgica 31, Sup. 8, 5-13, 1976.
- 5.-Poulik M.D.; Presence of  $\beta_2$ -microglobulin on B- and T-cells and lymphocytotoxicity of anti- $\beta_2$ -microglobulin sera. Immun. Commun. 2, 403-414, 1973.
- 6.-Evrin P.E., Peterson P.A., Wide L. & Berggard I.; Radioimmunoassay of  $\beta_2$ -microglobulin in human biological fluids Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28, 439-447, 1971.
- 7.-Peterson P.A., Cunningham B.A., Berggard I. & Edelman G. M.;  $\beta_2$ -microglobulin - a free immunoglobulin domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1697-1701, 1972.
- 8.-Smithies O. & Poulik M.D.; Initiation of protein synthesis at an unusual position in an immunoglobulin gene?. Science 175, 187-189, 1972.
- 9.-Nakamuro K., Tanigaki N. & Pressman D.; Multiple common properties of human  $\beta_2$ -microglobulin and the common por-

- tion fragment derived from HLA antigen molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2863-2865, 1973.
- 10.-Cresswell P., Springer T., Strominger J.L., Turner M.J. Grey H.M. & Kubo R.T.: Immunological identity of the small subunit of HL-A antigens and  $\beta_2$ -microglobulin and its turnover on the cell membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2123-2127, 1974.
- 11.-Peterson P.A.; Rask L. & Lindblom J.B.: Highly purified-papain-solubilized HL-A antigens contain  $\beta_2$ -microglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 35-39, 1974.
- 12.-Tanigaki N., Nakamuro K., Apella E., Poulik M.D. & Pressman D.: Identity of the HL-A common portion fragment and  $\beta_2$ -microglobulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1234-1239, 1973.
- 13.-Bernier G.M., Cohen R.J. & Conrad M.E.: Microglobulinuria in renal failure. Nature, Lond. 218, 598-599, 1969.
- 14.-Peterson P.A., Evrin P.E. & Berggard I.: Differentiation of glomerular, tubular and normal proteinuria: Determination of urinary excretion of  $\beta_2$ -microglobulin, albumin and total protein. J. clin. Invest. 48, 1189-1198, 1969.
- 15.-Evrin P.E. & Wibell L.: Serum  $\beta_2$ -microglobulin in various disorders. Clin. chim. Acta 43, 183-186, 1973.
- 16.-Karlsson F.A., Wibell L. & Evrin P.E.:  $\beta_2$ -microglobulin in clinical medicine. Scan. J. clin. Invest. 40, Suppl. 154, 27-37, 1980.
- 17.-Smithies O. & Poulik M.D.: Dog homologue of human  $\beta_2$ -microglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2914-2917, 1972.

- 18.-Berggard I.; Isolation and characteristics of a rabbit  $\beta_2$ -microglobulin; Comparison with human  $\beta_2$ -microglobulin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 57, 1159-1165, 1974.
- 19.-Natori T., Tanigaki N., Appella E. & Pressman D.: Amino acid composition and physicochemical properties of mouse  $\beta_2$ -microglobulin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 65, 611-617, 1975.
- 20.-Cigén R., Ziffer J.A., Berggard B., Cunningham B.A. & Berggard I.: Guinea pig  $\beta_2$ -microglobulin. Purification, properties and partial structure. *Biochemistry* 17, 947-955, 1978.
- 21.-Groves M.L. & Greenberg R.: Bovine homologue of  $\beta_2$ -microglobulin isolated from milk. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 77, 320-327, 1977.
- 22.-Winkler M.A. & Sanders B.G.: Chemical and immunologic characterization of a  $\beta_2$ -microglobulin-like protein isolated from chicken sera. *Immunochemistry* 14, 615-619, 1977.
- 23.-Logdberg L., Ostergren P.O. & Berggard I.: Rat  $\beta_2$ -microglobulin. Isolation, properties and relation to  $\beta_2$ -microglobulins from other species. *Mol. Immunology* 16, 577-587, 1979.
- 24.-Ostberg L., Rask L., Wigzell H. & Peterson P.A.: Thymus leukemia antigen contains  $\beta_2$ -microglobulin. *Nature, Lond.* 253, 735-737, 1975.
- 25.-Michaelson J., Flaherty L., Vitteta E. & Poulik M.D.: Molecular similarities between the Qa-2 alloantigen and other gene products of the 17th chromosome of the

- mouse, *J. exp. Med.* 145, 1066-1070, 1977.
- 26.-Fellous M., Gunther E., Kemler R., Wiels J., Berger R., Guenet J.L., Jacob H. & Jacob F.: Association of the H-Y male antigen with  $\beta_2$ -microglobulin on human lymphoid and differentiated mouse teratocarcinoma cell lines. *J. exp. Med.* 148, 58-70, 1978.
- 27.-Evrin P.E., Pertoft H.:  $\beta_2$ -microglobulin in human cells. *J. Immunol.* 111, 1147-1154, 1973.
- 28.-Grey H.M., Kubo R.T., Colon S.M. et al.: The small subunit of HL-A antigens is  $\beta_2$ -microglobulin. *J. exp. Med.* 138, 1608-1612, 1973.
- 29.-Evrin P.E., Peterson P.A., Wide L. et al.: Radioimmunoassay of  $\beta_2$ -microglobulin in human biological fluids. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 28, 439-443, 1971.
- 30.-Goodfellow P.N., Jones E.A., Van Heiningen V., Solomon E., Bobrow M., Miggiano V. & Bodmer W.F.: The  $\beta_2$ -microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 254, 267-269, 1975.
- 31.-Berggard B., Bjorck L., Cigén R. & Logdberg L.:  $\beta_2$ -microglobulin. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 40, Suppl. 154, 13-25, 1980.
- 32.-Cunningham B.A., Wang J.L., Berggard I. & Peterson P.A.: The complete amino acid sequence of  $\beta_2$ -microglobulin. *Biochemistry* 12, 4811-4822, 1973.
- 33.-Gates F.T., Coligan J.E. & Kindt T.J.: Complete amino acid sequence of rabbit  $\beta_2$ -microglobulin. *Biochemistry* 18, 2267-2272, 1979.
- 34.-Wlofe P.B. & Cebra J.J.: The primary structure of Guinea pig  $\beta_2$ -microglobulin. *Mol. Immunology* 17, 1493-1505,

1980.

35.-Francke U. & Pellegrino M.A.; Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1147-1151, 1977.

36.-Longo D.L. & Paul W.E.; Immune response genes and Ia antigens. The relationship between them, and their role in lymphocyte interactions. Receptors and recognition volumen 14, series B "Histocompatibility antigens, structure and function". Ed por P. Parham & J.L. Strominger. London and New York, Chapman and Hall, 159-185, 1982.

37.-Lopez de Castro J.A., Strominger J.L., Strong D.M. & Orr H.T.; Structure of crossreactive human histocompatibility antigen HLA-A28 and HLA-A2; Possible implications for generation of HLA polymorphism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3813-3817, 1982.

38.-Lopez de Castro J.A., Orr H.T., Kostik T., Mann D.L. & Strominger J.L.; Complete amino acid sequence of a pain solubilized human histocompatibility antigen, HLA-A7. Isolation and amino acid composition of fragments and of triptic and chimotriptic peptides. Biochemistry 18, 5704-5711, 1979.

39.-Parker K.C. & Strominger J.L.; Localization of the sites of iodination of human  $\beta_2$ -microglobulin; Quaternary structure implications for histocompatibility antigens. Biochemistry 22, 1145-1153, 1983.

- 40.-Parham P. & Brodsky F.M.: Partial purification and some properties of BB7.2A, cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28 Human Immunol. 3, 277-299, 1981.
- 41.-Arce-Gomez B., Jones E.A., Barnstable C.J., Solomon E. & Bodmer W.F.: The genetic control of HLA antigens in somatic cell hybrids: Requirement for  $\beta_2$ -microglobulin. Tissue Antigens 11, 96-112, 1978.
- 42.-Anderson C.L., Kubo R.T. & Grey H.M.: Studies on the cytophilic properties of human  $\beta_2$  microglobulin. J. Immunol. 114, 997-1000, 1975.
- 43.-Heron I., Hokland M. & Berg K.: Enhanced expression of  $\beta_2$ -microglobulin and HLA antigens on human lymphoid cells by interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 6215-6219, 1978.
- 44.-Hester R.B., Kubo R.T. & Grey H.M.: Studies on the cytophilic properties of  $\beta_2$ -microglobulin. Scand. J. Immunol. 9, 125-134, 1979.
- 45.-Birch E., Fanger M.W. & Bernier G.M.:  $\beta_2$ -microglobulin enhances human lymphocyte surface receptor expression for IgG<sup>1</sup>. J. Immunol. 122, 997-1001, 1979.
- 46.-Gatta A., Amodio P., Frigo A., Merkel C., Milani L., Zuin R. & Ruol A.: Evaluation of renal tubular damage in liver cirrhosis by urinary enzymes and beta-2-microglobulin excretions. Eur. J. Clin. Invest. 11, 239-243, 1981.
- 47.-Backman U.: Tubular defects in patients forming calcium-containing stones. Eur. Urol. 4, 50-56, 1978.



- 48.-Jones B.R., Bhalla R.B., Mladek J., Kaley R.N., Gralla R.J., Alcock N.W. & Reidenberg M.M.; Comparison of methods of evaluating nephrotoxicity of cis-platinum. Clin. Pharmacol. Ther. 27, 557-562, 1980.
- 49.-Kjellstrom t., Shiroishi K. & Evrin P.E.: Urinary  $\beta_2$ -microglobulin excretion among people exposed to cadmium in the general environment. Environmental research 13, 318-344, 1977.
- 50.-Hallgren R., Alm P.O. & Helsing K.: Renal function in patients on lithium treatment. Brit. J. Psychiat. 135; 22-27, 1979.
- 51.-Ballesta A.M., Elena M., Cabrera J., Arroyo, Mendez X. & Company X.: Beta-2-microglobulina urinaria como indicador de nefrotoxicidad por gentamicina. XXVI Congreso Nacional de la Sociedad de Biopatología Clínica. Oviedo.
- 52.-Vincent C., Revillard J.P., Pellet H. & Traeger J.:  $\beta_2$ -microglobulin in monitoring renal transplant function. Transplantn. Proc. 11, 438-442, 1979.
- 53.-Poulik M.D., Gold P. & Shuster J.:  $\beta_2$ -microglobulin: methods and clinical applications. CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 225-245, 1979.
- 54.-Avrameas S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of conjugate for detection of antigens and antibodies. Immunochem. 6, 43-52, 1969.
- 55.-Engvall E. & Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem. 8, 871-874, 1971.

- 56.-Engvall E., Jonsson K. & Perlmann P.; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), II. Quantitation of protein antigen Immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochem. Biophys. Acta* 251:427-434, 1971.
- 57.-Kenny G.E. & Dunsmoor C.L.: Principles, problems and strategies in the use of antigenic mixtures for enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 17:655-665; 1983.
- 58.-Van Weemen B.K. & Schuurs A.H.W.M.: Immunoassay using antigen-enzyme conjugate. *FEBS Letters*, 15, 232-236, 1971.
- 59.-Nakane P.K. & Kawaoi A.: Peroxidase-labelled antibody, a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084-1091, 1974.
- 60.-Avrameas S. & Ternynck T.: Peroxidase-labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochem.* 8, 1175-1179, 1971.
- 61.-Nakane P.; Preparation and standardization of enzyme labelled conjugates. *Immunoassays in the clinical laboratory*, ed. por Nakamura R.M., Dito W.R. & Tucker S.E. New York, 81-87, 1979.
- 61.-Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H. & Ishikawa E.: Enzyme-linked immunoassay. -I. Novel method for synthesis of insulin beta-D-galactosidase conjugate and its applicability for insulin assay. *J. Biochem.* 78, 235-237, 1975.
- 62.-Peterson E.A. & Sober H.A.: Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbants. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 751-755, 1956.

63. Porath J.: Some recently developed fractionation procedures and their application to peptide and protein hormones. Pure and appl. Chem, 6, 233-244, 1963.
64. Giddings J.C. & Mallik K.L.: Theory of gel filtration (permeation) chromatography. Anal. Chem. 38, 997-1000, 1966.
65. Weber K. & Osborn M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4411, 1969.
66. Laemli V.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227, 680-685, 1970.
67. Shapiro A. & Maizel J.V. Jr.: Molecular weight estimation of polypeptides by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: Further data concerning resolving power and general considerations. Anal. Biochem. 29, 505-508, 1969.
68. Reinhold J.G.: Total protein albumin and globulin. In Standard methods of clinical chemistry, ed. por Seligron D. New York Academic Press. Vol I, 88-120, 1953.
69. Seon B.K., Gailani S., Henderson E.S. & Pressman D.: Isolation and characterization of 7S IgG, a  $\gamma$ -fragment,  $\beta_2$ -microglobulin and Bence Jones protein in urien of a patient with plasma cell leukemia. Immunochemistry 14, 703-709, 1977.
70. Berggard I.:  $\beta_2$ -microglobulin: Isolation, properties and distribution. Federation Proc. 35: 1167-1170, 1976.
71. Freund J.: Some aspects of active immunization. Ann. Rev. Microbiol. 1, 291-300, 1947.
72. Cantarero L.A., Butler J.E. & Osborne J.W.: The

adsorptive characteristics of protein for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal. Biochem.* 105, 375-382, 1980.

73. Cuevas M., Moneo I., Ureña V., Domínguez J. & Bootello A.: Reverse enzyme immunoassay for the determination of *Lolium perenne* IgE antibodies. *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.* 72, 184-187, 1983.